

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

FERNANDO RIBEIRO FERREIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROXIAPATITA:
EM PRESENÇA DE GELATINA E ASSOCIADA A SULFATO DE GENTAMICINA

PONTA GROSSA
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FERNANDO RIBEIRO FERREIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROXIAPATITA:
EM PRESENÇA DE GELATINA E ASSOCIADA A SULFATO DE GENTAMICINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Química Aplicada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane P. F. Borges
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra R. M. Antunes

PONTA GROSSA
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

F383s Ferreira, Fernando Ribeiro
 Síntese, caracterização e aplicação biológica da
 hidroxiapatita : em presença de gelatina e associada a sulfato
 de gentamicina. / Fernando Ribeiro Ferreira. Ponta Grossa,
 2009.
 117f.
 Dissertação (Mestrado em Química Aplicada),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientadora: Prof. Dra. Christiane P. F. Borges
 Co-orientadora : Profa. Dra. Sandra R. M. Antunes

 1. Hidroxiapatita. 2. Gelatina. 3. Antibiótico.
 4. Sulfato de gentamicina I. Borges, Christiane P. F.
 II. Antunes, Sandra R. M. III. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

FERNANDO RIBEIRO FERREIRA

"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA DA HIDROXIAPATITA: EM PRESENÇA DE GELATINA E ASSOCIADA A SULFATO DE GENTAMICINA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora:

Christiane P. F. Borges
Prof^ª. Dr^ª. Christiane Philippini Ferreira Borges
Departamento de Química, UEPG/PR

Mariza Boscacci Marques
Prof^ª. Dr^ª. Mariza Boscacci Marques
Departamento de Química, UEPG/PR
Departamento de Química, UEPG/PR

Silvia Maria Leite Agostinho
Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Maria Leite Agostinho
Departamento de Química Fundamental, USP/SP

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Raul e Oralina, por todo o apoio depositado, à minha esposa Luciane, pelo amor incondicional e ao meu filho Lucas, minha paixão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por trilhar meu caminho ao lado de pessoas tão especiais.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Christiane P. F. Borges por sua contribuição e compreensão dedicada ao longo deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada e a UEPG pela oportunidade de realização deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada pela disposição em nos oferecer seu conhecimento, incentivo e trabalho, em especial à minha co-orientadora Prof. Dr^a. Sandra Regina M. Antunes, ao Prof. Dr. Fábio André do Santos por sua valiosa ajuda e aos professores Prof. Dr. Augusto Celso Antunes, Prof. Dr. André Victor Chaves de Andrade, Prof^a. Dr^a. Jacqueline Aparecida Marques e ao Prof. Dr. José Caetano Zurita da Silva (*in memoriam*) pelo exemplo de dedicação e profissionalismo, idealizador deste Programa de Pós-Graduação.

Aos colegas Fernando Perotta de Oliveira, amigo e professor, Liliam Cristina Angelo, Marilei Mendes, Rodrigo Sayka e à Fabiane Santos pelos momentos de descontração e companheirismo, mas, especialmente, por toda a ajuda recebida.

A todos os funcionários pelo suporte e pela atenção dispensada e em especial aos técnicos Valdeci e Sandra do DEQUIM/UEPG.

Ao Laboratório da UFPR onde foi realizada análise de MET.

À Universidade Jaume I, Castellon de La Plana pela colaboração com as análises BET.

À CAPES/PROAP pelo suporte financeiro e a todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram com o desenvolvimento desta pesquisa.

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

Fernando Pessoa

RESUMO

A utilização de biomateriais remonta à antiguidade e recentemente as biocerâmicas têm sido fortemente investigadas como material para implantes ósseos. Dentre os diferentes biomateriais a hidroxiapatita (HA) possui grande importância por ser um dos compostos que forma a fase mineral óssea. Assim, a HA tem sido amplamente estudada, especialmente pelo fato de ser um composto bioativo. A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação apresenta vantagens como baixo custo e simplicidade, mas a maioria dos procedimentos descritos na literatura apresenta formação de produtos não estequiométricos e mistura de fases. Neste trabalho foi estudada a síntese de HA analisando a influência da concentração de gelatina no meio de precipitação nas características da hidroxiapatita obtida. Também foi realizada a incorporação de gentamicina às amostras de HA obtidas e a análise do efeito antimicrobiano. A hidroxiapatita foi obtida através de precipitação em meio aquoso e gelatinoso, sendo posteriormente secada, peneirada e calcinada a 700°C. Foram utilizadas as concentrações de gelatina de 1, 6, 10 e 60 g.L⁻¹. Em seguida, foi efetuada a adição de sulfato de gentamicina na proporção de 1% em massa. As amostras foram caracterizadas por difração de raios X, distribuição do tamanho de partícula, área superficial específica pelo método BET, análise térmica, espectroscopia no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A análise de DRX revelou a presença da fase de HA em todas as amostras e através do refinamento pelo método de Rietveld, verificou-se, para amostra obtida sem adição de gelatina, a presença de carbonato de cálcio, e HA pura para amostra preparada em meio gelatinoso, indicando que a presença de gelatina estabilizou a fase hidroxiapatita. As análises FRX e EDS indicaram que a razão Ca/P ficou ligeiramente acima da esperada para obtenção de hidroxiapatita estequiométrica. A análise de distribuição granulométrica e área superficial pelo método BET indicaram diferenças no tamanho médio de aglomerados e na área superficial do material relativas à síntese e ao processo de preparação das amostras para receber o antibiótico, o qual se processou com moagem em moinho de bolas. As análises de MEV e MET revelaram aspectos morfológicos e estruturais característicos da hidroxiapatita, observando-se formação de aglomerados de cristais nanométricos. A avaliação da atividade microbiológica das amostras frente à saliva humana mostrou que a HA possui efeito inibidor no crescimento microbiano, tem sido observada redução na contagem de UFC. Para as amostras com a adição do antibiótico obteve-se contagem UFC igual a zero comprovando que o processo utilizado para incorporação da gentamicina na HA manteve a propriedade antibiótica do material, e que o mesmo foi liberado durante os testes.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, gelatina, antibiótico, sulfato de gentamicina.

ABSTRACT

The use of biomaterials comes from old times and recently bioceramics have been deeply investigated as a source of material for bone implant. Amongst the different biomaterials, hydroxyapatite (HA) has great importance for being one of the compounds which forms the bone mineral phase. Therefore, HA has been largely studied, mainly due to the fact that it is a bioactive compound. Calcium phosphate synthesis via precipitation presents great advantages such as low cost and simplicity, but most procedures described in literature regard the formation of non stoichiometric products and phase mixture. This work studied the HA synthesis by analyzing the influence of gelatin concentration in the precipitation means on the characteristics of the hydroxyapatite obtained. Gentamicin was also incorporated to the HA samples and antimicrobial activity was analyzed. The hydroxyapatite was obtained through precipitation in aqueous and gelatin means, being later on dried, sieved and calcined at 700°C. Gelatin concentrations of 1, 6, 10 and 60 g.L⁻¹ were used. Then, gentamicin sulfate was added, 1% in mass. Samples were characterized through X-ray diffraction, specific superficial area through the BET method, thermal analysis, infrared spectroscopy and transmission and scanning electronic microscopy. The X-ray diffraction revealed the presence of HA phase in all samples; and by refining through the Rietveld method, it could be seen, in the gelatin free sample, the presence of calcium carbonate and pure HA, for the sample prepared in gelatin, indicating that the presence of gelatin made the hydroxyapatite phase stable. XRF and EDS indicated that Ca/P ratio was slightly above what had been expected to obtain stoichiometric hydroxyapatite. The granulometric distribution analysis and superficial area through the BET method indicated differences in the average size of agglomerates and the superficial area of the material in relation to the synthesis and samples preparation process to receive the antibiotic, which was processed through milling in a ball mill. SEM and TEM revealed morphological and structural aspects characteristic of the hydroxyapatite with the formation of nanometric crystal agglomerates. Samples microbial activity evaluation with human saliva showed that pure HA has the effect of inhibiting microbial growth; CFU counting was observed to reduce. For the samples with antibiotic there was a CFU equal zero proving that the process used for gentamicin incorporation to the HA kept the antibiotic property of the material, and that the same was released during the tests.

Key words: Hydroxyapatite, gelatin, antibiotic, gentamicin sulfate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo do esqueleto humano	17
Figura 2 -	Corte do osso. Representação dos canais de Havers	19
Figura 3 -	Arranjo atômico da hidroxiapatita	29
Figura 4 -	Fórmula estrutural da gentamicina	35
Figura 5 -	Representação estrutural das bactérias Gram-positivas e Gram-Negativas	36
Figura 6 -	Espectro infravermelho comparativo entre amostras de gelatina comercial, hidroxiapatita comercial e HA preparada em meio gelatinoso	40
Figura 7 -	Fluxograma do esquema de obtenção das placas utilizadas para contagem do teste qualitativo.....	62
Figura 8 -	Fluxograma do preparo das amostras de HA para o teste microbiológico quantitativo	63
Figura 9 -	Difratogramas de raios X das amostras de HA obtidas por precipitação em meio aquoso (a) e gelatinoso (b) HA1; (c) HA6; (d) HA10 e (e) HA60 após calcinação a 700°C com passo de varredura 2°/min entre 5 e 90°	65
Figura 10 -	Identificação dos planos através dos índices de Miller “hkl” nos difratogramas das amostras de HA obtidas por precipitação em meio aquoso (a) HAGNT e gelatinoso (b) HA1GNT; (c) HA6GNT; (d) HA10GNT e (e) HA60GNT após calcinação a 700°C com passo de varredura 2°/min entre 5 e 90°	66
Figura 11 -	Difratograma com refinamento por Rietveld da amostra HAGNT.....	68
Figura 12 -	Difratograma com refinamento por Rietveld da amostra HA10	68
Figura 13 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA e HAGNT	75
Figura 14 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA1 e HA1GNT	75
Figura 15 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA6 e HA6GNT	76
Figura 16 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA10 e HA10GNT	76
Figura 17 -	Histogramas das análises granulométricas das amostras HA60 e HA60GNT	76
Figura 18 -	Micrografias das amostras HA (A) e HAGNT (B) com aumento de 200x e HA (C) e HAGNT (D) com aumento de 700x	78
Figura 19 -	Micrografias das amostras HA1 (A) e HA1GNT (B) com aumento de 200x e HA1 (C) e HA1GNT (D) com aumento de 700x	79
Figura 20 -	Micrografias das amostras HA6 (A) e HA6PGNT (B) com aumento de 200x e HA6 (C) e HA6GNT (D) com aumento de 700x	79
Figura 21 -	Micrografias das amostras HA10 (A) e HA10GNT (B) com aumento de 200x e HA10 (C) e HA10GNT (D) com aumento de 700x	80
Figura 22 -	Micrografias das amostras HA60 (A) e HA60GNT (B) com aumento de 200x e HA60 (C) e HA60GNT (D) com aumento de 700x	80

Figura 23 -	Micrografias de transmissão das amostras HA (A) e HAGNT (B) com aumento de 120'000x e HA P(C) e HAGNT (D) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV	82
Figura 24 -	Micrografias de transmissão das amostras HA6 (A) e HA6GNT (B) com aumento de 120'000x e HA6 (C) e HA6GNT (D) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV	83
Figura 25 -	Micrografias de transmissão das amostras HA10 (A) com aumento de 120'000x e (B) com aumento de 250'000x (região destacada) a 80kV	84
Figura 26 -	Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita sem calcinação (a) HA, (b) HA1, (c) HA6P, (d) HA10 e (e) HA60 obtidas em pastilha de KBr.....	85
Figura 27 -	Espectro IVTF das amostras (a) gelatina pura, (b) HA + gelatina e (c) HA obtidas em pastilha de KBr	87
Figura 28 -	Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita após calcinação a 700°C (a) HA, (b) HA1, (c) HA6, (d) HA10 e (e) HA60 obtidas em pastilha de KBr	88
Figura 29 -	Espectro IVTF das amostras (a) sulfato de gentamicina puro, (b) HA + sulfato de gentamicina puro e (c) HA obtidas em pastilha de KBr	89
Figura 30 -	Espectro IVTF das amostras de hidroxiapatita com adição de 1% em massa do antibiótico (a) HAGNT, (b) HA1GNT, (c) HA6GNT, (d) HA10GNT e (e) HA60GNT obtidas em pastilha de KBr	92
Figura 31 -	Curva TG para amostra HA com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N ₂	93
Figura 32 -	Curva TG para amostra HA1 com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N ₂	94
Figura 33 -	Curva TG para amostra HA10 com taxa de aquecimento de 5°C/min em atmosfera de N ₂	94
Figura 34 -	Unidades formadoras de colônia (UFC/ml) dos diferentes microrganismos contidos na saliva, (a) controle BHI puro mais 10 µL de saliva e (b) controle BHI puro mais 100 µL de saliva	95
Figura 35 -	Avaliação da atividade antimicrobiana da amostra de HA com variação da quantidade de material semeado igual a 10, 20 50 e 100 µL, respectivamente nas placas A, B, C, e D incubadas em caldo BHI contendo 0,1 mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar	96
Figura 36 -	Avaliação da atividade antimicrobiana através da contagem das unidades formadoras de colônia das amostras de controle com suas respectivas contagem em UFC de saliva. Os pontos vermelhos representam as colônias contadas em UFC	96
Figura 37 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA com adição de gentamicina (HAGNT.A e HAGNT.B) e sem gentamicina (HA.A e HA.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	97
Figura 38 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA1 com adição de gentamicina (HA1GNT.A e HA1GNT.B) e sem	

	gentamicina (HA1.A e HA1.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina.....	98
Figura 39 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA6 com adição de gentamicina (HA6GNT.A e HA6GNT.B) e sem gentamicina (HA6.A e HA6.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	98
Figura 40 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA10 com adição de gentamicina (HA10GNT.A e HA10GNT.B) e sem gentamicina (HA10.A e HA10.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	99
Figura 41 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de hidroxiapatita HA60 com adição de gentamicina (HA60GNT.A e HA60GNT.B) e sem gentamicina (HA60.A e HA60.B), incubadas em caldo BHI com 0,1mL de saliva humana por 24 horas e semeadas em placas de ágar. A e B mostram o crescimento bacteriano (UFC/mL) sem gentamicina. C e D mostram a ausência de crescimento bacteriano nas placas semeadas com HA com gentamicina	99
Figura 42 -	Amostras de controle após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	100
Figura 43 -	Amostras HA sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	101
Figura 44 -	Amostras HA1 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	101
Figura 45 -	Amostras HA6 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	101
Figura 46 -	Amostras HA10 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	102
Figura 47 -	Amostras HA60 sem adição de gentamicina após 48 horas de incubação ambas expressas em UFC/mL	102
Figura 48 -	Média e erro padrão dos valores transformados em Log(x) de UFC/mL de bactérias totais de saliva expostas à quantidades diferentes de HÁ. *p<0,05 com HA6, **p<0,01 com Controle e ***p<0,001 com HA60 (ANOVA com pós-teste de Bonferroni)	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores para os indicadores de qualidade do refinamento Rietveld para as amostras HAGNT e HA10.....	69
Tabela 2 -	Valores de análise quantitativa de fases as amostras HAGNT e HA10.....	69
Tabela 3 -	Valores da razão Ca/P obtidos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da amostras sem adição de gentamicina e com adição de gentamicina.....	70
Tabela 4 -	Tipos diferentes de fosfato de cálcio obtidos por diferentes razões Ca/P.....	71
Tabela 5 -	Valores de espectrometria de fluorescência de raios X (FRX) das amostras HA (amostra sem adição de gentamicina), HA10GNT e HA60GNT (amostras com adição de gentamicina)	71
Tabela 6 -	Resumo da distribuição granulométrica das amostras de HA sintetizadas.....	74
Tabela 7 -	Valores de área superficial específica de HA variando a concentração de gelatina durante o preparo das amostras.....	77
Tabela 8 -	Bandas de IV observadas nos espectros das amostras de HA, gelatina e gentamicina.....	90
Tabela 9 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA sem adição e com a adição de gentamicina, incubadas em caldo BHI com 0,1 mL de saliva humana e semeadas em placas de ágar. Contagens após 24 e 48 horas.....	103
Tabela 10 -	Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de HA sem adição de gentamicina, incubadas em caldo BHI com 0,1 mL de saliva humana e semeadas em placas de ágar. Contagens após 24 e 48 horas para coleta de dados para tratamento estatístico.....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2	- Posição do pico de Bragg
Å	- Unidade de Angstrom
ASTM	- American Society for Testing and Materials
BET	- Método utilizado na obtenção da área superficial específica
BHI	- Brain Heart Infusion
Ca/P	- Razão molar entre cálcio e fósforo
DRX	- Difração de raios X
DSC	- Calorimetria de varredura diferencial
EDS	- Espectroscopia por energia dispersiva
FRX	- Fluorescência de raios X
IV	- Infravermelho
IVTF	- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
JCPDS	- Joint Committee on Powder Diffraction Standards
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
HA	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio aquoso.
HA1	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 1 g.L ⁻¹
HA6	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 6 g.L ⁻¹
HA10	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 10 g.L ⁻¹
HA60	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 60 g.L ⁻¹
HAGNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio aquoso com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA1GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 1 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA6GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 6 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA10GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 10 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
HA60GNT	- Hidroxiapatita sintetizada por precipitação em meio gelatinoso em concentração de gelatina igual a 10 g.L ⁻¹ com 1% de sulfato de gentamicina em quantidade de massa.
R _{wp}	- Índice ponderado da qualidade do refinamento em função dos pontos do perfil
SBF	- Simulated Body Fluid
TCP	- Fosfato tricálcico
TG	- Análise termogravimétrica
UFC	- Unidade formadora de colônia
á-TCP	- Polimorfo de fosfato tricálcico
â-TCP	- Polimorfo de fosfato tricálcico
v	- Banda de estiramento
δ	- Banda de deformação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1.1	Tecido Ósseo	17
1.1.2	Biomateriais	21
1.1.2.1	Classificação dos Biomateriais	22
1.1.2.2	Aplicação dos Biomateriais	23
1.1.2.3	Biocompatibilidade	25
1.1.2.4	Hidroxiapatita (HA)	27
1.1.3	Antibióticos	33
1.1.3.1	Gentamicina	34
1.1.3.2	Farmacocinética da Gentamicina	37
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	39
3.1	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	39
3.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	41
3.2.1	Método de Rietveld	42
3.3	AVALIAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA PELO MÉTODO BET.....	44
3.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E DE TRANSMISSÃO (MET)	47
3.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura com Microanálise (EDS)	49
3.5	ANÁLISE TÉRMICA	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO AQUOSO.....	53
4.2	SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO GELATINOSO	55

4.3	IMPREGNAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HIDROXIAPATITA COM SULFATO DE GENTAMICINA	56
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	57
4.4.1	Teste em presença de saliva	60
4.4.1.1	Teste qualitativo da mistura HA + saliva	61
4.4.1.2	Teste quantitativo (contagem UFC) da amostras de HA impregnadas com gentamicina.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)	64
5.1.1	Refinamento pelo método de Rietveld	67
5.2	DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA E ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA	74
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	78
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	82
5.5	INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER (IVTF)	85
5.6	ANÁLISE TÉRMICA	93
5.7	TESTE MICROBIOLÓGICO EM PRESENÇA DE SALIVA HUMANA	95
5.7.1	Tratamento estatístico dos dados coletados nas contagens de UFC/mL .	104
6	CONCLUSÕES	107
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	108
8	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Dentre muitos materiais utilizados como substituintes ou enxerto nos reparos do tecido ósseo uma classe muito importante é constituída pelos fosfatos de cálcio. Este grupo de biomateriais é estudado há longo tempo e tem se aprimorado constantemente. Os fosfatos de cálcio são utilizados amplamente no reparo de tecidos ósseos injuriados na forma de implantes ou enxertos. Suas propriedades lhes conferem o caráter de biocompatíveis tornando-os fundamentais para a utilização em novos experimentos, sendo por sua vez estudados não somente por suas propriedades como materiais de reconstrução tecidual, mas também pelo seu comportamento frente à exposição ao meio *in vivo*, suas propriedades físicas como resistência à tração, flexibilidade, cristalinidade, tamanho de partículas, além de rotas alternativas de obtenção.¹⁻⁵

Um dos fosfatos de cálcio mais utilizados no reparo de tecidos ósseos é a hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que é um componente da estrutura óssea humana, usado também como reserva de fósforo, e que constitui uma fase menos solúvel dos fosfatos de cálcio, quando obtidos por uma rota convencional do sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{H}_3\text{PO}_4$ em pH básico para a formação da HA, como cita Santos².

Estudos de biocompatibilidade da HA são realizados há algum tempo, e recentemente, seu uso como cimento ósseo, tem sido testado frente a fluidos corporais ou fluidos que simulam a concentração dos minerais constituintes do sangue. Neste caso, temos ainda a possibilidade de infecção do tecido reparado, do qual se deseja extinguir, senão ao menos diminuir, a possibilidade do seu desenvolvimento no período de adaptação durante o tratamento. Assim, um dos

alvos destes estudos é a incorporação de drogas aos compostos derivados dos fosfatos de cálcio e demais biomateriais utilizados como enxertos ósseos.³⁻⁵ As possibilidades de estudo são amplas e a perspectiva de melhoria para o paciente que utiliza o enxerto combinado com a droga é evidente.

Ensaio microbiológico do biomaterial *in vitro* ou *in vivo* permitem avaliar a eficácia da droga testada, estes testes não são utilizados somente para estabelecer um padrão de funcionalidade, mas também para determinação de um valor quantitativo em relação ao percentual da droga permitida na utilização, além de estabelecer um padrão de eficácia em relação à contenção ou eliminação dos microrganismos que possam se desenvolver no local do reparo.⁵

Na avaliação de substituintes teciduais, especialmente ósseos, é possível fazer uma associação entre o enxerto e determinados componentes para aumentar a resistência mecânica do material e a elasticidade, entre outros fatores. Uma possibilidade é a utilização do colágeno, que é um polímero natural, e compõe parte da matriz óssea, dos dentes, da pele, dos tendões e cartilagens, com a intenção de modificar suas propriedades mecânicas.^{7,8}

Outro material que pode ser utilizado na alteração da condição do meio de precipitação ou na associação com a HA é a gelatina, que é obtida pela hidrólise parcial do colágeno. As características de hidrocolóide da gelatina e sua propriedade de formar géis, termicamente reversíveis, garantem uma infinidade de aplicações, tais como agente de gelificação, estabilizante e emulsificante.^{9,10}

Neste trabalho foram obtidas compósitos de HA-gelatina, usando diferentes concentrações de gelatina no meio de precipitação com a intenção de avaliar a melhor concentração para obtenção de um material mais puro através de uma rota alternativa, utilizando os precursores $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 em presença de gelatina

comercial. Este trabalho também contempla a incorporação de um material antibiótico, o sulfato de gentamicina, associado às amostras de HA e HA-gelatina como agente minimizador de rejeição do tecido substituído, em virtude da utilização clássica deste fármaco nos tecidos ósseo e epidérmico, por possuir boa capacidade de penetração óssea, sendo amplamente usado no tratamento de pacientes que passaram por cirurgias ortopédicas.^{11,12}

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo formado por células e substâncias que promovem a sustentação corporal dos animais vertebrados, contribuindo aproximadamente com 15% do peso do corpo.¹³

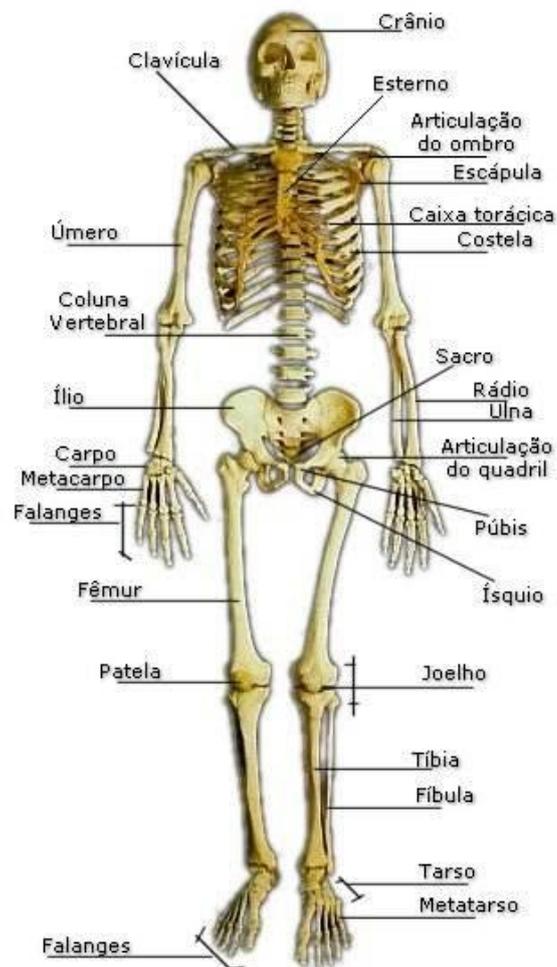


Figura 1 - Modelo de um esqueleto humano¹⁴

A função do tecido ósseo, associada à conformação anatômica do esqueleto, Figura 1, viabiliza aos organismos algumas vantagens fisiológicas

correlacionadas ao hábito de cada espécie, como por exemplo: ponto de inserção dos nervos, apoio aos músculos, adaptações locomotoras, produção de células do sangue, bem como proteção a alguns órgãos vitais (pulmão, coração, cérebro).^{13,15}

Entre os principais componentes dos ossos estão os elementos fundamentais que constituem a fração inorgânica, como os sais de cálcio, o fósforo e o magnésio, conferindo resistência através da formação de cristais responsáveis pela rigidez. É também formado por uma fração orgânica chamada “matriz óssea”, que possui substâncias intercelulares com abundante presença de fibras colágenas e glicoprotéicas, permitindo considerável flexibilidade às unidades ósseas^{14,15}.

Na organização macroscópica de um osso é possível observar duas regiões bem distintas: uma camada compacta mais externa e outra esponjosa interna, contendo, microscopicamente a mesma composição histológica.

Esse tecido é formado por células vivas dispostas em lacunas longitudinais paralelas (perfil vertical) ou lamelas concêntricas com camadas circunscritas a partir de um eixo central, denominado de canal de Havers (perfil horizontal), como mostra a Figura 2. As células que integram esse tecido podem ser: os osteoblastos, produzindo a matriz mesenquimal e os osteócitos, células com baixo potencial metabólico, inseridas na matriz, atuando na manutenção e reposição dos componentes orgânicos¹⁴.

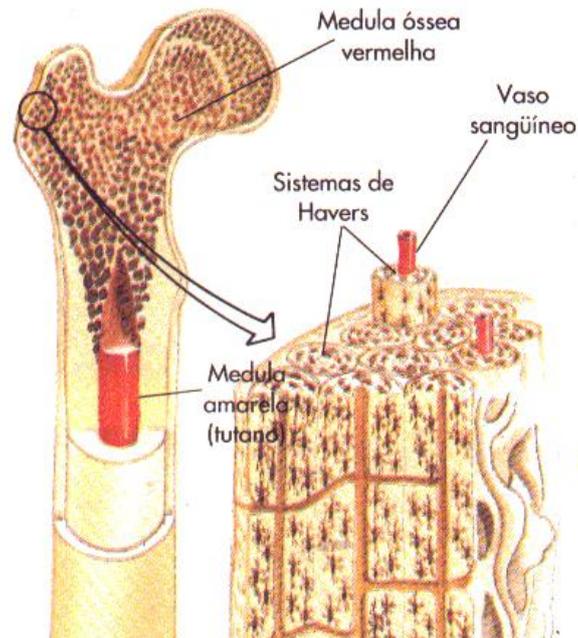


Figura 2 - Corte do osso. Representação dos canais de Havers¹⁶

As células mesenquimatosas indiferenciadas, além da capacidade de se moverem através dos tecidos, têm o potencial de se dividir rapidamente e se diferenciar em células especializadas do tecido músculo-esquelético; como exemplo, em células de cartilagem, osso, tecidos fibrosos densos e músculos. Inúmeros fatores sistêmicos relacionados com a nutrição, o equilíbrio hormonal ou ainda combinados com outros fatores locais, presença de oxigênio, citocinas, nutrientes, entre outros, influenciam a proliferação e a diferenciação das células mesenquimatosas.¹⁷

É importante realçar que o osso, *in natura*, possui uma matriz protéica que perfaz, respectivamente, 70% do volume e 30% do peso do osso; enquanto que a matriz inorgânica, que é formada principalmente pelo fosfato de cálcio, corresponde apenas a 30% do volume e 60% do peso. Os complementos restantes equivalem a outras substâncias, principalmente a água. É conceito básico da Física que a estrutura de subsistência de qualquer substância, produto, objeto ou do próprio

corpo humano é a responsável pela sua resistência e sustentação, assim, é possível entender que o colágeno ósseo, estrutura de sustentação de vários tecidos humanos, inclusive do osso, apresente relação direta entre deterioração e o risco de fratura.^{7,18,19}

Sendo o tecido ósseo altamente vascularizado, todo o esqueleto recebe, a cada minuto, 10% de todo o débito cardíaco, revelando a importância de uma eficaz perfusão sanguínea óssea, para oferecer nutrientes básicos essenciais à adequada síntese de colágeno.^{18,19}

O colágeno torna o material mais resistente e aumenta sua cristalinidade, além de reduzir efeitos como irritabilidade e alergenicidade, promovendo ainda a cicatrização de fraturas e a regeneração óssea devido à sua habilidade em facilitar o crescimento. O colágeno é a proteína mais abundante no organismo humano, constituindo cerca de 30% do total das proteínas e 6% do peso corpóreo. Esta proteína é biodegradável e de fácil obtenção, podendo ser extraída de animais ou obtida por síntese.²⁰

Na fase inicial do crescimento ósseo ocorre um contato, estreito, da HA com as fibrilas do colágeno, em locais específicos denominados de “buracos “ que existem entre as fibrilas que compõem a tripla-hélice do colágeno. Essa disposição sobre a matriz protéica básica resulta em um produto bilamelar, que é responsável pelas propriedades mecânicas do osso, sendo portanto capaz de resistir a todo tipo de estresse mecânico.²⁰

Por sua vez, o colágeno confere a todos os tipos de tecidos conjuntivos a sua forma básica e no tecido ósseo é o principal responsável pela resistência tênsil

(resistência à fratura). No entanto, os tipos, as concentrações e a organização do colágeno são variáveis em cada tecido, inclusive no osso.^{18,20}

1.1.2 Biomateriais

A busca incansável do ser humano pela longevidade e por melhores padrões de vida acaba por desencadear a necessidade do estudo, desenvolvimento e aprimoramento de técnicas na área da medicina. Algumas das técnicas desenvolvidas levaram a uma gama de alternativas para o reparo e a substituição de tecidos vivos afetados por traumas, patologias e fraturas entre outros. Estes materiais utilizados para a substituição de tecidos injuriados são denominados de biomateriais.²¹

Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética e que são toleradas de forma variável, podendo ser absorvidas permanentemente por diferentes tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles podem substituir, por completo ou partes de um tecido vitimado, podendo também fazer parte de tratamento como fonte restauradora parcial.^{12,17}

Em uma visão mais abrangente, um biomaterial é um dispositivo médico elaborado para interagir com sistemas biológicos a fim de realizar seu reparo, podendo ser de origem biológica ou não.^{12,17}

Para ser considerado um biomaterial, vários critérios devem ser atendidos. Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas realizada em 1982², um biomaterial é toda substância ou combinação de substâncias (com exceção de drogas) de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de

um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais. O que significa que estas substâncias são classificadas desta maneira porque consistem em materiais de uso médico, odontológico, veterinário, farmacológico e implantes em contato direto com tecidos do corpo.^{12,17}

1.1.2.1 Classificação dos Biomateriais

De acordo com o comportamento fisiológico, os biomateriais podem ser classificados como:

- *Biotoleráveis*: materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso.
- *Bioinertes*: materiais também tolerados pelo organismo, porém a formação de envoltório fibroso é praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente, sendo os mais utilizados a alumina, a zircônia, o titânio e suas ligas e o carbono.
- *Bioativos*: materiais que estabelecem ligações de natureza química com o tecido ósseo (osteointegração). Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.
- *Absorvíveis*: materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Os principais exemplos são o fosfato tricálcico (TCP) e o ácido polilático.^{2,17}

1.1.2.2 Aplicações dos Biomateriais

Com o aumento no número de pacientes, a ciência médica acaba recorrendo aos avanços na área de biomateriais para suprir as necessidades ocasionadas pelo aumento da população e a melhora da qualidade de vida almejada por uma população que cresce em expectativa de vida. Os problemas com os acidentes de trânsito, além daqueles decorrentes da longevidade da população, como é o caso da osteoporose, são alguns dos fatores que impulsionam o amplo avanço no estudo dos biomateriais.^{2,21,22}

Dos materiais sintéticos utilizados para reparar tecidos ósseos, as cerâmicas (biocerâmicas) são as mais empregadas. Estas se apresentam na forma de pó, revestimento ou próteses, ou ainda, como material de substituição dos tecidos afetados como ossos, juntas e dentes.^{21,22}

Alguns biomateriais são utilizados como cimentos, são materiais que possuem a capacidade de enrijecimento natural ou artificial pela combinação de fases distintas ou recombinação de fases, que pode acontecer pela exclusão da água, como exemplo. Os cimentos de substituição óssea usados como enxertos odontológicos à base de fosfato de zinco e silicato foram desenvolvidos em 1870 e têm sido utilizados até hoje. No início destes estudos houve o desenvolvimento de um cimento de silicato que apresenta excelentes propriedades, tais como cor, translucidez e ainda valor profilático, apresentando ação anticariogênica derivada dos fluoretos presentes em sua composição. Estes cimentos não devem ser tóxicos e devem apresentar forte ligação aos ossos, bem como possuir propriedades mecânicas e químicas que sejam satisfatórias.^{2,4,22}

O cimento ósseo como enxerto é colocado nos espaços vazios entre o implante e a superfície óssea endosteal, que endurece em pouco tempo e assegura a firme colocação da prótese ao preencher por completo o espaço vazio entre o implante e o osso. A aplicação de cimentos ósseos contempla uma série de vantagens das quais três são citadas a seguir:

- as dimensões da cavidade formada no osso para poder fixar a prótese não são tão críticas, pois o cimento proporciona um encaixe ajustável;
- como não é um ajuste exato, não é necessário golpear a prótese ao colocá-la na posição correta, evitando, possíveis fraturas;
- os cimentos aumentam a capacidade de resistência a cargas da prótese ao distribuir uniformemente as tensões entre a prótese e o osso.

Tendo em vista principalmente as desvantagens observadas, procurou-se o desenvolvimento de um material semelhante ao cimento, preparado à base de fosfato de cálcio, que reuniria as vantagens da biocompatibilidade dos biomateriais à base de fosfato de cálcio e dos materiais do tipo do cimento. A partir desta busca, houve a produção das cerâmicas de HA. Este material é produzido por cristalização direta "*in vivo*" e não requer nenhum tipo de aquecimento para a formação de um implante estruturalmente estável. A parte sólida é misturada com a parte líquida, cuja composição pode ser água, sangue, solução salina ou de ácido fosfórico diluído para formar uma pasta que será utilizada para reparar os defeitos ósseos e que ainda pode ser moldada diretamente na cavidade que receberá o preenchimento.^{2,7}

Nas cirurgias ortopédicas muitas vezes há necessidade de realizar grandes substituições do tecido ósseo devido a tumores, infecções e fraturas expostas, o que promove grandes cavidades em função da perda desse material. A utilização de auto-enxertos pode restabelecer a quantidade de massa óssea, porém, em muitos

casos, a quantidade de osso disponível não é suficiente para o preenchimento adequado da cavidade. Tal fato tem provocado a busca de novos materiais que possam atuar no preenchimento dessas cavidades e ainda permitir o aporte local de antibióticos para o tratamento de cavidades infectadas e para prevenção de infecções em fraturas abertas ou em cirurgias de substituição de próteses ou de tumores.^{6,7,8,12,22}

A área de Química pode contribuir de forma significativa para a evolução desta pesquisa e para o aumento do leque de sua aplicabilidade através do desenvolvimento de novos e mais eficazes biomateriais, juntamente com os estudos na área da Medicina que contemplam o esclarecimento dos mecanismos de regeneração óssea associados a materiais coadjuvantes para o pré-tratamento, como na associação com antibióticos. O gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$) e, especialmente a HA, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, apresentam alta bioatividade, isto é, forte interação cerâmica/tecido ósseo e biocompatibilidade, o que leva este material a ter uma grande aceitação como implante pelos tecidos vivos.^{6,7,17}

1.1.2.3 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade dos biomateriais é baseada na compatibilidade com o meio fisiológico que é resultante do fato de que estes materiais podem conter íons comuns àqueles encontrados neste meio (íons cálcio, magnésio, potássio, sódio, bicarbonato, etc.).^{21,23}

A rigor, a biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar danos ao organismo a curto e longo prazo. Além de biocompatível, o

implante deve permitir o desempenho imediato e com eficiência em função da parte que está sendo substituída. Nesse conceito estão incorporados, também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo - mesmo aos materiais considerados extremamente inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante.

Um material somente é aceito clinicamente se atende a alguns requisitos, como ser biocompatível, não podendo ser suscetível à degradação causada pelos tecidos (como a corrosão de metais), deve ser biofuncional, cumprindo a função adequada no tempo determinado e finalmente, o material deve ser esterilizável.^{2,7.}

Dentre os biomateriais encontram-se diferentes espécies de classes, sendo minerais ou ainda na forma de ligas metálicas, como Ti e Nb, que são utilizadas como material de substituição. Existem ainda as associações entre os componentes minerais e os metálicos que formam materiais com características diferenciadas, alterando sua dureza, resistência à tração e ainda tamanho de partícula. Cada fator é dependente do modo de como é feita a associação, seja ela durante ou após a síntese do material, como recobrimento ou apenas como dopante por impregnação.^{21,24}

1.1.2.4 Hidroxiapatita (HA)

A HA é um fosfato de cálcio hidratado, que consiste no componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos (cerca de 95%)^{2,17}. Sua fórmula química é representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras *hidróxi* que se refere ao grupo hidroxila (OH^{1-}) presente no material e da palavra *apatita* que designa o mineral. A palavra *apatita* vem do grego e significa “*decepção*”, em função de ela ser confundida com turmalina e berilo. A hidroxiapatita compõe a parte do esqueleto dos vertebrados e atua também como reserva de cálcio e fósforo.^{2, 25}

A HA sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção. Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos.^{2,17,25}

Dois tipos de HA devem ser consideradas: as sintetizadas a altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas a baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos. A HA precipitada por via úmida possui características similares as do tecido ósseo e dentário, diferente da HA sintetizada a altas temperaturas.²

Os fosfatos de cálcio disponíveis para comercialização em geral são hidroxiapatitas extraídas de ossos ou ainda produzidas pela precipitação de íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}). Este material na forma de pó pode ser obtido comercialmente com diferentes tamanhos de cristais. Infelizmente, alguns destes produtos não são livres de impurezas. Um exemplo são alguns tipos de HA com tamanho de partícula variando entre 10 e 40 μm para razão Ca/P = 1,62, enquanto outras possuem valores entre 160 e 200 μm para razão Ca/P de 1,66 a 1,69. A maioria dos fabricantes produz compostos sinterizados que diferem quimicamente das carbonato-apatitas biológicas. A sinterização da HA (dependendo de sua estequiometria) gera a decomposição das fases de fosfato de cálcio para oxiapatita e possivelmente fosfato tetracálcico e fosfato tricálcico (TCP).¹⁴

A extração da hidroxiapatita pode ser feita de osso bovino utilizando um procedimento onde o osso, após ser limpo e triturado, passa por tratamento em soluções de hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, sendo finalmente sinterizado a 1100°C e pulverizado para formação de partículas com tamanho entre 200 e 400 μm . O estágio final deste procedimento inclui a esterilização da hidroxiapatita a temperaturas entre 100 e 150°C.⁴

As cerâmicas de fosfato de cálcio se destacam por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, além da ausência de inflamações e capacidade de ligar-se ao tecido hospedeiro. Estas características podem ser explicadas pela natureza química dos materiais, especialmente pelo fato de serem basicamente formadas por íons cálcio e fosfato, que participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica, como é o caso da hidroxiapatita biológica que possui em sua constituição íons em concentrações diversificadas, tais como Ca^{2+} ,

Mg^{2+} , Na^{+} e CO_3^{2-} , que permitem o controle destes importantes íons nos diversos líquidos corporais por meio de sua liberação e armazenamento.²⁵

Existem padrões de difração de raios X entre a fase mineral dos ossos e a hidroxiapatita que comprovam estas razões de íons e que explica a alta interação entre os tecidos e a hidroxiapatita.²⁵

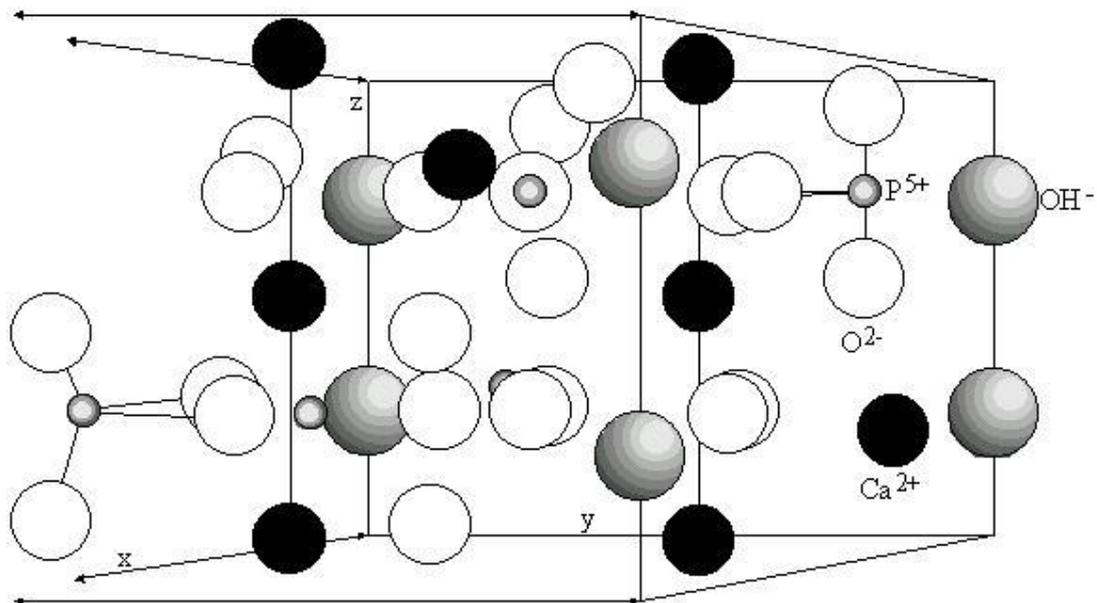


Figura 3 - Arranjo atômico da hidroxiapatita.²⁶

A superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água e, também, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície induzindo, assim, a regeneração tecidual. As principais aplicações da HA são: reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas; aumento de rebordo alveolar; coadjuvante na colocação de implantes metálicos; regeneração guiada de tecidos ósseos; reconstrução bucomaxilofacial; equipamentos

percutâneos; reparo e substituição de paredes orbitais; substituição do globo ocular; recobrimento de implantes metálicos.²⁷

Sua estrutura igualmente permite substituições catiônicas e aniônicas com grande facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , entre outros. Os grupos fosfato podem ser substituídos por carbonatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da HA.²⁷

Do ponto de vista biológico, o flúor é uma das impurezas mais importantes da HA dos tecidos calcificados. Nas hidroxiapatitas de ossos e dentes, os carbonatos ocupam sítios dos íons fosfato e dos íons OH^- numa razão de 10:1. O flúor pode ser incorporado à hidroxiapatita substituindo os grupos OH^- , tornando a estrutura mais estável e menos solúvel que a HA estequiométrica. A ação do flúor na proteção de cáries dentárias e no tratamento de osteoporose tem sido muito pesquisada.^{2,25}

Diferentes métodos de obtenção da HA foram propostos utilizando-se soluções aquosas. Um dos métodos é a utilização de nitrato de cálcio como precursor respeitando a proporção de $\text{Ca/P} = 1,67$ como na reação abaixo.¹



(à 100 °C na presença de metanol)

Outras duas rotas possíveis são demonstradas a seguir, uma a partir de hidróxido de cálcio e ácido fosfórico, e que é o método mais convencional, como segue:



O Ca(OH)_2 é menos solúvel na água e, o estado dos íons ortofosfatos depende do pH, a reação de precipitação envolve a dissolução de Ca(OH)_2 , difusão de espécies iônicas como Ca^{2+} e íons hidróxidos, e eletrólise de íons ortofosfatos, tornando complexas as condições de obtenção do pó com as características desejadas. Entretanto, este processo é conveniente para o uso industrial de HA uma vez que o subproduto é água. Após a reação completa e a retirada do excesso de água, obtém-se um gel de HA.



Esta rota é bastante semelhante à rota anterior, obtida a partir do H_3PO_4 e do Ca(OH)_2 especialmente no controle e no produto obtido, já que também há formação de hidroxiapatita e água.¹

Estas três rotas representam maneiras alternativas de se obter a HA a partir de diferentes precursores, podendo ainda variar o meio em que se processa a reação como é o caso da adição de colágeno (meio gelatinoso) ou em fluido de corpo simulado (SBF).^{28,29}

Recentemente, a utilização do processo sol-gel para a síntese de HA tornou-se objeto importante de pesquisa, consiste em um método químico via úmida, o qual dispensa a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas, sendo considerada uma das técnicas mais flexível e promissora. É um método utilizado para a preparação de um pó altamente puro devido à possibilidade de um controle

cuidadoso dos parâmetros do processo, favorecido por uma mistura em nível molecular dos íons cálcio e fósforo que é capaz de melhorar a homogeneidade química e física, resultando geralmente em uma microestrutura de granulometria bastante reduzida e que contém uma mistura de cristais de tamanho da ordem de *submicron* a *nano*, sendo muito importante para melhorar a reação de contato e a estabilidade da interface osso artificial/natural.²⁷

As propriedades mecânicas da hidroxiapatita não são apropriadas para aplicações de resistência à carga (como a ortopedia), sendo utilizada como cobertura em materiais como titânio e suas ligas, onde as propriedades bioativas contribuem enquanto o componente metálico suporta o peso.¹⁷

Substitutos de ossos e implantes reabsorvíveis podem ser produzidos quando a hidroxiapatita e outras variantes de fosfato de cálcio são utilizados na fase cerâmica. Espumas destas cerâmicas têm a habilidade de manter e estimular o crescimento de células humanas; poros com tamanhos variando entre 100 e 200 μm permitem o crescimento de osteoblastos acima e dentro dos poros, levando à formação de osteróides que mineralizam dentro dos poros.²⁸

As condições de processamento são importantes na obtenção de microporosidade, por exemplo, a presença de microporosidade de aproximadamente 1 μm nas paredes dos poros é importante para a fixação efetiva das células e crescimento interno. Tanto a microporosidade quanto a macroporosidade afetam a morfologia celular e o grau de infiltração celular.^{30,31}

O controle de porosidade da hidroxiapatita também permite grande potencial no desenvolvimento de implantes para a liberação lenta de agentes terapêuticos, como é caso da adição de antibióticos como a gentamicina, que acoplada ao biomaterial reduz consideravelmente a possibilidade de rejeição ao implante.^{6-8,32-39}

1.1.3 Antibióticos

A definição do termo antibiótico proposto por Vuillemin⁴⁰ em 1889 era "antibiose" e definia o antagonismo dos seres vivos em geral. O nome antibiótico foi primeiramente usado por Waksman que juntamente com outros microbiologistas, notou que algumas bactérias tinham a capacidade de destruir ou inibir outras, estudando amostras de fezes. Em 1942, Waksman redefiniu antibiótico como substâncias produzidas por microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetes), antagonistas ao desenvolvimento ou à vida de outros microrganismos em altas diluições no meio bioquímico do nosso corpo, exceto substâncias que, quando puras, têm uma potente ação antimicrobiana, como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e o álcool. Entretanto, o uso diário do termo, incluiu os agentes antibacterianos sintéticos, como as sulfonamidas e as quinolonas, que não são produzidos por microrganismos.⁴⁰

A rigor, os antibióticos são um grupo de fármacos utilizados para tratar as infecções causadas por bactérias. Originalmente extraídos de bolores e fungos, hoje podem ser obtidos por síntese química e utilizados para combater diversas doenças infecciosas.

Os antibióticos podem ser divididos em: bactericidas, quando eliminam as bactérias, provocando a destruição da parede bacteriana; e bacteriostáticos, quando detêm o crescimento das bactérias, deixando ao sistema imunológico a tarefa de eliminar a infecção.⁴⁰

Esta classe de fármacos ajuda a combater os sintomas da infecção, quer quando o organismo é atacado por bactérias nocivas, quer quando as bactérias

presentes no organismo se tornam patogênicas. Podem prevenir as infecções, mesmo nos casos em que o sistema imunológico se encontra debilitado.

Alguns antibióticos são eficazes apenas contra certos tipos de bactérias, enquanto que outros, os chamados antibióticos de largo espectro, podem combater uma grande variedade de bactérias.^{40,43} A escolha do fármaco a utilizar pode depender tanto do tipo de bactéria como do local de infecção. Certas bactérias também podem adquirir uma resistência especial a um determinado antibiótico. Isto sucede quando uma bactéria se desenvolve seguindo uma via metabólica que não é bloqueada pela ação do fármaco, ou consegue produzir uma enzima que torna inativo o próprio antibiótico. Existem antibióticos especialmente indicados para o tratamento de infecção graves resistentes a outros antibióticos. Para aumentar a eficácia da terapêutica e diminuir o risco de resistência aos antibióticos, pode também ser prescrito mais do que um antibiótico simultaneamente.^{40,42,43}

1.1.3.1 Gentamicina

A gentamicina ($C_{21}H_{43}N_5O_7 \cdot 2,5H_2SO_4$) é um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, de baixo custo e amplamente utilizado no tratamento de infecções ósseas, queimaduras, septicemia bacteriana, infecções da pele e do trato intestinal, entre outras.^{32,40,43} A fórmula estrutural da gentamicina é apresentada na Figura 4.

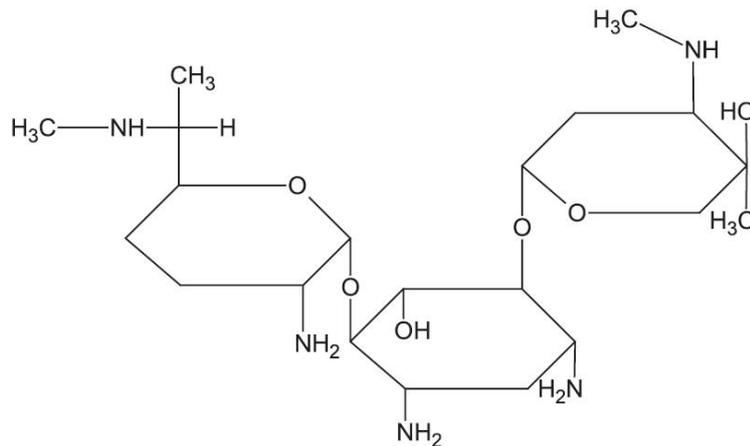


Figura 4 - Fórmula estrutural da gentamicina.⁴⁴

O sulfato de gentamicina é um pó com coloração que varia de branco a amarelado, que é isolado de *Micromonospora echinospora* e *Micromonospora purpurea*. Seu uso sistêmico principal é no tratamento de infecções graves por bactérias Gram-positivas e negativas.⁴¹

As bactérias Gram-negativas são aquelas na quais a parede celular é menos espessa, pois apresentam uma membrana externa cobrindo a fina camada de peptídeoglicano, um componente heteropolimérico da parede celular que lhe dá estabilidade mecânica rígida, conforme apresentado na Figura 5. A membrana externa é o que distingue as bactérias Gram-negativas, servindo como uma barreira seletiva para a entrada e saída de algumas substâncias da célula e podendo ainda causar efeitos tóxicos graves em animais infectados.⁴² A parede celular da bactéria Gram-positiva é única e consiste de uma camada espessa, composta quase que completamente por peptídeoglicano. As múltiplas camadas de peptídeoglicano das bactérias Gram-positivas constituem uma estrutura extremamente forte em tensão.

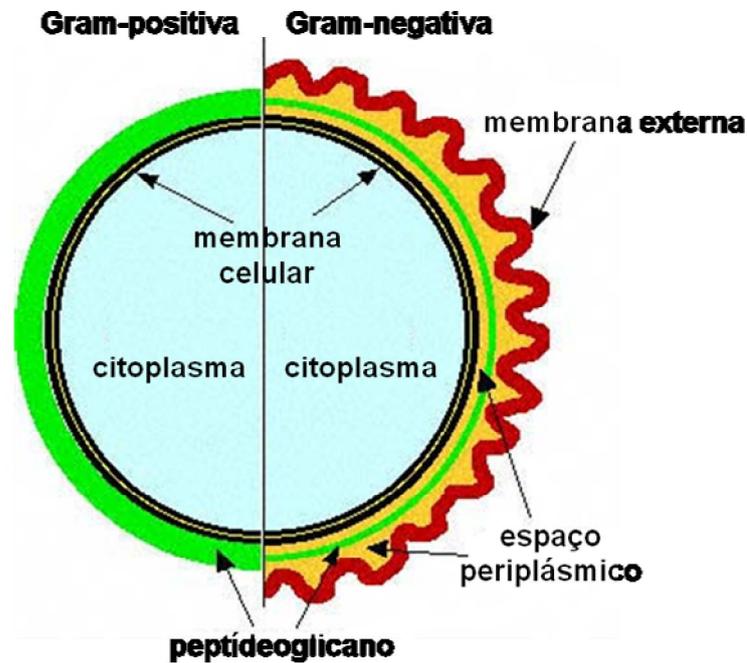


Figura 5 - Representação estrutural das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.⁴¹

A gentamicina é um medicamento bastante eficaz, mas que possui uma ação diferenciada, por se tratar de um antibiótico que é indicado para vários tipos de tratamento, desde uma simples dermatite até determinados tipos infecções no sistema nervoso central. Por este fato, é um medicamento considerado não seletivo, pois age paralela e simultaneamente em várias regiões corpo combatendo diferentes tipos de infecções.⁴²

A escolha do sulfato de gentamicina como antibiótico acoplado ao material utilizado como possível enxerto ósseo se deu devido a propriedades como sua alta solubilidade em água, por ser bastante acessível, isto é, facilidade de compra e custo relativamente baixo, além de sua vasta aplicabilidade no tratamento de doenças ligadas aos tecidos ósseo, muscular e epitelial, regiões diretamente ligadas ao local do implante.

1.1.3.2 Farmacocinética da Gentamicina

A gentamicina não é imediatamente absorvida logo após a administração oral, embora em locais tópicos possa ser absorvida em quantidades significativas desde que as superfícies corporais (exceto a bexiga urinária) sejam irrigadas com o material depois da aplicação local. Já a absorção intramuscular é total e rápida após sua administração.^{45,46}

As concentrações no córtex renal, às vezes, podem ser oito vezes mais altas que os níveis usuais. No líquido cefalorraquídeo (líquido que banha a medula e o cérebro) são baixas e dependentes da dose, do nível de penetração e do grau de inflamação da meninge (delicadas membranas que revestem e protegem o sistema nervoso central, a medula, o tronco encefálico e o encéfalo). A concentração efetiva às secreções brônquicas, a biliar e tecido ocular (regiões de maior concentração aquosa) é bastante pequena.^{37,45}

Nos adultos, logo após a administração intramuscular, observa-se um aumento significativo na concentração sérica de até quatro vezes o da dose única em mg/kg de massa corpórea, representando níveis medidos de 6 a 8 horas após a administração. Após a administração intravenosa, a concentração pode chegar à quantidade de 4 a 6 µg/mL alcançada após um período de tempo máximo entre 30 e 60 minutos.^{37,45,46}

A meia vida da gentamicina é de 2 horas e seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica, ligando-se às proteínas plasmáticas, mas em quantidades desprezíveis. Ela é excretada pelos rins, por meio de filtração glomerular, e encontra-se na urina em forma ativa.⁴⁵⁻⁴⁸

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de gelatina no meio de precipitação durante a síntese de hidroxiapatita e efetuar a incorporação de sulfato gentamicina nas amostras preparadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito de diferentes concentrações de gelatina nas propriedades da hidroxiapatita produzida;
- Testar metodologia para incorporação da gentamicina nos pós de hidroxiapatita preparada com adição de gelatina com o antibiótico;
- Avaliar a atividade microbiológica das amostras preparadas em saliva humana.

3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho (espectroscopia IV) é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Ela se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, denominados, nesse caso, de níveis vibracionais. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibracional.⁴⁹

Se a molécula receber luz com “exatamente” a mesma energia de uma dessas vibrações, então a luz será absorvida desde que sejam atendidas determinadas condições. Para que uma vibração apareça no espectro IV, a molécula precisa sofrer uma variação no momento dipolar durante essa vibração. Não obstante, as frequências de ressonância podem ser, em uma primeira aproximação, relacionadas ao comprimento da ligação e às massas dos átomos em cada ponta. As ligações podem vibrar de seis modos: *estiramento simétrico*, *estiramento assimétrico*, *tesoura*, *rotação*, *wag* e *twist*.⁴⁹

Esta técnica trabalha quase que exclusivamente em ligações covalentes, e é de largo uso na Química, especialmente na Química Orgânica. Espectros bem resolvidos podem ser produzidos com amostras de uma única substância com elevada pureza. Contudo, a técnica costuma ser usada para auxiliar a identificação de misturas bem complexas.⁴⁹

A análise da absorção no infravermelho das amostras de hidroxiapatitas sintetizadas indicará a presença de grupos funcionais, por exemplo, HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , PO_4^{2-} , nas amostras, assim como, dos grupos funcionais do composto que será incorporado e o efeito da incorporação sobre a frequência de vibração de outros grupos funcionais.^{50,51}

As apatitas possuem grupos funcionais característicos como os evidenciados pela Figura 6, onde se observam as bandas de estiramento: O-H a 3540 cm^{-1} e P-O (de PO_4^{3-}) em 1050 cm^{-1} , além das bandas de deformação de P-O (de grupos PO_4^{3-}) em 605 e 561 cm^{-1} . Assim como a hidroxiapatita a gelatina também possui grupos característicos observados pela presença dos estiramentos N-H em 3440 cm^{-1} , C-H em 2960 cm^{-1} e C=O em 1660 cm^{-1} .⁴⁸

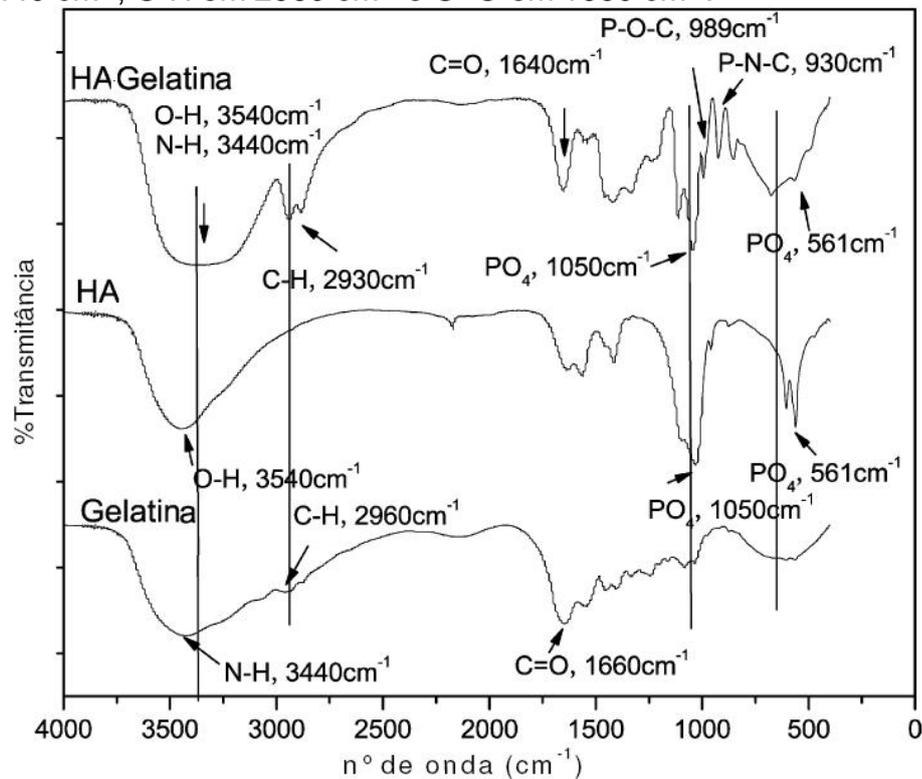


Figura 6 - Espectro infravermelho de gelatina comercial, HA comercial e HA preparada em meio gelatinoso.⁴⁸

3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os raios X são raios eletromagnéticos de comprimento de onda bem determinados produzidos pela aceleração ou desaceleração de elétrons de alta energia. Os raios X estão em um intervalo de comprimento de onda entre 10^{-5} e 10^2 Å e são amplamente usados em análise quantitativa de fase em cristais. Quando este feixe definido difrata em um cristal desconhecido, a medida dos ângulos de difração dos raios emergentes pode elucidar a distância dos átomos no cristal e, conseqüentemente, a estrutura cristalina.^{52,53}

A difração de raios X pela rede cristalina ocorre sobre uma larga faixa angular quando o comprimento de onda dos raios X é da ordem do espaçamento entre planos de átomos. A difração de raios X identificará as linhas de difração correspondentes aos espaçamentos interplanares dos materiais cristalinos. O padrão resultante (espectro), que é composto de espaçamentos planares (no eixo x) e intensidades (no eixo y), pode ser comparado a padrões do Comitê da Junta de Padrões de Difração de Pós (JCPDS) da ASTM para os vários fosfatos de cálcio.⁵²

A difração de raios X é usada para obter características importantes sobre a estrutura cristalina de um composto qualquer. Estas informações são geradas pelo fenômeno físico da difração e também da interferência, ou seja, quando os raios incidem sobre um cristal, ocorre a penetração do raio na rede cristalina e, a partir disso, teremos várias difrações e interferências construtivas e destrutivas, assim, os raios X irão interagir com os elétrons da rede cristalina e serão difratados, permitindo através desta leitura através de um dispositivo capaz de detectar e traçar o desenho da estrutura cristalina, obter informações como presença de fases características e parâmetros de rede.⁵²

3.2.1 Método de Rietveld

O método Rietveld é um método de refinamento estrutural e não um método de determinação estrutural embora constituindo uma parte importante no contexto da caracterização estrutural.⁵³⁻⁵⁵

O método Rietveld utiliza os espectros de difração de raios X e tem como característica fundamental a utilização de um modelo adequado ao estudo a realizar, permitindo extrair dos espectros de difração informações detalhadas da estrutura cristalina e informações analíticas dos materiais.

O modelo estrutural adotado por Rietveld inclui vários tipos de parâmetros de análise, sendo, entre eles:

- Parâmetros da estrutura cristalina;
- Parâmetros do perfil das reflexões;
- Parâmetros da intensidade;
- Parâmetro de correção da orientação preferencial dos cristalitos da amostra.⁵⁵⁻⁵⁷

Estes parâmetros permitem calcular através do algoritmo um espectro modelo adequado à fase que pretendemos estudar, o qual é comparado com o espectro observado e a diferença entre ambos minimizada fazendo variar os parâmetros no modelo estabelecido, utilizando o processo de minimização baseado no princípio dos mínimos quadrados até que o melhor ajuste seja obtido entre o padrão de difração observado experimentalmente e o cálculo de acordo com um modelo que envolve a estrutura cristalina, fatores instrumentais e características da amostra.⁵⁵⁻⁵⁷

O refinamento da análise de difração de raios X é obtido pela análise de Rietveld na qual pode se utilizar um programa como o GSAS para obtenção de parâmetros quantitativos relativos às amostras através do ajuste dos dados de difração usando um modelo matemático baseado em mínimos quadrados. Uma das importantes funções do programa GSAS é a análise quantitativa de fases, além da obtenção dos parâmetros de célula unitária e do volume da célula.^{53,55}

O valor de R_{wp} e o S indicam a qualidade do ajuste do perfil. O R_{Bragg} indica a qualidade do refinamento da estrutura (posições atômicas, ocupação do sítio atômico e deslocamento atômico).^{53,55}

No programa GSAS o valor do *goodness-of-fit*, S , não é obtido diretamente, mas pode ser calculado a partir da equação 4. R_e é o valor estatisticamente esperado para R_{wp} (índice ponderado da qualidade do refinamento em função dos pontos do perfil de difração de raios X). O valor mínimo possível para S é 1 e através da análise da equação 2 é possível verificar que quanto mais próximo de 1 estiver o valor de S , melhor será o refinamento.^{54,59}

$$S = \sqrt{X^2} \quad (\text{eq.4})$$

$$R_e = \frac{R_{wp}}{S} \quad (\text{eq.5})$$

onde: X^2 é o índice de ajuste ou qualidade do refinamento.

3.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA PELO MÉTODO BET

Esta análise (também conhecida como ASA – análise de área superficial) mede a área superficial específica por unidade de massa. A sigla BET tem origem em Brunauer, Emmett e Teller, os nomes dos pesquisadores que, em 1938, propuseram este método. A análise de BET é um dos modos mais antigos de caracterização e consiste na medida da fisissorção (adsorção física) de um gás inerte, como o N_2 e pode ser feita por um único ponto ou por vários pontos da amostra.^{58,59}

Existem várias teorias para a medida da área superficial e porosidade utilizando a sorção de gás. Para determinar a área superficial, amostras de sólidos são pré-tratadas aplicando-se combinação de calor e vácuo ou fluxo de gás para remover contaminações adquiridas da exposição à atmosfera. O sólido é então resfriado, sob vácuo. Um adsorbato (material que foi retido pelo processo de adsorção) normalmente utilizado é o gás nitrogênio que é admitido ao sólido em aumentos controlados. Após cada dosagem de adsorbato, a pressão é equilibrada e a quantidade de gás adsorvido é medida. O volume do gás adsorvido a cada pressão, a uma temperatura constante, define uma isoterma de adsorção, da qual a quantidade de gás exigida para formar uma única camada sobre a superfície externa do sólido e seus poros é determinada.^{60,61}

Com a área coberta por cada molécula de gás adsorvido conhecida, a área da superfície pode também ser calculada. À medida que a adsorção continua a espessura da camada adsorvida aumenta.^{60,61}

Os fundamentos da técnica analítica são: uma amostra acondicionada em um tubo sob vácuo é resfriada à temperatura criogênica e exposta a um gás de

análise sob uma série de pressões controladas com precisão. A cada aumento de pressão, o número de moléculas adsorvidas na superfície aumenta. A pressão na qual o equilíbrio da adsorção ocorre é medida e a lei universal dos gases é aplicada para determinar a quantidade de gás adsorvido.^{58,59}

Qualquer microporo na superfície é rapidamente preenchido, fazendo com que a superfície livre se torne completamente coberta e finalmente os poros grandes são cheios. O processo deve continuar até o ponto de condensação volumétrica do gás de análise.

Em seguida o processo de desorção deve começar ao passo que a pressão é sistematicamente reduzida resultando na liberação das moléculas adsorvidas. Assim como no processo de adsorção, a variação na quantidade de gás na superfície do sólido é quantificada. Estes dois conjuntos de dados descrevem as isotermas de adsorção e desorção. As análises das formas das isotermas revelam informações sobre as características da superfície e dos poros do material.^{58,59}

A isoterma de BET utiliza a seguinte equação para representar dados experimentais:

$$\frac{p}{V(p_0 - p)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c - 1}{V_m c} \frac{p}{p_0} \quad (\text{eq.6})$$

onde: V é o volume de gás absorvido à pressão p ; $(p_0 - p)$ é a pressão de vapor saturada do adsorbato à temperatura de absorção; V_m é capacidade da monocamada; $c - 1$ é a constante relativa às energias de adsorção e liquefação do gás. Desse modo, varia-se a pressão p e se obtém os valores de V . Assim, é possível construir um gráfico de $P/V(p_0 - p)$ em função de p ou de p/p_0 e, desse

modo, obter uma reta do tipo $y = ax + b$, sendo possível, pelo valor de c , determinar V_m . Tendo esse valor, obtém-se a área superficial do sólido através da equação:

$$S = \frac{N_{AV} \cdot \sigma \cdot V_m}{V} \quad (\text{eq.7})$$

onde: N_{AV} é o número de Avogadro; V_m é o volume molar igual a $22,410 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 1 atm e 0°C ; σ é a área ocupada por uma molécula.⁵⁹

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E DE TRANSMISSÃO (MET)

O Microscópio Eletrônico de Varredura é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas.⁴⁹ Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação. O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o microscópio ótico (MO) e o Microscópio Eletrônico de Transmissão. A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, da ordem de 2 a 5 nm (20 - 50 Å) - atualmente existem instrumentos com até 1 nm (10 Å) - enquanto que no ótico é de 0,5 µm. Comparado com o MET, a grande vantagem que o MEV possui está na facilidade de preparação das amostras.⁴⁹

Entretanto, não são apenas estas características que fazem do MEV uma ferramenta tão importante e tão usada na análise dos materiais. A elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica. A observação e a análise de fratura tiveram um grande avanço com o uso do microscópio eletrônico de varredura.⁴⁹

O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando

numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes que estes atinjam a amostra analisada.⁴⁹

Um microscópio eletrônico de transmissão consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão entre 5 e 10 mmHg.⁴⁹

Um microscópio de transmissão possui cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico. Entre estes componentes, destacam-se os três seguintes pela sua importância no processo de difração eletrônica: lente objetiva, abertura objetiva e abertura seletiva de difração. A função das lentes projetoras é apenas a produção de um feixe paralelo e de suficiente intensidade incidente na superfície da amostra.⁴⁹

Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva entra em ação, formando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo importantíssimo da lente objetiva, as lentes restantes servem apenas para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela ou na chapa fotográfica.^{49, 50}

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Microanálise (EDS)

O EDS (*energy dispersive spectrometer*) é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um mineral, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local e assim identificar em instantes que mineral está sendo observado. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos (< 5 μm), permitindo uma análise quase que pontual.⁴⁹

O uso em conjunto do EDS com a microscopia eletrônica de varredura é de grande importância na caracterização de diferentes materiais, enquanto a MEV proporciona nítidas imagens, o EDS permite sua imediata identificação. Além da identificação mineral, o equipamento ainda permite o mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais, gerando mapas composicionais de elementos desejados.

A MEV tem sido amplamente empregada na caracterização de minerais, sua grande vantagem consiste na observação direta de bordas ou contornos de grãos e na caracterização de porosidade inter e intragranular. Bordas de grãos são locais onde se concentram um grande número de defeitos cristalinos. Caracterizar as microestruturas e identificar seus mecanismos formadores é um passo fundamental

para se conhecer um determinado mineral, bem como prever seu comportamento nas diversas etapas do seu beneficiamento e processamento industrial.⁴⁹

Outro aspecto importante na caracterização de minerais é a determinação de sua composição química. Os microscópios eletrônicos de varredura equipados com detectores de energia dispersiva de raios X são de fundamental importância na determinação da composição dos minerais. Com o MEV-EDS, é possível determinar a composição química pontual das fases que compõem o mineral, constituindo o EDS ferramenta indispensável na caracterização e distribuição espacial de elementos químicos.⁴⁹

3.5 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica é definida como um grupo de métodos pelos quais as propriedades físicas ou químicas de uma substância, uma mistura e/ou um reativo são medidas como funções de temperatura ou tempo, enquanto a amostra está sujeita a um programa de temperatura controlada. O programa pode consistir em aquecer ou resfriar (dinâmico), ou manter a temperatura constante (isotérmica), ou qualquer seqüência destes.^{49,62,63}

Os métodos térmicos são técnicas de multicomponentes e incluem termogravimetria (TG), análise diferencial térmica e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Estes métodos são de grande utilidade para o controle da qualidade e aplicações de investigação sobre produtos industriais como polímeros, farmacos, metais e ligas.^{49,62,63}

Na termogravimetria (TG), a massa da amostra em uma atmosfera controlada é medida como uma função de temperatura ou de tempo. A TG pode ser usada para monitorar qualquer reação que envolve uma fase gasosa como a oxidação ou desidratação. Os estudos podem ser realizados a temperaturas de até 1550 °C. Este método é útil para determinar a pureza e a quantidade de água na amostra. O termograma traça o peso versus a temperatura ou o tempo, gerando assim informação sobre a estabilidade térmica da amostra, velocidades de reação e composição.^{49,62,63}

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é considerada uma potente técnica na caracterização das estruturas cristalinas ocorridas em um material em função da temperatura. As transições de fase são acompanhadas por alterações na

entalpia do composto, decorrentes de quebra ou formação de ligações ou simplesmente de rearranjos na estrutura cristalina.^{49,62,63}

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos mostrou que:

- O método proposto com precipitação em meio gelatinoso levou a obtenção de HA pura, não coexistindo outras fases referentes a sistema Ca-P.
- A concentração de gelatina influencia na morfologia das amostras, como comprovado pela análise dos resultados de distribuição granulométrica, área superficial específica e MEV.
- As amostras de HA preparadas possuem efeito inibidor no crescimento bacteriano.
- O processo utilizado para incorporação da gentamicina na HA manteve a propriedade antibiótica do fármaco e o mesmo foi liberado durante o teste em presença de saliva.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São sugestões para trabalhos futuros relacionados a este estudo:

- Estudo das propriedades mecânicas da hidroxiapatita obtida por precipitação nas diferentes concentrações utilizadas no meio gelatinoso com e sem submissão a tratamento térmico (calcinação e sinterização);
- Verificação das propriedades do material associado ao antibiótico para utilização como cimento ósseo;
- Estudo da liberação controlada do antibiótico;
- Estudo da incorporação de outros antibióticos e agentes de terapia associada.

8 REFERÊNCIAS

1. SANTOS, M. H.; DE OLIVEIRA, M.; SOUZA, L. P. F.; MANSUR, H. S.; VASCONCELOS, W. S. Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process. *Materials Research*, vol. 7, nº 4, p. 625 – 630, 2004.
2. SANTOS, L. A. Desenvolvimento do cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para o uso na área Médico-Odontológica, 2002, 274f. Tese (Doutorado em Materiais e Processos de Fabricação) – UNICAMP, Campinas, 2002.
3. BERUBE, P.; YANG, Y.; CARNES, D. L.; STOVER, L. E.; BOLAND, E. J.; ONG, J. L. The effect of sputtered calcium phosphate coatings of different crystallinity on osteoblast differentiation, *Journal Periodontal*, vol. 70, nº 10, p. 1697-1709, 2005.
4. WAHL, D. A; CZERNUSKA, J. T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair, *European Cells and Materials*, vol. 11, p. 43-56, 2006.
5. NASCIMENTO, C.; ISSA, J. P. M.; OLIVEIRA, R. R.; IYOMAZA, M. M. Biomaterials applied to the bone healing process, *Int. J. Morph.* vol. 25, nº 4, p. 839-846, 2007.
6. TADIC, D.; WELZEL, T.; SIDEL, P.; WÜST, E.; DINGELDEIN, E.; EPPLE, M. Controlled release of gentamicin from biomimetic calcium phosphate in vitro - Comparison of four different incorporation methods, *Matt-wiss - Werkstofftech*, vol. 35, nº.12, 2004.
7. SCHNIEDERS, J.; GEBURECK, U.; THULL, R.; KISSEL, T. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement, *Biomaterials*, nº 27, p. 4239-4249, 2006.
8. RADIN, S.; CAMPBELL, J. T.; DUCHEYNE, P.; CUCKLER, J. M.; Calcium phosphate ceramic coating as carriers of vancomycin, *Biomaterials*, nº 18, p. 777-782, 1996.
9. HILLIG, W. B.; CHOI, Y.; MURTHA, S.; NATRAVALI, N.; AJAYAN, P. An open-pored gelatin hydroxyapatite composite as a potential bone substitute, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, vol. 19, p. 11-17, 2007.

10. MATSUDA, M.; KOYAMA, Y.; HOSAKA, Y.; UEDA, H.; WATANABE, K.; ARAYA, T.; IRIE, S.; TAKEHANA, K. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, vol. 52, p. 211-215, 2006.
11. LUCKE, M.; SADONI, S.; HAAS, N. P.; RASCHKE, N. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats, *Bone*, vol. 32, p. 521-531, 2003.
12. CANO, J. M.; HACHEN, A.; RUZAFKA, A. G.; RODRIGUEZ, D.; SABATE, A. F.; SANTOS, L. A. Sulfato de cálcio associado a gentamicina como material de substituição óssea, *Revista Brasileira de Ortopedia*, vol. 34, nº. 5, p. 355-360, 1999.
13. MANKANI, M. H.; KUZNETSOV, S. A.; WOLF, R. M.; MARSHALL, G. W.; ROBEY, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible, *Stem Cells*, vol. 24, p. 2140-2149, 2006.
14. VAZ, G. J. O. Propriedades biocerâmicas de porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias primas de origem orgânica sintética, 2007, 108f. Dissertação (Mestrado em Processos de Fabricação) – Universidade Federal de Ouro Preto/ Universidade Estadual de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
15. PAIVA, A. O. Obtenção, caracterização e estudo *in vitro* do vidro bioativo VH30 e compósitos vidro bioativo/polihidroxibutirato, 2005, 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade Federal de Itajubá, SP, Itajubá, 2005.
16. SISTEMAS DE HAVERS, 2007. Disponível em <<http://br.geocities.com/investigandoaciencia/sistemaesqueleticocamad as.gif>> acesso em 20 de janeiro de 2009.
17. GUTIERREZ, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J. D. Substitutos Ósseos: Conceitos Gerais e Estado Actual, *Arquivos de Medicina*, vol.19, nº4, p. 153-162, 2006.
18. PRIOR, D. V. Localized drug delivery via collagen-based biodegradable matrices, *Pharmaventures*, p. 39-42, 2004.

19. ZHANG, Z. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limited split wastes, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemistry*, vol.90, p.23-28, 2006.
20. OGAWA, C. A. e PLEPIS, A. M. de G. Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em compósitos de hidroxiapatita: colágeno, *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, vol. 17, nº 3. p. 123-130, 2001.
21. ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas Bioativas – Estado da Arte, *Química Nova*, vol.29, nº. 1, p.100 -104, 2006.
22. VALLET-REGI, M e GONZÁLES-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in solid state chemistry*, vol. 32, p. 1-31, 2004.
23. RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação, *Revista Dental Press Periodontia Implantológica*, vol. 1, nº 3, p. 39-50, 2007.
24. KAWACHI, Y. E.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar, *Química Nova*, vol. 23 nº. 4, p. 518 – 522, 2000.
25. ASSIS, C. M.; VERCIK, L. C. O.; SANTOS, M. L.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C. Comparison of crystallinity between natural hydroxyapatite and synthetic cp-Ti /HA coatings, *Materials Research*, vol. 8, nº. 2, p. 207-211, 2005.
26. BAYRAKTAR. D; TAS. A. C. Chemical preparation of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37°C in urea-containing synthetic body fluids, *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 19, p.2573-2579, 1999.
27. SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A, O.; SAEKI, M. J.; APRECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico, *Eclética Química*, vol. 30, nº. 3, p. 29 – 35, 2005.
28. ORTEGA, F. S.; INOSTROZA, P. A. S.; PANDOLFELLI, V. C. Avaliação de sistemas gelificantes para a produção de cerâmicas porosas através da técnica “gelcasting” de espumas. *Cerâmica*, vol. 46, nº. 300, p. 225 – 229, 2000.

29. BARBATO, D. A.; CORRÊA, D. T. S.; NOVAKI, L.; ANDRADE, A. V. C.; DA SILVA, J. C. Z. Caracterização de amostras de biovidro em meio de fluido de corpo simulado (SBF), In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UEM, Livro de Resumos do XI EAIC, 2002.
30. DA COSTA, E.; NOVAKI, L.; TSAI H. I.; PEREIRA, L. T. P.; ANDRADE, A. V. C.; SANTOS, C. O. P.; BORGES, C. P. F.; MARQUES, M. B.; DA CRUZ, A. C. C.; DOS SANTOS, F. A.; DA SILVA, J. C. Z. Sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, vol. 30, p. 51-54, 2003.
31. DE CAMPOS, S. D.; DE CAMPOS, É, A.; DA SILVEIRA, C. B.; BINI, R. A. Biomaterials based on $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ prepared with sawdust or corn glucose: effects on porosity and crystallinity, *Cerâmica*, nº.1, p. 274-279, 2005.
32. MARTINS, M. A. P., STARLING, S. M., BORGES, S. A. Utilização de gentamicina em neonatos atendidos em uma maternidade pública da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (1999), *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 41, nº. 1, 2005
33. ALT, V. BECHERT, T.; STEINRÜCKE, P, WAGENER, M.; SIDEL, P.; DINGELDEIN, E.; DOMANN, E.; SCHNETTLER, R. In Vitro Testing of Antimicrobial Activity of Bone Cement, Antimicrobial Agentes and Chemotherapy, *American Society for Microbiology*, vol. 48, nº 11, p. 4084-4088, 2004.
34. GIROT, A. L.; VERDIER, M. C.; TRIBUT, O.; SANGLEBOEUF, J. C.; ALLAIN, H.; OUDADASSE, H. Gentamicin-Loaded Calcium Carbonate Materials: Comparison of Two Drug-Loading Modes, *J. Biomed. Mater. Res. B. Pt. Appl. Biomater*, vol.73, nº 1, p. 164-170, 2005.
35. KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Development of Hydroxyapatite Bone Scaffold for Controlled Drug Release via Poly (ϵ -caprolactone) and Hydroxyapatite Hybrid Coatings, *J. Biomed. Mater. Res. B. Pt. Appl. Biomater*, vol.70, nº 2, p. 240-249, 2004.
36. SILVERMAN, L. D.; LUKASHOVA, L.; HERMEN, O. T. Release of Gentamicin from a Tricalcium Phosphate Bone Implant, *Journal of orthopaedic research*, vol.25, p. 23-29, 2006.

37. STALLMAN, H. P., FABER, C., BRONKERS, A. L.; NIEUW, A. L.; WUISMAN, P. I. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile, *BMC Musculoskeletal Disorders*, vol. 7, nº 18, p. 1-8, 2006.
38. STIGTER, M.; BEZEMER, J.; GROOT, K.; LAYROLLE, P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy, *Journal of Controlled Release*, vol. 99, p. 127-137, 2004.
39. TORRADO, S.; FRUTOS, P. FRUTOS, G. Gentamicin bone cements: characterisation and release (in vitro and in vivo assays), *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 217, p. 57-69, 2001.
40. KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. *Química Farmacêutica*, 1ª. edição. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982, p. 575-578 e 601-603.
41. LOURENÇO, F. R.. Doseamento microbiológico de gentamicina por difusão em ágar – proposta de delineamento experimental, 2006, 218f. *Dissertação (Mestrado em Produção e Controle de Farmacêuticos) – USP, São Paulo, 2006.*
42. SILVA, P. *Farmacologia*, 7ª. edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006, p. 980-985.
43. BIER, O. *Fisiologia bacteriana*. In: *Microbiologia e Imunologia*. 23.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1984. cap.3, p.43-77.
44. MURUGAN, R., RAO, K. P. Controlled released of antibiotic from surface modified corallienhydroxyapatite, *Trends Biomater. Artif. Organs.*, vol. 16, nº 1, p. 43-45, 2002.
45. PEÑA, E.D.; FRUTOS, P. FRUTOS, G.; RIEND, J. M. B. Gentamicin sulphate release from a modified commercial acrylic surgical radiopaque bone cement. I. Influence of the gentamicin concentration on the release process mechanism, *Chem. Pharm. Bull*, vol. 50, nº9, p. 1201-1208, 2002.
46. LI, X. D., HU, Y. Y. The treatment of osteomyelitis with gentamicin-reconstituted bone xenograft-composite, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 83-B, nº 7, p. 1063-1068, 2001.

47. SIVAKUMAR, M., RAO, P. K. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite–gelatin composite microspheres, *Biomaterials*, vol. 23, p. 3175-3181, 2002.
48. CHEN, M. TAN, J.; LIAN, Y.; LIU, D. Preparation of gelatin coated hydroxyapatite nanorods and the stability of its aqueous colloidal, *Applied Surface Science*, vol. 254, p. 2730-2735, 2008.
49. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edição. São Paulo: Bookman, 2002.
50. DOURADO, E. R. Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio, 2006, 128f. *Dissertação (Mestrado em processos de fabricação) – CBPF, Rio de Janeiro, 2006.*
51. AVES, E. P. Comparative study of hydroxyapatite coatings obtained by sol-gel and electrophoresis on titanium sheets, *Revista Matéria*, vol. 12 nº. 1, p. 156-163, 2007.
52. JUNIOR, W. F. A. *Apostila de Difração de Raios X*, 2004, disponível em <<http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br>>. Acesso em 20 de janeiro de 2009.
53. LAING, M. An introduction to the scope potencial and applications of X-ray analysis, *International Union of Crystallography, University College Cardiff Press, College Cardiff*, 36p. 2001.
54. WEINAND, W. R.; GONÇALVES, F. F. R.; FEIDEN, A.; BERVEGLIERI, C. I.; GRANDE, H. L. C.; LIMA, W. M. Influência da temperatura de sinterização nas propriedades físico-químicas e na microestrutura da hidroxiapatita natural obtida de ossos de peixes, *17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais - CBECiMat, Livro de Resumos, Foz do Iguaçu*, 12p. 2006.
55. MENEZHIN, C. DALCONI, M. C.; NUZZO, S.; MOBILIO, S.; WENK, R. H. Rietveld refinement n X-ray diffractions on patterns of bioapatite on human fetal bonés, *Biophysical Journal*, vol. 84, p. 2021-2029, 2003.
56. LIPSON, H. The study os metals and allows by X-ray powder diffraction methods, *International Union of Crystallography*, 18p. 2001.

57. ANGELO, L. C. Síntese e caracterização de nanocompostos hidroxiapatita-gelatina obtidos pelo método de precipitação utilizando o método de Rietveld e IVTF, 2008, 122f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
58. WEBER, C. Influência do processamento via emulsão em compósitos de hidroxiapatita-zircônia, 2007, 59f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
59. OLIVEIRA, F. P. DE, 2008: Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas a base de hidroxiapatita, 2008, 119f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
60. TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. Química Nova, vol.24, nº 6, p. 808-818, 2001.
61. SHAWN, D. J. Introdução à Química de colóides e de superfícies. São Paulo. Ed. Edgar Blucher, 1975.
62. PIMENTEL, A. S.; ARBILLA, G. Cinética não isotérmica da análise térmica dos sólidos. Química Nova, vol. 21, nº3, p.263-266, 1998.
63. VOGEL, J. B. Análise química quantitativa, 6ª ed., Rio de Janeiro, LTC, 2002.
64. CARRODÉGUAS, R.G.2000: Cimentos ósseos de fosfato de calcio. 2000, 156f. Tese (Doutorado), Universidad de La Habana, La Habana, Centro de Biomateriales, 2000.
65. TAS. A.C. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids, Biomaterials, vol. 21, p. 1429-1428, 1999.
66. FONTES, S.S.; JUNIOR, G. G. G.; SADER, M. S.; OGASAWARA, T. Análise termodinâmica aplicada ao beta-fosfato tricálcico dopado com magnésio, 51º Congresso de Cerâmica, Livro de Resumos, Salvador, 11p., 2007.

67. APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C. Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP), *Química Nova*, vol. 30, nº 4, p. 892-896, 2007.
68. FILHO, E. A.; ASSIS, C. M.; VERCIK, L. O.; GUASTALDI, A. C. Biomateriais: Deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-Cp modificada por aspensão térmica, *Química Nova*, vol. 30, nº 5, p. 1229-1232, 2007.
69. American Society for Testing and Materials - ASTM F1185-88 (Reapproved 1993) Standard specification for composition of ceramic hydroxylapatite for surgical implants.
70. CARVAJAL, J. R. Apostila: Structural analysis from powder diffraction data the Rietveld method, disponível em <http://imaisd.usc.es/riaidt/raiosx/manuais/the_rietveld_method_97.pdf>. Acesso em 20 de janeiro de 2009.
71. CASAGRANDE, S. P., BLANCO, R. C. Método de Rietveld para El estudio de estructuras cristalinas, *Laboratorio de Datación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería*, 5p. 2004.
72. MOHSENI, K. Characterization of Precipitated Calcium Carbonate (PCC) compounds on the basis of powder X-ray diffraction data, 2007, 169f. Tese (Doutorado em Ciência de Materiais), Universidade Karlsruhe, Theran, Iran, 2007.
73. MOREIRA, E. L.; EON, J.; ROSSI, A. M. 2006: Análise por difração de raio-x de uma hidroxiapatita carbonatada usando o método de Rietveld, Livro de Resumos 28º SBQ, p. 152, 2006.
74. ARAÚJO, J. C.; SENA, L.; BASTOS, I, N.; SOARES, G, D. A. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios X, *Química Nova*, vol. 30, nº 8, p. 1853-1859, 2007.
75. RIBEIRO, C.; RIGO, E. C. S.; SEPÚLVEDA, P.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A. H. A. Formation of calcium phosphate layer on ceramics with different reactivities, *Material Science and Engineering*, vol. 24, p. 631-636, 2004.

76. NARBAT, M. K.; ORANG, F.; HASHTJIN, M. S.; GOUDARZI, A. Fabrication of porous hydroxyapatite-gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering, Iranian Biomedical Journal, vol.10, nº 4, p. 215-223, 2006.
77. KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release, Journal of Biomedical Materials Research, vol. 74-B, 686-698, 2005.
78. GOUVEIA, D. S.; COUTINHO, A. C. S.; GUIMARÃES, L. M. F.; BRESSIANI, A. H. A.; BRESSIANI, J. C. Efeito da velocidade de adição do H_3PO_4 e da incorporação do Mg^{2+} na síntese do HA, 51º Congresso de Cerâmica, Livro de Resumos, Salvador, 12p., 2007.
79. LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; VICHI, L.; SANDRI, M. Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite. Biomaterials, vol. 25, p. 1763-1770, 2004.
80. MOSTAFA, N. Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. Materials, Chemistry and Physics, vol.94, p.333-341, 2005.
81. DIAS, K. S.; ALMEIDA, D. S.; SILVA, A. B. L.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; CARVALHO, A. C. S. ANTONIOLLI, A. R.; MARÇAL, R. M. Avaliação dos efeitos miorelaxante, antiespasmódico e antinociceptivo do extrato aquoso da *Phoradendron piperoides*. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol.17, p. 373-377, 2007.
82. SILVA, A. B. L.; DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. Revista Brasileira de Farmacognosia, vol.16, p. 475-479, 2006.
83. CAMPOS, G. M. Estatística prática para docentes e pós-graduandos, disponível em http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro_cap13.html < Acesso em 12 de junho de 2009.
84. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Biblioteca Central Prof. Faris Michaele. Manual de normalização bibliográfica para trabalhos científicos, Ponta Grossa, UEPG, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)