



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
MATERIAIS**

**JOELANE MARIA DE CARVALHO TEIXEIRA**

**PRODUÇÃO DE COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA - ALUMINA UTILIZADO  
COMO SISTEMA PARA LIBERAÇÃO DE AMPICILINA**

**FORTALEZA**

**2018**

JOELANE MARIA DE CARVALHO TEIXEIRA

PRODUÇÃO DE COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA - ALUMINA UTILIZADO  
COMO SISTEMA PARA LIBERAÇÃO DE AMPICILINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciências de Materiais.

Área de concentração: Processos de Transformação e Degradação dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira.

Coorientador: Prof. Dr. José Silvio Veras Albuquerque.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

T266p Teixeira, Joelane Maria de Carvalho.  
Produção de compósitos de Hidroxiapatita - Alumina utilizado como sistema para liberação de Ampicilina / Joelane Maria de Carvalho Teixeira. – 2018.  
126 f. : il. Color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira.  
Coorientação: Prof. Dr. José Silvio Veras Albuquerque.

1. Biocerâmicas. 2. Hidroxiapatita. 3. Compósito. 4. Fármaco. I. Título.

CDD 620.11

---

JOELANE MARIA DE CARVALHO TEIXEIRA

PRODUÇÃO DE COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA - ALUMINA UTILIZADO  
COMO SISTEMA PARA LIBERAÇÃO DE AMPICILINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciências de Materiais.

Área de concentração: Processos de Transformação e Degradação dos Materiais.

Aprovada em: 13 /11 /2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ricardo Emílio Ferreira Quevedo Nogueira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Silvio Veras Albuquerque (Co-Orientador)  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Marcelo José Gomes da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Antônio Sérgio Bezerra Sombra  
Universidade Federal de Campina Grande (UFC)

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook  
Universidade Federal do Ceará (UFCG)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Chastinet Braga  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Ao meu Pai eterno e soberano Deus.

À Nossa Senhora de Fátima.

À minha mãe por tudo que representa em  
minha vida.

À minha avó Neusa, *in memoriam*, por todo  
amor que dela recebi e pelo exemplo de  
força e fé que sempre serão os princípios  
da minha vida.

Essa conquista é nossa!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida, pela força, saúde, inspiração e coragem para vencer mais esta etapa em minha vida, enfim por tudo que me proporcionou e tem proporcionado e à Nossa Senhora de Fátima, minha Santa de devoção pela força e presença em todos os momentos de desânimo.

À minha mãe Socorro por tanto sacrifício em prol da minha educação e formação acadêmica, pelo incentivo e palavras de ânimo e principalmente por acreditar em mim. Agradeço por sempre estar do meu lado, apoiando minhas decisões, rezando e torcendo pelo meu sucesso.

À minha irmã Joelma e aos meus sobrinhos Pedro Henrique e Lara pelos momentos de descontração e fonte inesgotável de alegria. Essa conquista é nossa!

À todos os meus familiares, em especial à minha tia Ceiça, por sempre me apoiar, incentivar nos meus estudos e por me ajudar nos momentos que mais precisei.

Ao meu orientador Prof. Ricardo Emílio, por mais uma vez ter a oportunidade de ser sua orientanda, pela paciência e incentivo nas horas de desânimo, pela amizade e por seu grande exemplo de humildade.

Ao co-orientador Silvio Veras, pela persistência e confiança neste trabalho nos momentos de dificuldade, pelas discussões e sugestões enriquecedoras na área de biomateriais que muito colaboraram para o meu aprendizado, pelo incentivo e pela paciência ao longo desses últimos anos. Serei eternamente grata!

À minha grande amiga e companheira de laboratório Suely, pelo ombro amigo que tanto precisei nos momentos difíceis e nas alegrias compartilhadas.

Às companheiras que cultivei desde a época do mestrado: Carol, Kamila, Rafaela e Juliane pela excelente convivência, pela amizade e pelo apoio nos momentos de dificuldades.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais por todo o conhecimento transmitido durante as aulas.

Aos laboratórios da UFC (Raios-X, Central Analítica, Materiais Funcionais Avançados, Bioinorgânica e Magnetismo e Materiais Magnéticos) pela colaboração ao desenvolvimento deste trabalho, com análises e pela ajuda através de seus colaboradores.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Materiais pela oportunidade a que me foi concedida, especialmente ao coordenador Dr. Cleiton Carvalho Silva.

Aos professores participantes da banca examinadora: Dr. Marcelo José Gomes da Silva, Dr. Antônio Sérgio Bezerra Sombra, Dr. Marcus Vinícius Lia Fook e Dr<sup>a</sup>. Renata Chastinet Braga pela disponibilidade.

À FUNCAP pelo incentivo financeiro concedido.

Aos amigos/irmãos de todas as horas: Fernando, Lara, Ylton e Tamiris por me fazerem crer nas relações de amizade, pois mesmo distantes sempre estiveram presentes, pelo apoio, companheirismo e pelo ombro amigo nas horas de desânimo.

Às minhas amigas Adriana e Betinha pelo carinho, incentivo e pela hospedagem em seu apartamento durante essa etapa final.

Às minhas amigas do IF-sertão campus Ouricuri: Aguida, Elisangela, Milka, Tathy e Rafaela, que acompanharam um pouco desta jornada. Obrigada pelo companheirismo, amizade, incentivo e orações.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

Abraham Lincoln



## RESUMO

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por não apresentarem toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações e aparente habilidade em interagir com o tecido hospedeiro. Dentre este grupo destaca-se a Hidroxiapatita (HA), que é um dos biomateriais a base de fosfato de cálcio mais investigados na pesquisa acadêmica, devido à sua semelhança com a fase inorgânica dos ossos e por apresentar propriedades osteocondutivas. Entre outras aplicações, a hidroxiapatita pode ser utilizada para liberar substâncias ativas no corpo humano, como antibióticos. De todos os biomateriais que possam ser combinados com a hidroxiapatita para melhorar as suas propriedades mecânicas, a Alumina é um material cerâmico que se caracteriza pela sua biocompatibilidade e dureza. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de Compósitos Hidroxiapatita/Alumina em diferentes proporções para determinar através de suas caracterizações qual o compósito que apresenta propriedades semelhante ao osso esponjoso para ser utilizado como sistema de liberação de ampicilina. Os pós sintetizados e sinterizados foram caracterizados por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho (IV), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e determinação do tamanho médio de partículas (BET). Também foi realizado o ensaio de citotoxicidade seguindo as normas ISO 10993-5 e ISO 10993-12. Os compósitos foram caracterizados por Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH), Porosidade Aparente e Resistência à Compressão Diametral. Após a caracterização dos compósitos foi utilizado a amostra HA-15 para incorporação e liberação de ampicilina. O estudo mostrou perfis de liberação diferenciados. Esses resultados podem ser interessantes, pois permite que esse dispositivo de liberação possa ser destinado a diferentes aplicações clínicas que necessitam de tempos distintos para tratamento.

**Palavras-chave:** Biocerâmicas. Hidroxiapatita. Compósito. Fármaco.

## ABSTRACT

Calcium phosphate ceramics have deserved prominence among so-called bioceramics because they lack local or systemic toxicity, absence of foreign body responses or inflammations, and apparent ability to interact with the host tissue. Among this group, the most important is hydroxyapatite (HA), which is one of the calcium phosphate-based biomaterials most investigated in academic research, due to its similarity to the inorganic phase of bones and to have osteoconductive properties. Among other applications, hydroxyapatite can be used to release active substances into the human body, such as antibiotics. Of all the biomaterials that can be combined with hydroxyapatite to improve its mechanical properties, Alumina is a ceramic material characterized by its biocompatibility and hardness. The objective of this work was to obtain Hydroxyapatite / Alumina Composites in different proportions to determine through their characterizations the composite that presents properties similar to the spongy bone to be used as an ampicillin release system. The sintered and sintered powders were characterized by X-ray Diffraction (XRD), Infrared Spectroscopy (IR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and the determination of mean particle size (BET). The cytotoxicity assay was also carried out in accordance with ISO 10993-5 and ISO 10993-12. The Composites were characterized by X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Determination of Hydrogenion Potential (pH), Apparent Porosity and Resistance to Diametral Compression. After characterization of the composites, the HA-15 sample was used for incorporation and release and ampicillin. The study showed differentiated release profiles. These results may be of interest because it allows this release device to be intended for different clinical applications requiring different treatment times.

**Keywords:** Bioceramics. Hydroxyapatite. Composite. Drug.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	– Aplicações dos biomateriais .....	20
Figura 2.2	– Estrutura da célula unitária da hidroxiapatita .....	24
Figura 2.3	– Arranjo da estrutura óssea em macro e nano-escala .....	32
Figura 2.4	– Esquema do Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.....	34
Figura 2.5	– Parâmetros que governam a capacidade de carregamento de moléculas biologicamente ativas. ....	36
Figura 2.6	– Representação do anel $\beta$ -lactâmico presente em todo o grupo. ....	38
Figura 2.7	– Estrutura da Ampicilina.....	40
Figura 2.8	– Representação esquemática dos seis tipos de isothermas de adsorção .....	49
Figura 2.9	– Tipos de laços ou loop de histerese presentes tipicamente nas isothermas de adsorção tipo IV e V. ....	50
Figura 2.10	– Distribuição de tensão e secção transversal em uma amostra submetida a ensaio de compressão diametral .....	52
Figura 3.1	– Fluxograma com as etapas da síntese da hidroxiapatita pelo método sol-gel.....	65
Figura 3.2	– Molde cilíndrico de aço carbono usado na prensagem dos pós.....	66
Figura 3.3	– Curva de calibração da ampicilina .....	73
Figura 4.1	– Difratoograma de raios X do pó não sinterizado.....	77
Figura 4.2	– Difratoograma de raios X do pó precursor sinterizado à 1200°C	78
Figura 4.3	– Difratoograma de raios X para a amostra HA-05 sinterizada à 1200°C.....	79
Figura 4.4	– Difratoograma de raios X para a amostra HA-15 sinterizada à 1200°C.....	80

Figura 4.5	– Difratoograma de raios X para a amostra HA-30 sinterizada à 1200°.....	81
Figura 4.6	– Análise por Infravermelho IV da amostra não sinterizada.....	82
Figura 4.7	– Espectroscopia de Infravermelho da amostra HA-05.....	83
Figura 4.8	– Espectroscopia de Infravermelho da amostra HA-15 .....	84
Figura 4.9	– Espectroscopia de Infravermelho da amostra HA-30 .....	84
Figura 4.10	– Microscopia Eletrônica de Varredura do pó sinterizado à 1200 °C. ....	85
Figura 4.11	– Microscopia eletrônica de varredura referente à amostra HAp-15. ....	86
Figura 4.12	– Microscopia eletrônica de varredura referente à amostra HAp-30.....	87
Figura 4.13	– Distribuição de tamanho de poros da amostra HA-05.....	88
Figura 4.14	– Distribuição de tamanho de poros da amostra HA-15.....	90
Figura 4.15	– Distribuição de tamanho de poros da amostra HA-30.....	90
Figura 4.16	– Isotermas de adsorção de N <sub>2</sub> para o HA-05.....	91
Figura 4.17	– Isotermas de adsorção de N <sub>2</sub> para o HA-15. ....	92
Figura 4.18	– Isotermas de adsorção de N <sub>2</sub> para o HA-30.....	92
Figura 4.19	– Representativa do poço controle com as células (NCTC Clone L929). em meio de cultura MEM.Aumento de 10x. ....	93
Figura 4.20	–Representativa do poço de células (NCTC Clone L929) incubadas com a substância teste HA. Aumento de 10x.....	94
Figura 4.21	– Representativa do poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM.....	95
Figura 4.22	– Representativa do poço de células (NCTC clone L929), incubadas com a substância de referência Zdec .....	96
Figura 4.23	– Classificação de citotoxicidade de acordo com a porcentagem de viabilidade celular, segundo a ISO 10993-5.....	96

Figura 4.24 – Representativa do poço controle com as células (NCTC Clone L929). em meio de cultura MEM. Aumento de 10X. ....	98
Figura 4.25 – Representativa do poço de células (NCTC Clone L929) incubadas com a substância teste HA-15. Aumento de 10x .....	99
Figura 4.26 – Representativa do poço de células (NCTC clone L929), incubadas com a substância de referência Zdec.....	99
Figura 4.27 – Ensaio de pH dos compósitos HA/ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	100
Figura 4.28 – Ensaio de porosidade aparente dos compósitos HA/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	102
Figura 4.29 – Ensaio de resistência à compressão diametral dos compósitos HA/15 .....	103
Figura 4.30 – Perfil de liberação do antibiótico em função do tempo de imersão em PBS do compósito HA -15 .....	110
Figura 4.31 –Taxa de liberação de ampicilina do compósito HA -15.....	110
Figura 4.32 – Modelo de Higuchi para o estudo da liberação da ampicilina no compósito HA-15 .....	111
Figura 4.33 – Modelo de Korsmeyer -Peppas para o estudo da liberação da ampicilina no compósito HA -15 .....	112

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	– Classificação dos fosfatos de cálcio segundo a razão Ca/P. ....	22
Tabela 2.2	– Composição do tecido ósseo. ....	30
Tabela 2.3	– Propriedades mecânicas do tecido ósseo .....	31
Tabela 2.4	– Bandas de absorção de IV para apatitas .....	44
Tabela 2.5	– Notações e organização dos dados para aplicação do método ANOVA. ....	59
Tabela 2.6	– Análise de variância (ANOVA) .....	63
Tabela 3.1	– Análise qualitativa de danos celulares seguindo a norma ISO 10993-5. ....	69
Tabela 3.2	– Relação entre o valor n e o mecanismo de liberação controlada. ....	76
Tabela 4.1	– Resultados de adsorção de N <sub>2</sub> .....	89
Tabela 4.2	– Classificação de citotoxicidade de acordo com a porcentagem de viabilidade celular, segundo a ISO 10993-5. ....	97
Tabela 4.3	– Planilha de dados pH dos tratamentos dos compósitos HA/ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	101
Tabela 4.4	– Análise de variância do pH dos compósitos HA/ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	102
Tabela 4.5	– Planilha de dados da porosidade aparente dos tratamentos dos compósitos HA/ Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	103
Tabela 4.6	– Resultado da análise estatística da porosidade aparente. ....	104
Tabela 4.7	– Teste de Tukey-Kramer correspondente a porosidade dos compósitos HA/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . ....	104
Tabela 4.8	– Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos compósitos HA/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . ....	106
Tabela 4.9	– Análise de variância da resistência à tração por compressão diametral dos quatro níveis .....	107
Tabela 4.10	– Teste de Tukey-Kramer correspondente a resistência à compressão diametral dos compósitos .....	107

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Objetivos</b> .....	15
<b>1.1.1</b>	<b>Geral</b> .....	15
<b>1.1.2</b>	<b>Específicos</b> .....	15
<b>1.3</b>	<b>Justificativa</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Biomaterias</b> .....	18
<b>2.1.1</b>	<b>Biocerâmicas</b> .....	20
<b>2.1.1.1</b>	<i>Hidroxiapatita</i> .....	23
<b>2.1.1.2</b>	<i>Síntese da hidroxiapatita pelo método sol- gel</i> .....	26
<b>2.1.2</b>	<b>Alumina</b> .....	28
<b>2.2</b>	<b>Tecido Ósseo</b> .....	29
<b>2.3</b>	<b>Liberação controlada de fármacos</b> .....	33
<b>2.3.1</b>	<b>Hidroxiapatita na liberação controlada de fármacos</b> .....	35
<b>2.4</b>	<b>Antibióticos <math>\beta</math>-lactâmicos</b> .....	37
<b>2.4.1</b>	<b>Ampicilina</b> .....	39
<b>2.5</b>	<b>Técnicas de Caracterização de Biomateriais</b> .....	40
<b>2.5.1</b>	<b>Difração de raios x (DRX)</b> .....	41
<b>2.5.2</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho (IV)</b> .....	42
<b>2.5.3</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	44
<b>2.5.4</b>	<b>Área superficial Específica (BET)</b> .....	46
<b>2.5.5</b>	<b>Porosidade através do método de Archimedes</b> .....	50
<b>2.5.6</b>	<b>Resistência à compressão diametral</b> .....	52
<b>2.6</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade</b> .....	53
<b>2.7</b>	<b>Análise de Variância (ANOVA)</b> .....	56
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	64
<b>3.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	64
<b>3.2</b>	<b>Métodos</b> .....	64
<b>3.2.1</b>	<b>Síntese dos pós Hidroxiapatita</b> .....	64
<b>3.2.2</b>	<b>Produção dos compósitos (HA/Alumina)</b> .....	65

3.3	<b>Caracterização dos Pós Sintetizados .....</b>	66
3.3.1	<b><i>Difração de raios X (DRX) .....</i></b>	66
3.3.2	<b><i>Espectroscopia de infravermelho .....</i></b>	67
3.3.3	<b><i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....</i></b>	67
3.3.4	<b><i>Determinação da Distribuição do Tamanho de Partículas (BET).....</i></b>	68
3.3.5	<b><i>Ensaio In Vitro: Citotoxicidade .....</i></b>	68
3.4	<b>Caracterização dos Compósitos .....</b>	70
3.4.1	<b><i>Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH) .....</i></b>	70
3.4.2	<b><i>Porosidade Aparente .....</i></b>	70
3.4.3	<b><i>Resistência à Compressão Diametral .....</i></b>	71
3.5	<b>Análise Estatística .....</b>	71
3.6	<b>Estudo da Liberação de Ampicilina nos compósitos .....</b>	72
3.6.1	<b><i>Avaliação da Cinética de Liberação do Fármaco .....</i></b>	74
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	77
4.1	<b>Caracterização Físico-Química .....</b>	77
4.1.1	<b><i>Difração de Raios X (DRX) .....</i></b>	77
4.1.2	<b><i>Espectroscopia de Infravermelho (IV) .....</i></b>	81
4.1.3	<b><i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....</i></b>	85
4.1.4	<b><i>Determinação da Distribuição do Tamanho de Partículas (BET) .....</i></b>	88
4.1.5	<b><i>Citotoxicidade in vitro .....</i></b>	94
4.2	<b>Caracterização dos compósitos .....</b>	101
4.2.1	<b><i>Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH) e Análise Estática</i></b>	101
4.2.2	<b><i>Porosidade Aparente e Análise Estática .....</i></b>	103
4.2.3	<b><i>Resistência à Compressão Diametral .....</i></b>	105
4.3	<b>Estudo da Liberação de Ampicilina nos compósitos .....</b>	109
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	115
6	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	116
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	117



## 1 INTRODUÇÃO

O interesse atual pelo desenvolvimento e aplicação de materiais na área biomédica, especialmente aqueles destinados à restauração ou reconstrução de partes e/ou funções do corpo, tem motivado um grande número de estudos e pesquisas.

Entre os diversos materiais pesquisados, pode-se encontrar alguns tipos de fosfatos de cálcio, metais, cerâmicas, polímeros, plásticos, compósitos, vidros e cerâmicas vítreas. Cada um desses biomateriais, como são comumente chamados, apresenta características próprias que os tornam adequados para o uso em determinadas regiões do organismo (VALLET-REGÍ, 2010). Independente da aplicação, é essencial que o biomaterial seja utilizado de uma maneira segura, confiável, econômica e biologicamente aceitável.

Neste contexto, os fosfatos de cálcio evidenciam-se como excelentes biomateriais por apresentarem biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade (GUO *et al.*, 2013). Dentre este grupo destaca-se a Hidroxiapatita (HA), que é um dos biomateriais a base de fosfato de cálcio mais investigados na pesquisa acadêmica, devido à sua semelhança com à fase inorgânica dos ossos e por apresentar propriedades osteocondutivas, bem como ausência de toxicidade local e sistêmica (ARCOS e VALLET-REGÍ, 2013).

A Hidroxiapatita ocupa posição de destaque por sua larga aplicação no campo da medicina, como enxerto ósseo. Dependendo de sua pureza, pode suportar aquecimentos superiores a 1200°C, sem se decompor, podendo também ser moldado com relativa facilidade. A Hidroxiapatita é frágil, como a maioria dos materiais cerâmicos, e apresenta baixa resistência mecânica (GOMIDE, 2005).

De todos os biomateriais que possam ser combinados com a HA para melhorar as suas propriedades mecânicas, a Alumina é um material cerâmico que se caracteriza pela sua excelente biocompatibilidade e dureza. Assim, um material composto HA - Alumina tem um grande potencial no campo de substituição óssea graças à combinação das propriedades das duas fases (FERNANDÉZ, 2010).

Uma aplicação que vem ganhando importância, atualmente, é a utilização desses biomateriais com a incorporação de fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios e outros) visando a sua liberação controlada em organismos vivos. Assim, a

incorporação de fármacos em biomateriais implantáveis apresenta a vantagem da liberação do medicamento diretamente no tecido danificado, em concentrações desejadas. Isto resolve o problema do reduzido efeito terapêutico da administração no modo convencional ou sistêmico, já que o tecido ósseo apresenta uma limitada circulação sanguínea e limita os efeitos colaterais. Outras vantagens são a não exigência de posterior cirurgia para remoção do implante após a liberação total do fármaco, menor frequência na administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e a eficácia do tratamento (WANG, 2009).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Geral**

Este trabalho tem como objetivo a síntese de pós de hidroxiapatita via processo sol-gel para preparação de compósitos de Hidroxiapatita/Alumina a serem utilizados como sistema de incorporação e liberação de fármaco.

### **1.1.2 Específicos**

- ✓ Obtenção e caracterização de Hidroxiapatita no processo sol-gel;
- ✓ Obter compósitos a base de hidroxiapatita e alumina variando a concentração de alumina;
- ✓ Investigar as propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas dos compósitos;
- ✓ Estudar a incorporação e liberação da Ampicilina no carreador.

## 1.2 Justificativa

Os estudos de biomateriais sintéticos aplicados a sistemas biológicos trazem inúmeros benefícios para a prevenção e tratamento de doenças, sobretudo aumentando a qualidade de vida da população. As biocerâmicas constituintes de fosfatos de cálcio se destacam por:

- Excelente biocompatibilidade;
- Não apresentar toxicidade sistêmica;
- Natureza biodegradável em pH fisiológico;
- Facilidade em adsorver íons e moléculas.

Todas essas características combinadas demonstram a potencialidade de aplicações dos fosfatos de cálcio em diversos sistemas desenvolvidos para fins terapêuticos na medicina (ELLIOTT,1998).

Os estudos sobre as biocerâmicas com base nos fosfatos de cálcio têm produzido avanços tecnológicos significativos, em especial no que tange à liberação controlada de fármacos no tratamento não invasivo de diversos tipos de infecções (CHANG et al., 2011). Um sistema eficiente para essa finalidade precisa ser dotado de poros, com diâmetros bem definidos que sejam capazes de transportar, sem afetar atividade biológica da substância terapêutica, e realizar a liberação *in situ* sobre o tecido alvo a ser tratado com taxas conhecidas (YANG et al., 2008 ).

Segundo Medeiros (2011), os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam diversas vantagens comparando-se aos sistemas convencionais de administração de princípios ativos, como: especificidade, melhor controle da administração, liberação com uma velocidade controlada durante períodos de tempo prolongados e redução de efeitos adversos. Desta forma, garante melhor eficiência terapêutica devido à liberação em condições específicas, e assim direcionamento a órgãos alvos e degradação controlada do fármaco.

O fármaco escolhido para esse trabalho foi a Ampicilina em virtude de sua conhecida utilização no tratamento de osteomielite. Contudo seu uso na forma oral pode causar efeitos colaterais tais como glossite, estomatite, náusea, vômito, enterocolite, colite pseudomembranosa e diarreia.

Assim, no caso de osteomielite, por exemplo, a incorporação de Ampicilina

em biomateriais destinados a enxertos provavelmente será vantajosa por minimizar esse tipo de desconforto para o paciente, visto que o fármaco é liberado diretamente no sítio de ação.

A substituição dos fármacos livres pelos de liberação controlada é uma tendência cada vez mais forte na medicina.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biomaterias

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais da Sociedade Européia de Biomateriais para aplicações clínicas ocorrida em 1982, na cidade de Chester (Inglaterra), os biomateriais são conceitualmente descritos como “toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais” (WILLIAMS, 1987).

Para que qualquer desses materiais seja inserido no corpo humano ele requer algumas propriedades fundamentais as quais determinam a viabilidade de seu uso como biocompatibilidade, biofuncionalidade e durabilidade.

De acordo com Williams (1991), A biocompatibilidade pode ser considerada a condição fundamental para que qualquer material possa ser utilizado como biomaterial, ela é conceituada como a capacidade de um material a responder de maneira adequada uma aplicação específica, sem causar qualquer reação indesejada ao organismo, assim, por exemplo, um biomaterial não deve causar reações inflamatórias no corpo humano.

A biofuncionalidade é a capacidade que o material possui em desempenhar uma função desejada, ou seja, ele deve resistir e suportar solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração. Por exemplo, um implante metálico deve resistir à corrosão eletroquímica não alterando assim sua resistência mecânica (BOSCHI, 1996), e por último deve apresentar durabilidade o que esta relacionado a capacidade de degradação do implante no meio biológico.

O material não deve apresentar potencial tóxico, carcinogênico ou corrosivo, oferecer custo relativamente baixo, ser de fácil reprodução, e principalmente, suas propriedades não devem ser afetadas durante sua utilização *in vivo* (MORAIS; GUIMARÃES; ELIAS, 2007).

Na perspectiva de interação com o meio biológico os biomateriais podem ser divididos de acordo com a resposta do tecido hospedeiro em três classes principais: biotoleráveis, bioinertes e bioativos (HENCH, 1999):

(A) Biotoleráveis: materiais tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos, como o Polietileno de Alta Densidade Linear (PEAD) utilizado na cabeça de próteses femorais, assim como a grande maioria dos metais.

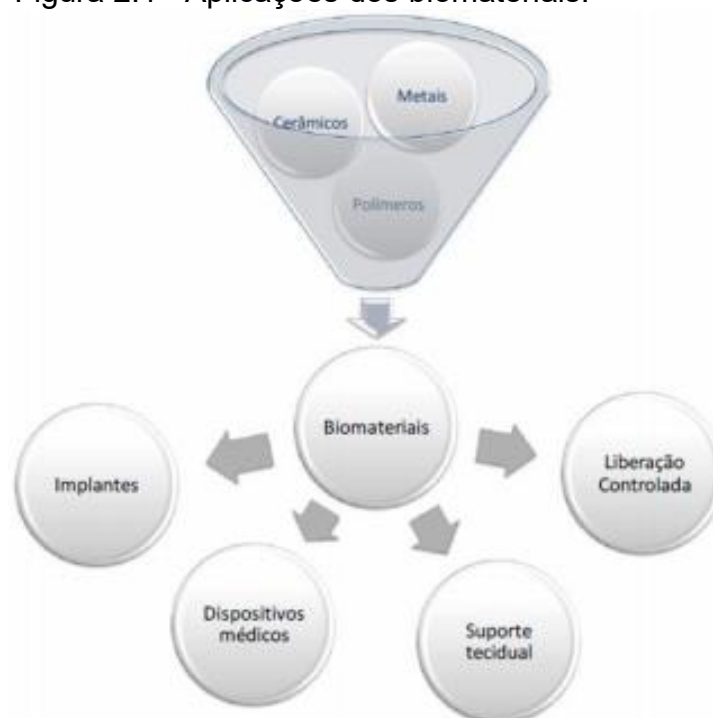
(B) Bioinertes: materiais também tolerados pelo organismo, em que a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

(C) Bioativos: materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração), em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea. 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.

A diversidade das aplicações dos biomateriais, assim como o amplo espectro de sua composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade e esterilidade clínica e resposta do tecido hospedeiro (KAWCHI et al., 2000). A Figura 2.1 mostra as principais aplicações dos biomateriais.

Podem ser utilizados como biomateriais os materiais poliméricos, metálicos, cerâmicos e compósitos, atendendo a uma vasta gama de aplicações como: desenvolvimento de dispositivos médicos (biossensores, marcapassos, etc), construção de suportes celulares que guiem a regeneração óssea, desenvolvimento de dispositivos que tenham a reabsorção “in vivo” controlada e permitam a liberação gradativa de drogas (MONTEIRO, et al., 2004; GINEBRA et al. 2012; ARCOS; REGI , 2013).

Figura 2.1 - Aplicações dos biomateriais.



Fonte: MONTEIRO, et al., 2004.

### 2.1.1 Biocerâmicas

São denominadas biocerâmicas a classe das cerâmicas empregadas no reparo e reconstrução de partes doentes ou danificadas de sistemas biológicos. Sua aplicação na área biomédica iniciou-se de maneira empírica no século XX, mas foram nas últimas quatro décadas que pesquisas sistemáticas, industriais e universitárias alavancaram o desenvolvimento de novos materiais no sentido de se melhor aproveitar as propriedades dos materiais cerâmicos como biomateriais (THAMARAISELV et al., 2004).

Atualmente as biocerâmicas proporcionam um leque de aplicações, a maioria relacionada à área do sistema ósseo, por exemplo, para implantes periodontais e enxertos. No entanto, alguns tipos de biocerâmicas ainda dispõem de capacidade de entrega de liberação de fármacos (VALLET-REGÍ, 2011).

Segundo Zavaglia (2003), as biocerâmicas têm sido empregadas tanto na forma porosa, bem como em grânulos. A forma de emprego da biocerâmica depende

da finalidade em que esta vai ser empregada. A porosidade é um fator importante e que leva à melhor integração entre o tecido vivo e o implante. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material, a existência de poros com determinadas dimensões pode favorecer o crescimento do tecido com o implante. Com isto, aumenta a resistência do material *in vivo*. Na forma porosa, os implantes aceleram o processo de cura, já que permitem o crescimento progressivo de colágeno e a seguinte mineralização de tecido ósseo através dos poros abertos e interconectados.

Os fosfatos de cálcio são formados basicamente pelos íons cálcio e fosfatos, similares aos componentes minerais dos ossos e dentes, permitindo a sua influência sobre os tecidos biológicos. Os seus comportamentos de biodegradação e interação são determinados pela sua composição química, pela morfologia e topologia da superfície (MOUTHUY et al., 2013; BOUTINGUIZA et al., 2012). Comumente, os vários fosfatos de cálcio são classificados a partir de sua razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), conforme Tabela 2.1 Os fosfatos de cálcio possuem razão molar variante de 0,5 a 2,0 e podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções que contenham íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas (KAWACHI et al., 2000).



Tabela 2.1 Classificação dos fosfato de cálcio segundo a razão Ca/P.

Ca/P	Fórmula	Composto	Abreviação
2,0	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato Tetracálcico	TTCP
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	HÁ
1,50	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	TCP
1,50	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de Cálcio Amorfo	ACP
1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato Octacálcico	OCP
1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato Bicálcico Dihidratado (Brushita)	DCPD
1,0	$\text{CaHPO}_4$	Fosfato Bicálcico (Monetita)	DCP
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de Cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	CPP
1,0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de Cálcio Dihidratado.	CPPD
0,7	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	Fosfato Heptacálcico	HCP
0,67	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Fosfato Dihidrógeno Tetracálcico	TDHP
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato Monocálcico Monohidratada	MCPM
0,5	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	Meta Fosfato de Cálcio	CMP

Fonte: RATNER, 1996.

Segundo Santos (2002), a solubilidade é uma das mais importantes propriedades dos compostos de fosfato de cálcio, sendo um parâmetro importante para seu comportamento *in vivo*. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade, ou seja, há uma redução da razão de degradação destas biocerâmicas. A reabsorção do material que representa esta degradação é causada pela dissolução, que por sua vez, depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, da desintegração física em moléculas menores e, ainda, de fatores biológicos, como a presença de agentes de fagocitose, leucócitos e mediadores químicos responsáveis pela diminuição do pH local.

Nesse sentido, em pH fisiológico, a solubilidade dos fosfatos de cálcio e, conseqüentemente, sua degradação *in vivo*, é descrita pela seguinte ordem: MCPM >  $\alpha$ -TCP > DCPD > DCP > OCP >  $\beta$ -TCP > HA. A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial, com a diminuição da cristalinidade e do tamanho de grão (SANTOS, 2002).

As principais limitações do uso de fosfatos de cálcio como biomateriais faz referência à sua fragilidade e baixa resistência mecânica, de forma que não podem ser utilizados em regiões que demandem grande esforço mecânico. No entanto, os fosfatos de cálcio são adequados para várias aplicações, incluindo o preenchimento de defeitos ósseos, reconstrução óssea (especialmente em cirurgia maxilofacial), substituições ósseas, transportadores de fármacos (antibióticos, fármacos anticancerígenos, fatores de crescimento) e revestimentos de próteses metálicas (FOOK, 2010; APARECIDA, 2010).

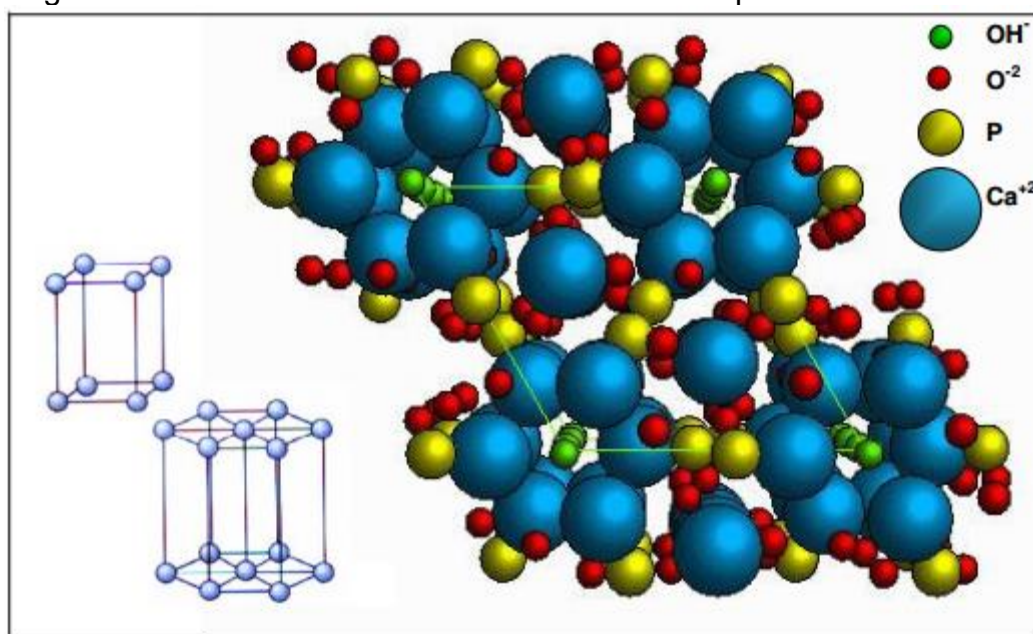
#### 2.1.1.1 Hidroxiapatita

A Hidroxiapatita (HA) apresenta fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  com razão Ca/P=1,67. Ela representa a principal fase mineral constituinte dos ossos e dentes humanos, e contém cerca de 90% de todo o cálcio do corpo humano. A HA é a fase de apatita mais estudada na área de biomateriais, devido a essa similaridade com parte do corpo humano além de sua biocompatibilidade e bioatividade. As principais aplicações da hidroxiapatita são: reparo de defeitos ósseos e em odontologia e ortopedia como recobrimento de implantes metálicos melhorando, assim, a bioatividade desses (DOROZHKIN, 2009).

A Hidroxiapatita é um composto de cristalografia definida, possui estrutura com grupo espacial  $P6_3/m$  e dimensões de célula unitária com eixo  $a = b = 0,9422$  nm e eixo  $c = 0,6880$  nm. A célula unitária hexagonal da HA contém 10 íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) localizados em sítios não equivalentes (Ca1 e Ca2). No sítio Ca1 quatro  $\text{Ca}^{+2}$  estão alinhados em coluna, enquanto no sítio Ca2 estão alinhados em triângulos equiláteros perpendiculares à direção  $c$  da estrutura e os íons  $\text{Ca}^{2+}$  ocupam duas posições diferentes. Os grupos  $\text{OH}^-$  estão ordenados no eixo  $c$  (Jones, 2001). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons  $\text{O}^{2-}$  e de íons  $\text{Ca}^{+2}$  estão ligados entre si por íons fosfato. Dos quatro átomos que constituem os grupos

fosfatos dois estão situados em planos perpendiculares à direção c e os outros dois são paralelos a esta direção, como mostra a Figura 2.2.

Figura 2.2 - Estrutura da célula unitária da hidroxiapatita



Fonte: Adaptado de ELLIOTT, 1994.

Segundo Aparecida (2010), assim como as outras fases de apatitas a HA podem sofrer uma grande quantidade de substituições catiônicas e aniônicas sendo capaz de incorporar quase metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Íons  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono e divalentes: a substituição mais comum é por  $\text{Na}^+$ . A diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Íons  $\text{PO}_4^{3-}$  podem ser substituídos principalmente por íons,  $\text{CO}_3^{2-}$ , e os íons  $\text{OH}^-$  por íons  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Essa facilidade de trocas faz com que a HA atue como um sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais através de sua liberação ou armazenamento. Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA, que por sua vez alteram a degradação e o comportamento *in vivo*.

Apesar das várias vantagens para regeneração óssea, seu uso nessa área é limitado, pois ela possui uma lenta velocidade de degradação no meio biológico.

Nesse caso o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. Assim, a formação de novo tecido ósseo é lenta. Estudos mostram que essa lenta degradação da hidroxiapatita é uma vantagem para que ela atue como plataforma de liberação controlada de fármacos já que o tempo de liberação do medicamento depende do tempo de liberação da matriz inorgânica (SUN, 2009).

A maioria dos medicamentos utilizados possui grande quantidade de grupos com polaridade negativa, e uma vez em contato com a hidroxiapatita esses grupos sentem forte atração dos átomos de cálcio com polaridade positiva (dipolodipolo) (OKADA, 2009).

A Hidroxiapatita porosa tem sido amplamente utilizada como substituinte ósseo. Ela apresenta forte ligação ao osso. Além disso, os poros fornecem um encaixe mecânico levando a uma fixação mais firme do material (Suchanek e Yoshimura, 1998).

A porosidade surge como a propriedade mais importante deste material. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento do tecido através do material, o que aumenta sua resistência in vivo (Hench 1998). Entretanto, mesmo não sendo osteoindutora, a HA estimula a síntese de colágeno, mostrando uma neoformação óssea na interface osso-HA que morfologicamente pode ser comparável aos locais normais de remodelação óssea (NAGEM, 2006).

O diâmetro mínimo dos poros exigidos para o crescimento interior do osso e angiogênese em um arcabouço é aproximadamente de 100 $\mu$ m (NAGEM, 2006). Um tamanho ótimo do poro para melhor aderência, diferenciação e crescimento dos osteoblastos e para maior vascularização é quando o diâmetro dos poros está entre 300  $\mu$ m a 400  $\mu$ m (TSURUGA et al., 1997).

A hidroxiapatita é produzida por uma série de reações, complexas e demoradas, de sinterização do carbonato de cálcio com o ácido fosfórico. Ao final dessas reações de síntese, se obtêm as apatitas na forma de um pó, isto é, constituídas por um aglomerado de partículas em simples justaposição, mantidas juntas por ligações muito fracas (NAGEM, 2006).

Dois tipos de hidroxiapatitas podem ser produzidos: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes, e as HAs

sintetizadas em baixas temperaturas, que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos e possuem características similares às do tecido ósseo e dentário, diferente da HA sintetizada a altas temperaturas. A temperatura de sinterização apresenta um efeito bastante evidente sobre a porosidade, sendo que, ao aumento da temperatura corresponde uma redução na porosidade da HA e que as sinterizadas a temperaturas menores apresentam maior porcentagem de porosidade (NAGEM,2006).

#### *2.1.1.2 Síntese da hidroxiapatita pelo método sol-gel*

O termo sol é geralmente usado para definir uma dispersão de partículas coloidais, com dimensões entre 1 e 100 nm, estável em um fluido. As partículas coloidais não se difundem através de membranas semipermeáveis como acontece no caso de soluções verdadeiras (MAMANI, 2009). O termo gel define um sistema formado pela estrutura rígida tridimensional de partículas coloidais ou de cadeias poliméricas, que imobiliza o solvente formando um estado intermediário entre um sólido e líquido. O termo gel, aplicado a precipitados gelatinosos, forma-se quando uma substância muito pouco solúvel é rapidamente precipitada. A formação do gel é devida a precipitação incompleta de um sol. Na formação de um gel, as partículas coloidais do sol se unem formando fibras, que se entrelaçam formando um sólido poroso.

A utilização do processo sol-gel para a síntese de HA tornou-se objeto importante de pesquisa. Este processo é 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 eletivo 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 granulação fina que contém uma mistura de cristais de tamanho submícron a nano, sendo muito importante para melhorar a reação de contato e a estabilidade da interface osso artificial/natural (SANTOS et al, 2005).

Segundo Farzadi et al. (2011), o processo sol-gel possui algumas vantagens relativamente aos outros processos. A nível atómico, durante a preparação do sol, garante uma mistura molecular homogénea do cálcio e do fósforo as reações de hidrólise e condensação podem ser catalisadas por ácidos ou bases mas a sua neutralização é fácil e nunca são atingidos valores de pH extremos; não exige temperaturas de processamento muito elevadas; os pós produzidos possuem elevada reatividade o que permite uma sinterização a temperaturas mais baixas e evita a ocorrência de fenómenos de degradação que surgem para temperaturas elevadas; o produto final apresenta um elevado grau de pureza.

No entanto alguns procedimentos sol-gel requerem um longo tempo de iniciação/hidrólise que depende da natureza química dos precursores, controle rigoroso de pH e elevada velocidade de agitação da solução. As principais desvantagens associadas a este processo são o elevado custo dos alcóxidos quando usados como precursores, o baixo controle de contaminações químicas e da qualidade do produto final uma vez que a temperatura de sinterização influencia as fases presentes no produto obtido( SANOSH et al., 2010; FENG et al., 2005; FARZADI et al., 2011). De acordo com a estabilidade térmica da fase gerada antes da sinterização, poder-se-ão formar fases cristalinas, fases cristalinas metaestáveis e fases não-cristalinas devido a mecanismos de decomposição ou desidroxilação. Uma das fases frequentemente presente no produto é o óxido de cálcio (CaO).

É ainda importante referir que a bioatividade dos fosfatos de cálcio depende de vários fatores inerentes à sua síntese como os reagentes precursores usados, conteúdo de impurezas, tamanho e morfologia dos cristais, concentração e ordem de mistura dos reagentes, pH e temperatura (FARZADI et al., 2011).

As características da hidroxiapatita como morfologia, área superficial, volume e diâmetro de poros, propriedades mecânicas, estabilidade térmica e permeabilidade da superfície estão relacionadas diretamente com o método de síntese (AMER et al, 2013). A literatura relata uma variedade de procedimentos de sínteses para a obtenção da hidroxiapatita densa e porosa que, embora diferentes em termos das condições específicas, são desenvolvidos almejando o aprimoramento das propriedades dos biomateriais (AHMED et al., 2014).

### **2.1.2 Alumina**

A alumina, cuja fórmula química é  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , é um material cerâmico com fortes ligações iônicas e apresenta diversas fases cristalográficas, entretanto a única fase pura presente na natureza é a  $\alpha$ -alumina, sendo esta fase mais estável (ROSÁRIO, 2012).

Dentre os pós cerâmicos comercialmente disponíveis e que possuem partículas com tamanho submicrométrico, a alumina pode ser considerada uma das cerâmicas quimicamente mais puras (PIERRI, 2005).

A alumina uma das matérias-primas mais utilizadas para a confecção de produtos cerâmicos avançados porosos, devido a sua estabilidade a altas temperaturas, propriedades térmica e mecânica, elevado ponto de fusão, isolamento elétrico elevado, além da facilidade de processamento e da forma, distribuição e homogeneidade de porosidade que pode ser produzida, elevada dureza e alta resistência a abrasão (KOOPS, 2010).

Devido a uma forte ligação química entre os íons  $\text{Al}^+$  e  $\text{O}^-$ , a alumina mantém uma estabilidade química até muito próximo do seu ponto de fusão ( $2050^\circ\text{C}$ ), a maior dureza dentre os óxidos industrialmente utilizados e alta resistência mecânica. Quanto às suas propriedades físicas e mecânicas, pode-se observar que a resistência mecânica é alta em temperatura ambiente, mas diminui bastante a partir de temperaturas acima de  $1100^\circ\text{C}$ . Em relação às propriedades químicas, a Alumina é quimicamente estável e tem uma alta resistência a corrosão. Esse material é insolúvel em água e muito pouco solúvel em ácidos fortes e soluções alcalinas. Assim como para os materiais cerâmicos em geral, a alumina tem muitas de suas propriedades de interesse, como material para Engenharia, vinculadas à sua microestrutura. A perda da resistência mecânica com o aumento da porosidade é bem conhecida para os materiais cerâmicos (HENCH, 1993).

Como biomaterial ela é inerte e resistente à maioria dos ambientes corrosivos, incluindo o ambiente altamente dinâmico que é o corpo humano. Sob condições fisiológicas, ela causa pouca ou nenhuma resposta dos tecidos em volta e se mantém essencialmente inalterada. No entanto, o corpo a reconhece como material estranho e procura isolá-lo formando uma fina camada de tecido fibroso não aderente

em volta do implante, onde necessário (KRIEGER, 2003).

A Alumina tem sido amplamente investigada como um agente de reforço para HA e sua utilização visa principalmente à melhoria da resistência mecânica da matriz. Porém, uma limitação desse compósito é a grande diferença de coeficiente de expansão térmica entre os dois materiais. Verifica-se também a degradação da HA na presença da alumina, com a formação de fosfato de tricálcio e aluminatos de cálcio durante a sinterização e consolidação do corpo (BONAN et al, 2014).

Os compósitos de hidroxiapatita/ $Al_2O_3$ , vem sendo desenvolvidos e pesquisados sob dois pontos:

1º elaborar biomateriais com novas características de propriedades mecânicas, o que nem sempre é possível, quando se utiliza uma matriz cerâmica de hidroxiapatita [SOUZA, 2009, DELIMA, 2009, KARVAT, 2005].

2º desenvolver novos biomateriais com microporosidade interconectada, grãos mais finos, área superficial de grãos e de microporos elevada, o que pode melhorar sensivelmente a capilaridade, a molhabilidade, fornecendo melhores condições à adesão e proliferação celular na superfície de grãos e de microporos, contribuindo com os processos de reparação e reconstrução óssea [CAMARGO, 2012, SANTOS, 2009, BELLINI, 2007].

## 2.2 Tecido Ósseo

O osso é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, de origem mesenquimatosa. Apresenta sua matriz extracelular mineralizada o que confere notável rigidez ao esqueleto, mantendo ao mesmo tempo, certo grau de elasticidade.

O tecido ósseo atua não somente como suporte mecânico, mas como reserva de mineral principalmente cálcio e fósforo. É extremamente dinâmico por possuir a capacidade de auto-regeneração e auto-modelagem (BOYLE et al., 2003).

A matriz óssea é composta por duas fases majoritárias em escala nanométrica; a fase orgânica (proteínas) e a inorgânica (minerais) conforme a Tabela 2.2 (MURUGAN. 2004).



Tabela 2.2 - Composição do tecido ósseo.

<b>Fase Inorgânica</b>	<b>% em Peso</b>	<b>Fase Orgânica</b>	<b>% em Peso</b>
Hidroxiapatita	~ 60	Colágeno	~ 20
Carbonato	~ 4	Água	~ 9
Citrato	~ 0,9	Proteínas	~ 3
Sódio	~ 0,7	Outros (polissacarídeos, lipídios, células ósseas primárias)	_____
Magnésio	~ 0,5		
Outros (Fe <sup>2+</sup> K <sup>+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> )	_____		

Fonte: MURUGAN, 2004.

Nota-se na fase inorgânica, a concentração superior da porcentagem em peso da fase mineral hidroxiapatita (LOWESNSTAM, 1989), observando em menores porcentagens para as composições, tais como o carbonato, citrato, sódio, magnésio, fluoreto e cloreto que variam conforme a função metabólica do tecido ósseo. A principal função dos minerais é promover resistência e dureza ao tecido ósseo enquanto o colágeno, principal constituinte da fase orgânica, proporciona resistência à tensão e a flexão.

Segundo Aubin (1996), A fase orgânica é composta principalmente por colágeno, os lipídeos, em torno de 2% do peso, que atuam no metabolismo celular do tecido ósseo e são importantes precursores da fase inicial de mineralização óssea.

A presença de água na fase orgânica de todos os tecidos ósseos promove a proliferação de células ósseas primárias e determina as propriedades biomecânicas do tecido ósseo conforme ilustrado na tabela 2.3 (MORUGUN, 2004).

Tabela 2.3 - Propriedades mecânicas do tecido ósseo

<b>Propriedades</b>	<b>Osso Cortical</b>	<b>Osso Esponjoso</b>
Módulo de Young (GPa)	14-20	0,05 - 0,5
Resistência à Tensão (Mpa)	50 - 150	10 - 20
Resistência à Compressão (MPa)	170 - 193	5 - 10
Tenacidade à Fratura (MPa m <sup>1/2</sup> )	2 - 12	0,1
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,8 - 2,2	0,1 - 1

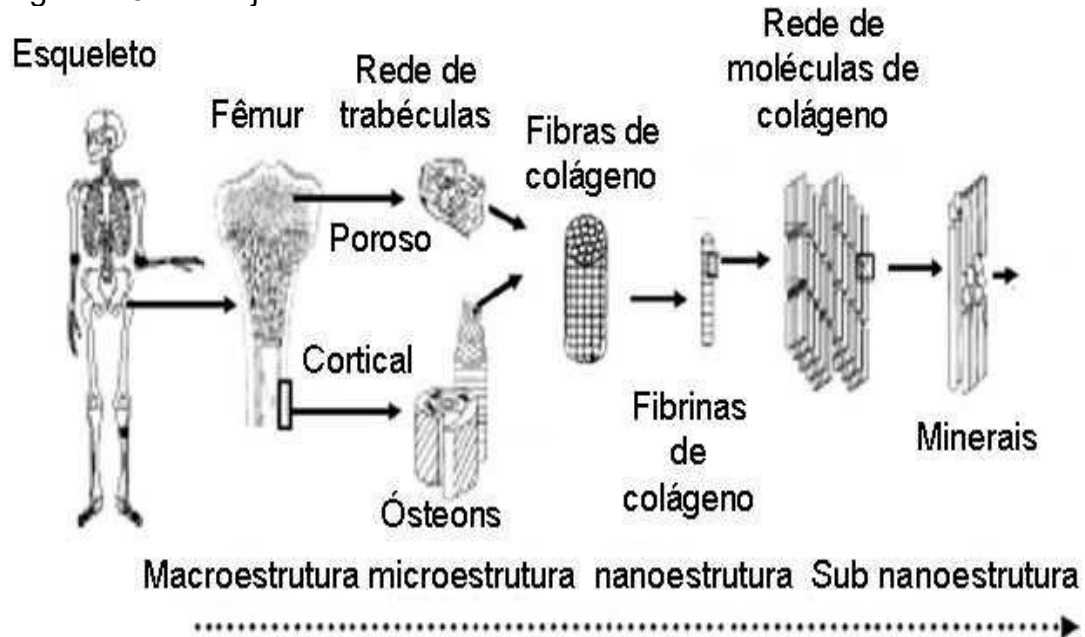
Fonte: MURUGUN, 2004.

A organização de formação celular do tecido ósseo segundo Currey (2002) é constituída por cinco classes:

- Células osseogênitoras – capazes de se dividirem e se diferenciarem originando outras classes de células ósseas.
- Osteoblastos – responsáveis pela formação de novos tecidos ósseos. Essas células secretam colágeno, e em seguida o recobrem com proteínas não colagenosas capazes de interagirem com minerais, principalmente cálcio e fosfatos.
- Osteócitos – células maduras derivadas dos osteoblastos. São responsáveis pela manutenção do tecido ósseo. Atuam também como transportadores de minerais entre os ossos e o sangue.
- Osteoclastos – são encontrados na superfície óssea e atuam na dissolução de minerais via ácida ou enzimática.
- Células de revestimento – encontradas na superfície do osso maduro e são responsáveis pela regulação e transporte e fluxo de minerais do tecido ósseo.

A estrutura óssea pode ser considerada como arranjos em escala micro e nanométrica para o estabelecimento de várias funções incluindo o transporte de nutrientes, oxigênio e fluidos corporais ao longo de sua estrutura (DUCY, 2000). A figura 2.3 ilustra a estrutura organizacional do tecido ósseo em diferentes escalas (COWIN, 1987).

Figura 2.3 - Arranjo da estrutura óssea em macro e nano-escala.



Fonte: COWIN, 1987.

Conforme a figura 2.3 o esqueleto é composto por estruturas corticais (osso denso) e esponjosas. O osso cortical é responsável por 80% da massa esquelética. É formado por uma série de estruturas que estão muito próximas chamadas ósteons. Este tipo de estrutura óssea se torna efetivamente resistente à solicitação mecânica, apresentando boas propriedades mecânicas à flexão, a compressão e a torção. Esta estrutura se encontra nas epífises dos ossos longos, e é encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo.

O osso esponjoso, trabécular ou poroso corresponde a 20% da massa esquelética do corpo humano. Por ser menos denso e compacto que o osso cortical apresenta maior porosidade e concentração de vasos sanguíneos.

Em escala nanométrica, a estrutura óssea apresenta fibras de colágeno formadas por uma rede de moléculas de colágenos e cristais de hidroxapatita em escala sub – nanométrica. Estas substâncias juntamente com polissacarídeos formam um tecido de sustentação e está em constante remodelação - através do qual, o “osso velho” é substituído por “osso novo”, através de um mecanismo mediado pelos osteoblastos e os osteoclastos (DUCY, 2000).

### 2.3 Liberação controlada de fármacos

A liberação controlada de fármacos é uma forma farmacêutica criada para se atingir um efeito terapêutico prolongado por liberação continuada do fármaco por um período de tempo prolongado após a administração de uma única dose do medicamento (REMINGTON, 2000). Dessa forma, a tecnologia de liberação controlada representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e que pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Ela trata da liberação do princípio ativo independente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida. Os sistemas de liberação, geralmente são descritos como “Drug Delivery Systems” (DDS), os quais oferecem inúmeras vantagens quando comparados aos sistemas de dosagem convencional (VALLET-REGI, 2010).

Segundo Wong et al. (2003), os medicamentos são utilizados com finalidade profilática, terapêutica ou diagnóstica. Contêm uma ou mais substâncias ativas que devem ser administradas ao paciente. Após a administração de uma forma farmacêutica sólida de uso oral, o fármaco deve ser liberado e dissolvido nos fluidos gastrointestinais para que seja absorvido e exerça a ação farmacológica esperada. No entanto, dependendo da solubilidade em água, cada fármaco possui um perfil diferente e único de liberação e de ação no alvo. Dessa forma, os fármacos pouco solúveis em água, assim como os que apresentam sérios efeitos colaterais, requerem uma tecnologia para a sua liberação em um alvo-específico. Outros problemas como lenta absorção e a aplicação de volumes excessivos como, por exemplo, em administrações intravenosas podem ser melhorados através do uso de sistemas de liberação controlada, que agem como sistemas inteligentes.

Ao longo dos últimos anos, várias técnicas de liberação vêm sendo desenvolvidas e aplicadas no sentido de promover uma liberação controlada do fármaco, com o objetivo de regular a sua velocidade de liberação, manter seu nível terapêutico constante por um maior período de tempo, no processo conhecido como liberação de ordem zero, além de direcionar sua ação a um tecido específico (Ranade et al., 2003).

De acordo com Ranade et al., (2003), Os sistemas de liberação controlada fornecem uma série de vantagens sobre os sistemas convencionais. Por exemplo,

após a ingestão ou injeção do fármaco usando uma dosagem padrão, observa-se que nos primeiros minutos ocorrem elevados picos de concentração do fármaco na corrente sanguínea e, em seguida ocorre um declínio. Uma vez que cada droga tem um intervalo terapêutico, acima do qual é tóxica e abaixo do qual são ineficazes, os níveis da droga oscilantes podem causar períodos alternados de ineficácia e toxicidade. Por outro lado, o sistema de liberação controlada mantém a droga na faixa terapêutica desejada por um longo período de tempo através de uma única administração, como mostrado na Figura 2.4.

Figura 2.4 - Esquema do Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: controlada versus convencional.



Fonte: Ranade et al.,(2003)

Dentre outras vantagens potenciais do sistema de liberação controlada sobre o sistema convencional pode-se destacar as seguintes (MONTEIRO, 1999):

- Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- Natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);
- Administração segura sem reações inflamatória local e conveniente menor número de doses;

- Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas

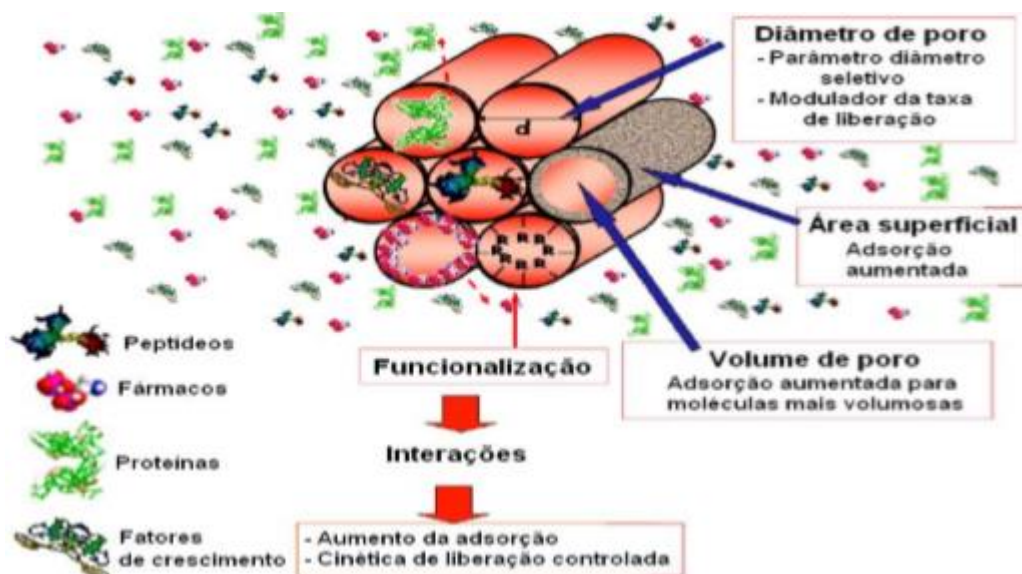
### ***2.3.1 Hidroxiapatita na liberação controlada de fármacos***

Segundo WANG et al. (2013), nas últimas três décadas pode ser observado um rápido crescimento na busca de novos sistemas de liberação. Os materiais naturais e sintéticos, incluindo fosfatos de cálcio, sílica inorgânica, bem como polímeros orgânicos tem sido estudado como substratos para o transporte de agentes terapêuticos (GINEBRA et al., 2012). A hidroxiapatita pode ser utilizada pura, porém, tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento e na preparação de compósitos para liberação controlada de fármacos.

Os estudos realizados por meio de ensaios celulares in vitro indicam que as estruturas microparticuladas de hidroxiapatita promovem a adesão e proliferação de células estrompiais da medula óssea humana e estimula a diferenciação osteogênica (GUO, Y.-P., et al., 2014).

Os principais fatores que podem influenciar o carregamento e o perfil de liberação da molécula hospedada são a natureza da interação química hospedeiro-hóspede, a dimensão dos poros da matriz, estrutura e a área da superfície, os grupos funcionais presentes ou ausentes (CAO et al., 2010; VALLET-REGÍ et al., 2010). Em relação ao efeito do diâmetro dos poros, considera-se que quanto menor o tamanho dos poros maior a limitação ao carregamento e liberação de moléculas de fármaco, influenciada também pela área de superfície. Alguns destes parâmetros são ilustrados na Figura 2.5.

Figura 2.5 - Parâmetros que governam a capacidade de carregamento de moléculas biologicamente ativas.



Fonte: VALLET-REGÍ, 2010.

De acordo com a literatura a hidroxiapatita apresenta-se como sistema de carregamento e liberação para diversos fármacos. Wang et al., (2010) relatam a utilização de microesferas de hidroxiapatita para liberação de cloridrato de doxiciclina, fármaco utilizado como modelo. Neste trabalho, pastilhas de HA foram mergulhadas em uma solução supersaturada de cloridrato de doxiciclina para a incorporação do mesmo. O perfil de liberação do fármaco nas microesferas mostrou uma liberação lenta e constante, que durou por pelo menos 7 dias e sem uma liberação “inicialmente explosiva” (WANG, S., et al., 2010).

Um estudo realizado por Pereira (2014), foi sintetizado a hidroxiapatita com porosidade controlada por meio do método de co-precipitação para avaliar a capacidade de carregamento do fármaco ibuprofeno. As quantidades máximas de ibuprofeno carregado foram de 188 e 184 mg g<sup>-1</sup> em etanol e hexano, respectivamente em 120 e 360 min, indicando que HA proporciona boa capacidade de carregamento do fármaco e os ensaios de liberação mostraram uma cinética rápida nas primeiras 24 h, seguida por uma cinética lenta.

Outro trabalho realizado por Ogawa et al., (2001) relata a utilização da hidroxiapatita associada ao colágeno para liberação do antibiótico ciprofloxacino.

Neste estudo os autores relatam que a melhor proporção HA e colágeno foi de 10:1 (m/m), respectivamente. Os resultados mostram que a associação entre hidroxiapatita e colágeno foi satisfatória e enfatizam que a vantagem deste tipo de liberação é que pode-se impedir uma concentração muito baixa do medicamento no sítio de ação no início do tratamento de uma infecção, evitando efeito terapêutico ineficiente e até 34 meses uma possível resistência bacteriana ao antibiótico (OGAWA C. A, et al., 2001).

Barroug e colaboradores (2002) utilizaram cristais de hidroxiapatita associada ao fármaco cisplatina para liberação controlada do mesmo. Os autores relatam que ocorre um aumento da quantidade de cisplatina ligada a hidroxiapatita conforme aumenta a concentração de cloretos no equilíbrio reativo. A taxa de liberação de cisplatina é relativamente lenta, aproximadamente 33% do total de cisplatina ligada aos cristais de hidroxiapatita foi liberada após 4,35 dias (BARROUG, A., et al., 2002)

Diversos estudos têm relatado a utilização hidroxiapatita como carreadora de fármacos. Dentro deste contexto, as hidroxiapatitas tem sido amplamente empregadas como matrizes eficazes para a encapsulação e liberação controlada de fármacos, proteínas e outras moléculas biologicamente ativas, devido à sua semelhança com o tecido ósseo, as suas estruturas porosas estáveis, bem como as propriedades superficiais, além da biocompatibilidade, osteocondutividade e caráter não inflamatório (COLILLA e VALLET-REGÍ, 2011; WANG et al., 2013).

## **2.4 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos). Podem ser produzidos unicamente através de processos de síntese química (antibióticos sintéticos) ou através de culturas de micro-organismos que são posteriormente modificadas quimicamente (antibióticos semissintéticos). Segundo Sande et al. (1993), a finalidade da terapêutica com antibióticos é controlar e diminuir os agentes patogénicos, de modo a que o sistema imunológico seja capaz de eliminá-los na totalidade. Ao longo de décadas foram identificados centenas de antibióticos importantes para a aplicação em terapias de doenças infecciosas. Os

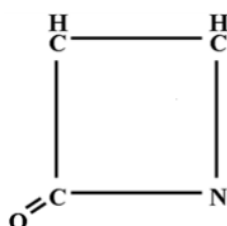


antibióticos diferem nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e nos mecanismos de ação. O conhecimento dos mecanismos moleculares de replicação das bactérias facilitou o desenvolvimento de compostos capazes de interferir nos ciclos vitais dos micro-organismos (CHABNER et al., 2012).

Os antibióticos podem ser classificados como bacteriostáticos e bactericidas, dependendo se a ação é inibitória do crescimento bacteriano ou se resulta na destruição ou lise bacteriana, respetivamente (SANDE et al., 1993). A classe de antibióticos bactericidas contempla o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, glicopéptidos e rifampicinas. Pode-se incluir nos antibióticos bacteriostáticos os macrólidos, as sulfamidas, tetraciclina entre outros (BRUGUERAS E GARCIA, 1998).

Os  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de antibióticos que se define pela presença do anel  $\beta$ -lactâmico na estrutura química, podem ser de origem natural ou semissintética e está sendo uma classe de elevada importância devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade. A sua atuação incide na inibição da última fase da síntese da parede celular das bactérias. Clinicamente é o grupo de antibiótico mais utilizado no combate a infeções bacterianas, possuindo um espectro bastante alargado. Atuam contra bactérias Gram positivo, Gram negativo e espiroquetas. Não são ativos contra o micoplasma visto ser desprovido de parede celular e também não atuam contra bactérias intracelulares. Podem classificar-se em quatro grupos diferentes: (i) penicilinas; (ii) cefalosporinas; (iii) monobactâmicos e; (iv) carbopenems (FONTANA et al., 1994). O anel  $\beta$ -lactâmico é constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio (Figura 2.6), podendo conter diversos radicais substituintes que o tornam ativo.

Figura 2.6 - Representação do anel  $\beta$ -lactâmico presente em todo o grupo.



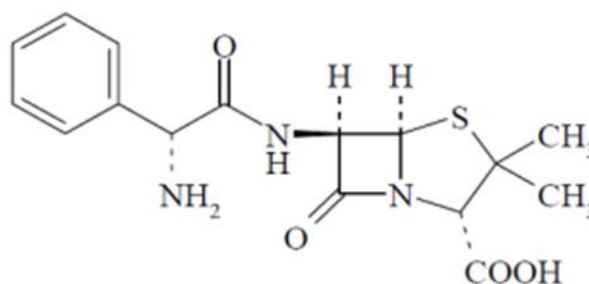
Fonte: FONTANA et al., 1994.

### **2.4.1 Ampicilina**

A ampicilina foi descoberta em 1961 sendo a primeira aminopenicilina. As aminopenicilinas são penicilinas semissintéticas obtidas a partir do ácido 6-aminopenicilânico. Possuem melhor ação contra Gram negativo do que as penicilinas naturais, devido principalmente à existência de um grupo amina que se encontra inserido na posição alfa do anel  $\beta$ -lactâmico, o que aumenta a hidrofília da molécula do antibiótico ampliando assim a sua ação contra as bactérias Gram negativo. A sua carga elétrica também difere das penicilinas naturais sendo estas aniônicas e as aminopenicilinas anfotéricas. Esta característica melhora a penetração dos antibióticos a nível dos canais de porina existentes na parede celular das bactérias Gram negativo (CHABNER et al., 2012)

A ampicilina é uma penicilina semissintética que possui um grupo amina ( $-NH_2$ ) em posição alfa (Figura 2.7), encontrando-se inserido no núcleo benzênico do radical R, característica que diferencia a ampicilina da penicilina G. A presença de um grupo amina confere à ampicilina carga positiva dando-lhe um caráter anfotérico, ou seja, possui um polo positivo e um pólo negativo, no caso da penicilina G só existe carga negativa. A via de administração da ampicilina pode ser por via oral apresentando-se sob a forma carboxílica livre ou por via parentérica em que se apresenta sob a forma de sal sódico. É estável na presença de ácido gástrico, sendo bem absorvida pelo trato gastrointestinal (cerca de 40 a 50%). Após a sua administração é rapidamente difundida na maioria dos tecidos e fluídos do organismo alcançando níveis máximos de concentração sérica após 2 horas da administração via oral, caso a administração seja por via parentérica intramuscular as concentrações máximas séricas são atingidas muito mais rápido do que a mesma dose administrada por via oral. A excreção é realizada principalmente por via renal na forma não metabolizada, mas também através da biliar nas fezes. A eliminação através dos rins é realizada por filtração glomerular, secreção tubular e reabsorção tubular. A disfunção renal diminui a excreção sendo a semivida da ampicilina no organismo superior nestes casos. Apresenta um amplo espectro antimicrobiano, tanto em Gram positivo como em Gram negativo (Sousa, 2005).

Figura 2.7. Estrutura da Ampicilina



Fonte: (Sousa, 2004).

A ampicilina deve sua atividade e estabilidade aparentemente à presença do grupo amino livre na posição  $\alpha$  da cadeia lateral. Normalmente a produção de ampicilina por síntese química envolve um processo complexo que requer a proteção do grupo  $\alpha$ -amino de fenilglicina. Requer ainda o uso de derivados altamente reativos da fenilglicina (instáveis), condições anidras, temperaturas muito baixas, e o uso de compostos altamente tóxicos (piridina, dimetilanelina e diclorometano) na separação do produto, já que a síntese resulta numa mistura final complexa, (Ferreira, 2004).

Ampicilina é uma aminopenicilina, só se diferenciando estruturalmente de penicilina G pela presença de um grupo amino na posição alfa no anel benzênico. Ampicilina está disponível comercialmente na forma trihidratada para administração oral e como sal de sódio para administração intramuscular. Sua potência é expressa em termos de ampicilina calculada em base anidra. Ampicilina trihidratada ocorre como um pó branco cristalino, praticamente sem odor que é ligeiramente solúvel em água (solubilidade aquosa de cerca de 6 mg/ml a 20°C e cerca de 10 mg/ml a 40°C). Ampicilina sódica ocorre como um pó branco, cristalino, sem odor, higroscópico, muito solúvel em água.

## 2.5 Técnicas de Caracterização de Biomateriais

A caracterização morfológica dos materiais é de fundamental importância para se definir seu comportamento. Várias técnicas de caracterização são utilizadas na avaliação estrutural e físico-química de materiais antes e após a sinterização tais

como:

### **2.5.1 Difração de raios x (DRX)**

Trata-se de umas das principais técnicas para a caracterização de materiais, sendo possível determinar as diferentes substâncias e fases cristalográficas presentes, assim como os parâmetros de rede da célula unitária quando desejável.

Os raios X são produzidos quando elétrons são acelerados a partir do cátodo (um filamento de tungstênio) e atingem o ânodo metálico, mantido em um alto potencial. A maior parte da energia dos elétrons é dissipada como calor. A desaceleração dos elétrons ao penetrar na amostra é o processo mais importante na produção de raios-X. Como resultado se obtém um espectro com picos que podem ser associados às distâncias interplanares das fases presentes. O difratograma obtido pode ser então comparado com os padrões difratométricos de fases individuais disponíveis no ICSD (Inorganic Crystal Structure Database) para os vários fosfatos de cálcio. Tratamentos matemáticos possibilitam a identificação precisa dessas fases, grau de cristalinidade do material e do tamanho médio dos cristais (Prado da Silva, 1999).

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 com os padrões difratométricos. Logo, a localização e a intensidade dos picos fornecerão um espectro característico que será utilizado na análise qualitativa.

Para uma análise de rotina do pó a difração de raios X fornece as seguintes informações sobre o composto:

- Identidade: Cada fase cristalina tem seu conjunto de picos de difração próprios para ângulos de difração específicos;
- Pureza: Se o composto consiste de uma única fase ou mistura de fases;

- **Cristalinidade:** Refletindo o tamanho ou perfeição do cristalito derivado do alargamento dos picos de difração;
- **Tamanho e forma aproximados:** A morfologia dos cristalitos alongados ou equiaxiais podem ser deduzidas;
- **Parâmetros de rede:** Junto com análise química e espectroscopia, indicam o tipo de substituição na estrutura;
- **Orientação.**

Embora muitas informações possam ser obtidas pela difração de raios X, a combinação com outros tipos de técnicas apresenta uma visão mais ampla das propriedades físico-química da hidroxiapatita biológica ou sintética. As propriedades de várias hidroxiapatitas, biológicas como sintéticas, têm sido obtidas utilizando-se a difração de raios X e a espectroscopia no infravermelho.

### **2.5.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)**

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica baseada nos modos vibracionais de grupos funcionais, presentes nas amostras. Estas vibrações ocorrem em frequências quantizadas e quando a radiação infravermelha de mesma frequência incide sobre a molécula, ocorre absorção da energia que é convertida em energia de vibração, aumentando a amplitude desses modos vibracionais. Assim, os espectros são obtidos medindo-se a intensidade relativa da luz transmitida (ou absorvida) em função do número de onda da radiação (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O espectro de infravermelho é constituído por bandas de absorção que correspondem às frequências de ligações dos átomos das moléculas que compõem o material. A absorção de radiações eletromagnéticas por átomos ou moléculas exige que elas tenham energia apropriada e que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia. O mecanismo apropriado à excitação vibracional é proporcionado pela variação periódica de dipolos elétricos na molécula durante as vibrações; a transferência de energia ocorre, então, por interação destes dipolos oscilatórios, com o campo elétrico oscilatório da radiação infravermelha, dependendo da frequência (ORÉFICE et al., 2006).

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença de bandas características de grupos, que permite a identificação de estruturas, através de análise do espectro e consulta a tabelas de informações estruturais úteis. A utilização do espectro de infravermelho em conjunto com outros dados espectrais é eficiente para caracterizar a estrutura de moléculas. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos. A frequência de absorção no infravermelho é também comumente usada para obter as constantes de força das ligações.

Rehman et al., (1997) demonstraram a possibilidade de obtenção de bons detalhes de espectros de infravermelho usando a técnica de espectrometria FTIR fotoacústica. Nesse estudo, foram analisados os espectros da fase inorgânica do osso cortical, de hidroxiapatita sintética implantável e de carbonato-apatita sintética. O tipo e as propriedades das carbonato apatitas sintéticas dependem da rota utilizada para a sua obtenção, como a fonte de íons carbonato, a razão molar dos precursores iniciais, o pH e a temperatura de síntese. A substituição do grupo carbonato na estrutura da apatita pode ocorrer sob duas formas distintas: nos sítios trivalentes fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) formando uma carbonato apatita do tipo B e nos sítios monovalentes da hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), formando uma carbonato apatita do tipo A. Podem ocorrer substituições na estrutura do cristal em ambos os sítios, formando-se a carbonato apatita do tipo AB (LEGEROS, 1991).

A análise de espectroscopia no infravermelho permite observarmos as seguintes características dos materiais analisados: identificação da fase ou da presença de fases, identificação de grupos funcionais  $\text{CO}_3$ ,  $\text{PO}_4$  OH,  $\text{H}_2\text{O}$  (ver Tabela 2.4 que mostra as bandas de absorção de IV para apatitas). Os dados obtidos por essa análise complementam os dados observados na difração de raios x, pois identificam a composição química dos fosfatos de cálcio. O diferencial da espectroscopia por transformada de Fourier é que esta faz uso de um dispositivo óptico chamado de interferômetro que mede todas as frequências de infravermelho simultaneamente. Por meio deste dispositivo a espectroscopia por transformada de Fourier oferece algumas vantagens como: maior velocidade e sensibilidade na

realização da medida, maior intensidade no detector, calibração automática, não há luz dispersa e não há aquecimento (Dourado, 2006).

Tabela 2.4 – Bandas de absorção de IV para apatitas.

Frequência IV (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais
3700-3000	H <sub>2</sub> O de cristalização adsorvida (AP)
3580	O-H, do grupo hidroxila
1615	H <sub>2</sub> O de cristalização adsorvida (AP)
1454, 1414	C-O do CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
1119, 1098 (F-AP), 1114 (CO <sub>3</sub> -AP)	P-O e P-OH, dos grupos HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> e PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
965 (F-AP), 961	P-O do grupo PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
865 (AP)	P-OH modo estiramento do grupo HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
873 (CO <sub>3</sub> -AP)	C-O
630	O-H do grupo OH hidroxila
620,600,564, 600,563	P-O do grupo PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
471, 368 (F-AP), 365	P-O do grupo PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>

Fonte: OLIVEIRA, 2008.

### 2.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura é utilizada para a caracterização morfológica de pós e de outros materiais, essa técnica tem se demonstrado essencial na observação e na análise da microestrutura de superfícies. O equipamento de MEV possui uma fonte geradora de feixe de elétrons. Esse feixe é colimado ao passar por lentes eletromagnéticas e é focalizado numa região muito pequena da amostra. Bobinas adequadamente posicionadas promovem a varredura desse feixe sobre a área da amostra a ser examinada. Essa interação feixe-amostra gera uma série de sinais, que são captados por um detector. Após a amplificação, o sinal gerado modula o brilho de um tubo de raios catódicos, que é varrido de forma sincronizada com a varredura da superfície da amostra, gerando uma imagem ponto a ponto da superfície examinada. Ainda de acordo com Sena (2004), sua principal vantagem é a excelente profundidade de foco que permite a obtenção de imagens de superfícies de fraturas ou superfícies irregulares com alta definição. De uma forma

resumida, tem-se o seguinte princípio de funcionamento, a superfície da amostra é bombardeada por um feixe de elétrons, esses elétrons interagem com a matéria e posteriormente são coletados por um detector que transforma as radiações provenientes da amostra em sinais elétricos que por sua vez são processados e transformados em uma imagem que descreve claramente a forma da superfície da amostra.

Os dois processos empregados para a geração de elétrons são: fonte termo iônica e fonte de emissão por efeito de campo. A fonte termo iônica apoia-se na propriedade de certos materiais, que quando aquecidos a uma temperatura significativamente alta, adquirem energia suficiente para os elétrons vencerem a barreira natural que impede sua fuga. Tem o menor custo e maior estabilidade sendo a mais utilizada. A fonte de emissão por efeito de campo tem como princípio básico de funcionamento a criação de campos elétricos intensos em formas pontiagudas. Permite a ampliação da superfície em dezenas de milhares de vezes com uma pequena voltagem de aceleração de elétrons, reduzindo efeitos de acúmulo de cargas na superfície de materiais isolantes e a profundidade de penetração do feixe em algumas dezenas de nanômetros (Sena, 2004).

De uma maneira geral um microscópio eletrônico de varredura é constituído pelos elementos seguintes:

- a) Canhão de elétrons - Gerador do feixe eletrônico.
- b) Coluna Óptico-Eletrônica - Responsável pela focalização do feixe eletrônico.
- c) Câmara de amostra - Local onde a amostra fica acondicionada.
- d) Sistema a vácuo - Auxilia na estabilidade do feixe eletrônico.
  
- e) Controle eletrônico - Responsável pela estabilidade do feixe eletrônico e coleta de dados.
- f) Sistema de imagem - Com o sistema de imagem realiza-se a coleta de dados e o armazenamento das informações



#### **2.5.4 Área superficial específica (BET)**

É possível obter informação textural de uma ampla faixa de materiais porosos, tal como extensão da área superficial específica (área superficial por unidade de volume), tamanhos de poros e sua distribuição, mediante a medição da área ocupada por uma determinada quantidade de moléculas de gás adsorvidas na superfície do material (SING, 1985). Este processo é realizado pela adsorção e desorção de nitrogênio gasoso (ou um gás não reativo (KANG, 2007)) sobre a superfície (FULVIO, 2009; HERNÁNDEZ, 2003; GBOLAHAN e MOJTABA, 2011) e usualmente analisado pela técnica BET (SING, 1985). O fundamento da técnica tira proveito da capacidade de adsorção e desorção que algumas substâncias gasosas sofrem sobre a superfície de outras, após uma medição da área coberta. É uma das técnicas mais usadas na caracterização de membranas porosas (AKBARNEZHAD, MOUSAVI e SARHADDI, 2010; KANG, 2007), seja na rotina de controle da qualidade, ou na pesquisa e aperfeiçoamento destes materiais (SING, 2001).

A adsorção é possível porque moléculas da superfície de um material estão em desequilíbrio de cargas (pelo menos, uma ligação atômica a menos do que as moléculas do interior do material), pelo que na tentativa de encontrar o equilíbrio, admitem outras moléculas se adsorverem sobre sua superfície (GUOZHONG, 2004). No processo, o gás a ser adsorvido recebe o nome de adsorvato, enquanto que o material analisado recebe o nome de adsorvente.

O processo de adsorção pode ser compreendido como físico (fisorção) ou químico (quimisorção). Na fisorção, moléculas de adsorvato são adsorvidas sobre a superfície do material de forma não específica, formando ligações de Van Der Waals; as forças formadas são fracas e de longo alcance fazendo possível a desorção, ou seja, o decréscimo da quantidade adsorvida (SING, 1985), pelo qual se diz que o processo é reversível. Na fisorção, o adsorvato conserva sua natureza química e adsorve-se formando camadas sucessivas, mas não se formar uma segunda camada sem terminar de completar a anterior. Na quimisorção, o processo é específico, com formação de ligações químicas covalentes ou por pontes de hidrogênio, onde as interações são fortes e de curto alcance. A espécie adsorvida sofre transformações e a energia de adsorção envolvida é maior do que a energia de fisorção. A quimisorção só é possível numa única camada (FULVIO, 2009). Processos físico-químicos que

ocorrem numa interface como a adsorção, dependem da quantidade total de superfície disponível, da temperatura de trabalho e da pressão parcial do adsorvato. O processo de adsorção usado nas análises texturais é a fisorção (GBOLAHAN e MOJTABA, 2011), pois permite o enchimento total dos poros de um material na medida em que é incrementada a pressão relativa no adsorvato, assim, o preenchimento dos microporos acontece por processos de fisorção, e os meso e macroporos por adsorção em monocamada – multicamada seguida de um processo de condensação (SING, 1985).

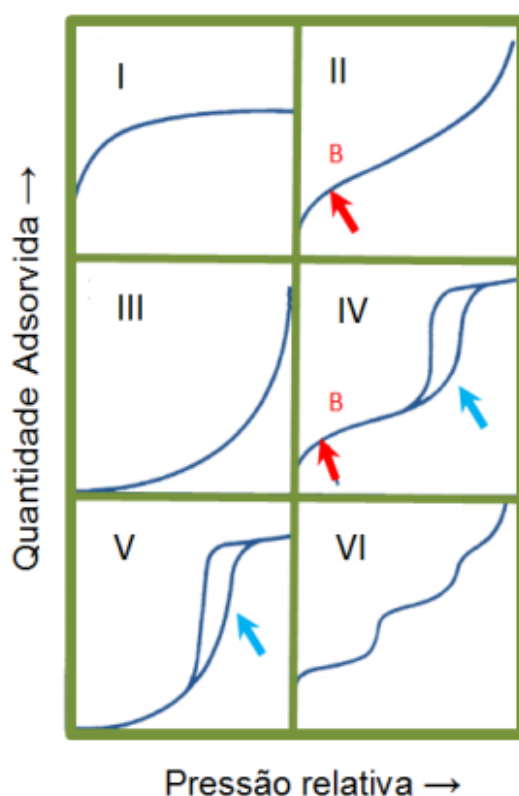
No processo é usado Nitrogênio como gás adsorvato, na sua temperatura de evaporação (77K) sobre a superfície limpa do material (SING, 2001). Caso seja conhecido que o material possui uma área menor do que  $5\text{m}^2/\text{g}$ , é preciso empregar Cripton ou Xenônio, também em 77K com as respectivas calibrações no equipamento. No entanto, o nitrogênio sempre oferece maior exatidão nas medições (SING, 1985). A uma determinada pressão mínima, os poros menores são cheios com o nitrogênio, que ao preenchê-los fica no seu estado líquido; o valor da pressão relativa ( $p/p_0$ ) para os microporos está na faixa de 0,01-0,2 para poros de 1-2 nm (LLEWELLYN, 2000); os maiores vão sendo cheios (início do processo de multicamada) com o incremento da pressão ( $p/p_0 > 0,99$ ) até seu preenchimento total (LLEWELLYN, 2000; ROUQUEROL, ROUQUERON e SING, 1999). Isso porque na medida em que diminui o tamanho de poro, o potencial de adsorção é maior. No caso em que o poro seja suficientemente amplo, as moléculas irão se adsorvendo numa única camada (monocamada) e na medida em que a quantidade adsorvida aumenta, o adsorvato irá se ordenando em camadas sucessivas (multicamada). A força que dá origem ao processo de multicamada é a mesma que produz a condensação (SING, 1985; SING, 2001), neste caso meso e macroporos são cheios pelo processo de adsorção em multicamada, sendo que a condensação é o processo secundário (SING, 2001; BRUNAUER, EMMETT e TELLER, 1938), pois ocorre após que as multicamadas terem preenchido totalmente o poro, e forma um menisco entre a fase líquida e a fase gasosa. A condensação é usualmente acompanhada de histerese (SING, 1985) (vide Figura 2.6). A quantidade total dos poros é determinada pela quantidade de gás adsorvido na pressão final ou pressão de saturação. Ao abaixar a pressão, o processo de dessorção começa seu curso.

Dado que o processo é realizado numa única temperatura, é possível obter gráficos das isotermas de adsorção e desorção do processo, ou seja, a medida da quantidade adsorvida nas diferentes pressões de equilíbrio do gás (SING, 1985), e cuja forma depende das propriedades da superfície e porosidade (FULVIO, 2009). As isotermas são curvas de volume de Nitrogênio adsorvido (medido em  $\text{cm}^3/\text{g}$ ) versus pressão relativa  $p/p_0$ , onde  $p$  é a pressão de vapor do nitrogênio e  $p_0$  é a pressão de saturação de  $\text{N}_2$  absorvível e que foi registrada continuamente durante a adsorção/dessorção (HERNÁNDEZ, 2003). Geralmente as isotermas tem forma de S, cuja porção a baixas pressões vem sendo côncava ao eixo de pressão, enquanto que a porção em altas pressões é convexa ao eixo de pressão, já a parte central é paralela a dito eixo (BRUNAUER, EMMETT e TELLER, 1938). A forma peculiar que apresentam as isotermas de adsorção na região de muito baixas pressões tem origem nas fortes interações adsorvato/adsorvente que ocorrem em poros de dimensões moleculares, além do incremento na sua energia de adsorção, este processo é devido aos microporos (ROUQUEROL, ROUQUERON e SING, 1999). Se a isoterma possui um patamar horizontal, ele é indicativo de uma área superficial externa muito pequena.

Dependendo do tipo de porosidade no material, ou da sua ausência, as isotermas possuirão uma geometria diferente (Vide Figura 2.8). Isotermas tipos I são típicas de sólidos microporosos onde a adsorção se produz a pressões relativamente baixas e são muito similares aos casos de quimisorção. Isotermas tipos II e III ocorrem em sólidos não porosos finamente divididos ou, então, nos macroporosos. Enquanto que as isotermas tipos II exibem um ponto de inflexão correspondente à completa formação da monocamada e o começo da multicamada, as isotermas tipos III não o apresentam devido às fracas interações entre adsorvente e adsorvato (FULVIO, 2009). Isotermas tipos III e V são típicas da adsorção de vapores, tais como vapor de água em materiais hidrofóbicos, ou quando a interação adsorvato-adsorvente é baixa. A diferença entre a isoterma III e a IV, é que na última o caminho final não é assintótico. As isotermas tipos IV e V apresentam um laço de histerese (indicado na Figura 2.8 com as setas azuis), que aparecem quando as curvas de adsorção e desorção não coincidem (SING, 1985), e são típicas de materiais mesoporosos, com preenchimento em multicamadas, os quais apresentam desorção numa pressão menor do que a respectiva adsorção. Isotermas tipo VI, que são as menos comuns, são típicas de tipos especiais de carbono. As setas vermelhas na Figura 2.8 indicam o ponto B no qual o

gás adsorvido completou a monocamada e começa o processo de multicamada, considerada também como condensação do adsorvato (FULVIO, 2009; KANG, 2007; SING, 2001; BRUNAUER, EMMETT e TELLER, 1938).

Figura 2.8 - Representação esquemática dos seis tipos de isotermas de adsorção.

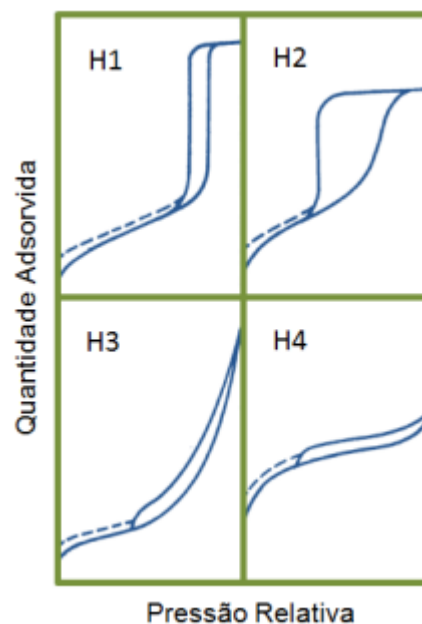


Fonte: KANG, 2007.

Os laços ou loop de histerese apresentados nas isotermas tipo IV e V, associados com a condensação capilar das estruturas mesoporosas, podem apresentar diferentes formatos dependendo da forma dos poros, assim, histerese tipo H1 é comum em materiais porosos caracterizados por consistir de aglomerados ou de esferas uniformes compactadas em um arranjo bastante regular que, portanto, têm uma estreita distribuição de tamanhos de poros. Materiais porosos adsorventes, que apresentam distribuição de tamanhos de poros e forma não muito bem definida, possuem uma histerese tipo H2. O loop de histerese tipo H3 é observado em agregados de partículas tipo placas que dão origem a poros com forma de fenda; de maneira similar, o tipo H4 é típico de poros estreitos tipo fenda. Caso a isoterma

apresente um loop de histerese a baixas pressões, vide linhas não contínuas na Figura 2.9, este é devido ao inchamento de uma estrutura porosa não rígida, ou à adsorção irreversível das moléculas nos poros, ou em entradas tão pequenas como as moléculas de adsorvato, ou pela interação química irreversível entre adsorvato – adsorvente. Não é recomendável usar as isotermas de dessorção dos loops tipo H2 e H3 para a determinação da distribuição de tamanhos de poros, sendo mais apropriado empregar suas correspondentes curvas de adsorção (SING, 1985).

Figura 2.9 Tipos de laços ou loop de histerese presentes tipicamente nas isotermas de adsorção tipo IV e V.



Fonte: SING, 1985.

### **2.5.5 Porosidade através do método de Archimedes**

Uma técnica básica de caracterização de materiais é a determinação da porosidade através do princípio de Archimedes, cujo objetivo é determinar as diferenças de densidade entre os compósitos seguindo a norma ASTM C373-88. A porosidade de um material afeta suas propriedades físicas e conseqüentemente seu comportamento no ambiente próximo a ele. O termo porosimetria é frequentemente usado para compreender as determinações de tamanho de poro, distribuição, volume, densidade e outras características relacionadas à porosidade de um material. A

adsorção e permeabilidade, energia, densidade e outros fatores influenciados pela porosidade de uma substância determinam a maneira e a condição nas quais estas podem ser usadas apropriadamente.

Após a compactação ou conformação das partículas do material pulverizadas na forma desejada, existirão poros ou espaços vazios entre as partículas do pó. Durante o tratamento térmico posterior, a maior parte da porosidade será eliminada, entretanto, é frequente o caso de este processo de eliminação de poros ser incompleto e alguma porosidade residual irá permanecer. Qualquer porosidade residual terá uma influência negativa tanto sobre as propriedades elásticas como sobre a resistência (CALLISTER et al, 2002).

As medidas de porosidade aparente são obtidas por meio do método de Arquimedes. Este método é baseado em medidas de massa da amostra quando seca e após permanecer imersa em água durante 24 horas. Pode ser empiricamente determinada a partir da Equação:

$$PA(\%) = \frac{M_u - M_s}{M_u - M_i} \times 100 \quad \text{Equação (2.3)}$$

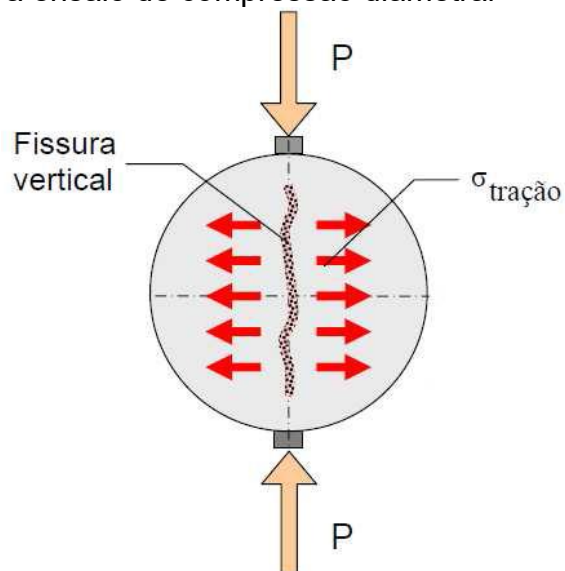
onde,  $M_s$  é a massa seca da amostra (g),  $M_u$  é a massa da amostra úmida,  $M_i$  é a massa da amostra imersa em água.

Uma das características mais importantes associadas a um compósito a ser utilizado para substituição de tecidos ósseos é a porosidade. A porosidade é necessária para facilitar a distribuição e difusão das células e nutrientes por toda a estrutura, facilitando o crescimento celular e tecidual e a densidade pode afetar as propriedades físicas do material, bem como o comportamento biológico do mesmo (FILHO, JUNIOR, et al., 2006). Alta porosidade gera materiais com menor densidade e assim, quanto menor a densidade, maior a porosidade do material. A porosidade aumenta a área superficial disponível entre o local do implante e o implante em si, aumentando e facilitando a osteointegração.

### 2.5.6 Resistência à compressão diametral

O ensaio de resistência a tração indireta por compressão diametral, conhecido como Brazilian Test, tem sido usado por diversos autores na caracterização da resistência mecânica dos fosfatos de cálcio com o objetivo de avaliar a tensão de tração máxima suportada por uma amostra, antes da ruptura (Carrodéguas, 2000). Também chamado de método indireto, geralmente considera apenas o plano diametral da amostra testada, onde ocorrem mais tensões. O ensaio consiste na aplicação de duas forças diametralmente opostas sobre um corpo de prova cilíndrico, produzindo uma tensão de tração normal ao plano de carregamento, como mostrado na Figura 2.10.

Figura 2.10 - Distribuição de tensão e secção transversal em uma amostra submetida a ensaio de compressão diametral



Fonte: (Stanley, 2001).

A simplicidade de execução do ensaio de compressão diametral e a facilidade de obtenção de amostras densas com geometria cilíndrica pelo processo de prensagem axial tornam atrativa a avaliação da tensão de fratura por meio deste ensaio. Porém, o formalismo matemático para calcular a tensão máxima de fratura requer certas aproximações devido à complexidade do perfil de tensões que atuam no corpo de prova durante o ensaio (PEITL FILHO, 1995).

Segundo Pittet e Lemaître (2000), O teste de compressão diametral é

normalmente utilizado para medir a resistência à tração de materiais frágeis como cerâmicas e biocerâmicas. A vantagem desse ensaio é que a fratura se inicia dentro da amostra, e o valor medido, portanto, não depende da superfície da amostra. O teste também pode ser usado para se fazer uma comparação entre diferentes composições de materiais frágeis.

Os cálculos de resistência à tração por compressão diametral serão feitos segundo a norma da ABNT - NBR 7222/94 (GOMIDE, 2005), seguindo a Equação 2.4:

$$\sigma_T = \frac{2P}{\pi DL} \quad \text{Equação (2.4)}$$

Onde “ $\sigma_T$ ” resistência a tração por compressão diametral, expressa em MPa, “P” carga máxima obtida no ensaio (kN), “D” é o diâmetro da amostra (mm) e “L” a altura do corpo-de-prova (mm).

A simplicidade de execução do ensaio e a facilidade de obtenção de amostras densas com geometria cilíndrica tornam atrativa a avaliação da tensão de fratura por meio deste ensaio. Porém, o formalismo matemático para calcular a tensão máxima de fratura requer certas aproximações devido à complexidade do perfil de tensões que atuam no corpo de prova durante o ensaio (PEITL FILHO, 1995).

## 2.6 Ensaios de citotoxicidade

Antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos, são efetuados ensaios de toxicidade extensos em sistemas *in vitro* e *in vivo* utilizando diversas espécies animais (RANG et al, 2004). A toxicidade consiste em uma ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo (MINE, 2003). Sendo assim um fator limitante na liberação e consumo de fármacos.

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais em ensaios toxicológicos, tem-se a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que detectem a toxicidade de substâncias para uso em seres humanos, evitando a liberação de substâncias que possam causar reações adversas e lesionar o



organismo do paciente (ROGERO et al, 2003). Assim, de acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer produto para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade. Em seguida, testes *in vivo* se fazem necessários para a avaliação da biocompatibilidade do material, definida como a resposta do meio fisiológico ao corpo implantado (RAVAGLIOLI, 1992).

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO et al., 2000).

O cultivo celular compreende um conjunto de técnicas que permite manter as células *in vitro* conservando ao máximo suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Dependendo do grau de preservação da estrutura do tecido e do órgão de origem e a sua duração, os cultivos são classificados em diferentes tipos: de órgãos, de tecido, cultivo primário e linhagem celular.

Os primeiros meios utilizados para a manutenção de células *in vitro* eram constituídos por extratos derivados de tecidos e fluidos corpóreos. Posteriormente, o uso de cultivos celulares em diversos setores biotecnológicos, paralelamente ao surgimento de novas linhagens celulares, propiciou a pesquisa e o desenvolvimento de meios sintéticos com formulações e composição química bem definidas e equivalentes àquelas encontradas nos meios naturais. Entre elas o Meio Essencial Mínimo de Eagle representou um importante marco na implementação do uso de células em laboratório (ARNS, 2004).

Os soros de origem animal são amplamente utilizados na rotina dos cultivos celulares como fonte de suplementação aos meios sintéticos. Além do aspecto nutricional, desempenham papel efetivo na proteção celular em dois momentos críticos do manejo: repique e congelamento. Isto porque os soros têm inibidores para a ação enzimática da tripsina e também produzem maior eficiência no processo de congelamento, restringindo os danos causados pelas baixas temperaturas (ARNS, 2004).

Para ser aprovado num teste de citotoxicidade in vitro, um material não deve causar a morte das células nem afetar suas funções celulares. Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células, os testes podem detectar se ocorre a lise das células, a inibição do crescimento celular e outros efeitos que possam ser causados nas células pelo material e/ou extratos oriundos do material.

Existem dois tipos de testes in vitro, os métodos de contato direto e os métodos de contato indireto. No primeiro, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente semeadas na forma de uma suspensão celular sobre o material. Já os métodos de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e o segundo tipo no qual substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente e colocada em contato com as células. Normalmente, utilizam-se nestes testes células de linhagens estabelecidas, devido à facilidade de obtenção e manutenção em laboratório (NORTHUP, 1986).

As linhagens celulares mais recomendadas para testes de citotoxicidade são: a NTC clone 929, a Balb/ 3T3 clone A31; a MRC-5, a WI-38, a VERO, a BHK-21 e a V79. Além destas, outras linhagens podem ser utilizadas se for possível demonstrar que os resultados obtidos são semelhantes (ISO 10993-5, 1992). A avaliação da citotoxicidade pode ser feita através membrana celular, pela utilização de métodos com corantes vitais ou não, da proliferação celular, de atividade biossintética, etc. Existem diferentes protocolos padrões já estabelecidos para os testes de citotoxicidade, dentre os quais podem ser citados:

- ASTM F-813-83 - Método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células (ASTM, 1992);
- ASTM F-895-84 - Método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade (ASTM, 1992);
- ISO 10993-5 - Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Testes para citotoxicidade: métodos in vitro (ISO 10993, 1992).

Além de aspectos referentes ao procedimento, os padrões normalmente especificam a linhagem celular, o meio de cultura e as técnicas para avaliação da citotoxicidade. Além disso, todos os protocolos padrões preveem a utilização e especificam materiais a serem utilizados como controles positivo e negativo. Controle positivo é uma substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível e

controle negativo é o material ou substância que não produz efeito citotóxico.

A norma ISO 10993-5 (2009) apresenta três categorias de testes de citotoxicidade *in vitro*: teste de extrato, teste de contato direto e teste de contato indireto. Os testes de extrato e de contato direto possibilitam a avaliação qualitativa e quantitativa da citotoxicidade dos materiais ou da viabilidade das células quando em contato com os materiais. Por outro lado, o teste de contato indireto permite apenas a avaliação qualitativa da citotoxicidade.

A avaliação quantitativa da viabilidade celular pode ser realizada através de métodos colorimétricos utilizando-se corantes como o MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) e o MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (Fig. 1).

O MTT é um sal amarelo que é reduzido pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial resultando em um sal de formazan de cor púrpura. Esta redução ocorre somente nas células vivas. Desta maneira, a viabilidade celular pode ser determinada pela intensidade da coloração púrpura que é proporcional à quantidade de cristais de formazan formados. A desvantagem da utilização deste corante é a necessidade do uso de solventes orgânicos como o DMSO ou o isopropanol para dissolver os cristais de formazan que são insolúveis em água (NOZAKI et al., 2012).

O corante MTS é reduzido da mesma forma que o MTT, pela enzima desidrogenase mitocondrial, com a formação de cristais de formazan. A diferença é que os cristais formados a partir do MTS são solúveis em água e, portanto, o uso de solventes orgânicos não é necessário. O MTS é utilizado em conjunto com um agente acoplador de elétrons, o PMS (fenazina metosulfato) (NOZAKI et al., 2012).

## **2.7 Análise de Variância (ANOVA)**

A análise de variância (ANOVA) consiste em uma técnica estatística para comparação simultânea de várias médias, provenientes de amostras distintas. O método ANOVA é utilizado para aceitar ou rejeitar, estatisticamente, as hipóteses investigadas durante a realização de experimentos (Vieira, 2006).

De acordo com Freund e Simon (2000), O propósito básico de um teste de

significância é comparar uma estimativa do efeito de um tratamento ou amostra com a estimativa do erro aleatório. Considerando-se que o erro aleatório é desprezível, é possível através dessa comparação estabelecer se o efeito do tratamento em questão é ou não significativo. Para isso faz-se uso do teste de hipótese. Um teste de hipótese estatístico, como por exemplo, o teste  $F$  das variâncias amostrais, é um critério que conduz à decisão de se aceitar ou rejeitar a hipótese em consideração, a partir de valores experimentais obtidos das amostras. Ou seja, o valor de  $F$  só diz se houve alguma diferença geral entre as médias, mas não nos diz nada sobre quais pares de grupos possuem médias significativamente diferentes.

Como as conclusões derivadas de testes de hipótese baseiam-se em curvas de distribuição de probabilidades, dois tipos de erros podem ser cometidos, denominados erro do tipo I e erro do tipo II. O erro do tipo I ocorre ao se aceitar a hipótese inicial  $H_0$  quando esta é falsa. A probabilidade de se cometer um erro desse tipo pode ser controlada pela seleção da confiança estatística desejada na realização do teste de hipóteses. Dessa forma, se a confiança escolhida for de 99%, a probabilidade de se aceitar uma hipótese falsa é de 1%, que é igual ao nível de significância do teste, denominado de  $\alpha$  (FREUND; SIMON, 2000).

A rejeição de  $H_0$ , quando esta é uma hipótese verdadeira é conhecida como erro do tipo II. A probabilidade de se cometer um erro desse tipo depende do tamanho da amostra, do desvio padrão amostral e da magnitude da diferença entre médias necessária para se aceitar a hipótese nula, segundo a qual as médias são diferentes. Amostras muito pequena podem levar a um erro do tipo II, principalmente quando a diferença observada entre as médias for muito pequena.

Ainda de acordo com Vieira (2008), no método ANOVA, considera-se que qualquer observação aleatória possui três componentes: o efeito comum, o efeito do tratamento e o erro aleatório. O efeito comum é um valor constante presente em todas as observações. O efeito do tratamento consiste de uma parcela fixa ou aleatória, que varia de acordo com a condição experimental considerada. Quanto ao erro, trata-se de uma quantidade aleatória não previsível, cujo valor esperado é zero.

A validade de testes estatísticos de significância depende da existência de réplicas, pois estas fornecem uma estimativa do erro aleatório e tornam possível o uso de tabelas de significância, construídas sob a consideração de que os erros são independentes.

O modelo matemático que descreve a origem da variação em cada uma das observações tomadas aleatoriamente de uma população dividida em  $k$  tratamentos é dado pela equação 2.5.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{Equação (2.5)}$$

onde:

- $Y_{ij}$  =  $i$ -ésima observação aleatória do  $j$ -ésimo tratamento;
- $\mu$  = efeito comum ou média da população;
- $\tau_j$  = efeito devido ao tratamento  $j$ ;
- $\varepsilon_{ij}$  = erro aleatório na  $i$ -ésima observação do  $j$ -ésimo tratamento.

Sendo  $\mu_j$  a média do tratamento  $j$ , o efeito do tratamento  $j$  ( $\tau_j$ ) é dado pela diferença entre a média do tratamento  $j$  e a média da população, de acordo com a equação 2.6, e o erro aleatório na  $i$ -ésima observação do  $j$ -ésimo tratamento é dado pela diferença entre o valor da observação e a média do tratamento ao qual pertence a observação em questão, conforme equação 2.7.

$$\tau_j = \mu_j - \mu \quad \text{Equação (2.6)}$$

$$\varepsilon_j = y_{ij} - \mu_j \quad \text{Equação (2.7)}$$

A Tabela 2.5 resume as notações e o formato utilizado para organização dos dados necessários à aplicação do método de análise de variância ANOVA (Garcia Diaz e Phillips, 1995).

Tabela 2.5 - Notações e organização dos dados para aplicação do método ANOVA.

	Tratamentos					
	j = 1	j = 2	j = 3	...j	j = m-1	j = m
	Y <sub>11</sub>	Y <sub>12</sub>	Y <sub>13</sub>	Y <sub>1j</sub>	Y <sub>1,m-1</sub>	Y <sub>1m</sub>
	Y <sub>21</sub>	Y <sub>22</sub>	Y <sub>23</sub>	Y <sub>2j</sub>	Y <sub>2,m-1</sub>	Y <sub>2m</sub>
	.	.	.	.	.	.
	Y <sub>r<sub>1,1</sub></sub>	Y <sub>r<sub>2,2</sub></sub>	Y <sub>r<sub>3,3</sub></sub>	Y <sub>r<sub>j,j</sub></sub>	Y <sub>r<sub>m-1,m-1</sub></sub>	Y <sub>r<sub>m,m</sub></sub>
Total	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>j</sub>	T <sub>m-1</sub>	T <sub>m</sub>
Tamanho da amostra	r <sub>1</sub>	r <sub>2</sub>	r <sub>3</sub>	r <sub>j</sub>	r <sub>m-1</sub>	r <sub>m</sub>
Média amostral	Ȳ <sub>1</sub>	Ȳ <sub>2</sub>	Ȳ <sub>3</sub>	Ȳ <sub>j</sub>	Ȳ <sub>m-1</sub>	Ȳ <sub>m</sub>

Fonte: Garcia Diaz e Phillips, 1995.

Sejam as definições:

$$total\ geral = T = \sum_{j=1}^m T_j \quad \text{Equação (2.8)}$$

$$número\ total\ de\ observações = N = \sum_{j=1}^m r_j \quad \text{Equação (2.9)}$$

$$média\ total = \bar{Y} = \frac{T}{N} \quad \text{Equação (2.10)}$$

O desvio total  $Y_{ij} - \mu$  (Equação 2.11) pode ser dividido em duas parcelas: o desvio da média do tratamento  $j$  em relação à média total da população, ou seja,  $\tau_j$ , e o desvio da  $i$ -ésima observação do  $j$ -ésimo tratamento em relação à média do tratamento correspondente, denominado de  $\varepsilon_{ij}$ .

$$Y_{ij} - \mu = \tau_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{Equação (2.11)}$$

Como os parâmetros populacionais não são conhecidos, utilizam-se os valores amostrais estimados de acordo com as definições apresentadas nas Equações 2.8, 2.9 e 2.10 para obtenção do desvio total, que dessa forma pode ser expresso por

$$Y_{ij} - \bar{Y} = (\bar{Y}_j - \bar{Y}) + (Y_{ij} - \bar{Y}_j) \quad \text{Equação (2.12)}$$

Para levar em consideração apenas a magnitude da variação independentemente do sinal algébrico, calculam-se os quadrados das diferenças,

conforme equação. (2.13).

$$(Y_{ij} - \bar{Y})^2 = (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j)$$

Somando-se em  $i$  e  $j$ , tem-se

$$\begin{aligned} \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 &= \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 + \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 + \\ &+ \sum_j \sum_i 2(\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) \end{aligned} \quad \text{Equação (2.14)}$$

O último termo da equação (2.14) é nulo, como pode ser visto pela equação (15).

$$\begin{aligned} \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})(Y_{ij} - \bar{Y}_j) &= \sum_j (\bar{Y}_j - \bar{Y}) \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j) = \\ &= \sum_j ((\bar{Y}_j - \bar{Y}))(r_j \bar{Y}_j - r_j \bar{Y}_j) = 0 \end{aligned} \quad \text{Equação (15)}$$

Definindo-se as seguintes somas de quadrados:

$$SQ_{total} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad \text{Equação (2.16)}$$

$$SQ_{tratamento} = \sum_j \sum_i (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2 \quad \text{Equação (2.17)}$$

$$SQ_{erro} = \sum_j \sum_i (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2 \quad \text{Equação (2.18)}$$

pode-se escrever a equação fundamental da análise de variância (eq. 2.19)

$$SQ_{total} = SQ_{tratamento} + SQ_{erro} \quad \text{Equação (2.19)}$$

Introduzem-se então três estatísticas adicionais, denominadas de quadrados médios, definidas como o quociente entre cada soma de quadrados e seu respectivo grau de liberdade ( $GL$ ). O número de graus de liberdade consiste em uma medida da independência dos valores utilizados para determinação de uma estatística.

$$QM_{total} = \frac{SQ_{total}}{N-1} \quad \text{Equação (2.20)}$$

$$QM_{tratamento} = \frac{SQ_{tratamento}}{m-1} \quad \text{Equação (2.21)}$$

$$QM_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{N-m} \quad \text{Equação (2.22)}$$

O quadrado médio total ( $QM_{total}$ ) representa a variância total dos dados. O número de graus de liberdade total ( $GL_{total}$ ) é calculado pelo número total de observações menos um,  $N - 1$ , em virtude da restrição imposta pelo cálculo da média total ( $Y$ ), que implica na perda de um grau de liberdade.

Da mesma forma, os quadrados médios  $QM_{tratamento}$  e  $QM_{erro}$  representam estimativas das variâncias entre tratamentos e dentro de cada tratamento, respectivamente, obtidas dividindo-se as somas de quadrados pelos respectivos números de graus de liberdade. Como o objetivo é comparar as variâncias entre tratamentos, o quadrado médio que representa a variação dentro do tratamento ou amostra é chamado de erro experimental.

O número de graus de liberdade entre tratamentos, ou entre amostras, é igual ao número de tratamentos menos um ( $GL_{tratamentos} = m - 1$ ) e o número de graus de liberdade dentro de cada tratamento, ou dentro de cada amostra, é igual ao número de tratamentos vezes o número de réplicas por tratamento menos um, ou seja  $GL_{erro} = m \times (r - 1)$ . O número de graus de liberdade dentro do tratamento ou amostra pode também ser calculado pela diferença entre o número de graus de liberdade total ( $GL_{total} = N - 1$ ) e o número de graus de liberdade entre tratamentos ( $GL_{tratamentos} = m - 1$ ), obtendo-se dessa forma  $GL_{erro} = N - m$ .

A comparação das variâncias entre tratamentos é feita comparando-se valores de quadrados médios, admitindo-se uma hipótese inicial  $H_0$  de que as médias dos tratamentos ou amostras são diferentes ( $H_0 \neq \bar{Y}_1 \neq \bar{Y}_2 \neq \dots \neq \bar{Y}_m$ ). Se o quadrado médio entre tratamentos apresentar valor bem superior ao quadrado médio dentro dos tratamentos, a hipótese de pesquisa, segundo a qual as médias comparadas são iguais, poderá ser rejeitada, confirmando-se a hipótese nula  $H_0$ .

Essa comparação deverá ser feita com rigor matemático, fundamentando-se na teoria da probabilidade (Carpinetti, 2000). A estatística utilizada para testar diferenças entre médias é a "estatística  $F$ ", determinada pela razão entre dois quadrados médios ou duas variâncias, conforme eq. (2.23), na qual  $v_1$  representa o grau de liberdade do quadrado médio 1 ( $QM1$ ) e  $v_2$ , o grau de liberdade do quadrado médio 2 ( $QM2$ ).



$$F_{v_1, v_2} = \frac{QM_1}{QM_2} \quad \text{Equação (2.23)}$$

O teste  $F$  de Snedecor baseia-se na comparação do valor de  $F$  calculado a partir dos resultados observados (eq.24) com valores de  $F$  tabelados, obtidos a partir de uma distribuição de probabilidades da razão entre variâncias de duas amostras, extraídas aleatoriamente de uma mesma população com distribuição normal. São tabelados valores de  $F$  em função do nível de significância e dos graus de liberdade das variâncias do numerador e do denominador ( $v_1$  e  $v_2$ , respectivamente). O nível de significância  $\alpha$  é igual a um menos o nível de confiança adotado. Níveis de significância usualmente aceitos são  $\alpha = 0,01$ ;  $0,05$  ou  $0,1$ , correspondentes a níveis de confiança ou probabilidades de 99%, 95% e 90%, respectivamente (Piratelli Filho, 1997). Dessa forma, o valor de  $F$  tabelado é representado na forma  $F_{\alpha, v_1, v_2}$ , sendo denominado de valor crítico de  $F$ .

$$F_{m-1, N-m} = \frac{QM_{tratamento}}{QM_{erro}} \quad \text{Equação (24)}$$

Se o valor de  $F$  calculado for maior do que o valor tabelado pode-se afirmar com uma confiança de  $[(1 - \alpha) 100] \%$  que as médias são diferentes e, portanto, aceita-se a hipótese nula.

O resumo dos resultados da análise de variância geralmente mostra-se no formato apresentado na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Tabela de análise de variância (ANOVA)

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	Razão entre QM (F)
Varição entre tratamentos	$m - 1$	$SQ_{tratamento}$	$QM_{trat} = \frac{SQ_{trat}}{m - 1}$	$F = \frac{QM_{trat}}{QM_{erro}}$
Varição dentro				

de cada tratamento (erro)	$N - m$ ou $m \times (r - 1)$	$SQ_{erro}$	$QM_{erro} = \frac{SQ_{erro}}{N - m}$	
Varição total	$N - 1$	$SQ_{total}$		

Para que os resultados obtidos da análise de variância sejam válidos, é necessário que os dados apresentem distribuição normal e que as variâncias dentro das amostras sejam aproximadamente iguais. Além disso, as variáveis devem ser aleatórias.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta parte do trabalho serão descritas as matérias-primas, o método de síntese utilizado para obtenção de hidroxiapatita e a metodologia utilizada para elaboração dos compósitos e obtenção dos corpos de prova. Também serão apresentados a seguir, os métodos e técnicas utilizados para caracterização dos compósitos, como também o estudo da liberação de ampicilina no compósito.

#### 3.1 Reagentes

- Hidróxido de cálcio P.A. (Merck) -  $\text{Ca(OH)}_2$ ; Lote: K38493147;
- Ácido fosfórico (Orto) (Merck) -  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; Lote:K 39541273;
- Alumina RC – HPT –  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; Lote: BL 4443 RC HPT DBM (Reynolds, EVA);
- Água deionizada;
- Água destilada;
- Ampicilina Trihidratada (Winlab, Lote: 31410026).

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Síntese dos pós Hidroxiapatita

Com base na razão ideal para hidroxiapatita,  $\text{Ca/P} = 1,67$ , o material foi precipitado a partir da reação:

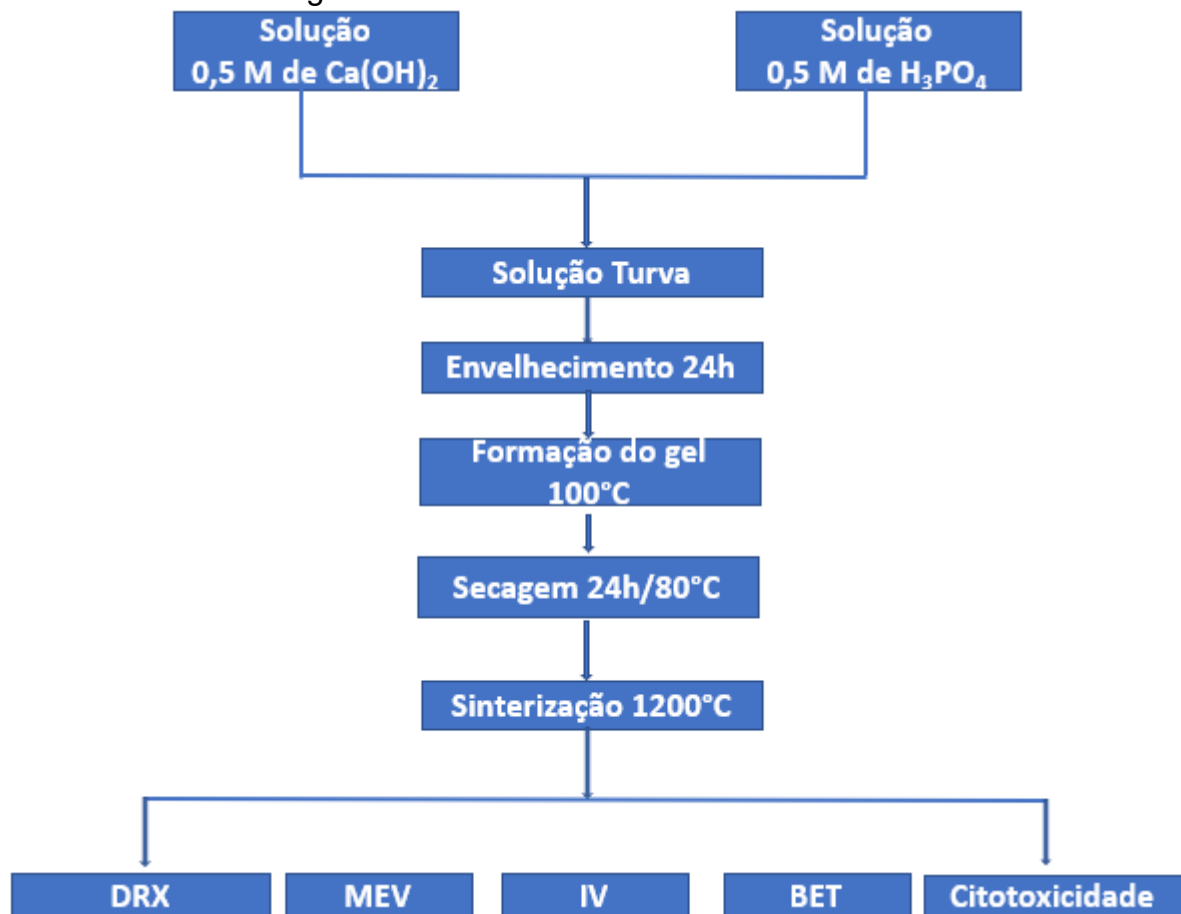


As soluções utilizadas para obtenção dos pós têm a seguinte composição: 0,5M de  $\text{Ca(OH)}_2$  e 0,3M de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Em um béquer contendo a solução de  $\text{Ca(OH)}_2$  sob agitação constante, foi adicionada, lentamente, a solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . A adição de ácido fosfórico foi controlada de modo a atingir vazão aproximadamente constante de 8 ml/min. Após a adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a solução no béquer foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente durante o período de 1 hora. A solução resultante foi envelhecida durante 24 horas. Após o término do período de envelhecimento, a

solução foi submetida a um tratamento térmico de 100°C para a formação do gel. O gel obtido foi seco em estufa a 80°C por 24 horas e, em seguida, desagregado em um almofariz de ágata, peneirado e tratado termicamente.

Na Figura 3.1 é apresentado o fluxograma com as etapas da síntese da hidroxiapatita pelo método sol-gel.

Figura 3.1- Fluxograma com as etapas da síntese da hidroxiapatita pelo método sol-gel.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.2.2 Produção dos compósitos (HA/Alumina)

Foram preparados compósitos de hidroxiapatita com percentuais de 5%, 15%, 30% de alumina. Os pós de Hidroxiapatita e Alumina foram misturados em um moinho de alta energia por 30 minutos a uma velocidade de rotação de 350 rpm em

seguida, foram produzidas pastilhas com dimensões de 12 mm de diâmetro e 6mm de altura, através da prensagem uniaxial utilizando uma carga de 2 Mpa e um tempo de 20 segundos. O Molde cilíndrico (Figura 3.2) foi lubrificado com vaselina, a fim de minimizar os esforços de cisalhamento na interfase matriz/compactado, facilitando a desmoldagem dos corpos de prova. Feito isso, as pastilhas foram sinterizadas em um forno mufla em temperatura de 1200°C durante 2 horas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Ao final do processo as amostras foram caracterizadas.

Figura 3.2 – Molde cilíndrico de aço carbono usado na prensagem dos pós.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.3 Caracterização dos Pós Sintetizados

#### 3.3.1 Difração de raios X (DRX)

A amostra foi caracterizada em um difratômetro Panalytical modelo XPERT Pro MPD, operando com uma voltagem de 40 KV e uma corrente de 40 mA, equipado com um tubo de cobalto. Os difratogramas foram obtidos varrendo a faixa de 20° - 60° para hidroxiapatita e 5° - 60° para os compósitos. A análise de DRX permitiu a identificação das fases cristalinas presentes no material, portanto o tipo de fosfato formado. A técnica não é destrutiva e utiliza apenas pequenas quantidades da amostra. Os difratogramas obtidos foram comparados a padrões encontrados na literatura através do banco de dados JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction

Standards), com auxílio do programa X'PertHighScore Plus

A análise foi realizada no laboratório de Raios-X do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará – UFC.

### **3.3.2 Espectroscopia de infravermelho**

Os espectros de espectroscopia de infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Nicolet 800 associado a uma célula MTech PAS do Laboratório de Bioinorgânica da UFC. Os espectros foram obtidos a  $4\text{ cm}^{-1}$  com resolução de uma média de 128 varreduras. A câmara de amostra da célula PAS foi evacuada com gás hélio e seca empregando-se percloroeto de magnésio como agente desumidificante. A técnica possibilita a caracterização dos grupos funcionais característicos presentes nas amostras.

A análise foi realizada no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará – UFC.

### **3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise microestrutural da amostra foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura FEG Quanta 450 ambiental com EDS/EBSD, estágio de resfriamento e aquecimento, a partir de amostras fixadas em um suporte com fita de carbono dupla-face. As amostras foram recobertas com uma fina camada de carbono utilizando em sistema de deposição a vácuo Bal-Tec. A microscopia permitiu obter dados sobre a morfologia.

A análise foi realizada na Central Analítico - Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará – UFC.

### **3.3.4 Adsorção de Gases (BET)**

As características dos poros das amostras foram analisadas usando um equipamento Autosorb – Quantachrome NOVA 1200, o qual é composto por um sistema de adsorção física automatizado que fornece dados de equilíbrio de adsorção e dessorção. Os dados de volume adsorvido e dessorvido em várias pressões relativas foram utilizados para gerar informações sobre a área superficial por BET, volume de poros( $\text{cm}^3/\text{g}$ ), distribuição e tamanho médio de poros (nm). Medidas da área superficial específica( $\text{m}^2/\text{g}$ ) foi baseada nas teorias de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (LOWELL, 1984). Análises do tamanho de poros e volume total de poros foram obtidas pelo método de Barret, Joyner e Halenda (BJH) (BARRETT, 1951, KRUK, 1997).

A análise foi realizada no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará – UFC.

### **3.3. 5 Ensaio In Vitro: Citotoxicidade**

Para o estudo de toxicidade, os materiais foram submetidos a uma avaliação de citotoxicidade in vitro. Os ensaios foram realizados no Laboratório Biotechcell® de acordo com a norma ISO 10993, 2009. (Biological evaluation of medical devices; Part 5: tests for in vitro cytotoxicity).

A amostra de referência Zdec (*Zinc Diethyldithiocarbamate*), a de Hidroxiapatita e do compósito Hidroxiapatita/Alumina foram extraídos em meio de cultura durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , conforme a norma ISO 10993-12, 2012. O extrato foi testado a uma concentração máxima de 100% e as demais, em diluição seriada, de: 50%, 25%, 12,50%, 6,25%, 3,12% e 1,56%.

As células (linhagem NCTC clone L929) foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 104 células/100 $\mu\text{L}$  e cultivadas em meio de cultura MEM (Meio Mínimo de Eagle) suplementado com 10% de soro e 1% de solução composta dos antibióticos penicilina (100U/mL) / estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As placas de 96 poços foram incubadas ( $37^\circ\text{C}$ ) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24

horas a fim de permitir a sedimentação e adesão celular.

Após esse período, as amostras testes (Hidroxiapatita e Hidroxiapatita/Alumina), bem como a substância de referência foram adicionadas às culturas celulares. Após a exposição de 24 horas, o meio foi retirado e adicionado a cada poço 50µL de solução com o corante MTT [3-(4,5- dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio] (1mg/mL). As placas foram incubadas (37°C) em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas e logo após a solução de de MTT foi removida e o precipitado de formazan foi ressuspendido em 100 µL álcool isopropílico. Para a quantificação do sal reduzido (formazan), as absorbâncias de cada poço foram obtidas com o auxílio do espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

Os resultados foram analisados de forma qualitativa usando a Tabela 3.1 de acordo com a ISO 10993-5.

Tabela 3.1 Análise qualitativa de danos celulares seguindo a norma ISO 10993-5.

<b>Grau</b>	<b>Reatividade</b>	<b>Condições de todas as culturas</b>
0	Nenhum	Grânulos intracitoplasmáticos discretos, sem lise celular, sem redução do crescimento celular e conseqüentemente ausência de inibição de crescimentocelular.
1	Leve	Não mais de 20% das células são arredondadas; ausência de grânulos intracitoplasmáticos; presença de alterações na morfologia; presença ocasional delise celular; observação de ligeira inibição de crescimento celular.
2	Suave	Não mais de 50% das células são arredondadas e desprovidas de grânulos intracitoplasmáticos; sem grande lise celular; inibição do crescimento celular não superior a 50%.
3	Moderado	Não mais de 70% das células são arredondadas ou lisadas; camada celular não completamente destruída; mas a inibição do crescimento celular é superior a 50%.
4	Severo	Quase completa ou destruição completa da camada de células.



### 3.4 Caracterização dos Compósitos

#### 3.4.1 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH)

Os compósitos foram submersos em um Becker contendo água deionizada à temperatura constante de 37° C, com uma relação líquido/sólido 10:1. O pH das amostras foi determinado após 24 horas em um pH-Metro digital marca QUIMIS, modelo Q-400A. Antes de cada medida o pH-Metro foi calibrado com soluções tampão Merck para pH 4 e 7. Todas as medidas de pH foram realizadas em triplicata.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Departamento de engenharia Metalúrgica e Materiais da Universidade Federal do Ceará – UFC.

#### 3.4.2 Porosidade Aparente

A porosidade de um material afeta suas propriedades físicas e conseqüentemente seu comportamento no ambiente próximo a ele. O termo porosimetria é frequentemente usado para compreender as determinações de tamanho de poro, distribuição, volume, densidade e outras características relacionadas à porosidade de um material. A adsorção e permeabilidade, energia, densidade e outros fatores influenciados pela porosidade de uma substância determinam a maneira e a condição nas quais estas podem ser usadas apropriadamente.

As medidas de porosidade aparente foram obtidas por meio do método de Arquimedes. Este método é baseado em medidas de massa da amostra quando seca e após permanecer imersa em água durante 24 horas.

Para os cálculos de densidade ( $DA$ ) e porosidade aparente ( $PA$ ) foi utilizada a seguinte equação (3.3):

$$PA(\%) = \frac{M_u - M_s}{M_u - M_i} \times 100 \quad \text{Equação (3.3)}$$

onde,  $M_s$  é a massa seca da amostra (g),  $M_u$  é a massa da amostra úmida,  $M_i$  é a massa da amostra imersa em água e  $\rho$  é a densidade da água na temperatura em que foi realizada a medida.

O ensaio foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Departamento de engenharia Metalúrgica e Materiais da Universidade Federal do Ceará – UFC.

### **3.4.3 Resistência à Compressão Diametral**

A resistência mecânica das amostras sem adição e com adição de alumina foi determinada pelos ensaios de resistência à compressão diametral. As amostras foram preparadas em lotes de 3 (cada). Os testes foram realizados em um equipamento universal, marca Instron, modelo 4443, com velocidade de 1 mm/min, utilizando cilindros de 12 mm de diâmetro e 6 mm de altura.

A análise foi realizada no Laboratório de Ensaio Mecânico do Departamento de Odontologia na Universidade Federal do Ceará.

## **3.5 Análise Estatística**

Os resultados obtidos na determinação do potencial hidrogeniônico (pH), porosidade aparente e resistência a compressão diametral foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) para verificar se existem possíveis diferenças estatísticas significantes fossem detectadas entre os grupos testados.

Os dados obtidos foram sujeitos ao tratamento estatístico em duas etapas. A primeira foi a análise descritiva dos resultados, com a construção de gráficos que permitiram visualizar as principais tendências observadas e a segunda foi a análise específica de cada uma das variáveis, onde foi utilizado o teste ANOVA (Análise de Variância de fator único), que teve como objetivo comparar se as médias aritméticas entre os tratamentos eram estatisticamente significantes e o procedimento de múltiplas comparações de Tukey- Kramer, para determinar quais dentre as médias aritméticas eram significativamente diferentes (Vieira, 2006). Caso a diferença

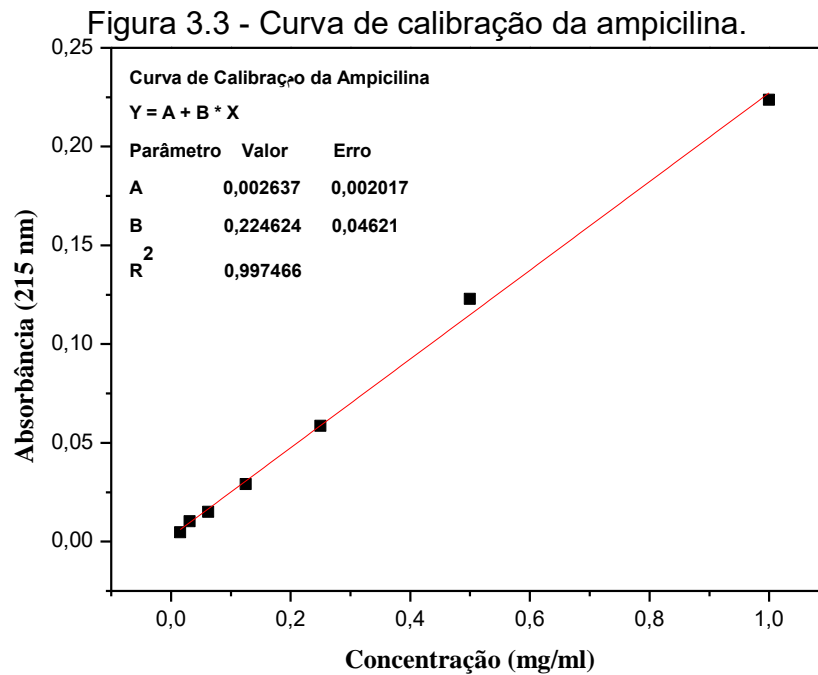
absoluta nas médias aritméticas das amostras seja maior do que o intervalo crítico, o par específico é considerado significativamente diferente (Levine, et al., 2008).

Embora o teste de ANOVA de fator único seja relativamente robusto com respeito ao pressuposto de variância igual nos tratamentos, grandes diferenças nas variâncias dos tratamentos podem afetar seriamente o nível de significância. Então, para testar a homogeneidade da variância foi utilizado o teste de Levene (Vieira, 2006).

### **3.6 Estudo da Liberação de Ampicilina nos compósitos**

O estudo da liberação de fármaco, bem como a taxa e o mecanismo predominante foram realizados *in vitro*. O compósito obtido de acordo com o descrito anteriormente foi escolhido para a incorporação da ampicilina. A amostra foi presa em um fio de platina e submersas em um becker com temperatura constante de  $37^{\circ} \text{C} \pm 0,1$ , contendo 100 ml de PBS (PhosphateBuffered Saline – Solução Salina de Fosfato Tamponada) de pH 7,4, sob agitação constante 50 rpm. Alíquotas de 1 ml foram retiradas em determinados períodos, e repostas com solução tampão. As alíquotas foram diluídas para 2 ml com solução PBS e, para estimar a quantidade de ampicilina liberada, foi medido a absorbância, utilizando-se uma cubeta de quartzo e comprimento de onda de 215 nm, em um espectrofotômetro de UV-visível Termo Scientific modelo Biomate 3.

A curva de calibração apresentada na figura 3.3 possibilitou que a quantificação da concentração do fármaco fosse realizada durante as medidas. Para a curva de calibração diluiu-se uma solução de ampicilina (1mg/ml) para concentrações variando entre 0,001 e 1 mg/ml. Os resultados foram analisados como porcentagem cumulativa de ampicilina liberada no meio em função do tempo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Devido às diluições subseqüentes da solução tampão em que foi liberada a ampicilina, tornou-se necessário corrigir a quantidade de massa obtida pelas leituras no espectrofotômetro utilizando a seguinte equação (Ogawa e Plepis, 2002):

$$M_n = m_n - (m_{n-1} \times 0,99) + M_{n-1} \quad \text{Equação 3.5}$$

onde,

- $M_n$  = massa de antibiótico presente na solução no momento da retirada da alíquota;
- $m_n$  = massa de antibiótico considerando-se a diluição de vido à reposição com tampão;
- $M_{n-1}$  = massa de antibiótico obtida na leitura imediatamente anterior.

### **3.6.1 Avaliação da Cinética de Liberação do Fármaco**

O modelo matemático de sistemas de liberação e previsibilidade de disponibilização de fármacos é um campo muito importante, tanto acadêmica quanto industrialmente, apresentando um enorme potencial de aplicação no futuro. Estes modelos visam elucidar o comportamento do material e fornecer mecanismos de previsão da cinética de liberação (LAO et al., 2011).

O processo de liberação de fármacos pode ser dividido em quatro etapas, consecutivas ou não:

- 1) permeação do meio de liberação para dentro do dispositivo;
- 2) dissolução do fármaco;
- 3) difusão do fármaco através da matriz devido ao gradiente de concentração;
- 4) transferência convectiva do fármaco para dentro do meio de liberação.

Os dados obtidos dos perfis de liberação controlada foram submetidos a tratamentos matemáticos para a determinação de cinética de liberação, para isso foram aplicados dois modelos matemáticos, os quais descrevem a liberação do fármaco incorporado na matriz: Modelo de Higuchi, Modelo de Korsmeyer – Peppas.

Higuchi (1963), desenvolveu diversos modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes sólidas e semi-sólidas. A equação de Higuchi foi inicialmente empregada para sistemas planares, sendo depois modificada para considerar diferentes geometrias dos sistemas matriciais. O modelo de Higuchi é um modelo aproximado e fundamentado na primeira lei de Fick. Esse modelo assume que a droga na camada superficial do sistema dissolve-se na matriz e difunde-se para fora da mesma. Quando o teor do agente na superfície esgota-se, a próxima camada começa a exaurir. A cinética de liberação pode ser descrita pela equação de Higuchi (Equação. 3.6), onde uma reta é esperada para a quantidade liberada em função da raiz quadrada do tempo ( $t^{1/2}$ ) para sistemas baseados no mecanismo de difusão (Costa & Lobo, 2001).

$$M_t = k t^{1/2}$$

Equação (3.6)

onde,  $M_t$  é a quantidade total de droga liberada,  $k$  é a constante de liberação e  $t$  é o tempo.

De acordo com Souza (2009), a aplicação do modelo de Higuchi segue alguns postulados:

- (a) a concentração inicial do fármaco no sistema deve ser maior que a sua solubilidade no meio;
- b) a análise matemática é baseada em difusão unidimensional;
- c) a dissolução do sistema de liberação é desprezível;
- d) o coeficiente de difusão do fármaco é constante;
- e) é válido somente para os primeiros 60% de liberação do fármaco.

Para simplificar a análise dos dados de sistemas de variadas geometrias, uma expressão empírica exponencial foi desenvolvida para relacionar a liberação fracional do fármaco com o tempo de liberação (Equação 3.7). Este é o modelo de Korsmeyer-Peppas, também chamado lei da potência (Costa & Lobo, 2001).

$$\frac{M_t}{M_0} = K t^n \quad \text{Equação (3.7)}$$

onde,  $M_t/M_0$  é a liberação fracional do soluto ( $M_t$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ ;  $M_0$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo infinito),  $t$  é o tempo de liberação,  $K$  é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica e  $n$  é o expoente de liberação, característico do mecanismo de liberação (Costa & Lobo, 2001). A lei de potência aplica-se até 60% da quantidade total do fármaco liberado. Prediz que a liberação fracional do fármaco é exponencialmente relacionada ao tempo de liberação e descreve adequadamente a liberação do fármaco a partir de esferas, barras, cilindros e discos. Os parâmetros da equação 3.7 podem ser obtidos a partir da equação 3.8.

$$\ln\left(\frac{M_t}{M_0}\right) = \ln K + n \ln t \quad \text{Equação (3.8)}$$

A inclinação ( $n$ ) de um gráfico correlacionando  $\ln$  da concentração do fármaco liberado *versus*  $\ln$  do tempo é 0,5 para difusão que puramente segue a lei de

Fick (Tabela 3.2). Um padrão que não segue a lei de Fick ( $0,5 < n < 1,0$  ou  $0,45 < n < 0,89$ ) é observado quando a proporção de penetração do solvente e a liberação do fármaco estão num mesmo patamar.

Tabela 3.2 - Relação entre o valor  $n$  e o mecanismo de liberação controlada.

Expoente de Liberação ( $n$ )	Mecanismo de Liberação de Fármaco
0,5	Difusão de acordo com a lei de Fick
$0,5 < n < 1$	Transporte anômalo (não Fickiano)
1	Ordem zero

Fonte: Peppas, 1985.

Para estes tipos de sistemas, as equações que descrevem o modelo de liberação dependem da geometria da amostra e da superfície exposta (CARRODEGUAS, 2000).

A modelagem matemática de sistemas de liberação e previsibilidade de disponibilização de fármacos é um campo muito importante, tanto acadêmica quanto industrialmente, apresentando um enorme potencial de aplicação no futuro. Estes modelos visam elucidar o comportamento do material e fornece mecanismos de previsão da cinética de liberação (LAO et al., 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

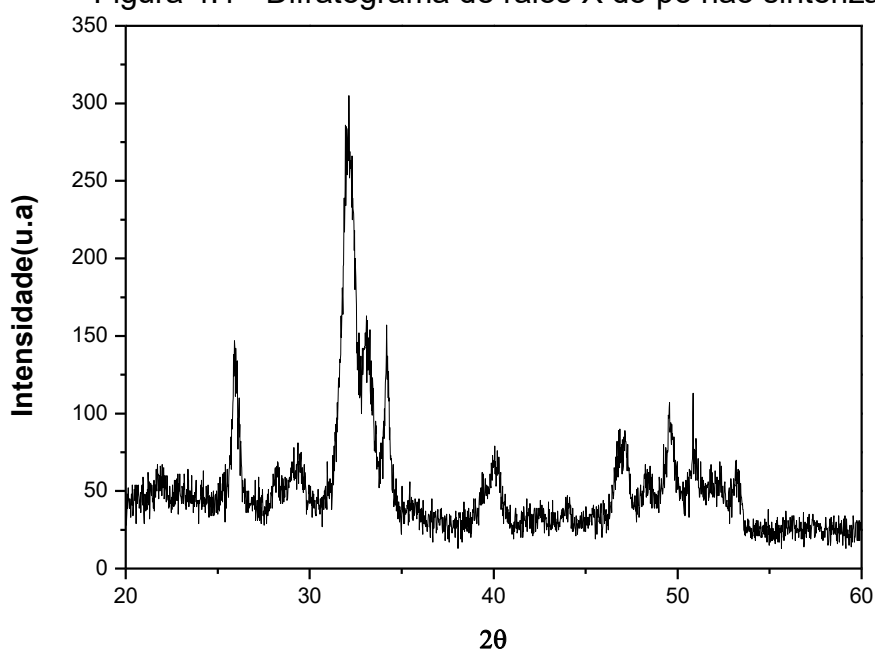
Para facilitar a análise dos resultados neste trabalho, as formulações foram nomeadas segundo as iniciais do nome hidroxiapatita e hidroxiapatita com fármaco seguido de dois dígitos numéricos correspondentes à sua respectiva fração em massa de aditivo incorporado (Alumina), ou seja, HAp-00, HA-05, HA-15, HA-30, HAF-15.

### 4.1 Caracterização Físico-Química

#### 4.1.1 Difração de Raios X (DRX)

Os estudos realizados por difratometria de raios X serviram de apoio para identificação das fases presentes em cada uma das etapas durante o desenvolvimento deste projeto. Foram obtidos difratogramas do pó sintetizado (sem tratamento térmico) para verificar a eficiência da técnica sol-gel e sinterizado (com tratamento térmico a 1200°C) com tempo de envelhecimento de 24 horas do precipitado e das amostras de Hidroxiapatita com adição de Alumina a 5%, 15% e 30% para identificação das fases presentes. A figura 4.1 apresenta a análise da amostra não sinterizada.

Figura 4.1 - Difratograma de raios X do pó não sinterizado.

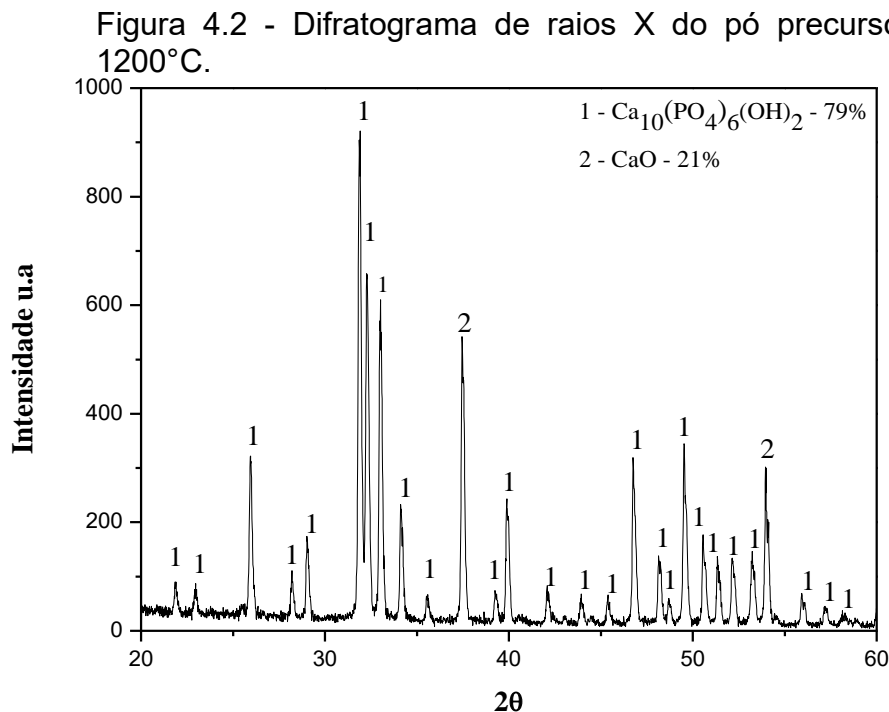


Fonte: Elaborada pela autora.



Observa-se a presença de picos largos e com baixa intensidade, resultando em um produto de reação que consiste em um fosfato de cálcio com baixa cristalinidade, ou seja, indica a presença de fase semi-amorfa, com padrão característico de uma hidroxiapatita pouco cristalina semelhante à fase mineral do osso humano (SANOSH et al., 2008).

A Figura 4.2 apresenta o resultado da análise por difratometria de raios X do pó precursor depois de sinterizado a 1200°C por 2 horas. No difratograma foi observado aumento da intensidade dos picos quando comparado com a amostra não sinterizada, apresentando picos bem definidos referentes à fase hidroxiapatita, como fase prioritária, na composição  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  de ficha cristalográfica 009-0432 JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards), apresentando plano principal de difração [121]. Também foi observado, a formação de uma segunda fase, Óxido de Cálcio (CaO) ficha cristalográfica 075-0264 JCPDS.



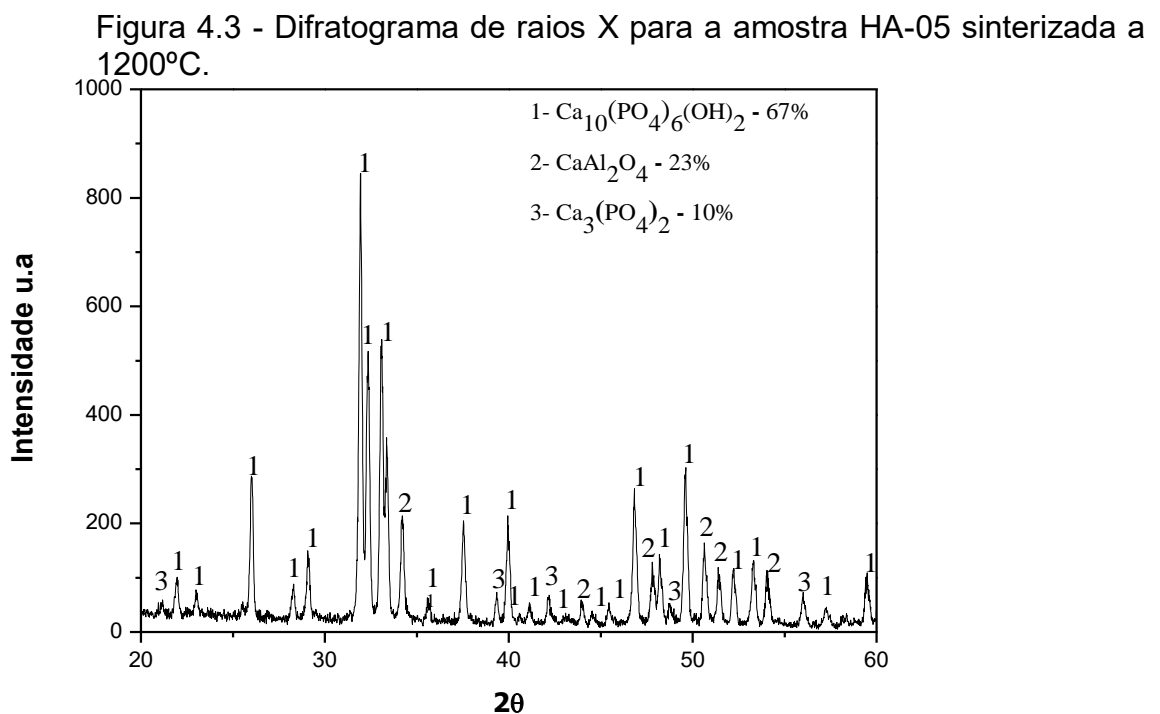
Fonte: Elaborada pela autora.

Pequenos desvios da composição estequiométrica podem contribuir para que a hidroxiapatita decomponha-se, transformando-se em novas fases, durante processos de sinterização. Variações na razão molar  $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$  significam um maior número de íons de fósforo ou cálcio. Dessa forma, durante a sinterização, nas

interfaces de grãos do biomaterial pode haver a difusão desses íons levando à decomposição de hidroxiapatita formando fases de CaO (BEST et al., 2008).

Segundo Aguilar et. al. (2014), o método sol-gel é um dos melhores métodos para a síntese de hidroxiapatita por permitir uma mistura a nível molecular dos precursores de cálcio e fósforo e, conseqüentemente, por induzir a formação de hidroxiapatita de alta pureza e homogeneidade, utilizando baixas temperaturas de processamento, com a produção de partículas nanométricas, que favorecem a integração óssea, por conduzirem a uma melhor resposta celular.

Os resultados dos difratogramas de raios X obtidos para os compósitos HA-05, HA-15, HA-30 constatou-se a presença das fases Hidroxiapatita (JCPDS 09-0432),  $\beta$ -Fosfato Tricálcico ( $\beta$ -TCP) - JCPDS: 070-2065 e de Aluminato de Cálcio ( $\text{CaAl}_2\text{O}_4$ ) - JCPDS: 070-0134 de acordo com as Figuras 4.3, 4.4 e 4.5.

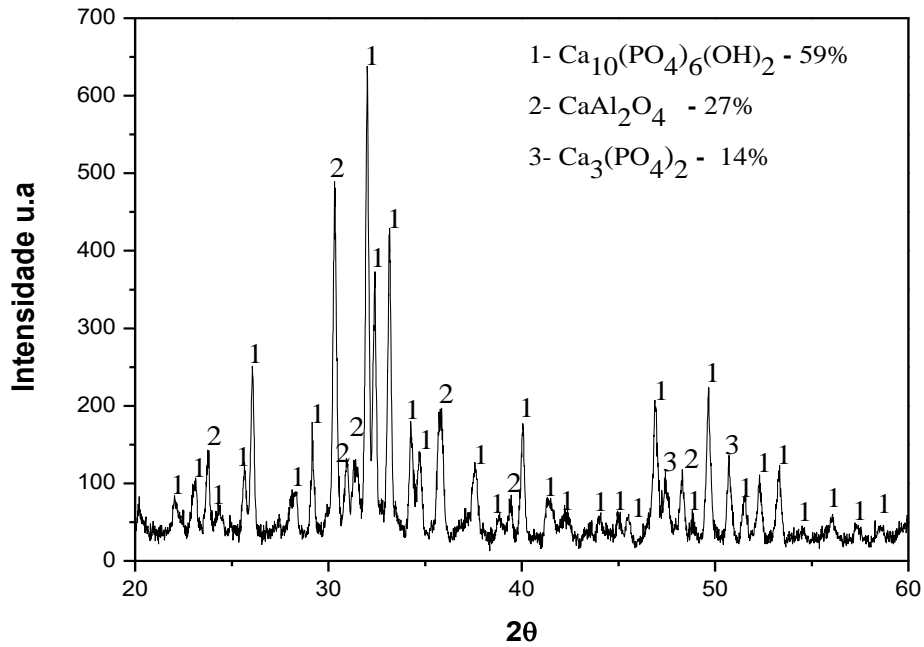


Fonte: Elaborada pela autora.

Para a composição com 5% de alumina observa-se a formação de picos representativos da fase  $\beta$ -TCP e  $\text{CaAl}_2\text{O}_4$ . Constatou-se na literatura que a alumina, dentro de uma matriz hidroxiapatita, aumenta a taxa de decomposição desta fase em  $\beta$ -TCP a temperaturas acima de 1150°C, associando também à formação dos aluminatos de cálcio. Tal efeito é justificado pela presença da segunda fase de alumina

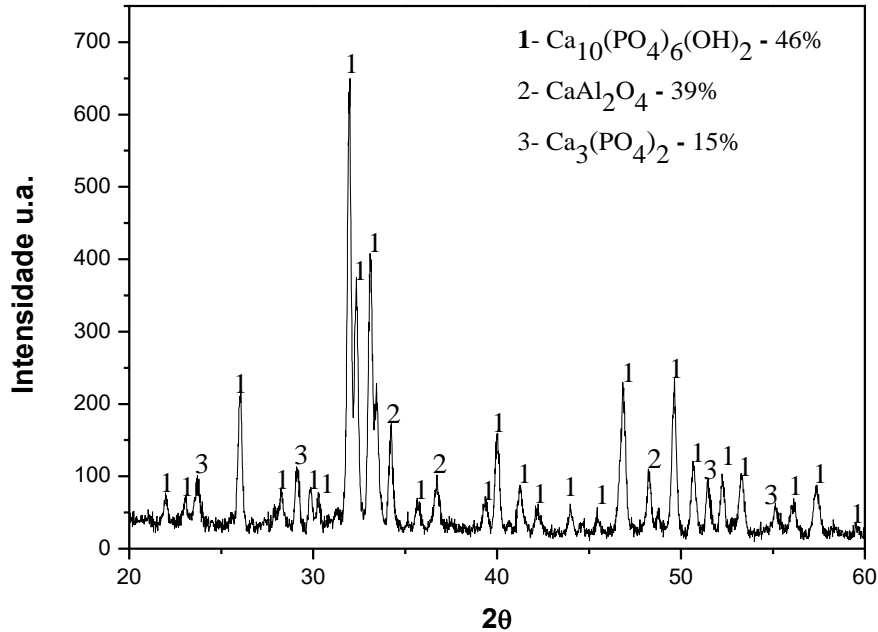
na composição, que altera a cinética de difusão superficial dos íons da matriz hidroxiapatita, agora favorecendo a formação de novas fases (AMINZARE, 2012, EVIS, 2007).

Figura 4.4 - Difratoograma de raios X para a amostra HA-15 sinterizada a 1200°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.5 - Difratoograma de raios X para a amostra HA-30 sinterizada a 1200°.



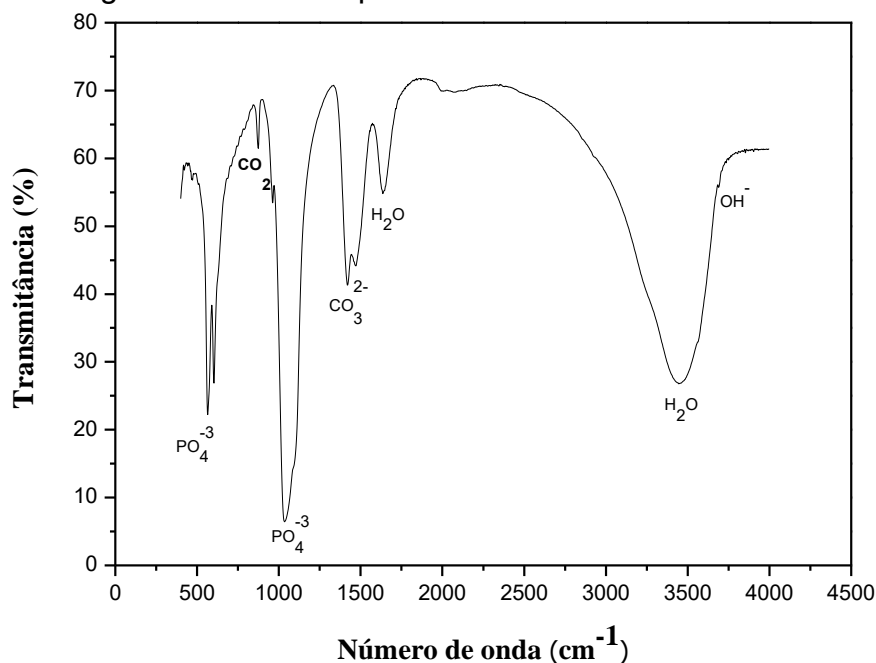
Fonte: Elaborada pela autora.

Ao comparar os difratogramas com os resultados da análise qualitativa das fases presentes, observa-se que o aumento da composição de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nas amostras apresentou variações significativas. O pico principal da fase HA apresentou intensidade visivelmente menor e aumento em percentagens das fases  $\text{CaAl}_2\text{O}_4$  e  $\beta$ -TCP.

#### 4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A análise por espectroscopia na região do infravermelho foi realizada para identificação das bandas correspondentes aos grupos funcionais do pó de fosfato de cálcio sintetizado, com o objetivo de complementar as informações obtidas pela DRX. A Figura 4.6 mostra que os espectros no infravermelho apresentam bandas correspondentes aos grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e também bandas referentes a moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  fisicamente adsorvidas na superfície da hidroxiapatita.

Figura 4.6 - Análise por Infravermelho IV da amostra não sinterizada.



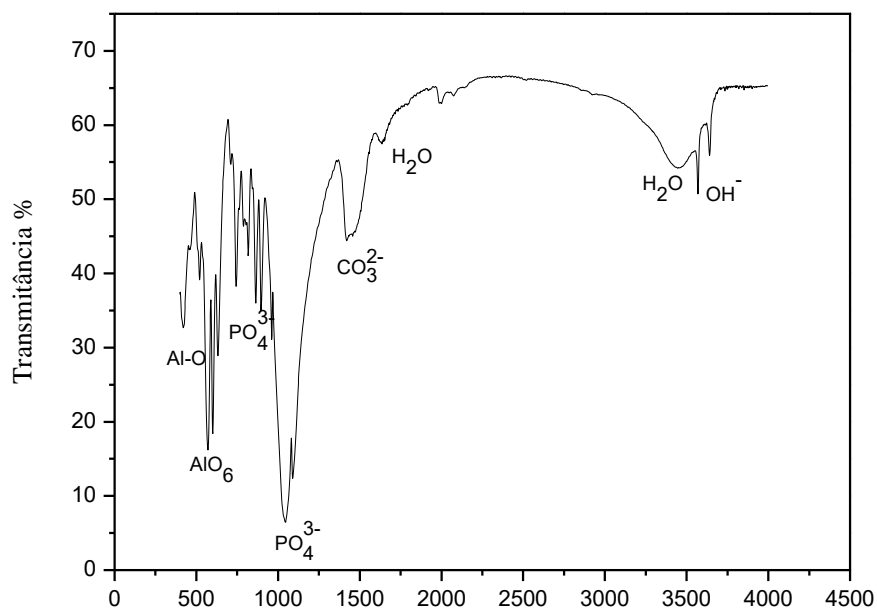
Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que no espectro de absorção no infravermelho está presente a banda em  $3696\text{ cm}^{-1}$  que é atribuída ao modo de vibração de estiramento e flexão dos grupos O-H que caracterizam o composto HA. As bandas nas regiões de  $561$  e  $1032\text{ cm}^{-1}$  no espectro correspondem às vibrações de estiramentos dos grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ . Essas bandas relacionadas ao grupamento fosfato reforçam a obtenção da Hidroxiapatita (AZEVEDO, 2015). A amostra em estudo apresentou banda na região de  $1430\text{ cm}^{-1}$  correspondente a vibrações do C-O em regiões de alta energia e uma banda em  $865\text{ cm}^{-1}$  em regiões de baixa energia. Essas bandas de absorção mostram que, utilizando um sistema aberto na preparação das amostras para análise, houve incorporação de  $\text{CO}_2$ . Bandas com comprimentos de onda próximos de  $3444$  e  $1624\text{ cm}^{-1}$  correspondem a moléculas de água fisicamente incorporadas à superfície da Hidroxiapatita (RAMESH et al., 2013; MARKOVIC et al., 2004; KONGSRI et al., 2013)

Os espectros de infravermelho obtidos sobre às amostras HA-05, HA-15 e HA-30 (Figura 4.7, 4.8 e 4.9), não apresentaram diferença em relação à matriz hidroxiapatita. Observa-se bandas de estiramento O-H a  $3570\text{ cm}^{-1}$  e de P-O (de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ ) a  $1046\text{ cm}^{-1}$ , bem como de água absorvida a  $3456$ ,  $1634\text{ cm}^{-1}$ . Os grupos funcionais relativo ao estiramento C-O também estão presentes nas amostras,

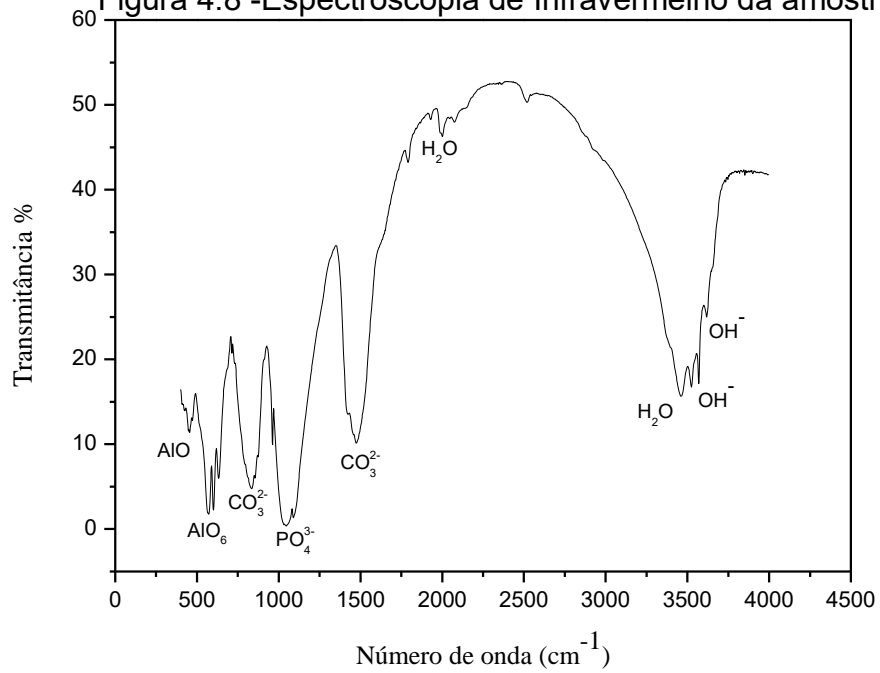
indicando a presença de moléculas de  $\text{CO}_2$  que podem ter se originado do ambiente atmosférico e/ou estar adsorvidas na superfície do material. Ao adicionar a fração mássica de alumina é mais visível o aparecimento de bandas nas regiões  $416,850 \text{ cm}^{-1}$ , o que indica presença de aluminatos de cálcio, resultados semelhantes já foram observados por (BERZINA-CIMDINA e BORODAJENKO, 2012) (KIM, BANG, et al., 2008).

Figura 4.7 -Espectroscopia de Infravermelho da amostra HA-05.



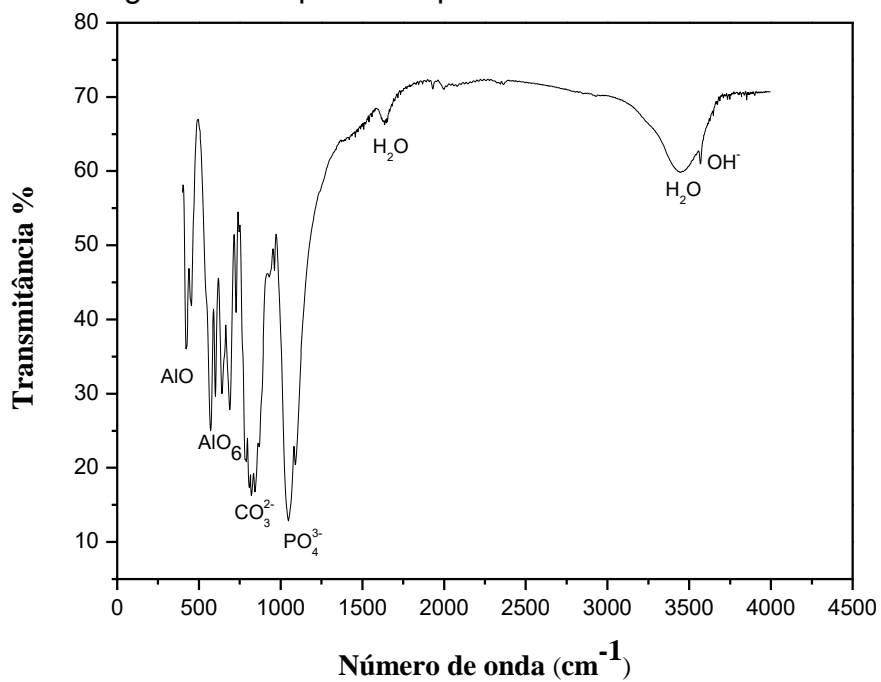
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.8 -Espectroscopia de Infravermelho da amostra HA-15.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.9 -Espectroscopia de Infravermelho da amostra HA-30.

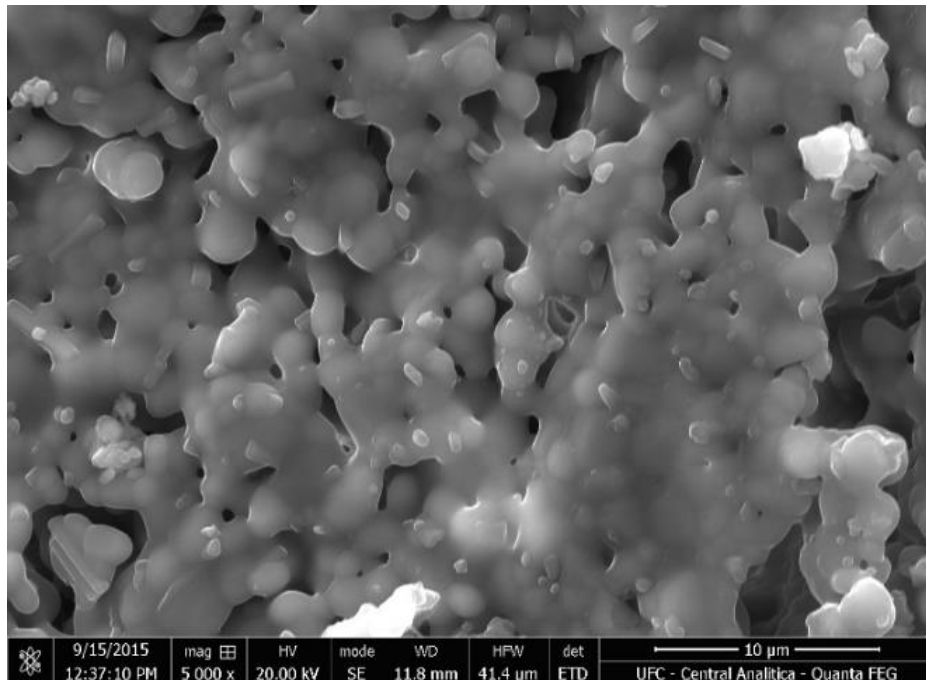


Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microestrutura do pó obtido e sinterizado a 1200°C foi observada por microscopia eletrônica de varredura - MEV (Figura 4.10). Observa-se que a sinterização ocorreu na temperatura utilizada, o que pode ser confirmado pelo crescimento de grãos com a formação de pescoço entre as partículas além da presença de vazios entre os aglomerados. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores (LANDI et al., 2000, TAMPIERI et al., 2000).

Figura 4.10 - Microscopia Eletrônica de Varredura do pó sinterizado à 1200 °C.



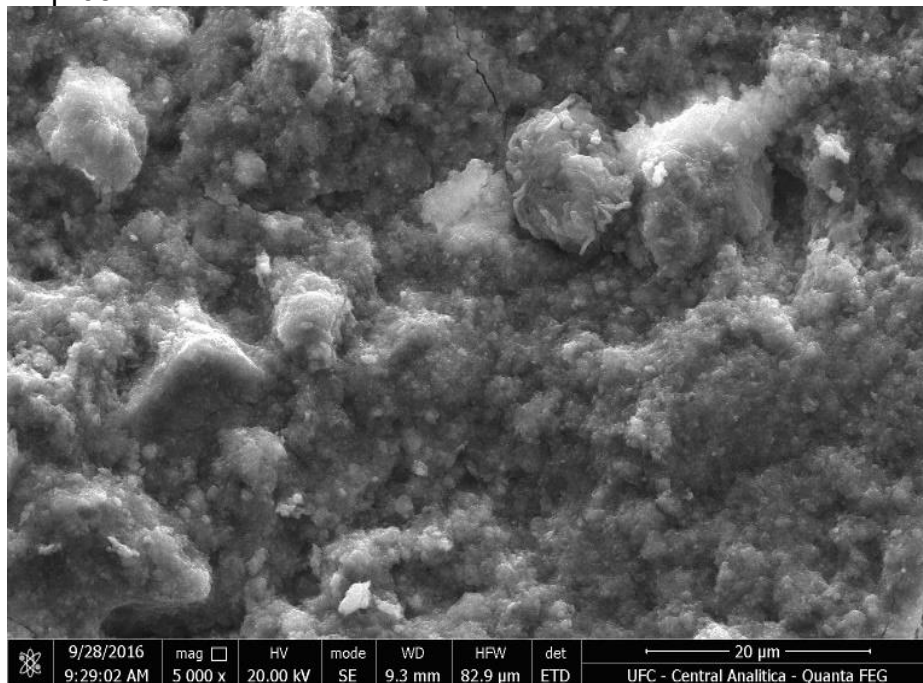
Fonte: Elaborada pela autora.

Os estudos de caracterização por microscopia eletrônica de varredura realizados nos compósitos de HA com 5, 15 e 30% em peso de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mostraram uma modificação significativa da microestrutura se comparada com a da matriz Hidroxiapatita sinterizada em forno mufla a uma temperatura de 1200 °C durante duas horas conforme ilustrado nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13. Outra observação foi à boa dispersão da alumina dentro da matriz e diminuição da porosidade conforme



observado nas Figuras 4.12 e 4.13. Isso pode estar associado à presença da alumina em posição inter e intra granular inibindo a aderência de grãos e influenciando na cinética de difusão interfacial entre as fases durante o processo de sinterização dos compósitos (CAMARGO et al., 2009; KARVAT, 2005; EPURE et al., 2007). Encontra-se na literatura o fato de a densificação de um pó cristalino ser influenciado pela presença de uma segunda fase inerte em posição inter e intra granular na matriz cerâmica, principalmente quando o processo de compactação dessas cerâmicas heterogêneas precede a sinterização. Isto pode levar à desestabilização das interfaces pela presença da difusão interfacial, conduzindo a modificação das estruturas cristalina e transformação de novas fases (EPURE et al., 2007; JI e MARQUIS, 1993).

Figura 4.11 - Microscopia eletrônica de varredura referente à amostra HAp-05.

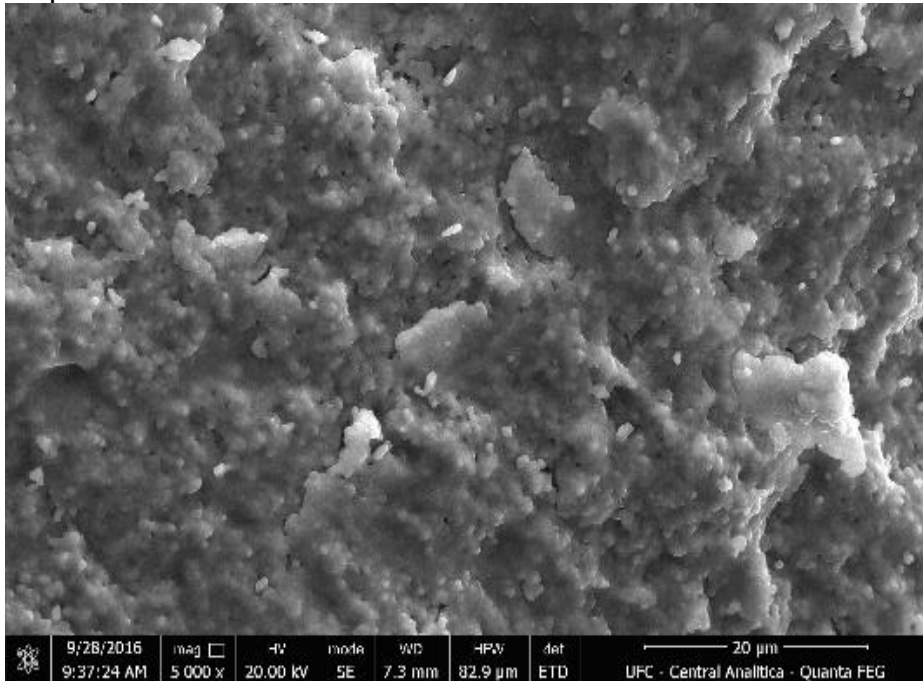


Fonte: Elaborada pela autora.

Uma segunda fase do tipo alumina pode influenciar diretamente sobre a sinterabilidade do compósito, além de alterar fortemente no processo de decomposição da fase Hidroxiapatita em função da temperatura, o que pode desestabilizar a fase alumina, conduzindo a formação de precipitados de aluminatos

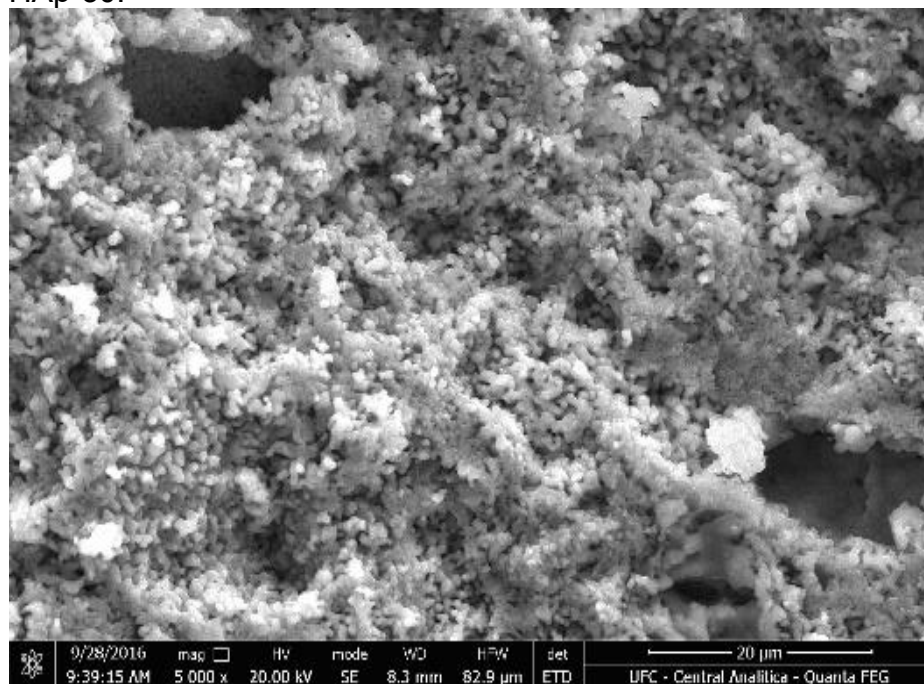
de cálcio na interface de grãos da matriz hidroxiapatita, caso já observado por outros autores (KARVAT, 2005; EVIS e DOREMUS, 2007; VISWANATH et al.,2006)

Figura 4.12 - Microscopia eletrônica de varredura referente à amostra HAp-15.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.13 - Microscopia eletrônica de varredura referente à amostra HAp-30.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### **4.1.4 Determinação da Área Superficial (BET e BJH)**

Os sólidos porosos sintéticos vêm despertando grande interesse devido à possibilidade de um controle mais preciso, não só da composição química, como também da forma, estrutura e dimensionalidade dos poros (SELVAM et al., 2001). Os sólidos porosos segundo a IUPAC podem ser divididos em três categorias, conforme o tamanho dos poros presentes na estrutura. Os sólidos microporosos têm poros com dimensões inferiores a 2 nm, os mesoporosos entre 2 e 50 nm e os macroporosos apresentam poros maiores do que 50 nm (SOLER-LLIA et al., 2002 e CHOMA et al., 2002).

A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos das medidas de adsorção de  $N_2$ , que mostram as diferenças nos valores da área superficial específica ( $S_{BET}$ ), volume de poros ( $V_p$ ) e diâmetro de poros ( $D_p$ ) das amostras. O diâmetro de poros observado diminuiu de 8,79 nm para 3,00 nm quando a quantidade de Alumina aumentou de 5% para 15% e teve um aumento nos compósitos com 30 % de Alumina. Áreas superficiais são medidas para as formulações preparadas. Um acréscimo para

31,82 m<sup>2</sup>/g é observado para amostra HA-15, com um decréscimo para 16,32 m<sup>2</sup>/g na amostra HA-30. Pode-se observar através que o diâmetro de poros do compósito com 15% de Alumina é menor do que das outras formulações.

Tabela 4.1 - Resultados de adsorção de N<sub>2</sub>

Amostra	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	D <sub>p</sub> (nm)	V <sub>p</sub> (cm <sup>3</sup> /g)
HÁ-05	16,33	8,79	0,035
HÁ-15	31,82	3,00	0,023
HÁ-30	16,32	6,53	0,026

Fonte: Elaborada pela autora

Os gráficos de distribuição de tamanho de poros obtidos pelo método BJH para as amostras são apresentados nas Figura 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17. Observa-se uma distribuição de tamanho de poros muito estreita, centrada em um valor de diâmetro de poros, característica típica dos materiais mesoporosos com arranjo estrutural bem ordenado. Dependendo da aplicação, a distribuição do tamanho de poros também passa a ser um fator importante. É essencial que os sólidos apresentem poros de diâmetros bem definidos, principalmente se forem destinados à liberação controlada de fármacos (ARCOS et al., 2009).

Figura 4.15 - Distribuição de tamanho de poros da amostra HA-05.

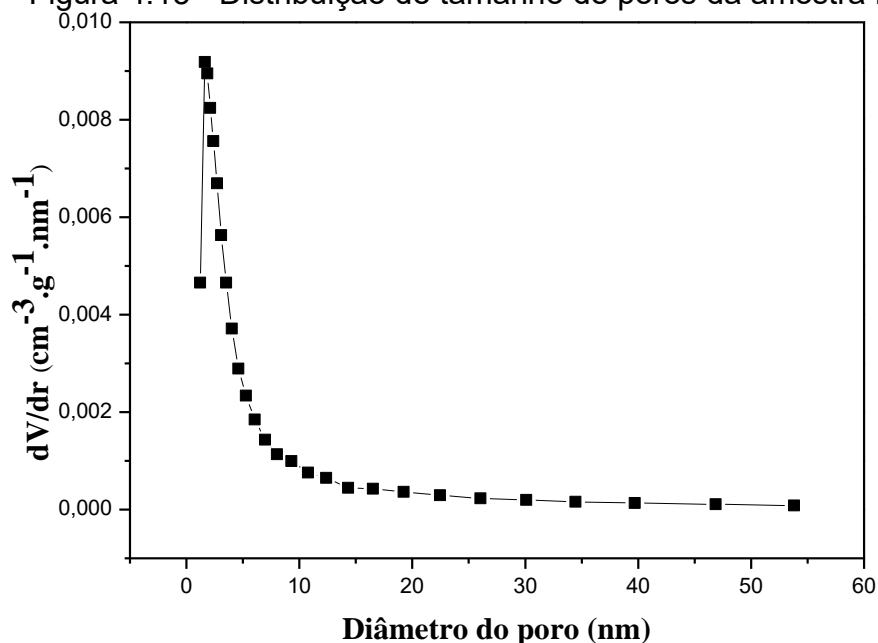
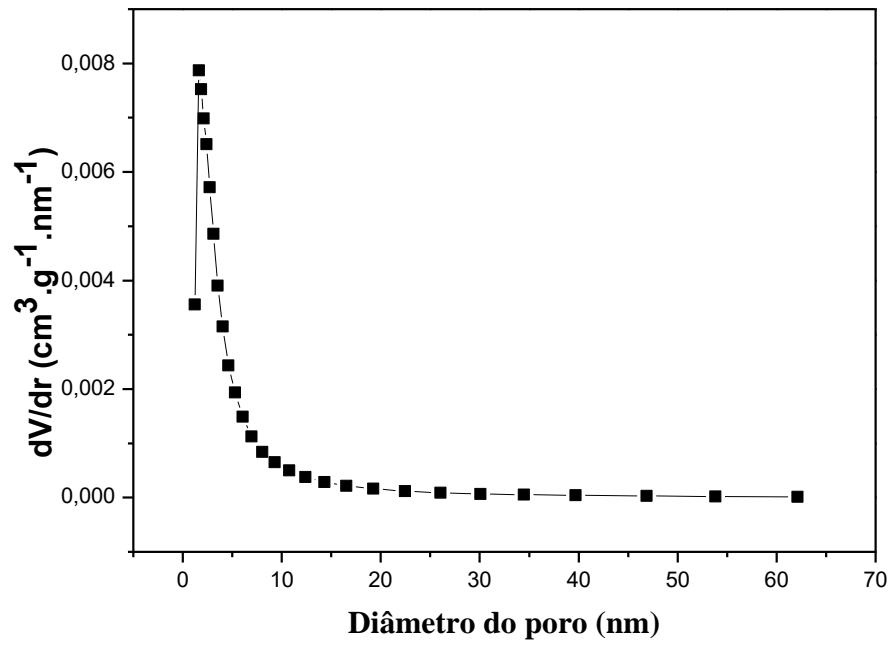
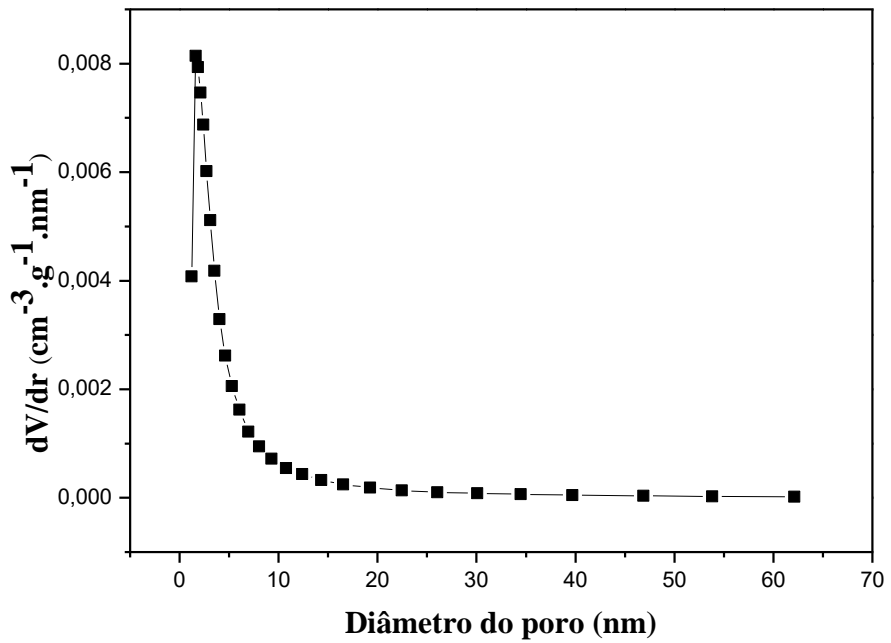


Figura 4.15 - Distribuição de tamanho de poros da amostra HA-15.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.16 - Distribuição de tamanho de poros da amostra HA-30.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os gráficos de volume adsorvido *versus* pressão relativa  $P/P_0$  representam as isotermas de adsorção/dessorção que podem ser obtidas experimentalmente, medindo-se a quantidade de gás adsorvido para valores crescentes de pressão até atingir a saturação ( $P/P_0 \approx 1$ ). A isoterma de dessorção é obtida fazendo-se o caminho inverso. Quando os caminhos não são coincidentes, obtém-se uma histerese. O perfil das isotermas de adsorção e a histerese fornecem informações a respeito da textura do material. As histereses indicam que o material apresenta poros, podendo ser microporoso quando a histerese ocorre a baixas pressões parciais e mesoporoso, a altas pressões parciais. Ela resulta da diferença entre o mecanismo de condensação e evaporação do gás adsorvido e seu formato determina a geometria dos poros (MCCUSKER et al., 2001).

Pelas isotermas de adsorção de  $N_2$  das Figuras 4.17, 4.18 e 4.19, observa-se que a quantidade de microporos é desprezível em relação à de mesoporos, corroborando com os dados das Tabelas 4.1, pois a baixos valores de pressão parcial relativa ( $P/P_0 \approx 0$ ), o volume de gás adsorvido praticamente parte do zero. O aumento do volume de gás adsorvido em pequenas pressões relativas indicaria a existência significativa de microporos (GREGG e SING, 1982)

Figura 4.17 - Isotermas de adsorção de  $N_2$  para o HA-05.

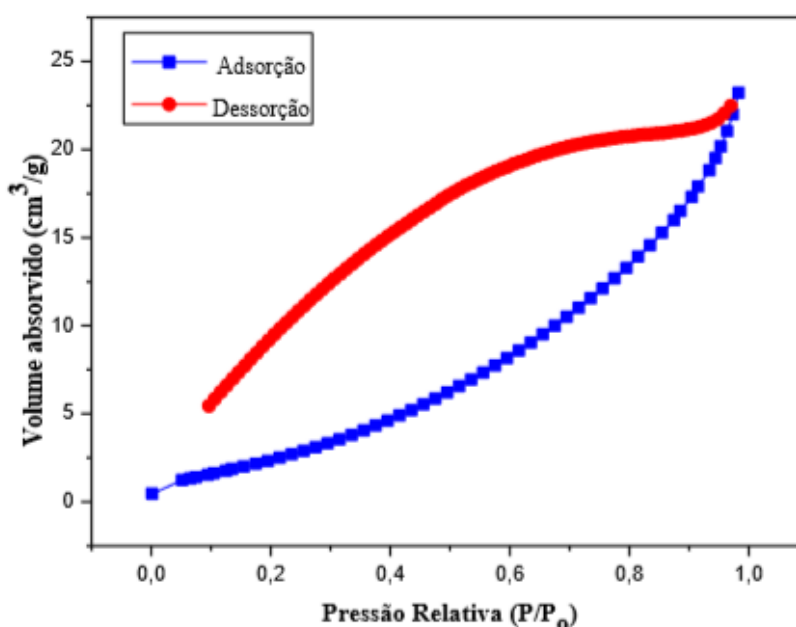
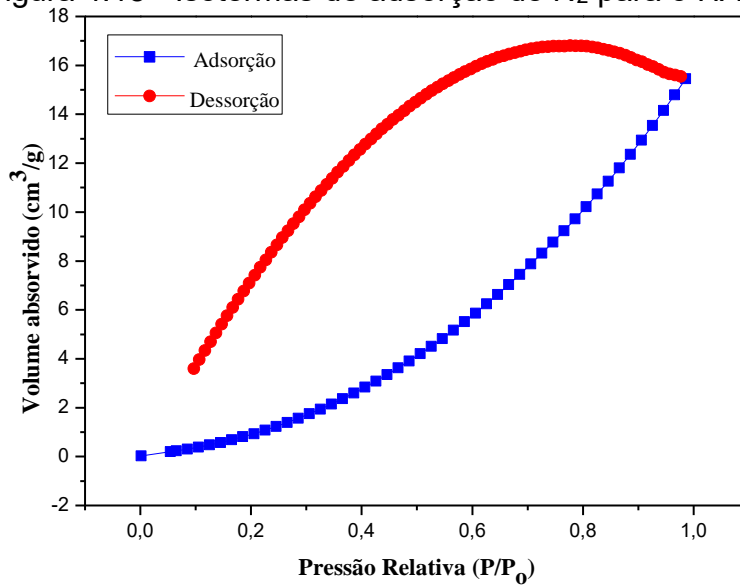
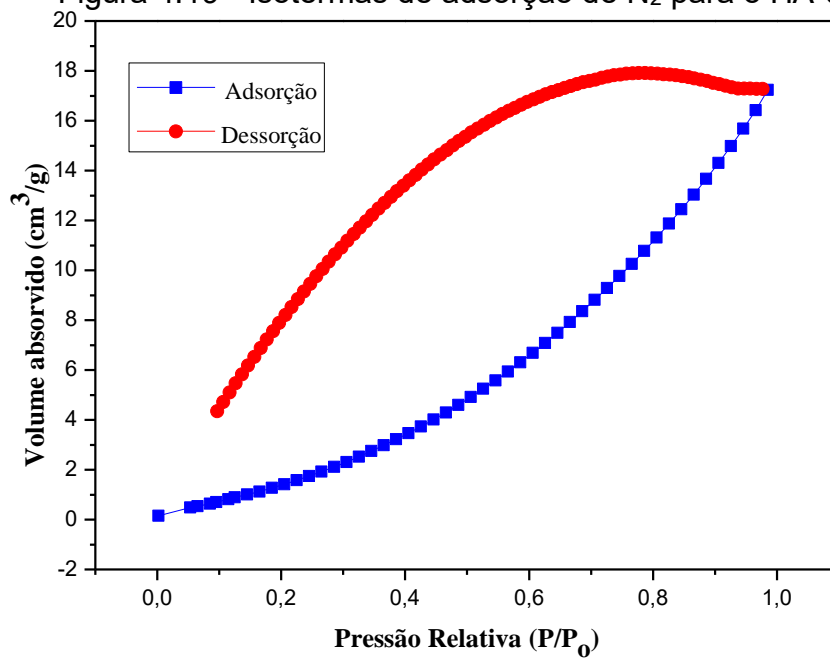


Figura 4.18 - Isotermas de adsorção de N<sub>2</sub> para o HA-15.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.19 - Isotermas de adsorção de N<sub>2</sub> para o HA-30.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os gráficos de volume adsorvido de nitrogênio versus  $P/P_0$  (Figuras 4.17 a 4.19) indicam que as isotermas foram classificadas como sendo do tipo IV, em que os materiais são classificados como mesoporoso. Todas as isotermas apresentaram histerese em altas pressões parciais, indicativo de materiais que apresentam

mesoporosos, sendo classificadas pela IUPAC, como sendo do tipo H3 com poros de tamanho e formatos não uniformes. A diferença entre as várias isotermas nas Figuras está na variação do volume máximo de gás adsorvido. Este volume está relacionado com a capacidade máxima de adsorção do sólido ( $P/P_0 \approx 1$ ) sendo esta associada diretamente à quantidade total de poros existentes.

Zeng et al. (2014), Amer et al. (2013) e Dongdong et al. (2013), observaram este mesmo comportamento de isoterma em amostras de hidroxiapatita mesoporosa e as classificaram como tipo IV, típica de materiais mesoporosos, mesmo sem a identificação de patamar de saturação em pressões relativas altas. Ye et al. (2013) classificaram a curva de isoterma da hidroxiapatita mesoporosa obtida como do tipo II, contudo justifica ser mesoporosa por apresentar histerese tipo H3 e distribuição de tamanho de poros entre 3,17 e 5,8 nm. Guo et al. (2013) justificaram a estrutura mesoporosa da hidroxiapatita com área de 46,5 m<sup>2</sup>/g, indicando apresentar histerese tipo H3 e diâmetro de poro entre 5,4 e 12,2 nm.

É importante ressaltar que a possibilidade de controle da estrutura, como variação do tamanho de poros, é uma das características que tornam estes materiais atraentes como matrizes para dispositivos de liberação controlada de fármacos, visto que a quantidade de fármaco carregado dependente da área superficial específica e do diâmetro dos poros da matriz hospedeira. Assim, quanto maior a área de superfície e o tamanho dos poros, mais favorecido poderá ser o carregamento do fármaco na matriz (VALLETREGI et al., 2011).

#### **4.1.5 Citotoxicidade *in vitro***

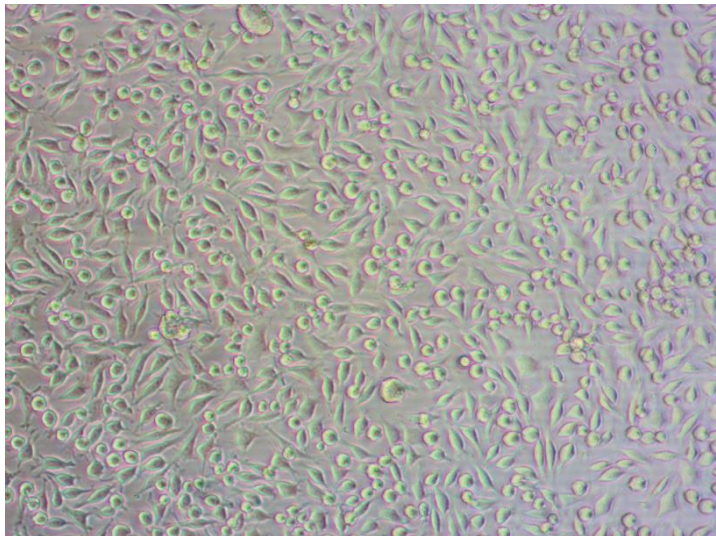
A validade do ensaio foi determinada a partir das respostas das células ao tratamento pelos controles positivo e negativo, avaliadas macro e microscopicamente. O controle positivo utilizado foi uma amostra de referência Zdec (*ZincDiethyldithiocarbamate*) e o controle negativo foram as células (linhagem NCTC Clone L929). O controle positivo e o negativo são materiais que, quando testados de acordo com a norma ISO 10993-5, promovem resposta citotóxica ou não citotóxica.

Linhagens imortalizadas de fibroblastos foram utilizadas para avaliar a



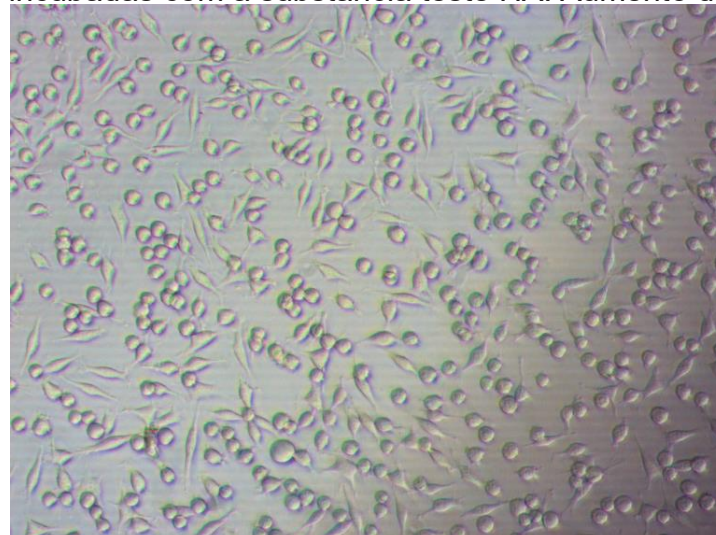
hidroxiapatita e o compósito frente a citotoxicidade, crescimento e adesão celular. Em células viáveis o reagente MTT, de coloração amarelada, é reduzido a cristais de formazan de cor púrpura, através de enzimas chamadas redutases. A concentração de cristais formados é diretamente proporcional à concentração de células viáveis em um experimento. As figuras 4.20 e 4.21 mostram que a análise qualitativa da amostra de Hidroxiapatita não apresentou alterações celulares morfológicas e não inibiu o crescimento celular.

Figura 4.20- Representativa do poço controle com as células (NCTC Clone L929). em meio de cultura MEM. Aumento de 10x



Fonte: Biotechcell, 2016.

Figura 4.21 - Representativa do poço de células (NCTC Clone L929) incubadas com a substância teste HA. Aumento de 10x



Fonte: Biotechcell, 2016.

Através dos resultados obtidos as amostras apresentaram glândulos intracitoplasmáticos discretos, sem redução do crescimento celular, sendo classificadas como GRAU 0 (ISO10993-5, 2009) . Essa análise mostrou resultados satisfatórios, pois as amostras apresentaram comportamentos semelhantes ao controle negativo (Figura 4.13) , ou seja, não apresentaram toxicidade.

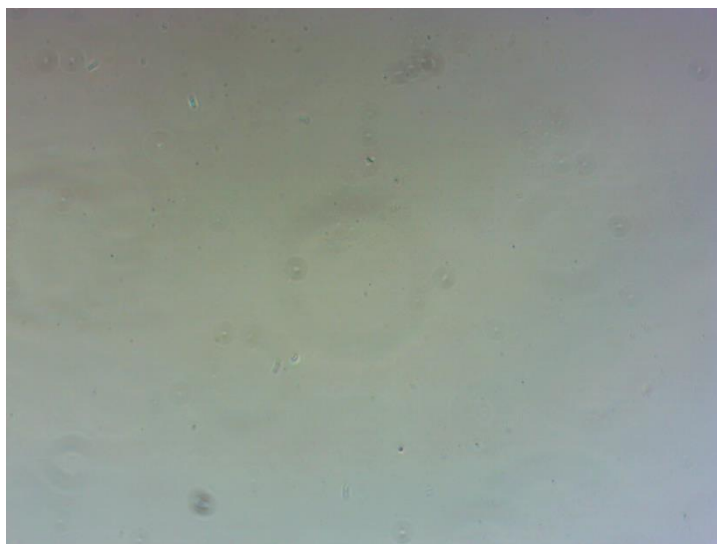
Nas Figuras 4.22 e 4.23 são apresentados os resultados obtidos para a amostra de referência Zdec. Essa análise mostrou efeitos citotóxicos, com destruição da camada de células inibindo o crescimento celular, sendo classificada como GRAU 4 (ISO10993-5, 2009).

Figura 4.22– Representativa do poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM.



Fonte: Biotechcell, 2016.

Figura 4.23 – Representativa do poço de células (NCTC clone L929), incubadas com a substância de referência Zdec.



Fonte: Biotechcell, 2016.

O controle positivo e o negativo são utilizados para verificar a eficácia do ensaio de citotoxicidade. O controle negativo utilizado deve ser um material que não cause dano nas células em cultura, ou seja, deve ser atóxico enquanto que o controle positivo deve ser um material que cause dano celular, ou seja, deve ser citotóxico. Através da intensidade da cor presente nos micropoços da placa utilizada nesse ensaio, contendo células tratadas com diferentes diluições do extrato de cada material, pode-se verificar que onde há maior morte celular (controle positivo em concentração de extrato 100%) a coloração torna-se transparente, pois não há captura do corante (Figura 4.22). Por outro lado, micropoços onde há células vivas, não houve reatividade na presença da HA, a coloração é um pouco rosada indicando a precipitação do MTT (Figura 4.21).

Na avaliação quantitativa dos materiais em estudo foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular de acordo com Equação 4.1 da norma ISO 10993-5.

$$Viab. \% = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}} \quad \text{Equação (4.1)}$$

Onde:

- Viab. %: viabilidade em porcentagem
- OD<sub>570e</sub>: valor médio de densidade óptica na amostra 100% do extrato.
- OD<sub>570b</sub>: valor médio de densidade óptica medida no poço de controle com as células NCTC Clone L929.

De acordo com a ISO 10993-5 a viabilidade celular em porcentagens estão classificadas segundo a Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Classificação de citotoxicidade de acordo com a porcentagem de viabilidade celular.

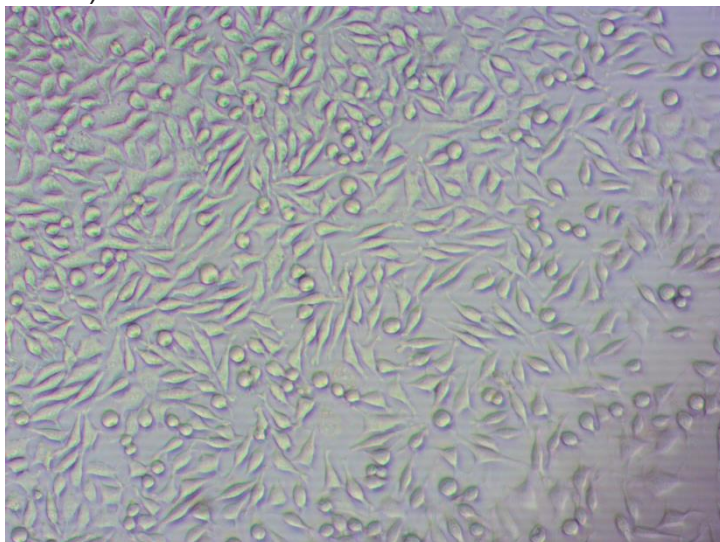
Citotoxicidade	Viabilidade celular (%)
Não-citotóxico	> 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

Através dos resultados da análise quantitativa, a amostra HA apresentou viabilidade celular de 100%, enquanto que a amostra de referência Zdec 0,012%. É possível afirmar que a amostra de HA, por apresentar valor de viabilidade celular maior que 90% não causa morte ou prejuízo à população celular, sendo, portanto caracterizada como não tóxica (ISO 10993-5), podendo apresentar uma boa biocompatibilidade. Enquanto a amostra de referência Zdec, foi considerada severamente tóxica por apresentar viabilidade celular abaixo de 50% (ISO 10993-5).

Na análise qualitativa para amostra de HA/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> não apresentou alterações celulares morfológicas, como também não inibiu o crescimento celular, classificando-a a como Grau 0 conforme as Figuras 4.24 e 4.25.

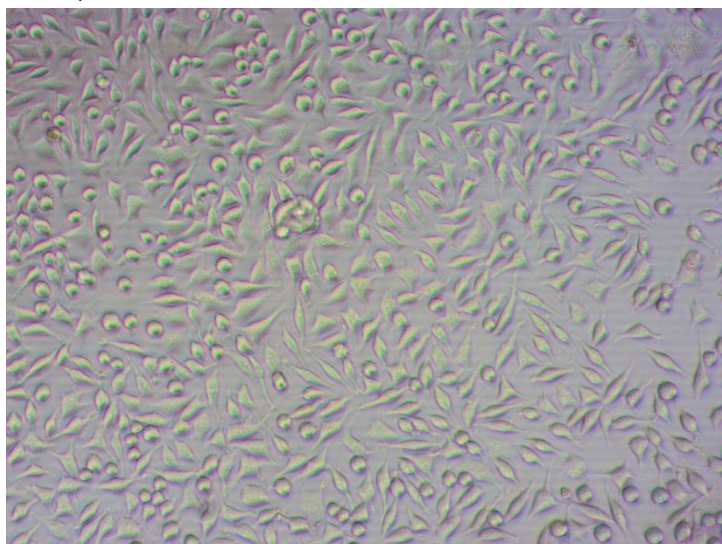


Figura 4.24 - Representativa do poço controle com as células (NCTC Clone L929). em meio de cultura MEM. Aumento de 10



Fonte: Biotechcell, 2016.

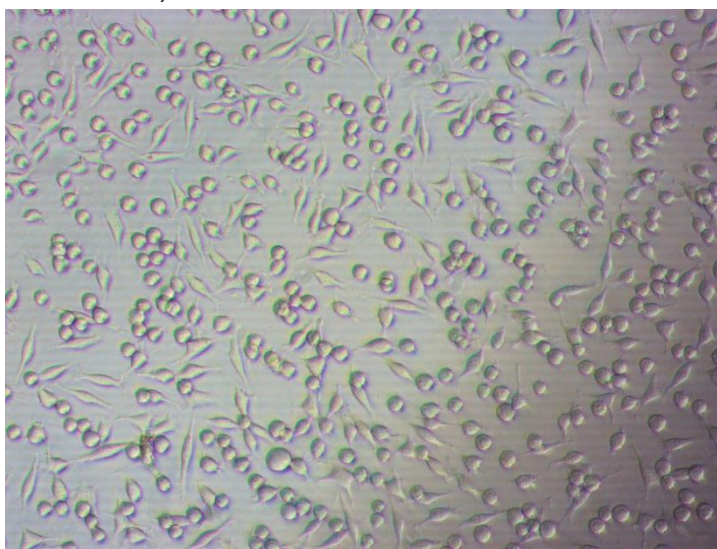
Figura 4.25 - Representativa do poço de células (NCTC Clone L929) incubadas com a substância teste HA-15. Aumento de 10x (NCTC Clone L929). em meio de cultura MEM. Aumento de 10



Fonte: Biotechcell, 2016

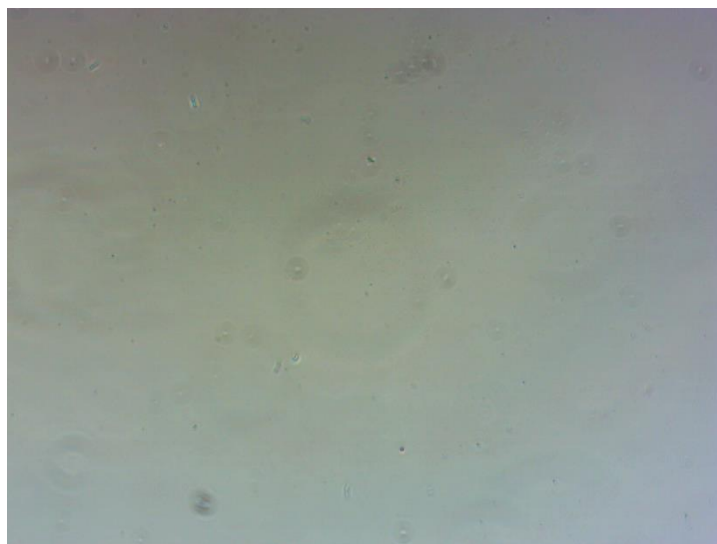
Para a amostra de referência Zdec a análise qualitativa apresentou completa destruição da camada de células, inibindo o crescimento celular, conforme a comparação entre as Figuras 4.26 e 4.27. Assim, a amostra foi classificada como grau 4, ou seja, possui reatividade severa.

Figura 4.26 - Representativa do poço de controle com as células (NCTC Clone L929), em meio de cultura MEM.



Fonte: Biotechcell, 2016.

Figura 4.27 – Representativa do poço de células (NCTC clone L929), incubadas com a substância de referência Zdec.



Fonte: Biotechcell, 2016.

Na análise quantitativa a amostra de apresentou valor de viabilidade celular igual a 100,00%. Portanto, nas condições laboratoriais testadas e descritas anteriormente, a amostra não é citotóxica. Os testes de citotoxicidade mostrou que o compósito de hidroxiapatita/Alumina, pode ser aplicado sem causar reações adversas em tecidos celulares, ou seja, mesmo após o processo de fabricação dos biocompósitos, o material não se mostra citotóxico.

Vários autores relatam a biocompatibilidade das cerâmicas de fosfato de cálcio. No trabalho de Alcaide et al. (2008), testando uma composição de 27%HA/73% $\beta$ -TCP/agarose em fibroblastos e osteoblastos, concluiu-se que o biomaterial era biocompatível, com potencial no uso de reparação óssea. Tamai et al. (2006) estudaram a citotoxicidade de várias biocerâmicas de fosfato de cálcio e observaram que a hidroxiapatita, o trifosfato de cálcio- $\beta$  e o tetracálcio fosfato não foram citotóxicos. Chen et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade de três tipos de fosfatos de cálcio, o TCP- $\beta$  isolado, o bifásico (HA/ TCP- $\beta$ ) e hidroxiapatita isolada. Não houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle no teste MTT, comprovando a biocompatibilidade do material, bem como observado em nossos resultados preliminares. Biocerâmicas bifásicas porosas de TCP- $\beta$ /HA produzidas via reação de estado sólido em diversas temperaturas foram testadas no ensaio MTT em macrófagos de ratos e não demonstraram citotoxicidade (WEBLER et al., 2014).

Deve-se levar em consideração que apenas os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade não são os únicos parâmetros para se avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial. É necessário testar simultaneamente outros aspectos do comportamento e função celular que evidenciam a resposta das células perante a presença de biomateriais e combinar os resultados obtidos nos diferentes tipos de ensaio. Desta forma, com a interpretação integrada dos testes in vitro pode-se ter uma ideia do comportamento in vivo de um novo biomaterial (GOMES et al., 2001).

## **4.2 Caracterização dos compósitos**

### **4.2.1 Determinação do Potencial Hidrogeniônico (pH) e Análise Estática**

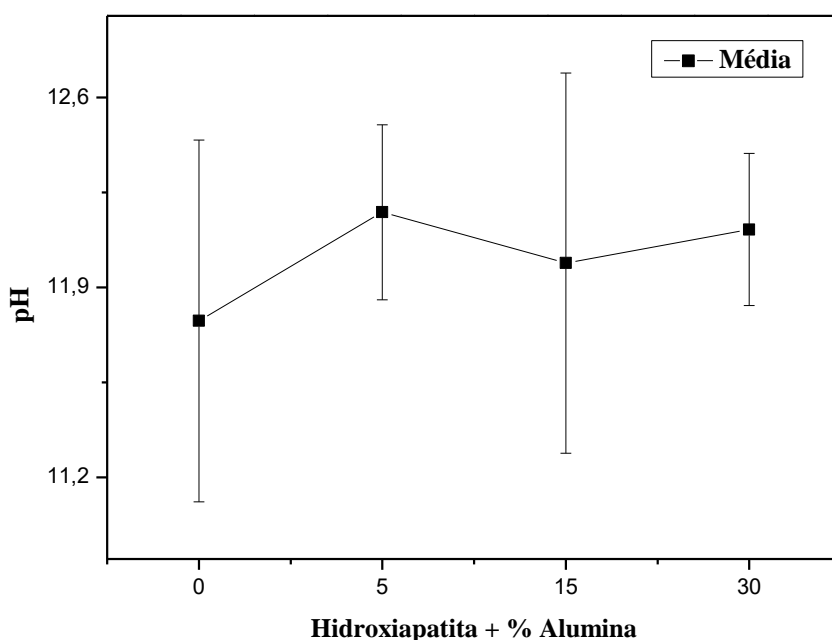
A Tabela 4.3 apresenta a planilha de dados para o pH de quatro tratamentos, juntamente com a média aritmética e o desvio padrão.

Tabela 4.3 - Planilha de dados pH dos tratamentos dos compósitos HA/ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Aditivo (%)	Média	Desvio Padrão
0	11,77667	1,1537
05	12,17667	0,55788
15	11,99	1,21244
30	12,11333	0,48439

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.28 mostra, graficamente, os resultados obtidos para o pH das amostras após 24 horas de imersão em água destilada a uma temperatura de 37°C. Sabe-se que o pH é o parâmetro que apresenta maior influência na razão Ca/P como referido por Ranito e al., 2006. Para todas as formulações com incorporação de Alumina, observou-se uma variação gradual do pH, sendo menor para a formulação HA-00, que apresentou um valor de pH  $11.8 \pm 1.15$  e maior para formulação HA-05 pH  $12.2 \pm 0.56$ . Sabe-se que fosfatos de cálcio com razão estequiométrica Ca/P 1,67 apresentam valores de pH de 9,5 - 12 em pH fisiológico, (LAURENCE, 1991).

Figura 4.28 – Ensaio de pH dos compósitos HA/ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância ( $\alpha$ )



de 5% foi utilizada com objetivo de conferir estatisticamente se a variação dos resultados é suficientemente diferente para que se conclua que as médias aritméticas das porosidades aparentes não são todas iguais. Para esta análise foi utilizado o programa Origin<sup>®</sup> 8. Os testes foram realizados com estatística F.

Tabela 4.4 - Análise de variância do pH dos compósitos HA/ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	0,27969	3	0,09323	0,11142	0,95099
Resíduo	6,6938	8	0,83672		
Total	6,97349	11			

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da ANOVA realizado pelo programa computacional Origin<sup>®</sup> 8, podemos concluir que sendo o p-valor igual a 0,95099, não rejeitamos a hipótese nula de igualdade de médias para nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Assim, esses resultados permitem concluir que para o nível de significância especificado, a média aritmética do potencial hidrogeniônico são todas iguais. Com base nestes resultados não foi preciso utilizar o procedimento de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

#### 4.2.2 Porosidade Aparente e Análise Estática

A Tabela 4.5 apresenta a planilha de dados para a porosidade de quatro tratamentos de aditivos, juntamente com a média aritmética e o desvio padrão.

Tabela 4.5 -Planilha de dados da porosidade aparente dos compósitos HA/ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

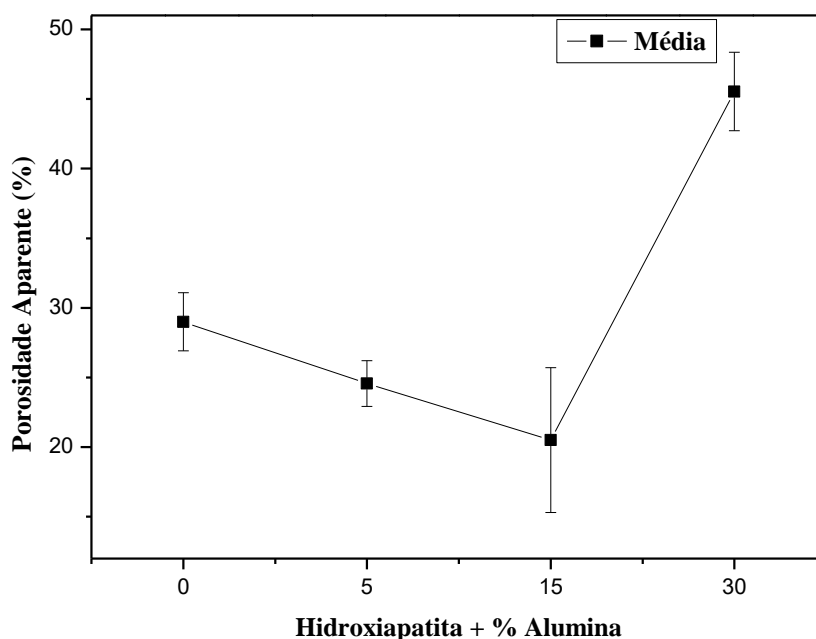
Aditivo (%)	Porosidade Aparente	Desvio Padrão
0	29	3,60555
05	24,56667	2,82902
15	20,5	9,01388
30	45,53333	4,88399

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.29 mostras graficamente os resultados obtidos para a

porosidade das diferentes formulações, com relação à fração dos aditivos incorporados na matriz de Hidroxiapatita. Observa-se que a porosidade diminui com o aumento da concentração de alumina e que a partir de 15% de alumina ocorre um aumento da porosidade, caracterizando uma interferência da alumina na estrutura.

Figura 4.29 - Ensaio de porosidade aparente dos compósitos HA/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



Estes resultados vêm contribuir com os já obtidos por microscopia eletrônica de varredura, onde se observou a diminuição porosidade com adição de 5 e 15% de alumina e aumento para o biomaterial compósito com 30% em volume de alumina. O aumento da porosidade em composições HA/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> já foi observado por outros autores (CAMARGO, 2009 (b), SOUZA, 2009, EVIS, 2007, JUANG, 1994).

A análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância ( $\alpha$ ) de 5% foi utilizada com objetivo de conferir estatisticamente se a variação dos resultados é suficientemente diferente para que se conclua que as médias aritméticas das porosidades aparentes não são todas iguais. Para esta análise foi utilizado o programa Origin<sup>®</sup> 8. Os testes foram realizados com estatística F.

A Tabela 4.6 - apresenta o resultado da análise estatística da porosidade aparente.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	1086,04667	3	362,01556	11,48284	0,00286
Resíduo	252,21333	8	31,52667		
Total	1338,26	11			

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao realizar a ANOVA foi observado que a alumina adicionada influenciou de maneira significativa na porosidade para um nível de confiança de 0,05. Neste caso, como o p-valor (0,00286) é menor do que o  $\alpha$  especificado de 0,05 rejeitamos a hipótese nula de igualdade das médias, ou seja, podemos dizer que existe diferença estatisticamente significativa na média aritmética da porosidade dos compósitos no que concerne às quatro formulações.

Como o teste ANOVA demonstrou haver diferenças entre os níveis, o método de comparações múltiplas de Tukey (Tabela 4.7) foi empregado para determinar quais níveis apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4.7 - Teste de Tukey-Kramer correspondente a porosidade dos compósitos HA/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Comparação Níveis	Diferença Absoluta	Erro-Padrão da Diferença	Significância
5 - 0	- 4,43333	4,58451	0
15 - 0	-8,5	4,58451	0
15 - 5	- 4,06667	4,58451	0
30 - 0	16,53333	4,58451	1
30 - 5	20,96667	4,58451	1
30 - 15	25,03333	4,58451	1

Significância igual a 1 indica que a diferença de média é significativa no nível 0,05.

Significância igual a 0 indica que a diferença de média não é significativa no nível 0,05

O teste de Tukey avalia a igualdade entre os tratamentos, então é um teste de hipóteses. Nestes resultados vemos que a hipótese de igualdade é rejeitada para os níveis 30-0, 30-5 e 30-15, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas, ou seja, apresentaram aproximadamente o mesmo valor de porosidade.

Nos materiais biocerâmicos frágeis, os poros constituem regiões onde a

tensão se concentra, e quando a tensão junto ao poro atinge um valor crítico, forma-se uma fenda que se propaga, visto que nestes materiais não existem processos suficientemente absorvedores de energia como aqueles que operam durante a deformação de materiais dúcteis. Os poros são também prejudiciais para a resistência dos materiais cerâmicos porque fazem diminuir a área da seção transversal em que é aplicada a carga e conseqüentemente fazem baixar a tensão que o material pode suportar (Smith, 1998). Deste modo, o tamanho e a distribuição do tamanho de poros são fatores importantes que afetam sua resistência.

#### 4.2.3 Resistência à Compressão Diametral

As principais medidas dos ensaios mecânicos estão relacionadas na Tabela 4.8. Os dados referem-se à resistência ao teste de compressão diametral (MPa) para cada um dos quatro tratamentos estudados.

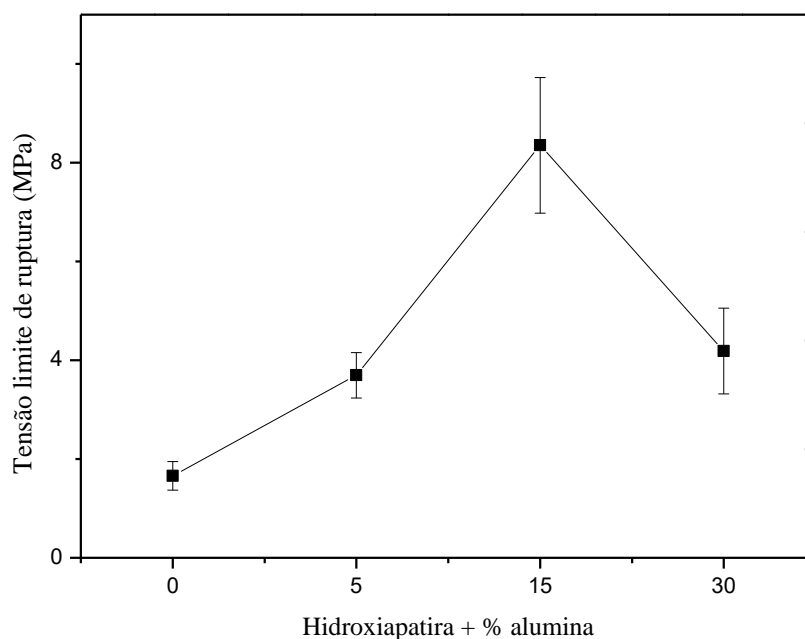
Tabela 4.8 - Médias e desvio padrão dos resultados de resistência à compressão diametral dos compósitos HA/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Tratamentos (%)	Resistência Média (MPa)	Desvio Padrão
0	1,66	0,5012
5	3,69997	0,79501
15	8,35333	2,37692
30	4,18667	1,50434

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.30 apresenta o gráfico da resistência à compressão diametral das diferentes formulações, com relação à fração da Alumina incorporados à Hidroxiapatita. Pode-se observar que um aumento no teor de aditivo em massa gera um inicial aumento da resistência, até que seja atingido um limite, cerca de 15%. Constata-se claramente que o aumento de 30% da segunda fase de alumina na matriz de hidroxiapatita fragilizou a propriedade mecânica devido ao aumento da porosidade para o biomaterial compósito. Outra observação foi o valor da resistência para compósito HA-15, chegando a um valor de aproximadamente 8,4 MPa, valor que está dentro do intervalo encontrado para o osso esponjoso na bibliografia (5 – 10 MPa) (MURUGUN, 2004; BLACK 1988; JEE, 1983).

Figura 4.30 - Ensaio de resistência à compressão diametral dos compósitos HA/15.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados referentes aos testes de compressão diametral descrito na Tabela 9 foram submetidos a análise de variância (ANOVA de fator único) com nível de significância  $\alpha$  de 5%, com o propósito de averiguar estatisticamente se a variação dos resultados é suficientemente diferente para que se conclua que as médias aritméticas das resistências não são todas iguais, como mostra a tabela 4.9. Para esta análise foi utilizado o programa Origin® 8. Os testes foram realizados com estatística F.

Tabela 4.9 - Análise de variância da resistência à tração por compressão diametral dos quatro níveis.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	p-valor
Aditivo	70,96389	3	23,65463	10,75699	0,00351
Resíduo	17,592	8	2,199		
Total	88,55589	11			

Ao realizar a ANOVA foi observado que o aditivo empregado influencia de maneira significativa as propriedades mecânicas dos compósitos para um nível de confiança de 0,05. Neste caso, como o p-valor é menor do que o  $\alpha$  especificado de

0,05 rejeitamos a hipótese nula de igualdade das médias, ou seja, podemos dizer que existe diferença estatisticamente significativa na média aritmética das resistências à compressão diametral dos compósitos no que concerne às quatro formulações.

Como o teste demonstrou haver diferenças entre os níveis, o método de comparações múltiplas de Tukey (Tabela 4.10) foi empregado para determinar quais níveis apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4.10 - Teste de Tukey-Kramer correspondente a resistência à compressão diametral dos compósitos.

<b>Comparação Níveis</b>	<b>Diferença Absoluta</b>	<b>Erro-Padrão da Diferença</b>	<b>Significância</b>
5 - 0	2,03667	1,21078	0
15 - 0	6,69333	1,21078	1
15 - 5	4,65667	1,21078	1
30 - 0	2,52667	1,21078	0
30 -5	0,49	1,21078	0
30 - 15	1,21078	1,21078	1

Significância igual a 1 indica que a diferença de média é significativa no nível 0,05.

Significância igual a 0 indica que a diferença de média não é significativa no nível 0,05

Desta análise, observa-se que existem diferenças significativas entre os pares dos níveis 15 – 0, 15 – 5 e 30 – 15. Isso implica que 5% - 0%, 30%-0% e 30%-5% de concentração de alumina produzem aproximadamente, a mesma resistência a compressão diametral.

A redução da resistência à compressão da formulação acima de 15% de Alumina pode ser explicada devido ao aumento de porosidade, associada à maior quantidade de precipitados de sais na preparação. A presença de outras fases nos contornos de grãos de uma matriz cerâmica de Hidroxiapatita, principalmente precipitados de sais, associados à porosidade elevada, contribuem sensivelmente para diminuição das propriedades mecânicas do compósito. A presença de Aluminatos de Cálcio e a porosidade fragilizam as interfaces de contornos de grãos, assim, contribuindo para um modo de fratura predominantemente inter-granular, para os biomateriais compósitos (JUANG e HON, 1994), conforme pode ser observado nas micrografias representadas pelas figuras 4.10 a 4.12. Segundo Hannora (2014), as propriedades mecânicas são controladas não só pela quantidade de adição de Alumina, mas também pelas condições de tratamento térmico. A melhoria da

resistência mecânica com adição de Alumina até (15% em peso) pode ser devido à transformação subsequente de HA/Alumina em fosfato de cálcio alumina  $\text{Ca}_9\text{Al}(\text{PO}_4)_7$ . No entanto, o excesso de alumina na composição pode resultar na redução das propriedades mecânicas.

O uso de Alumina na constituição da Hidroxiapatita tem como propósito de incrementar maior resistência mecânica à matriz, apesar de apresentarem algumas limitações, sendo elas a diferença considerável de densidade e a temperatura de sinterização (BONAN, BONAN, et al., 2014).

A sinterização por reação sólido-sólido entre hidroxiapatita sintetizada via precipitação e adição alumina com sua porcentagem de fração mássica variando entre 0%, 10%, 20% e 30%, nas temperaturas de 1000°C e 1200°C foi estudada por VISWANATH e RAVISHANKAR, 2006. A Hidroxiapatita pura não apresentou degradação em temperaturas próximas à 1200°C, mas, ao aumentar o teor de alumina em sua composição, inicia-se o processo de degradação da hidroxiapatita, isso ocorre devido à difusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na interface entre as superfícies, formando inicialmente diversos tipos de aluminatos de cálcio em decorrência da falta desses íons.

### **4.3 Estudo da Liberação de Ampicilina nos compósitos**

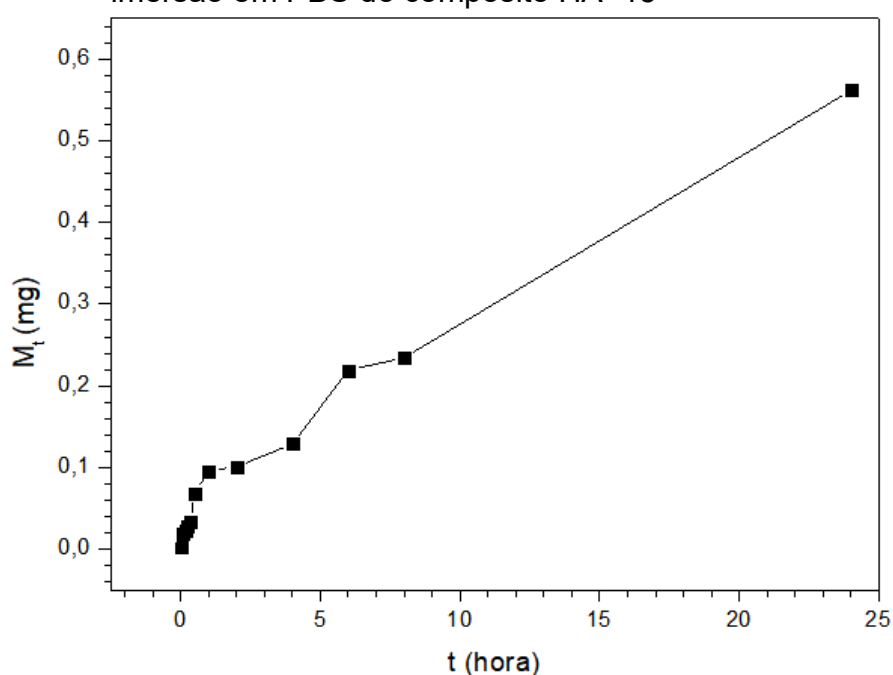
A ampicilina foi o antibiótico escolhido neste trabalho em virtude de sua conhecida utilização no tratamento de infecções nos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário devidas a Staphylococci, Streptococci, Haemophilus influenzae, Proteus mirabilis, Neisseria gonorrhoeae, certas estirpes de Escherichia coli e algumas espécies de Salmonella, Shigella e Moraxella. A ampicilina é indicada no tratamento de infecções urinárias, particularmente aquelas devidas a E. coli, Proteus mirabilis e Streptococcus faecalis, em virtude das altas concentrações alcançadas na urina após sua administração oral. Também é eficaz e segura na terapia de infecções urinárias na gestação (DOLLERY, 1991).

Seu emprego na forma oral pode causar efeitos colaterais tais como diarreia, náusea, depressão, cansaço, colite isquêmica, trombose entre outros. Assim, no caso de hipertensão, por exemplo, o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada de do antibiótico é vantajoso por minimizar esse tipo de desconforto para o paciente, visto que a concentração da droga tende a se manter num nível controlável

na corrente sanguínea por um período de tempo maior.

Com o objetivo de investigar a influência das características estruturais do compósito na liberação de ampicilina, a amostra com 15% de alumina foi testada com a incorporação de 1% em peso de ampicilina. A percentagem de antibiótico foi calculada em relação à massa da amostra prensada. Na figura 4.31 é apresentado o perfil de liberação do fármaco estudado em função do tempo. É importante que este ensaio seja realizado em solução tampão PBS para garantir que a liberação esteja ocorrendo apenas pela difusão do fármaco do interior dos poros e não por degradação da matriz (VALLET-REGÍ et al., 2008)

Figura 4.30 - Perfil de liberação do antibiótico em função do tempo de imersão em PBS do compósito HA -15



Fonte: Elaborada pela autora.

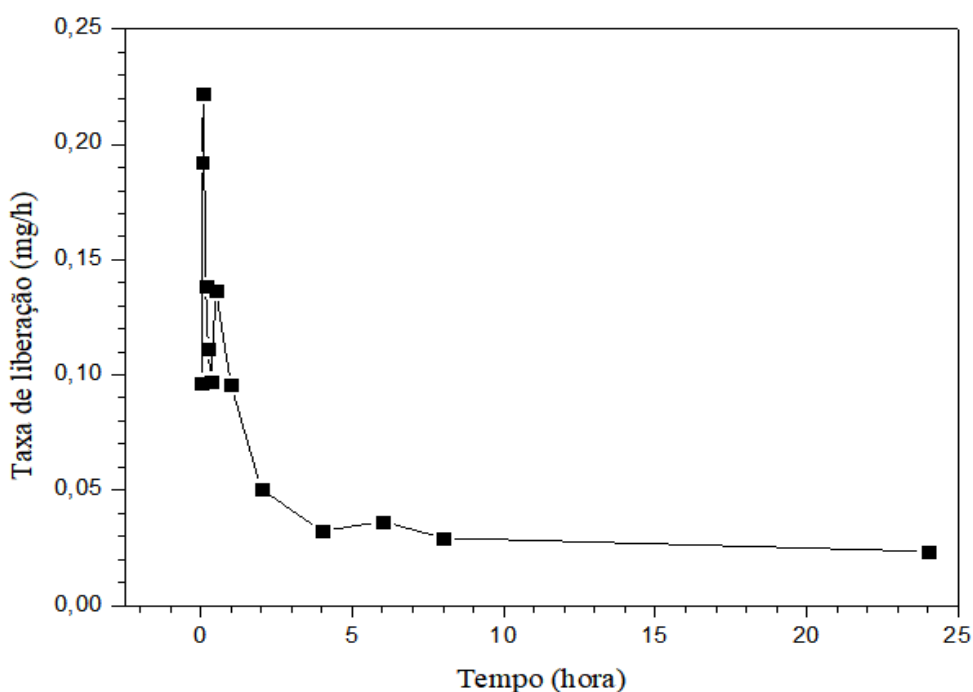
Pode-se observar que a amostra libera maior quantidade de fármaco por unidade de tempo, essa liberação inicial é atribuída à dissolução e liberação imediata da porção do fármaco localizada na superfície do compósito. Os resultados indicam que em 24 horas de experimento, 5,29% do fármaco são liberados. Este decréscimo na taxa de liberação provavelmente ocorre em função da quantidade de fármaco incorporado e da quantidade dos poros presentes na amostra (OGAWA E PLEPIS, 2002). O processo de síntese do compósito levou à incorporação de Alumina, provocando assim, uma diminuição em sua porosidade aparente e por simples



questões geométricas, uma maior dificuldade de difusão do fármaco ao longo dos espaços vazios disponíveis na estrutura.

Na Figura 4.32 é apresentada a taxa de liberação da ampicilina no compósito HA-15. Verificou-se que o compósito apresenta uma taxa de liberação variada nos primeiros 10 minutos decrescendo em seguida com o tempo, como era de se esperar, visto que a quantidade de droga liberada vai diminuindo com tempo. Essa variação se deve ao fato de alterações ocorrida na superfície da Hidroxiapatita proporcional à concentração de Alumina na composição como observado na microscopia eletrônica de varredura (Figura 4.11). Este perfil é normalmente observado para matrizes mesoporosas. Nela, grande quantidade do fármaco é liberada rapidamente no início, seguido por uma taxa de liberação mais lenta. Este tipo de perfil pode ser útil quando uma dose alta inicial é requerida, por exemplo, para combater infecções ou inflamações (VALLETREGÍ et al., 2007).

Figura 4.31- Taxa de liberação de ampicilina do compósito HA -15.



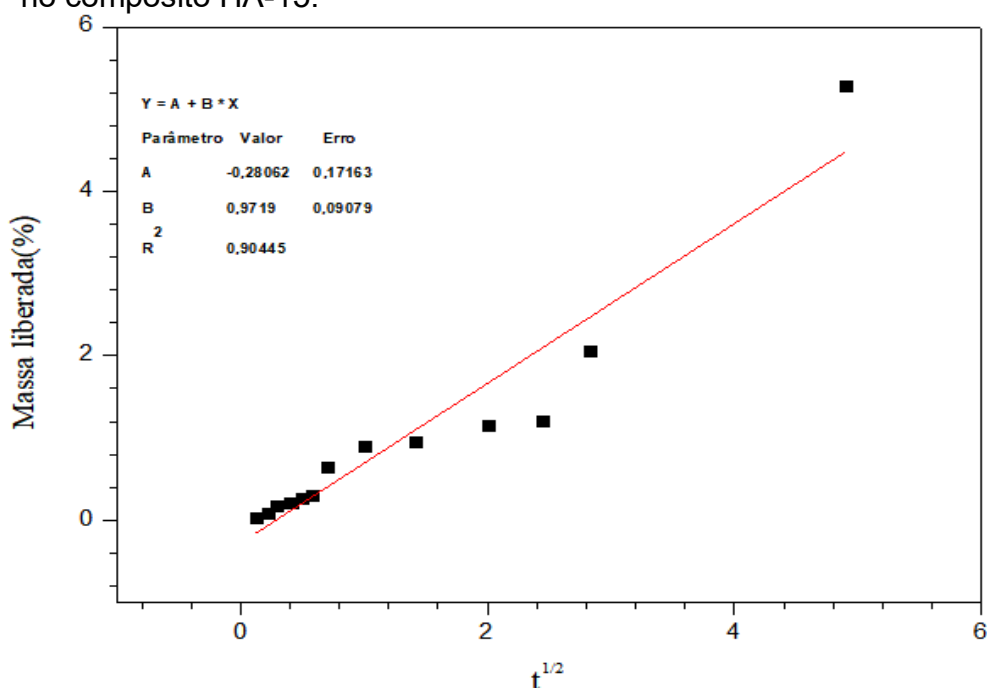
Fonte: Elaborada pela autora.

A liberação muito lenta de drogas pode não ser muito vantajosa, visto que poderia não surtir o efeito terapêutico desejado e até mesmo provocar resistência da bactéria ao antibiótico (OGAWA E PLEPIS,2002). Diversos fatores influenciam a liberação do fármaco, como a estrutura, o tipo de interação existente entre o fármaco

e a matriz e o mecanismo de degradação do fosfato de cálcio, se existir (WANG, 2009).

A Figura 4.33 mostra a cinética de liberação de antibiótico do compósito segundo o modelo de Higuchi (HIGUCHI, 1970). Verifica-se que a quantidade de ampicilina liberada em função da raiz quadrada do tempo obedece ao modelo de Higuchi nas duas primeiras horas de liberação. Entretanto, a liberação do fármaco a partir do compósito HA-15 é realizada nas primeiras duas horas por um processo de difusão nos poros, indicando que a liberação depende da porosidade da matriz (MARTINS et al., 1998). Foi observado também que à partir das duas horas a liberação não segue o modelo Higuchi, como pode ser confirmado pelos valores obtidos no gráfico ( $R^2=0,90445$ ).

Figura 4.33 - Modelo de Higuchi para o estudo da liberação da ampicilina no compósito HA-15.

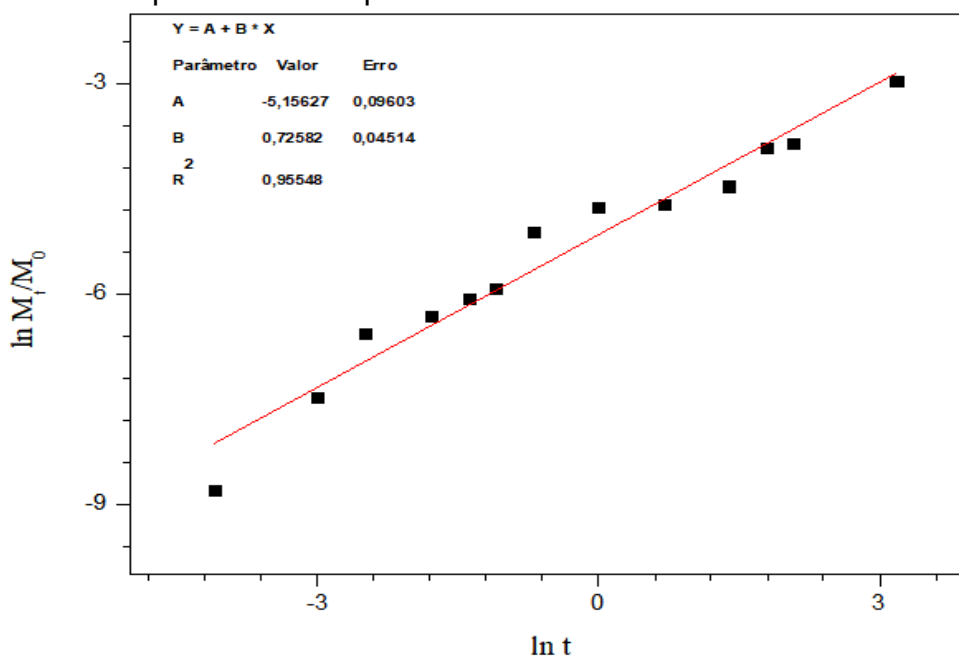


Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com esse modelo, uma reta foi obtida pelo gráfico de liberação da ampicilina no compósito (Figura 4.34). O resultado da regressão linear apresenta um valor de expoente de liberação  $n = 0,72$ . O resultado do valor de  $n$  mostra que a ampicilina é liberada devido a transporte anômalo não governado por difusão de Fick

(PEPPAS, 1985; COSTA e LOBO, 2001).

Figura 4.34 - Modelo de Korsmeyer -Peppas para o estudo da liberação da ampicilina no compósito HA -15.



Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento de liberação anômalo ocorre quando as taxas de difusão e relaxamento são da mesma ordem de grandeza, ou seja, a liberação está associada não somente à difusão do fármaco, mas também a mudanças estruturais da matriz. Fatores como a alteração na cristalinidade e a redução da quantidade de fármaco no interior da matriz podem levar a este tipo de liberação (COSTA e LOBO, 2001).

Estudos já vêm sendo realizados com o objetivo de que o fosfato de cálcio seja utilizado como matriz para a liberação controlada de fármacos, Eltohamy (2006), apresentou resultados satisfatórios na obtenção de um sistema de TCP com um antibiótico (ampicilina) no qual o perfil ilustrou uma liberação do antibiótico por cerca de 36 horas. Ogawa e Plepis (2002), estudou compósitos hidroxiapatita:colágeno em diferentes proporções a fim de se obter a melhor proporção para incorporação de ciprofloxacina, o ensaio de liberação de antibiótico foi bastante promissor, visto que mostrou uma liberação rápida nas primeiras horas de imersão. Fernandes (2011), avaliou a hidroxiapatita mesoporosa em ensaios de liberação de fármaco, o perfil de

liberação seguiu o modelo de Higuchi, com uma liberação de 52% antibiótico benzil penicilina-G em um tempo de 41 h.

A realização dos testes de liberação é importante não apenas para determinar o modelo cinético de liberação, mas principalmente para determinar a concentração do fármaco no meio. Assim, mesmo que os fosfatos de cálcio mesoporosos apresentem baixa área superficial e volume de poro, se comparados às sílicas mesoporosas, e a concentração liberada no meio seja baixa, mesmo assim, não será uma limitação para a aplicação. Sabemos que cada medicamento exerce sua função adequada se estiver presente no meio na concentração terapêutica requerida. Os ensaios de liberação em laboratório geralmente são feitos com pouca quantidade da matriz mesoporosa, e nestes testes determina-se a quantidade do fármaco que está sendo liberada. Com isso, pode-se determinar a quantidade total do fosfato mesoporoso para ser implantado no local, que contenha a dosagem requerida do medicamento para ser liberado durante o tempo desejado (FERNANDES e CORREIA, 2015).

## 5 CONCLUSÃO

Os precursores selecionados, o método sol-gel e a temperatura de sinterização de 1200°C durante 2 horas são adequados à obtenção da hidroxiapatita. Os resultados obtidos da caracterização do pó pelas técnicas de difratometria de raios X, Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho mostraram-se eficientes na identificação da fase Hidroxiapatita.

As isotermas de adsorção de N<sub>2</sub> demonstraram que os compósitos analisados foram classificados como sendo do tipo IV, em que os materiais são classificados como mesoporoso.

O teste de citotoxicidade permitiu a observação de um caráter não tóxico da amostra utilizada, mostrando que o material em estudo apresenta viabilidade de ser utilizado como material biocompatível. Vale ressaltar, no entanto que a determinação da segurança e biocompatibilidade requer a realização de ensaios adicionais de avaliação biológica.

Os resultados utilizando o compósito HA-15 apresentou resultados bastante satisfatório. Foi observado que o aumento na quantidade de Alumina nos compósitos provoca a degradação da Hidroxiapatita, com formação de fosfato tricálcico e aluminatos de cálcio durante a sinterização dos corpos de prova, fatores estes que favoreceram a redução da propriedade mecânica.

O experimento de liberação da ampicilina utilizando o compósito HA-15, mostrou uma liberação rápida nas primeiras horas, pois obedece ao modelo de Higuchi neste intervalo de tempo. A vantagem deste tipo de liberação é que se pode impedir uma concentração muito baixa do fármaco no sítio de ação no começo do tratamento de uma infecção, evitando assim efeito terapêutico ineficiente e até mesmo uma possível resistência bacteriana ao antibiótico.

A análise do perfil de liberação utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas mostrou que a ampicilina é liberada dos compósitos por um processo de transporte anômalo não governado por difusão de Fick. O estudo de liberação do compósito produzido mostrou perfis de liberação bem diferentes. Esse fato pode ser interessante, pois permite que esses dispositivos de liberação possa ser destinados a diferentes aplicações clínicas que necessitam de tempos distintos para tratamento.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho consistiu na síntese de hidroxiapatita e obtenção de compósitos como dispositivos para liberação controlada de fármacos. Vários resultados importantes foram obtidos e foi possível estabelecer conexões entre o comportamento na liberação da ampicilina e as propriedades estruturais das amostras estudadas. Entretanto, esses resultados são ainda preliminares e muito ainda deverá ser investigado para consolidar as idéias aqui desenvolvidas. Dessa forma, algumas sugestões seguem para trabalhos futuros.

Variar parâmetros do experimento de obtenção do compósito, como tempo de sinterização, variação de temperatura, tempo de moagem.

Avaliar a capacidade de migração e crescimento celular nos biocompósitos formulados através de testes *in vivo*, para complementar os resultados *in vitro* já obtidos.

Fazer um estudo mais detalhado das propriedades do material associado ao antibiótico para utilização como cimento ósseo.

Fazer um estudo de liberação da ampicilina utilizando outra técnica (HPLC) para confrontar os resultados encontrados com a técnica de espectrometria de UV.

Estudar os mecanismos cinéticos de liberação com diferentes fármacos em meios biológicos sob condições *in vitro*, para comprovar de forma efetiva o potencial dos compósitos para serem utilizados como dispositivos de liberação controlada de drogas.

Estudar os mecanismos cinéticos de biodegradação do compósito em diferentes meios biológicos em termos da quantificação do teor de ampicilina liberada.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, M. A.; MANSOUR, S. F.; EL- DEK, S. I.; ABD-ELWAHAB, S. M.; AHMED, M. K. Characterization and annealing performance of calcium phosphate nanoparticles synthesized by co-precipitation method. **Ceramics International**, v. 40, n. 8, p. 12807-12820, 2014.
- AMER, W.; ABDELOUAHDI, K.; RAMANANARIVO, H. R.; ZAHOUILY, M.; COPPEL, A. F. Y.; VARMA, R. S.; SOLHY, A. Synthesis of mesoporous nano hydroxyapatite using surfactant zwitterions. **Materials Letters**, v. 107, p. 189-193, 2013.
- ARCOS, D.; REGÍ-VALLET, M. Bioceramics for drug delivery. **Acta materialia**, v. 61, p. 890-911, 2013.
- ARCOS, D.; LÓPEZ-NORIEGA, A.; RUIZ-HERNÁNDEZ, E.; TERASAKI, O.; VALLET-REGÍ, M. Ordered mesoporous microspheres for boné grafting and drug delivery. **Chemistry of Materials**, v. 21, p. 1000-1009, 2009.
- BARROUG, A.; GLIMCHER, M. J. Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: adsorption and release of cisplatin in vitro. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 20, n. 2, p. 274-280, 2002.
- BELLINI, Odair José. **Síntese e Caracterização de uma Matriz Óssea de Fosfato de Cálcio e Nanocompósitos Fosfato de Cálcio/SiO<sub>2</sub>n para Substituição e Regeneração Óssea**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Joinville, 2007.
- BERZINA-CIMDINA, L.; BORODAJENKO, N. Research of Calcium Phosphates using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology**. IntechOpen, 2012.
- BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury, International Journal of the care of the Injured**, v. 31, p. 37-47, 2000.
- BONAN, R. F.; BONAN, P. R. F.; BATISTA, A. U. D.; OLIVEIRA, J. E.; MENEZES, R. R.; MEDEIROS, E. S. Methods of microstructural strengthening of hydroxyapatite. **Cerâmica**, v. 60, p. 402-410, 2014.
- BOUTINGUIZA, M.; POU, J.; COMESAÑA, R.; LUSQUIÑOS, F.; DE CARLOS, A.; LEÓN, B. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, p. 478-486, 2012.
- CAMPOS, Doris Moura. **Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Universidade Federal do Rio de Janeiro –UFRJ, 2008.

CARVALHO FILHO, Marco Aurélio da Silva. **Preparação e estudo termoanalítico dos cinamatos de terras raras, exceto (escândio), no estado sólido**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

CHABNER, B. A., BRUNTON, L. L., KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gillman**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CHANG, P. R.; YU, J.; MA, X. Preparation of porous starch and its use as a structuredirecting agent for production of porous zinc oxide. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 1016-1019, 2011.

CAMARGO, N. H. A.; DELIMA, S. A.; GEMELLI, E. Synthesis and Characterization of Nanostrured Calcium Phosphates Poweders and Calcium Phosphates /Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanocomposites. **Journal of Advanced Materials**, v. 41, n. 3, p.33-43,2010.

CONSTANTINO, V. R. L; ARAKI, K; SILVA, D. O.; OLIVEIRA, W. Preparação de compostos de alumínio a partir da bauxita: considerações sobre alguns aspectos envolvidos em um experimento didático. **Química Nova**, v. 25; n. 3; p. 490-498, 2002.

CHOMA, J.; JARONIEC, M.; BURAKIEWICZ-MORTKA, W.; KLOSKE, M. Critical appraisal of classical methods for determination of mesopore size distributions of MCM4. **Materials Applied Surface Science**, v. 196, n. 1-4, p. 216-223, 2002.

DANTAS, Nedison Oliveira.; **A influência da pressão e da temperatura na emissão de luz do ZnO**. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Sergipe – UFS, São Cristóvão, 2008.

ELLIOTT, J. C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. **Elsevier, Amsterdan**, v.18, p 111, 1994.

ELLIOTT, J. C. Recent studies of apatites and other calcium orthophosphates. **Calcium Phosphate Materials, Fundamentals**. Special Edition: Sauramps Medical. Montpellier, p.25-66, 1998.

ELTOHAMY, M, et al. Electrospayed tricalcium phosphate spherical microcups and antibiotic drug delivery. **Materials Letters**, v. 65, p. 2043-2046, 2011.

ESPANOL, M.; GINEBRA, M. P.; PEREZ, R. A.; MONTUFAR, E. B. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. **Acta Biomaterials**, v. 5, p. 2752–2762, 2009.

FARZADI, A; SOLATI-HASHJIN, M; BAKHSHI, F; AMINIAN, A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation. **Ceramics International**, v. 37, n. 1, p. 65-71, 2011.

FAROOQ, A. K.; SALEEM, M.; AFZAL, A.; ALI, A.; KHAN, A. Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 245-252, 2014.



FENG, W.; MUSEN, L.; YUPENG, L.; YONGXIN, Q. A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. **Materials Letters**, v. 59, n. 8-9, p. 916-919, 2005.

FERNANDES, A. J. D. **Fosfato de cálcio mesoporosos e como nanocompósitos com sílica: Síntese caracterização e ensaios de liberação controlada de fármaco**. Tese (Doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4. ed. Wiley-Liss, 2000.

GARRATT-REED, A. J.; BELL, D. C. **Energy dispersive X-ray analysis in the electron microscope**. Bios, 2003.

GINEBRA, M. P.; CANAL, C.; ESPANOL, M.; PASTORINO, D.; MONTUFAR, E. B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1090–1110, 2012.

GOMIDE V. S. **Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.

GUO, Y. P.; LIN, T. S.; ZHOU, Y; JIA, D. C; GUO, Y. J. Fabrication of monodisperse mesoporous hydroxycarbonate apatite microspheres by emulsion method. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 127, n. 3, p. 245-249, 2010.

GUO, Y. P.; LONG, T.; TANG, S.; GUO, Y. J.; ZHU, Z. A. Hydrothermal fabrication of magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres: biocompatibility, osteoinductivity, drug delivery property and bactericidal property. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 19, p. 2899-2909, 2014.

HEIMANN R. B. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 233, p. 27–38, 2013.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the american ceramic society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

HENCH, L. L., JUNE, W. **An introduction to bioceramics**, World Scientific. Singapore, v. 1, p. 139, 1993.

HUANG, C. L.; LI, W. L. LOO, J. S. C. Drugeluting scaffolds for bone and cartilage regeneration. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 6, p. 714–724, 2014.

IVANOVA, E. P.; BAZAKA, K. Crawford Natural polymer biomaterials: advanced applications. **New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare**, v. 1, p.

32–70, 2014.

IONASHIRO M. **Fundamentos de Termogravimetria e Análise térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial**. Giz Editorial, São Paulo, 2005.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods**. International Organization for standardization, Geneva, 1992.

KAYGILI, O.; KESER, S.; ORAINYC, R. H. A.; ATES, T.; YAKUPHANOGLU, F. In vitro characterization of polyvinyl alcohol assisted hydroxyapatite derived by sol-gel method. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 239–244, 2014.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; RALPHO, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 123-129, 2000.

KOKUBO, T.; KUSHITAMI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. **Journal of biomedical materials research**, v. 24, n. 6, p. 721-734, 1990.

KENKEL, John. **Analytical Chemistry, Refresher Manual**. Lewis Publishers Inc., London, 1992.

KIRKPATRICK, C. J.; MITTERMAYER, C. Theoretical and practical aspects os testing potencial biomaterials in vitro. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, n. 1, p. 9- 13, 1990.

LAO, L. L.; PEPPAS, N. A.; BOEY, F. Y. C.; VENKATRAMAN, S. S.; Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.418, p.28-41, 2011.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 81-98, 2002.

LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J., P. **Dense Hydroxyapatite in Handbook of Bioactive** Ceramics. CRC Press, v. II, 1990.

LIU, C.; WANG, W.; SHEN, W., CHEN, T.; HU, L; CHEN, Z. Evaluation of the biocompatibility of a nonceramic hydroxyapatite. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 8, p. 490-493, 1997.

LYGRE, H.; MOE, G.; SOLHEIM, E.; GJERDET, N. R. Biologic testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. **Acta Odontologica Scandinavica**. v. 53, n. 6, p. 397-40, 1995.

MAVROPOULOS, Elena. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

MAVROPOULUS, E.; ROSSI, A. M.; COSTA, A. M.; PEREZ, C. A. C.; MOREIRA, J. C.; SALDANHA, M. Studies on the Mechanisms of Lead Immobilization by Hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 1630-1635, 2002.

MECCUSKER, L. B.; LIEBAU, F.; ENGELHARDT, G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 381-394, 2001.

MEDEIROS, Kelliane de Almeida. **Desenvolvimento e testes in vitro de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais**. Dissertação (Mestrado em Biologia animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MONTEIRO, F. J.; SAN RÓMAN J. **Biomateriales: Introducción y Desarrollo Histórico**. 1. ed. Faenza Editrice Iberica, 2004.

MOUTHUY, P. A.; CROSSLEY, A.; YE, H. Fabrication of calcium phosphate fibres through electrospinning and sintering of hydroxyapatite nanoparticles. **Materials Letters**, v. 106, p. 145–150, 2013.

NAGEM FILHO, H.; CAMPI JUNIOR, L.; NAGEM, H. D.; FRANCISCONI, P. A. S. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innovations Implant Journal - Biomaterials and Esthetics**, v. 1, n. 1, p. 54-62, 2006.

NORDSTROM, E. G.; KARLSSON, K. H. **Carbonatetoped hydroxyapatite**. J. Mater. Sci.: Mater. Med., v. 1, p.182, 1990.

NOZAKI, A. C. M.; MARQUES, R. F. C.; DINIZ, I. M. A.; MARQUES, M. M.; MARCHI, J. **Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial**. In: 7º Congresso Latino Americano e de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal, RN, Agosto de 2012.

OGAWA C. A.; PLEPIS A. M. G. Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em composto hidroxiapatita: colágeno. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 17, n. 3, p. 123-130, 2001.

OLIVEIRA, F. P. **Influência do processamento na obtenção de biocerâmicas à base de hidroxiapatita**. Dissertação (mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2008.

PEITL FILHO, Oscar. **Vitro-cerâmica bioativa de alto desempenho mecânico**. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

PIERRI, J. J.; MAESTRELLI, S. C.; PALLONE, E. M. J. A; TOMASI, R. Dispersão de nanopartículas de ZrO<sub>2</sub> visando produção de nanocompósitos de ZrO<sub>2</sub> em matriz de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **Cerâmica**, v. 51, n. 317, p. 8-12, 2005.

RANADE, V., HOLLINGER, M. A., CANNON, J. B. **Drug Delivery Systems**. 2. ed. London: CRC Press, 2003.

REMINGTON, J. P. **A ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Easton: Mack, 2000.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M.; KHOSHDARGI, E. D.; AHMAD, J. KHOSHDARGI. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterials**, v. 9, p. 7591- 7621, 2013.

SANTOS, Luis Alberto. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado por Fibras para Uso na Área Médico – Odontológica**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2002.

SANTOS S. R. A.; ROSSI, A. M.; ANDRADE, Z .R.; SILVA, P. M. H. In vitro Evaluation of Porous Biphasic Scaffolds. **Key Engineering Materials**, v.330-332, p.935-937, 2007.

SANOSH, K. P.; CHU, M. C.; BALAKRISHNAN, A.; LEE, Y. J.; KIM, T.N.; CHO, S. J. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. **Current Applied Physics**. v. 9, n. 6, p.1459–1462, 2009.

SENA, Lídia Ágata. **Produção e caracterização de compósitos de hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. Tese (Doutorado) – Departamento de em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 2004.

SELVAM, P.; BHATIA, S. K.; SONWANE, C. G. Recent advances in processing and characterization of periodic mesoporous MCM-41 silicate molecular sieves (Review). **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 15, p. 3237-3261, 2001.

SILVA, Leonardo Antônio. **Obtenção e caracterização de scaffolds de hidroxiapatita utilizando amido de milho como agente porogênico**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Mecânica, Campinas – SP, 2012.

SILVA, Oberto Granjeiro. **Síntese e caracterização de híbridos inorgânicoorgânico formados a partir de reações de silanização da hidroxiapatita e monetita**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

SOARES, Cristina. **Síntese e Caracterização de Biocimentos Nanoestruturados para Aplicações Biomédicas**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do estado de Santa Catarina, Joinville - SC, 2006.

SOLER-LLIA, G. J. A. A.; SANCHEZ, C.; LEBEAU, B.; PATARIN, J. Chemical strategies to design textured materials: from microporous and mesoporous oxides to

nanonetworks and hierarchical structures. **Chemical Review**, v. 102, n. 11, p. 4093-4138, 2002.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Fundação Universidade Fernando Pessoa. 1. ed. Porto, 2005

STANLEY, P. Mechanical strength testing of compacted powders. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 227, n. 1-2, p. 27-38, 2001.

TADIC, D., EPPLE, M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, v. 25, p. 978-994, 2004.

THAMARAISELVI, T. V.; RAJESWARI, S. Biological Evaluation of Bioceramic Materials: a review. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v.18, n.1, p.9-17, 2004.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials: proceedings of a consensus conference of European Society for Biomaterials**. 1. ed. Amsterdã: Elsevier, 1986.

WANG, S. Ordered mesoporous materials for drug delivery (review). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1-2, p. 1-9, 2009.

WANG, Y.; CHEN, T.; WEI, Y.; CHU, L.; GUO, Y. Hollow carbonated hydroxyapatite microspheres with mesoporous structure: Hydrothermal fabrication and drug delivery property. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, p. 3166 – 3172, 2013.

WILLIAMS, D. F.; BLACK, J.; DOHERTY, P. J. Second consensus conference on definitions in biomaterials. **Advances in Biomaterials: Biomaterial-Tissue Interfaces**, v. 10. p. 525-533, 1992.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, p. 5897-5909, 2009.

WONG, J. P., YANG, H. M., BLASETTI, K. L., SCHNELL, G., CONLEY, J., SCHOFIELD, L. N. Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular *Francisella tularensis* infection. **Journal of Control Release**, v. 92, p. 265–273, 2003.

YANG, C.; YANG, P.; WANG, W. Solvothermal synthesis and characterization of Ln (Eu<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>) doped hydroxyapatite. **Journal of colloid and interface science**, v. 328, n. 1, p. 203-10, 2008.

VALLET-REGÍ, M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. **Comptes Rendus Chimie**. v. 13, n. 1-2, p. 174–185, 2010.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; ARCOS, D. Mesoporous materials for drug delivery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 40, p. 7548-7558, 2007.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; COLILLA, M.; MANZANO, M. Bone-regenerative

bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 163-191, 2008.