

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA INSTITUTO
MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

RENAN COSTA CUOZZO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS
BIOCERÂMICAS ADSORVIDAS DE CLOREXIDINA PARA APLICAÇÃO
COMO ENXERTOS ÓSSEOS**

Rio de Janeiro

2013

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

RENAN COSTA CUOZZO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS
BIOCERÂMICAS ADSORVIDAS DE CLOREXIDINA PARA
APLICAÇÃO COMO ENXERTOS ÓSSEOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.Sc.

Prof^a. Maria Helena da Rocha Leão – D.Sc.

Rio de Janeiro

2013

© 2013

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmado ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e do orientador.

620.11 C967p	<p>Cuozzo, Renan Costa. Produção e caracterização de microesferas biocerâmicas adsorvidas de clorexidina para aplicação como enxertos ósseos / Renan Costa Cuozzo; orientado por Marcelo Henrique Prado da Silva e Maria Helena da Rocha Leão – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2013.</p> <p>73 p.: il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro, 2013.</p> <p>1. Ciência dos Materiais. 2. Biocerâmicas. 3. Microesferas. 4. Clorexidinas. Silva, Marcelo Henrique Prado da. II. Leão, Maria Helena da Rocha. III. Título. IV. Instituto Militar de Engenharia.</p> <p>CDD 620.11</p>
-----------------	---

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

RENAN COSTA CUOZZO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS
BIOCERÂMICAS ADSORVIDAS DE CLOREXIDINA PARA
APLICAÇÃO COMO ENXERTOS ÓSSEOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.Sc. do IME

Prof^a. Maria Helena da Rocha Leão – D.Sc. da UFRJ

Aprovada em 16 de Maio de 2013 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.Sc. do IME – Presidente

Prof^a. Maria Helena da Rocha Leão – D.Sc. da UFRJ

Prof^a. Mônica Diuana Calasans Maia – D.Sc. da UFF

Prof. Ricardo Pondé Weber – D.Sc. do IME

Rio de Janeiro

2013

A Todos que me Apoiaram

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Ao meu professor e orientador Marcelo Henrique Prado da Silva pela amizade, por todo ensinamento e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Maria Helena Leão, pelo incentivo a pesquisa e ensinamentos fundamentais para este trabalho.

À minha amiga Andrea Costa, pela enorme atenção, ajuda e tempo despendido nas análises no CBPF.

À Valeria e Vitor, do Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios X- CBPF, que me receberam muito bem e ajudaram com suas análises para a finalização do trabalho.

Meu agradecimento, mais que especial, aos amigos do IME: Thiago Guerra, Daniel Navarro, Rubens Marçal, Joel, Wilson e Luis.

Obrigado ao CBPF pelo suporte técnico durante o trabalho de espectroscopia de UV e espectroscopia de Infravermelho.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho.

Ao Instituto Militar de Engenharia pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora pelas correções e esclarecimentos.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	9	
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10	
LISTA DE TABELAS	13	
1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Biomateriais.....	16
1.2	Objetivo.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Tecido Ósseo.....	19
2.2	Tipos de Enxerto Ósseo e Mecanismos de Regeneração.....	23
2.3	Hidroxiapatita.....	24
2.3.1	Substituições na Hidroxiapatita.....	27
2.3.2	Vias Para a Síntese da Hidroxiapatita.....	28
2.4	Zinco.....	29
2.5	Clorexidina.....	30
2.6	Sistema de Liberação de Fármacos (Drug Delivery).....	32
2.7	Alginato de Sódio	34
3	MATERIAIS E METODOLOGIA.....	37
3.1	Síntese da Hidroxiapatita (HA).....	37
3.2	Produção de Esferas de Hidroxiapatita	38
3.3	Adsorção de Clorexidina	39
3.4	Dessorção de Clorexidina	40
3.5	Caracterização do Material.....	40
3.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	40
3.5.2	Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS).....	40
3.5.3	Difração de Raios X (DRX).....	40

3.5.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	41
3.5.5	Espectroscopia no Ultra Violeta (UV)	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Aspecto Físico e Visual	43
4.2	Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/EDS).....	45
4.3	Análise por Difração de Raios X (DRX).....	56
4.4	Análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	62
4.5	Análise por Espectroscopia no Ultravioleta.....	64
5	CONCLUSÕES.....	67
6	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	68
7	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 2.1 Composição do Osso (Ten Cate, 1994).....	20
FIG. 2.2 Esquema da estrutura da diáfise dos ossos longos. Aparecem os sistemas circunferenciais externo e interno de Havers. Os sistemas de Havers, desenhado em três dimensões, no alto e à esquerda, mostra a orientação das fibras colágenas nas lamelas. À direita, um sistema de Havers isolado, mostrando a forma dos osteócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).	21
FIG. 2.3 Corte transversal do corpo da mandíbula: a camada externa do osso compacto e a malha interna do osso trabeculado de suporte podem ser nitidamente distinguidas (TEN CATE, 1998).	22
FIG. 2.4 A estrutura da HA – célula unitária (KAY et al, 1964).	25
FIG. 2.5 Estrutura da HA ao longo do eixo c (ELLIOT, 1994).	25
FIG. 2.6 Fórmula estrutural do digluconato de clorexidina formado por dois anéis 4-clorofenil simétricos, dois grupos biguanida, ligados por um hexametileno e dois grupos gluconato (Sigma Aldrich, 2013).....	31
FIG. 2.7 (a,b,c) Microscopia eletrônica de transmissão de sílicas mesoporos com determinação de diâmetro. (a) 20nm (b) 45nm (c) 80nm (d) MEV correspondente à imagem (b) (NANDIYANTO, et al, 2008).....	33
FIG. 2.8 Micrografia eletrônica da HA em diferentes magnificações (MANZANO, 2012).....	34
FIG. 2.9 Esquema representando a união das moléculas de alginato de sódio após a introdução do cátion divalente Ca^{2+} (KATSOUFISOU et al, 2007)	35
FIG. 3.1 Fluxograma para a síntese de hidroxiapatita.....	38
FIG. 4.1 Esferas de HA e alginato em solução de nitrato de zinco.....	44
FIG. 4.2 Esferas de HA gotejadas em solução de cloreto de cálcio. (a) Esferas ainda úmidas, após 24 horas em contato com a solução. (b) Esferas secas após 24 horas na estufa. (c) Esferas calcinadas a 900°C. (d) Esferas sinterizadas a 1250°C.....	44

FIG. 4.3 Esferas de HA gotejadas em solução de nitrato de zinco. (a) Esferas ainda úmidas, após 24 horas em contato com a solução. (b) Esferas secas após 24 horas na estufa. (c) Esferas calcinadas a 900°C. (d) Esferas sinterizadas a 1250°C.....	45
FIG. 4.4 Micrografia (MEV) da HA_CaCl ₂ _900 em aumento de 100 vezes (77x).....	47
FIG. 4.5 Micrografia da HA_Zn_900 (81x).....	47
FIG. 4.6 Micrografia da HA_CaCl ₂ _1250 (100x).....	48
FIG. 4.7 Micrografia da HA_Zn_1250 (100x).....	48
FIG. 4.8 MEV da HA_CaCl ₂ _900 (7000x).....	49
FIG. 4.9 MEV da HA_Zn_900 (7000x).	49
FIG. 4.10 MEV da HA_CaCl ₂ _1250 (7000x).	50
FIG. 4.11 MEV da HA_Zn_1250 (7000x).....	50
FIG. 4.12 MEV da HA_Zn_1250 (20.000x).....	50
FIG. 4.13 (a) MEV da região de análise por EDS da HA_CaCl ₂ _900. (b) EDS HA_CaCl ₂ _900.	51
FIG. 4.14 (a) MEV da região de análise por EDS da HA_Zn_900. (b) EDS HA_Zn_900.....	52
FIG. 4.15 (a) MEV da região de análise por EDS da HA_CaCl ₂ _1250. (b) EDS HA_CaCl ₂ _1250.	53
FIG. 4.16 (a) MEV da região de análise por EDS da HA_Zn_1250. (b) EDS HA_Zn_1250.	54
FIG. 4.17 (a) MEV do ponto de análise por EDS da HA_Zn_1250. (b) EDS HA_Zn_1250.	55
FIG. 4.18 Presença da fase hidroxiapatita na amostra de HA corpo verde.....	56
FIG. 4.19 Presença da fase hidroxiapatita na amostra HA_CaCl ₂ _900.....	57
FIG. 4.20 Presença da fase hidroxiapatita no refinamento da HA_CaCl ₂ _900.....	57
FIG. 4.21 Difratograma HA_Zn_900.....	58

FIG. 4.22 Presença da fase Beta TCP no refinamento da HA_Zn_900.....	58
FIG. 4.23 Presença da fase Zincita (ZnO) no refinamento da HA_Zn_900.....	59
FIG. 4.24 Difratoograma da HA_CaCl ₂ _1250 evidenciando a presença da fase hidroxapatita.....	59
FIG. 4.25 Presença da HA no refinamento da amostra HA_CaCl ₂ _1250.....	60
FIG. 4.26 Difratoograma da amostra de HA gotejada em solução de nitrato de zinco e sinterizada a 1250°C.....	60
FIG. 4.27 Presença da fase Beta TCP no refinamento da amostra de HA gotejada em solução de nitrato de zinco e calcinada a 1250°C.....	61
FIG. 4.28 Presença da fase Zincita (ZnO) no refinamento da amostra de HA gotejada em solução de nitrato de zinco e calcinada a 1250°C.....	61
FIG. 4.29 Análise por FTIR da amostra de HA corpo verde, demonstrando os grupos funcionais característicos da hidroxapatita.....	62
FIG. 4.30 Análise por FTIR da amostra de HA_CaCl ₂ _900.....	63
FIG. 4.31 Análise por FTIR da amostra de HA_Zn_900.....	63
FIG. 4.32 Espectro UV da solução de digluconato de clorexidina 2% mostrando duas bandas com máximos em 230 nm e 254 nm.....	64
FIG. 4.33 Curva padrão da solução de digluconato de clorexidina diluída 1000 vezes.....	65

LISTA DE SIGLAS

CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
DRX	Difração de Raios X
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
IME	Instituto Militar de Engenharia
mm	Milímetro
pm	Picômetro
rpm	Rotações por Minuto
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco
β -TCP	Beta Fosfato Tricálcico
μm	Micrometro

LISTA DE TABELAS

TAB. 1.1 Classificação das biocerâmicas de acordo com a resposta tecidual.....	17
TAB. 4.1 Amostras caracterizadas.....	43
TAB. 4.2 Diâmetro médio e desvio padrão das bioesferas antes e após serem tratadas termicamente.....	46
TAB. 4.3 Determinação das fases presentes nas amostras analisadas difração de raios x.....	61
TAB. 4.4 Quantificação no UV da solução de clorexidina 2% antes e após 24 horas em contato com as bioesferas.....	66
TAB. 4.5 Quantificação no UV da clorexidina dessorvida pelas bioesferas após 1 hora.....	66

RESUMO

Neste estudo foi realizado o desenvolvimento de bioesferas de alginato, hidroxiapatita e zinco para enxerto ósseo. Foi adicionado o antimicrobiano clorexidina por meio de adsorção, com o objetivo de reduzir as taxas de infecção que ocorrem durante a etapa cirúrgica de incorporação dos enxertos aloplásticos nos tecidos vivos.

Pela análise dos resultados, pôde-se observar que o elemento zinco desestabiliza a estrutura da hidroxiapatita, favorecendo a formação da fase β -TCP e óxido de zinco. Além disso, devido o zinco apresentar raio iônico inferior ao do cálcio, presente nas amostras comparadas em mesma temperatura, esse determinou a maior contração das bioesferas.

ABSTRACT

In this study the development of hydroxyapatite and zinc biospheres was performed for bone graft. In order to reduce infection related to the surgical placement of alloplastic grafts in tissues, the antimicrobial chlorhexidine was added by adsorption.

Based on these results, it was observed that the zinc unbalances the hydroxyapatite structure, favoring the formation of β -TCP and zinc oxide phases. The spheres produced with zinc showed higher shrinkage when compared to calcium ones.

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOMATERIAIS

A engenharia tecidual é um campo em expansão que tem por objetivo proporcionar e acelerar a recuperação dos tecidos lesionados, baseada num potencial de cicatrização natural dos próprios pacientes. Essa tecnologia visa criar um ambiente favorável à regulação e proliferação de células indiferenciadas, assim como crescimento vascular, que irão ditar a recuperação tecidual (TABATA, 2009).

As estratégias atualmente utilizadas para o tratamento de tecidos perdidos ou lesionados incluem a utilização de enxertos autógenos, alógenos, aloplásticos (materiais sintéticos) e xenógenos. Apesar de cada um desses tipos de tratamentos apresentar taxas de sucesso e serem considerados inovações na medicina, cada um deles apresenta limitações. Uma das principais falhas do enxerto autógeno, assim como o alógeno é o fato dos seres humanos não apresentarem reservas em excesso de tecido para transplante. Outra restrição relacionada particularmente com a reposição óssea, é a morbidade da área doadora, problemas anatômicos e estruturais e altas taxas de reabsorção durante o processo de cicatrização. Combinado a estes fatores, para o enxerto alógeno existe sempre uma maior taxa de rejeição devido as diferenças genéticas, assim como a possibilidade de transmissão de doenças e a dificuldade de obtenção nos bancos de ossos. Por último, estão os materiais aloplásticos. Assim como todos os materiais estranhos implantados no corpo, o organismo apresenta uma tendência de encapsulamento por meio da formação de uma fina camada fibrosa.

Atualmente, o padrão ouro para a engenharia tecidual, a respeito da substituição de um tecido danificado ou perdido, é a obtenção do próprio tecido natural e saudável, sendo que neste aspecto os biomateriais entram como uma forte opção com amplas possibilidades de atuação (KAIGER; MOONEY, 2001). Além disso, os biomateriais possuem a grande vantagem de atuação como materiais de enxerto ósseo por não danificarem os tecidos saudáveis, não

umentarem os riscos de contaminação viral e bacteriana e estarem disponíveis comercialmente (WILLIAMS, 1987).

A estrutura dos biomateriais e o sistema de liberação de fármacos vêm sendo estudados como possíveis formas de se conseguir uma melhor resposta na proliferação e diferenciação de células potenciais para a recuperação tecidual (TABATA, 2009).

Em 1993, HENCH classificou os biomateriais em quatro tipos de acordo com a resposta tecidual apresentada na interface dos materiais, sendo estes:

1- Inertes: Quando não ocorre união com o osso, havendo a formação de uma camada fibrosa não aderente na interface do material. São exemplos de materiais inertes a alumina e a zircônia;

2- Biotoleráveis: São materiais tolerados pelo organismo, sendo isolados por uma camada de tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons ou produtos da corrosão. Estes são praticamente todos os polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais.

3- Bioativos: Existe uma união do material com o osso por meio de reações químicas que ocorrem na interface. Um exemplo de material bioativo é o biovidro e a hidroxiapatita.

4- Reabsorvíveis: São reabsorvidos e substituídos por osso, podendo ser degradados ou fagocitados pelo organismo. Como exemplo temos o fosfato tricálcico (TCP).

TAB 1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS DE ACORDO COM A RESPOSTA TECIDUAL

Biomateriais	Tipo de ligação	Exemplos
Inertes	Fixação mecânica	Zircônica, Al_2O_3
Biotoleráveis	Crescimento tecidual	Metais
Bioativos	União química com tecidos	HA, biovidro
Reabsorvíveis	Substituição por tecido	Fosfato tricálcico

Fonte: HENCH e WILSON (1993).

Os grandes defeitos ósseos decorrentes de traumas, tumores, má consolidações de fraturas e defeitos congênitos são problemas de difícil resolução vivenciados na cirurgia crânio facial (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN et al.,2009).

A consolidação óssea por meio da utilização do biomaterial está relacionada a diversos fatores como a estabilidade do material, irrigação

sanguínea, o que proporciona nutrientes e células para a região, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho do defeito ósseo. Em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado e, desta forma, há formação de uma cicatriz fibrosa (KIM et al., 2006). Assim, os biomateriais devem possuir características adequadas, de forma a proporcionar a recuperação óssea. Estes devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, e osteocondutores, proporcionando a migração de osteoblastos e células precursoras do crescimento e desenvolvimento ósseo (LIU; MA, 2004; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN et al., 2009).

A caracterização das partículas de biomateriais como por exemplo as apatitas, por meio de substituições funcionais, constitui uma importante área de estudo com objetivo de otimização das propriedades de bioatividade, osteocondução e até mesmo de osteoindução desses materiais.

A bioengenharia tecidual, deste modo, visa desenvolver biomateriais com estrutura tridimensional que sirvam de suporte físico estrutural e que afetem a fisiologia celular, estimulando sua migração e diferenciação (LIU; HAN; CZERNUSKA, 2009).

1.2 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver bioesferas compostas por hidroxiapatita e zinco com sistema de liberação de fármacos. Estas características visaram a produção de um biomaterial capaz de estimular o reparo ósseo, diminuir o tempo de reabsorção óssea e reduzir as chances de infecção durante e após a cirurgia de enxerto ósseo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um órgão dinâmico composto pela medula óssea, endóstio, perióstio, nervos, vasos sanguíneos, canais linfáticos e matrizes orgânicas e minerais. Macroscopicamente, o osso é organizado em uma camada externa densa, conhecida como cortical óssea que envolve uma camada óssea porosa interligada conhecida como osso medular.

A composição do osso pode ser descrita em três níveis de organização de acordo com o tamanho dos seus componentes. O menor nível de organização inclui estruturas nano do osso, compostas por cristais inorgânicos e proteínas. A matéria inorgânica é composta por cristais de cálcio e fosfato que irão formar a estrutura da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Outros íons como carbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato também estão presentes, porém, em pequenas quantidades (BONAR LEES, and MOOK 1985;). A proteína presente em maior quantidade é o colágeno do tipo I. A concentração e organização da hidroxiapatita, colágeno e água são características da macroestrutura do osso, definindo o tipo ósseo; por exemplo, o aumento da concentração mineral está relacionado diretamente ao aumento do estresse mecânico (CURREY, 1990). Apesar do colágeno do tipo I representar oitenta por cento de toda proteína presente no osso (NIYIBIZI AND EYRE 1994), existem mais de duzentos tipos de proteínas não colágenas no osso (DELMAS et al. 1984) responsáveis pela biomineralização.

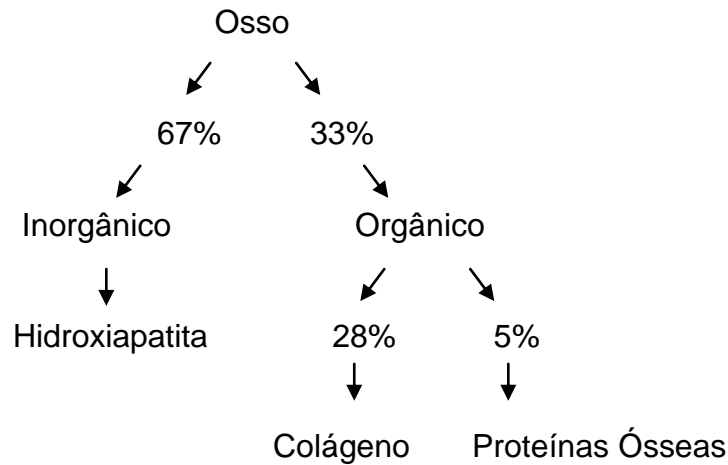


FIG. 2.1: Composição do Osso (Ten Cate, 1994).

O segundo nível de organização óssea apresenta microestruturas, as quais incluem as lamelas, trabéculas e ósteons. As lamelas são compostas de fibras colágenas mineralizadas, organizadas em folhas planares ou concêntricas em volta de um canal conhecido como canal de Havers. Essas unidades de lamelas e canais são conhecidas como sistemas de Havers, sendo estes os componentes funcionais principais do osso cortical.

Cada sistema haversiano é constituído por um cilindro longo, às vezes bifurcado, paralelo à diáfise e formado por quatro a vinte lamelas ósseas concêntricas, sendo o diâmetro dos canais de Havers muito variável. Como cada sistema é construído por deposição sucessiva de lamelas ósseas a partir da periferia, os sistemas em formação têm canais mais largos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os canais de Havers contêm vasos, nervos, e tecido conjuntivo frouxo, sendo que eles comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso, por meio de canais transversais ou oblíquos, os canais de Volkmann. Estes se distinguem dos de Havers por não apresentarem lamelas ósseas concêntricas, sendo que os canais de Volkmann atravessam as lamelas ósseas. Todos os canais vasculares existentes no tecido ósseo aparecem quando a matriz óssea se forma ao redor dos vasos preexistentes.

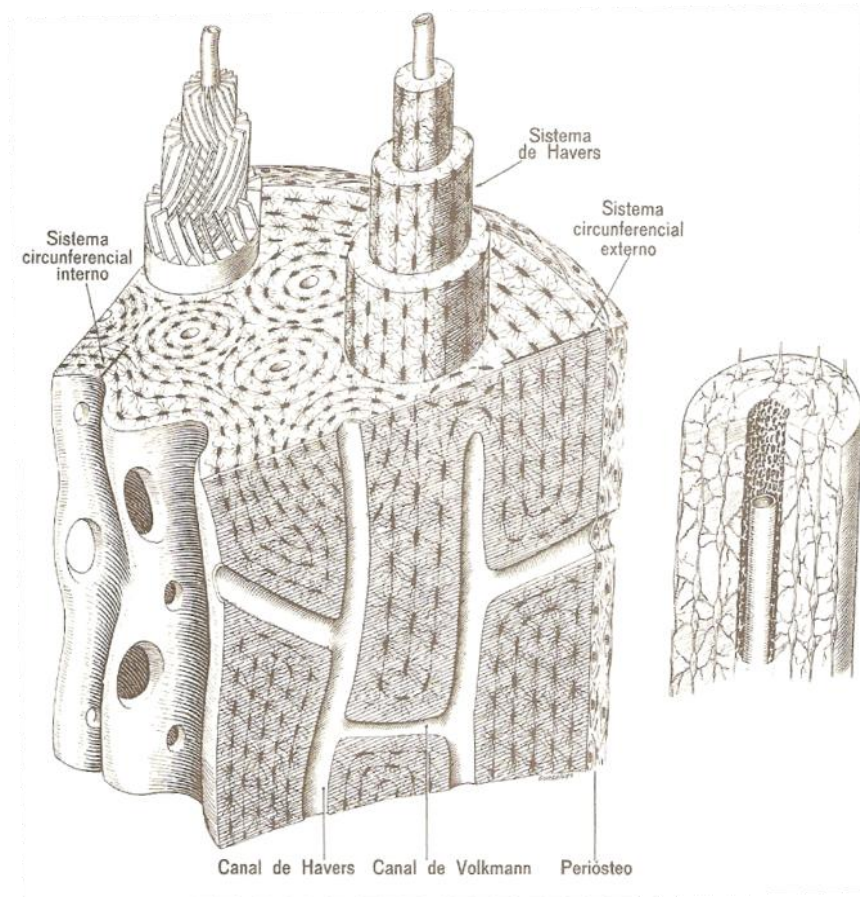


FIG. 2.2: Esquema da estrutura da diáfise dos ossos longos. Aparecem os sistemas circunferenciais externos e internos de Havers. O sistema de Haver, desenhado em três dimensões, no alto e à esquerda, mostra a orientação das fibras colágenas nas lamelas. À direita, um sistema de Havers isolado, mostrando a forma dos osteócitos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Todos os ossos apresentam uma densa camada externa de osso compacto e uma cavidade medular central. No osso vivo, essa cavidade é preenchida por medula óssea vermelha ou amarela. A cavidade medular é interrompida em sua extensão, particularmente nas extremidades dos ossos longos, por uma malha trabecular óssea (osso esponjoso). Esse trabeculado interno suporta a camada cortical (mais espessa) do osso compacto.

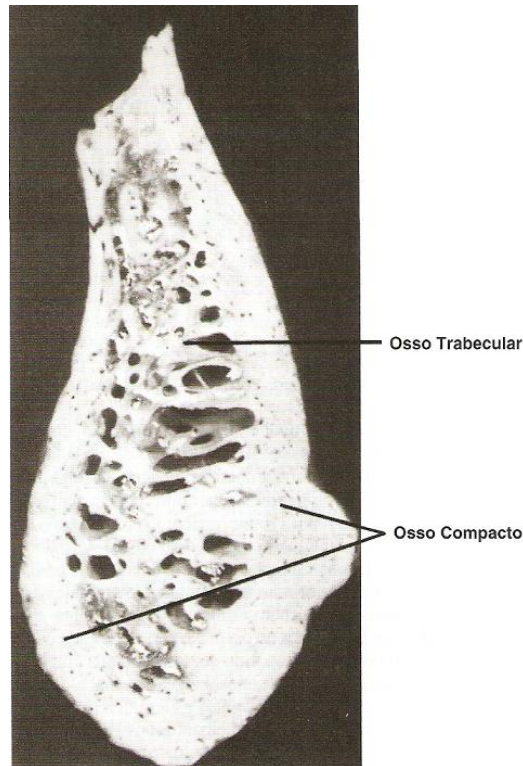


FIG. 2.3: Corte transversal do corpo da mandíbula: a camada externa do osso compacto e a malha interna do osso trabeculado de suporte podem ser nitidamente distinguidas (TEN CATE, 1998).

Ao redor de cada osso, existe uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico (células formadoras de osso), denominada periósteo, que consiste de duas camadas. A camada interna, próxima a superfície óssea, é mais rica em células, principalmente precursoras de células ósseas, e um rico suprimento vascular, enquanto a camada externa é mais fibrosa. A superfície interna do osso é recoberta por uma camada única de células ósseas, o endósteo, que fisicamente separa a superfície óssea da medula óssea contida no seu interior.

No osso, células distintas são principalmente responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da osteoarquitetura. Classicamente, três tipos de células ósseas são descritas, cada qual com sua função específica: os osteoblastos, que formam a matriz óssea; os osteócitos, os quais juntamente com osteoblastos inativos mantêm a matriz óssea; os osteoclastos, que reabsorvem matriz óssea. O osteoclasto é auxiliado, no processo de reabsorção, por macrófagos livres e citocinas emitidas por osteoblastos vizinhos. Em virtude dos osteócitos derivarem dos osteoblastos, pode-se

considerar que as células ósseas derivam de duas linhagens apenas, a primeira relacionada a formação e manutenção e a segunda responsável pela remoção. Essa distinção é importante devido ao grande número de células provenientes de ambas as fontes, que necessitam ser recrutadas continuamente ao longo da vida, para manter a integridade funcional do osso (TEN CATE, 1998).

2.2 TIPOS DE ENXERTO ÓSSEO E MECANISMOS DE REPARAÇÃO

Atualmente existem diferentes materiais biológicos que são utilizados na terapia de reconstrução óssea, incluindo os alógenos, autógenos, aloplásticos e xenógenos. Os enxertos autógenos são aqueles transplantados de um sítio doador para um sítio receptor em um mesmo indivíduo. Os enxertos alógenos são transplantados entre indivíduos da mesma espécie, porém diferentes geneticamente. Os xenógenos são aqueles realizados entre espécies diferentes. Os aloplásticos são feitos por meio da utilização de materiais sintéticos ou inorgânicos como as biocerâmicas por exemplo.

Os enxertos ósseos podem atuar por meio de três mecanismos possíveis: *osteogênese*, *osteoidução* e *osteocondução*. Sendo que os materiais podem incluir um, dois ou os três mecanismos.

A **osteogênese** é a nova formação óssea induzida por células osteoprogenitoras que estão presentes no enxerto, sobrevivem ao transplante, proliferam e se diferenciam em osteoblastos; este processo é conhecido como *fase I da osteogênese*. O osso autógeno é o único material de enxerto com potencial osteogênico (LINDHE et al, 2005).

A **osteoidução** envolve a nova formação óssea pelo estímulo e recrutamento de células derivadas de células mesenquimais indiferenciadas para o sítio do enxerto; este processo é conhecido como *fase II da osteogênese*. O recrutamento e diferenciação são acompanhados por uma cascata de eventos iniciados pelos fatores de indução enxertados, conhecidos como *proteínas ósseas morfogenéticas* (BMPs), as quais fazem parte da

superfamília do fator de transformação do crescimento (TGF- β). As BMPs estão presentes na matriz enxertada e são ativadas após o composto mineral do enxerto ósseo ser reabsorvido pela ação dos osteoclastos. Tem sido evidenciado que os materiais osteoindutores podem induzir a formação óssea até em sítios ectópicos, como em tecidos subcutâneos por exemplo(BOWERS et al. 1989).

A **osteocondução** não leva consigo ou induz o crescimento de tecido vascular e a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas na estrutura preenchida com o material de enxerto. O crescimento ósseo ocorre pela reabsorção e aposição da estrutura óssea existente ao redor, num processo conhecido com fase III da osteogênese. Conseqüentemente, este processo deve ocorrer na presença de osso ou células mesenquimais indiferenciadas. Os materiais osteocondutores não formam osso quando colocados em tecido mole. Ao invés, o material permanece relativamente não modificado ou é reabsorvido (LINDHE et al, 2005).

2.3 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HA) possui fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, cuja razão molar Ca/P é igual a 1,67, sendo constituída a partir de uma rede tridimensional de óxido de cálcio e poliedros de fosfato. A sua cela unitária contém uma representação completa do cristal de apatita, consistindo em grupos de Ca, PO_4 e OH empacotados juntos em um arranjo (Fig.2.4, 2.5). (ELLIOT, 1994).

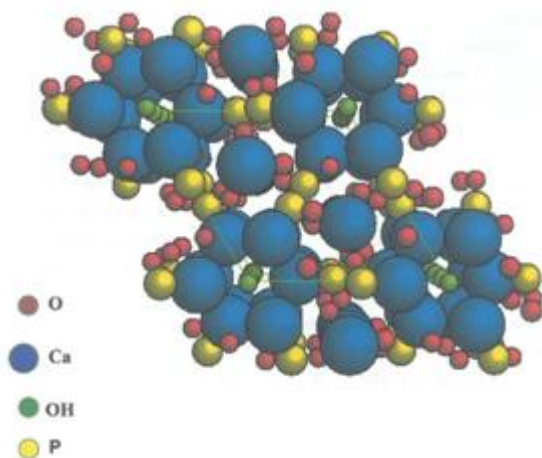


FIG. 2.4: A estrutura da HA – célula unitária (KAY et al, 1964).

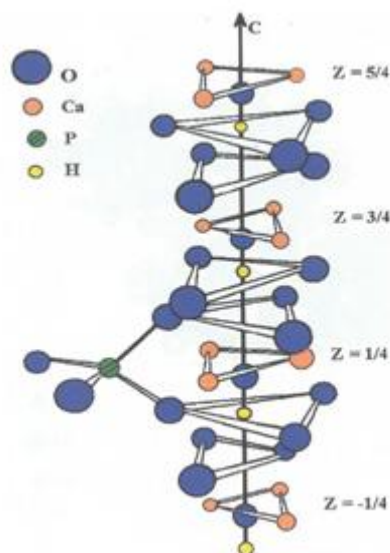


FIG. 2.5: Estrutura da HA ao longo do eixo c (ELLIOT, 1994).

Em 1926, De Jong foi o primeiro a observar a semelhança entre os padrões de difração de raios X (DRX) da fase mineralizada dos ossos e da hidroxiapatita sintética. Ele verificou que a fase mineralizada não apresentava uma composição bem definida, além de mostrar variações durante os estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros (BENS NISSAN and PEZZOTTI, 2002).

A HA encontrada nos ossos não é estequiométrica, sendo observada uma deficiência em cálcio de até 10%. O balanço eletrônico das cargas pode ser obtido pela ausência de grupos hidroxilas (OH^-) ou, alternativamente, pela presença do ânion hidrogenogofato no lugar do PO_4^{3-} (HENCH and WILSON, 1993). A hidroxiapatita sintetizada deficiente em cálcio é geralmente caracterizada pela razão Ca/P. Enquanto a razão molar Ca/P da HA estequiométrica é igual a 1,67 a razão molar da HA sintetizada pode variar de 1,5 a 1,67. O grau da estequiometria da HA depende do método de síntese empregado. Uma variedade de métodos tem sido proposta para sintetizar a HA. Um dos mais utilizados é o de precipitação ou hidrólise com temperatura variando de 25 a 100°C. De acordo com a literatura, o pH inicial da suspensão deve ser menor que 12 e, após a síntese, o pH final obtido deve ser igual a 7 (LEGEROS, 1991).

A utilização da hidroxiapatita como material substituto ósseo se torna evidente, uma vez que aproximadamente 70% do osso humano é composto por hidroxiapatita. Já a necessidade de desenvolvimento deste material macroporoso não é tão óbvia e necessita de uma análise da arquitetura dos tecidos e seus efeitos na regeneração. Um defeito ósseo deve regenerar se o substituto implantado proporcionar uma estrutura organizacional que permita a proliferação celular e a formação de interconexões vasculares (HENCH and WILSON, 1993). Assim, como o tecido ósseo que apresenta porosidades que abrigam células e vasos, a hidroxiapatita também deve ter essas estruturas para que permita o desenvolvimento do tecido ósseo.

A hidroxiapatita é considerada uma cerâmica bioativa, pois promove a ligação química com o tecido ósseo e estimula a formação óssea tecidual, sendo utilizada para o preenchimento de defeitos ósseos (AOKI, 1994). A característica limitante da hidroxiapatita é a baixa resistência a tração, flexão e baixa tenacidade.

A natureza química da HA e os parâmetros de processamento utilizados afetam diretamente o comportamento compressivo, o que influencia enormemente o processamento cerâmico e as propriedades mecânicas finais da HA sinterizada (PONTIER, et al, 2001).

A dureza das cerâmicas depende de outros fatores além do tamanho de grão, como densidade, forma dos poros, (SNYDERS, et al, 2007). Além disso, a pressão de prensagem e a temperatura de sinterização exercem grande influência nas propriedades mecânicas da HA (PROKOPIEV, and SEVOSTIANOV, 2006). O tratamento térmico em temperaturas acima de 700°C por exemplo, leva à formação de misturas bifásicas HA e β -TCP (LEGEROS, 1991).

2.3.1 SUBSTITUIÇÕES NA HIDROXIAPATITA

Apesar da hidroxiapatita e dos fosfatos de cálcio apresentarem estrutura e composição similar à das apatitas biológicas, a bioatividade destes materiais artificiais fica relativamente limitada (HENCH, 1998). Com o objetivo de melhorar as propriedades biológicas destes materiais, tornando-os quimicamente mais semelhantes ao osso humano, diversos estudos têm focado em processos de substituição na estrutura das apatitas (VALLET-REGI & ARCOS, 2005).

Diversos íons podem ser introduzidos na estrutura da hidroxiapatita por meio do processo de substituição, induzindo assim modificações na morfologia, cristalinidade, estabilidade térmica e parâmetros de rede.

As apatitas apresentam grupamentos iônicos que podem ser substituídos por outro grupamento iônico de mesma valência ou valência diferente. Diversos íons relacionados aos presentes na própria fase mineral do osso podem ser utilizados no processo de substituição (PALARD et al., 2008).

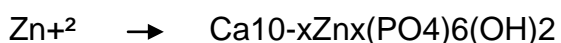
A introdução de novos grupamentos iônicos na estrutura da apatita leva a uma diminuição de cristalinidade e da estabilidade térmica e a um aumento da solubilidade. Estas apatitas apresentadas atendem a essa regra, com exceção para os íons flúor (F^-), que substituem os íons hidroxila (OH^-), pois essa substituição tende a reduzir a solubilidade do material (YAO et al., 2009).

O resultado da substituição aniônica ou catiônica no parâmetro de rede da HA irá depender do raio iônico e da quantidade a ser substituída. Geralmente, se o substituinte é maior que o íon substituído (Sr^{2+} por Ca^{2+} por exemplo), o efeito é de expandir um ou os dois parâmetros de rede. Em determinados casos de substituição, ambos os parâmetros são afetados na mesma direção ou em direções opostas. Há também a possibilidade de apenas a dimensão do eixo "a" aumentar ou diminuir enquanto que o eixo "c" não varia ou viceversa. Quando o substituinte é menor que o substituído (Cd^{2+} por Ca^{2+}) os dois parâmetros tendem a diminuir (ELLIOT, 1994).

Dentre os substituintes catiônicos, o magnésio é o mais estudado, sendo o quarto cátion mais abundante no osso humano (0,44 – 1,23% massa). Diversos trabalhos mostram que o magnésio está associado com a

mineralização de tecidos calcificados, estimulando diretamente a proliferação de osteoblastos. Além disso, foi mostrado que a presença do Mg^{2+} na estrutura da HA afeta sensivelmente a sua cristalização, desestabilizando sua estrutura e favorecendo a formação de β TCP (CACCIOTTI et al., 2009).

O íon zinco (Zn^{+2}), conhecido como bioelemento, está presente nos ossos em 0,0126 a 0,0217% em massa (TAMM & PELD, 2006). A presença de Zn na apatita diminui a reação de inflamação induzida pela fagocitose das partículas de HA (GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2006). Além disso, o Zn estimula o crescimento e a mineralização óssea (HASHIZUME & YAMAGUCHI, 1993; KISHI & YAMAGUCHI, 1994). Estudos realizados por Jallot e colaboradores mostraram que a bioatividade da HA contendo 0,5% em massa de Zn ($x=0,78$) é superior à da HA pura (JALLOT et al., 2005).

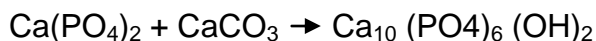
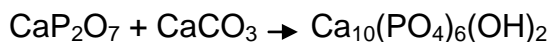


2.3.2 VIAS PARA SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita pode ser obtida através de reações no estado sólido ou métodos em via úmida, como por exemplo, a síntese hidrotérmica, o processo sol-gel, a precipitação e a neutralização. Algumas alterações nestas técnicas clássicas de obtenção têm sido empregadas para o preparo de pós com morfologia, estequiometria, grau de cristalinidade ou substituições iônicas variáveis de acordo com a aplicação (VALLET and GONZÁLEZ, 2004).

A reação no estado sólido é um processo que envolve temperaturas acima de $950^{\circ}C$ nos fosfatos de cálcio, e se baseia na troca iônica entre partículas sólidas, originando assim um produto por mecanismos de difusão e nucleação (AOKI and LEGEROS, 1991). Esta técnica apesar de ser de fácil execução, apresenta alguns pontos negativos como a não uniformidade no tamanho das partículas formadas, perda de estequiometria devido à volatilização dos reagentes em altas temperaturas, difícil reprodutibilidade e caráter multifásico.

Existem duas reações principais que caracterizam este método:



Já a via úmida é defendida por muitos autores por apresentar baixo custo, permitir a obtenção de um biomaterial homogêneo, reativo e de composição estequiométrica melhor definida, possibilitando controle nas condições de síntese. Além disso, a hidroxiapatita precipitada pela via úmida apresenta características similares às do tecido ósseo e dentário, diferente da hidroxiapatita sintetizada pela via seca a altas temperaturas.

O método da via úmida por precipitação pode apresentar problemas como a dificuldade de controle da relação Ca/P dos reagentes, temperatura, pH, tempo de maturação e tempo da reação. Estes aspectos podem gerar pequenas diferenças na cristalinidade, estequiometria e morfologia do material.

O método da via úmida pode ser realizado por duas formas, uma envolve reações de neutralização de soluções ácidas e alcalinas, enquanto a outra envolve reações entre sais de fosfato e cálcio.

O método envolvendo a reação ácido-base tem como resultado partículas de baixa cristalinidade, sendo importante o controle da reação para a obtenção da proporção adequada de íons cálcio e fósforo (AOKI, 1991). Nas reações entre sais e fosfatos de cálcio, também ocorre a formação de partículas de baixa cristalinidade, semelhantes ao osso humano (AOKI, 1991; LE GEROS, 1991).

2.4 ZINCO

O zinco é um importante elemento biológico, considerado essencial para estrutura e função do metabolismo ósseo (TAPIERO and TEW, 2003). Dentre todos os tecidos do corpo humano, o osso é o que apresenta maior quantidade deste elemento químico, tendo cerca de 160 a 300 ppm de zinco (HOLLOWAY

et al, 1996). Deficiências de zinco podem diminuir o metabolismo ósseo, resultando em uma redução no seu crescimento, peso e desenvolvimento, prejudicando a manutenção da saúde dos tecidos ósseos (HSIER, 1980; ONER, 1984).

Estudos demonstram a atuação do zinco no estímulo à formação e mineralização de osso in vivo e in vitro, e diminuição da reabsorção óssea, uma vez que este inibe a ação dos osteoclastos e estimula a atividade da fosfatase alcalina (YAMAGUSHI, 1986; HALL, 1999). Além disso, associou-se sua presença ao estímulo para formação de colágeno em calvária de ratos (YAMAGUCHI, 1987).

O zinco demonstrou estimular a proliferação e diferenciação celular, assim como a síntese de proteínas que favorecem o crescimento ósseo. Dentre estas proteínas estão a aminoacil-tRNA, osteocalcina, IGF-1, TGF-f e a fosfatase alcalina que é uma proteína óssea essencial para a diferenciação dos osteoblastos (HASHIZUME and YAMAGUCHI, 1994; FRANCESCHI, 1992).

2.5 CLOREXIDINA

A clorexidina é uma base, que apresenta na sua estrutura dois anéis clorofenólicos e dois grupos biguanida, ligados simetricamente por cadeias de hexametileno. A biguanida por ser uma base forte, carregada positivamente, torna a clorexidina praticamente insolúvel em água, por isso, seu uso em odontologia é preconizado na forma do sal digluconato de clorexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) (FIG. 2.6). Nesta forma, é possível aumentar a solubilidade da clorexidina em água, permitindo que em pH fisiológico ocorra dissociação de moléculas carregadas positivamente.

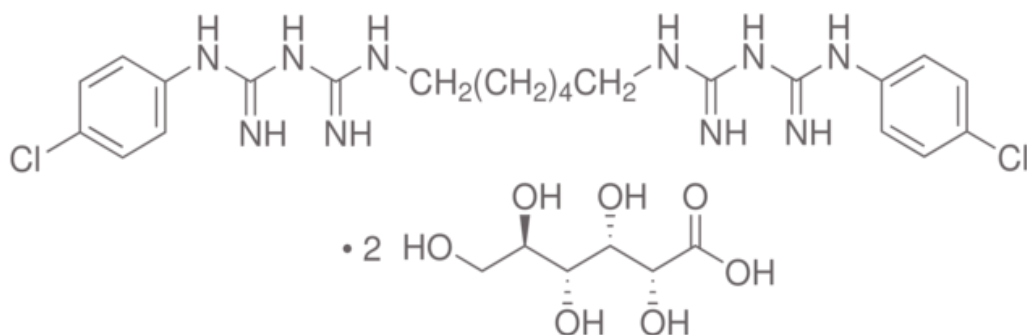


FIG. 2.6: Fórmula estrutural do digluconato de clorexidina formado por dois anéis 4-clorofenil simétricos, dois grupos biguanida, ligados por um hexametileno e dois grupos gluconato (Sigma Aldrich, 2013).

Dependendo da concentração empregada, o digluconato de clorexidina pode apresentar ação bacteriostática ou bactericida. A concentração mínima eficaz para redução do número de microorganismos orais é de 0,12%, sendo que concentrações inferiores a esta, falham ao reduzir o número de *Streptococcus mutans* (CLARK e GUEST, 1994).

A molécula catiônica do digluconato de clorexidina, age se ligando na parede celular aniônica das bactérias, alterando a estrutura superficial membranar, o que gera um aumento da permeabilidade bacteriana. Em consequência, ocorre a entrada de clorexidina para o interior do citoplasma bacteriano, causando um desequilíbrio osmótico, o que faz com que haja a perda do conteúdo celular (HUGO e LONGWORTH, 1964).

Quando utilizada como anti-séptico oral, a clorexidina apresenta boa substantividade. Esta é adsorvida pela hidroxiapatita do esmalte dos dentes, proteínas salivares, placa e macromoléculas ácidas das superfícies orais, devido a sua carga positiva, podendo permanecer ativa durante tempo suficiente para proporcionar ação bactericida (VAHDATY et al, 1993).

Atualmente, a ação da clorexidina tem papel fundamental na odontologia, atuando no controle de infecções, como no período de cicatrização após cirurgias orais ou periodontais. Além disso, age de forma preventiva na redução da placa bacteriana, como por exemplo, em pacientes com limitações motoras, geriátricos, e que fazem uso de aparelhos ortodônticos.

2.6 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS (DRUG DELIVERY)

Diversos estudos da engenharia tecidual têm focado nas vantagens e possibilidades que os sistemas de liberação de fármacos podem oferecer a biomedicina. Estes sistemas funcionam por meio da incorporação de fármacos em uma estrutura que servirá como arcabouço para a liberação da droga localmente. O fármaco terá ação sobre esta área específica podendo ser distribuído para o corpo pela corrente sanguínea. Esta tecnologia permite a liberação da droga diretamente nos tecidos alvo, provocando uma menor quantidade de efeitos adversos e overdose, já que é necessária uma quantidade e concentração inferiores do medicamento para a sua eficácia (HABRAKEN et al, 2007).

Dependendo do tipo de material utilizado, é possível o controle do tempo e da quantidade de liberação, permitindo um controle sobre a biodisponibilidade do fármaco na circulação sistêmica. Quanto maior a área superficial e quantidade de poros, maior será a capacidade do material carrear substâncias específicas. As biocerâmicas apresentam uma capacidade de atuação como estrutura para *“drug delivery”*, porém estes materiais não apresentam um controle tão preciso com relação ao tempo e quantidade de liberação. A sílica mesoporosa apresenta excelente capacidade para atuação como material para drug delivery (MANZANO, M. et al, 2012) (FIG 2.7).

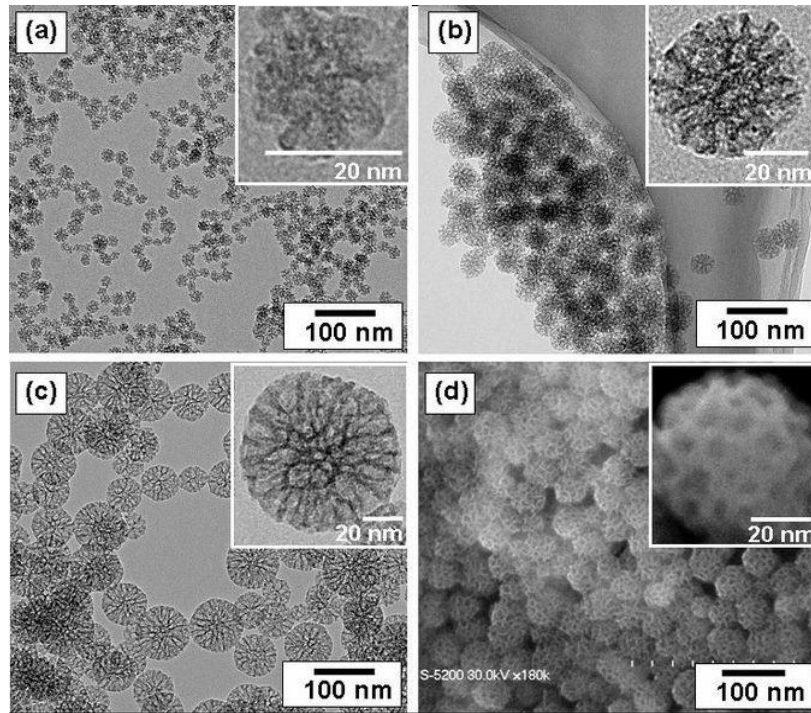


FIG. 2.7: (a,b,c) Microscopia eletrônica de transmissão de sílicas mesoporos com determinação de diâmetro. (a) 20nm (4) 45nm (c) 80nm (d) MEV correspondente à imagem (b) (NANDIYANTO, et al, 2008).

O risco de infecção é um problema sério, associado ao preenchimento e substituição óssea. Ele é baseado em um processo infeccioso acompanhado de destruição óssea, sendo causado por microorganismos infecciosos. Para resolução deste problema, os sistemas de *drug delivery* que liberam antimicrobianos nos sítios locais, em combinação com o material de enxerto, são os alvos no tratamento da infecção óssea. No tratamento desta patologia, os sistemas de liberação local apresentam diversas vantagens, como a redução na toxicidade, ação local e conveniência para os pacientes, visto que há uma menor demanda pelo uso de medicamentos pós-operatórios (MANZANO, M. et al, 2012).

A estruturação das porosidades nas biocerâmicas, juntamente com a ordenação e alta área superficial, são fatores que contribuem para que esses materiais sejam utilizados para o tratamento de infecções (FIG 2.8). A razão se deve à capacidade de liberação local de antimicrobianos nas áreas de infecção, juntamente com a capacidade de promover a formação óssea (ZHU, YF. et al, 2009).

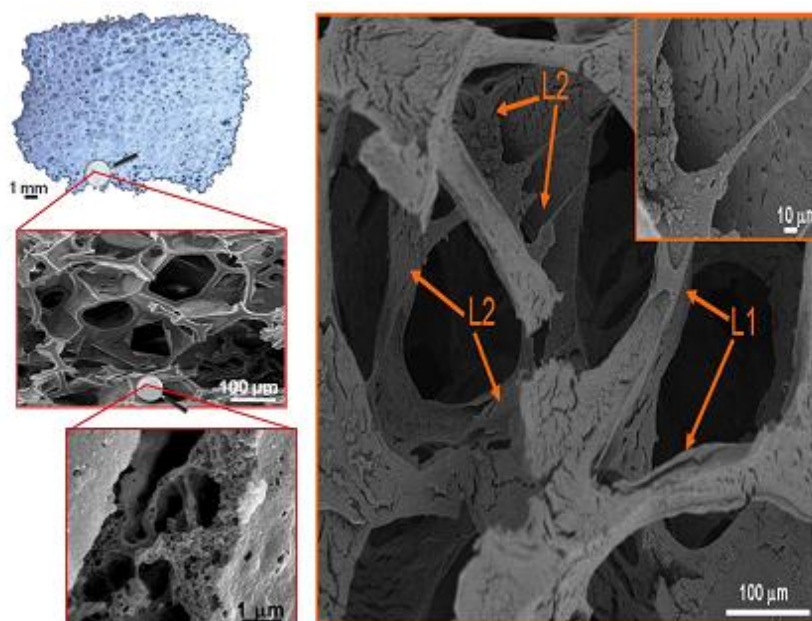


Fig. 2.8: Micrografia eletrônica da HA porosa em diferentes ampliações (MANZANO, 2012).

2.7 ALGINATO DE SÓDIO

O alginato é um polissacarídeo aniônico, que apresenta estrutura linear compreendida por ligações glicosídicas de unidades de β -D-ácido manurônico e α -L-gulurônico (ZHANG; CHENG; YING, 2006). Estas unidades podem variar em composição e seqüência, arranjadas em blocos ao longo da cadeia. As propriedades físicas e químicas deste polissacarídeo são determinadas pela massa molecular e composição dos blocos. A seqüência da composição dos monossacarídeos e a massa molecular são importantes fatores para determinação das propriedades físicas do gel formado pelo alginato (LIEW et al., 2006).

O alginato de sódio pode realizar diversas trocas iônicas na presença de íons divalentes, por meio de um processo de ligações cruzadas. Estas trocas ocorrem por meio do íon sódio com o íon divalente, geleificando o meio em que o alginato se encontra. Os cátions monovalentes e o Mg^{2+} não induzem a essa geleificação e alguns íons como o Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} possuem um uso limitado por apresentarem uma certa toxicidade (GOMBOTZ

and WEE, 1998). Devido a essa propriedade de geleificação, o alginato pode ser usado como matriz e assim envolver moléculas de significância biológica, tais como, proteínas, células e medicamentos.

Quando ocorre a troca do íon Na^+ do ácido gulurônico com cátions divalentes, existe a formação de uma estrutura conhecida como "caixa de ovo", caracterizada pela reticulação o que possibilita o aprisionamento ou incorporação de substâncias desejadas (FIG. 2.9). Os cátions divalentes se ligam aos blocos de ácidos α -L-gulurônicos de uma maneira cooperativa que pode ter mais de 20 monômeros associados. Cada cadeia de alginato pode dimerizar para formação de junções com muitas outras cadeias, resultando em cadeias de gel (GOMBOTZ and WEE, 1998).

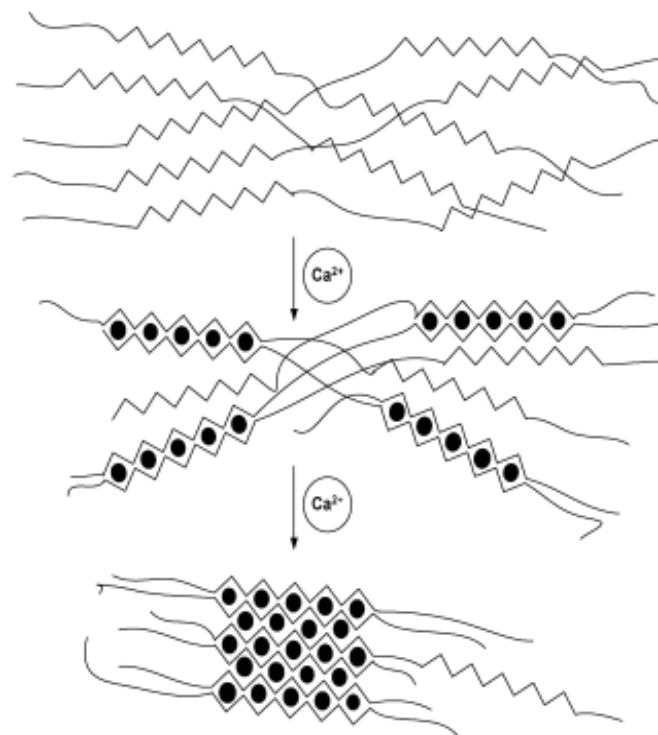


FIG. 2.9: Esquema representando a união das moléculas de alginato de sódio após a introdução do cátion divalente Ca^{2+} (KATSOUFISOU et al, 2007).

Géis de alginato maiores de 1,0 mm podem ser formados ao gotejar uma solução de alginato de sódio em uma solução contendo cátions divalentes (OUWERX et al., 1988). O controle do diâmetro das partículas formadas pode ser alcançado por meio do diâmetro da agulha utilizada para gotejar a solução e da viscosidade da solução de alginato. Maiores diâmetros e viscosidades

mais altas produzem partículas maiores. Os géis de alginato são estáveis entre uma faixa de temperatura de 0 a 100 °C, apesar do seu módulo de rigidez diminuir com o aumento da temperatura (GACESA, 1988). Esses géis podem ser preparados tanto em água quente quanto em água fria (CHAPMAN, 1980).

As pesquisas e o interesse pelas indústrias farmacêutica e biomédica tem aumentado recentemente em relação ao alginato, devido suas propriedades específicas. Uma das suas propriedades bem exploradas é a capacidade de agir como espessante, geleificante e agente coloidal (LIEW et al, 2006). Além disso o alginato apresenta propriedades de imunogenicidade, biocompatibilidade, bioadesão e baixa toxicidade , apresentando amplas áreas de exploração na indústria biotecnológica (EISELT et al, 2000; GOMBOTZ e WEE, 1998).

No campo cirúrgico o alginato pode ser utilizado no reparo de tecidos celulares, na contenção de hemorragias capilares e no tratamento de queimaduras (BLAINE, 1947). Géis de alginato podem ser aplicados na superfície ocular, onde o α -L-gulurônico interage com os íons cálcio presentes na lágrima, possibilitando a liberação controlada de drogas oculares (COHEN, et al. 1997).

Estudos realizados com a administração de drogas encapsuladas com alginatos demonstraram que após a administração o fluido gastrointestinal dissolve o complexo do alginato liberando a droga. Essa liberação depende da dissolução do gel e da difusão da droga no fluido gastrointestinal. Porém há estudos que evidenciam que esse sistema apresenta uma resistência ao ácido gástrico (STOCKWELL and WALKER, 1986).

Atualmente é ampla a utilização de micro e nanoesferas de alginato associadas com proteínas, sendo que interações entre a albumina e alginato tem sido descritas (NEISER, et al, 1999; LEONARD, 2004).

3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA (HA)

A técnica de obtenção da hidroxiapatita se baseou na síntese química, por meio de uma solução transparente que deu origem a um precipitado, havendo controle de pH e temperatura da solução.

A síntese de HA foi realizada por meio da técnica da solução transparente, sendo inicialmente preparada uma mistura através de agitação magnética (agitador magnético – Quimis, São Paulo, Brasil), de uma suspensão de 0,5M hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) (Merk-Darmstadt, Alemanha), 1M ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,3M ácido orto fosfórico (H_3PO_4) (Merk-Darmstadt, Alemanha).

O ácido fosfórico foi adicionado por último à mistura das outras duas soluções, lentamente por gotejamento, a uma taxa de 8 ml/min, no intuito da obtenção final de um pó monocristalino.

Terminada a mistura, adicionou-se uma solução de 1M hidróxido de potássio (KOH), para o pH ser ajustado até 12, sendo o precipitado resultante envelhecido por 24 horas.

Após, a solução foi filtrada utilizando papel filtro acoplado a uma peneira sendo realizada pressão negativa por meio de um sistema de bomba vácuo (Edwards, Neuberger, Alemanha). Foram realizadas diversas lavagens da solução, por meio da adição de água bi destilada, com o objetivo de remover o KOH e neutralizar o pH da solução.

O pó foi liofilizado (Freezone 1- Labconco, USA) por 48 horas no Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Em seguida o pó passou por um processo de maceração e peneiramento, com o objetivo de reduzir e nivelar o tamanho dos grânulos utilizados no processo.

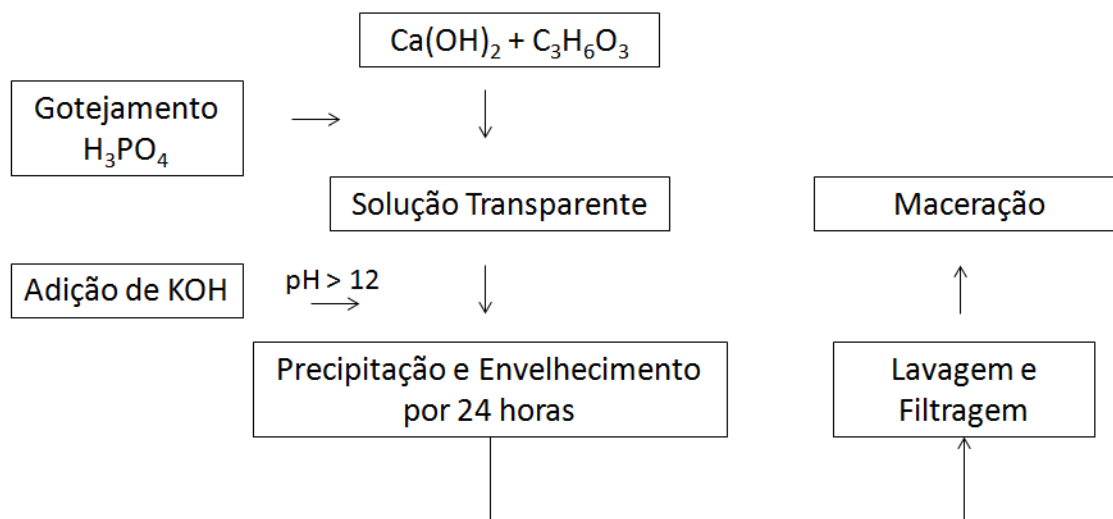


FIG. 3.1: Fluxograma para síntese da hidroxiapatita.

3.2 PRODUÇÃO DE ESFERAS DE HIDROXIAPATITA

Inicialmente foi preparada uma solução de alginato de sódio 1% (Fluka, Rio de Janeiro, Brasil), utilizando água ultrapura, sendo realizada a mistura de 0,1g de alginato em 10 ml de água. Para incorporação total do alginato de sódio à água, foi realizado o aquecimento (aquecedor – Quimis, São Paulo, Brasil) e mistura com bastão de vidro vigorosamente até formação de um gel sem a presença de partículas espessas.

Em seguida, a hidroxiapatita foi pesada mantendo-se uma proporção de 1:15 de alginato para hidroxiapatita. Após a adição da HA à solução de alginato, foi realizada mistura com bastão de vidro durante cinco minutos e aquecimento até incorporação completa das biocerâmicas na solução.

Em seguida, foi feita a aspiração da solução utilizando-se uma seringa descartável de 10 ml (BD Plastipak) com agulha de 0,7mm de diâmetro (BD Precisionglide) e o gotejamento parte em solução 0.3M nitrato de zinco (Vetec, Rio de Janeiro) e outra parte em solução 1.5M cloreto de cálcio (Vetec, Rio de Janeiro), havendo a formação de esferas em ambas as soluções devido às

trocas iônicas.

Quando em contato com a solução de nitrato de zinco e cloreto de cálcio, o alginato de sódio reticulou-se devido a troca iônica do sódio com o zinco e com o cálcio, havendo a formação de esferas de alginato de zinco com HA, e alginato de cálcio com HA respectivamente. As esferas permaneceram durante 24 horas nas soluções, a fim de permitir as trocas iônicas durante este período.

Após este período, as esferas foram removidas da solução, lavadas três vezes com água ultrapura, colocadas dentro da capela sobre um papel filtro onde permaneceram durante 24 horas até a completa secagem. Durante a próxima etapa, as esferas foram colocadas em cadinhos de zircônia distintos e levadas ao forno onde foram sinterizadas parte a 900°C e outra parte a 1250°C. A programação da taxa de aquecimento do forno foi de 0.5°C/min de 0° a 550°C, permanecendo 1 hora em 550°C para completa eliminação do alginato, 5°C/min de 550° a 900°C ou 1250°C, permanecendo 1 hora na temperatura final e depois resfriadas numa taxa de 4°C/min até a temperatura ambiente.

3.3 ADSORÇÃO DA CLOREXIDINA

Foi preparada inicialmente uma solução de digluconato de clorexidina 2% (Sigma-Aldrich, São Paulo), para o processo de adsorção do antimicrobiano. Foi realizada a pesagem de 50 mg das esferas de cada amostra. As esferas foram colocadas em microtubos separados, com 1 ml da solução de digluconato de clorexidina 2% cada, sendo em seguida colocados em um shaker sob temperatura ambiente, onde permaneceram durante 24 horas.

Após este período, 0,6 mL do líquido sobrenadante foi removido de cada amostra e vertido em novos microtubos. O líquido sobrenadante removido foi centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos, com o objetivo de separar as partículas de biocerâmica que poderiam ter se soltado das esferas, da solução de clorexidina.

Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de cada amostra centrifugada foram retiradas e diluídas 300 vezes em 30mL de água ultrapura. O objetivo da diluição foi ajustar a intensidade do sinal da clorexidina para leitura no UV, uma vez que a clorexidina apresenta sinal de detecção muito intenso no UV.

As esferas remanescentes foram removidas da solução de clorexidina, lavadas 3 vezes com água ultrapura, secas em estufa e armazenadas na temperatura de 15 °C, com o objetivo de manter a estabilidade do agente antimicrobiano.

3.4 DESSORÇÃO DA CLOREXIDINA

Foram adicionados 1 mL de água ultrapura às esferas armazenadas, sob temperatura de 15 °C. Em seguida, as esferas foram colocadas no agitador sob agitação de 50 rpm, durante 1 hora. Após esse período foi realizada centrifugação a 14.000 rpm durante 10 minutos, com o objetivo de separar as partículas de biocerâmica que poderiam ter se soltado das esferas. Foi removida uma alíquota de 50 µL de cada amostra e transferida para um novo microtubo, onde foram diluídas 30 vezes em água ultra pura. Após este processo, foi realizada a leitura das amostras diluídas no UV.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

3.5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das bioesferas de HA tratadas termicamente foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura (MEV) – FEG FEI Quanta 250. As amostras foram recobertas com ouro, depositado por um metalizador Emitech K550X sob corrente de 50 mA durante 2 minutos.

3.5.2 ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDS)

A identificação dos elementos químicos presentes nas esferas de HA tratadas termicamente foi realizada utilizando-se o equipamento de EDS - FEG FEI Quanta 250.

3.5.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A investigação das fases presentes nas amostras foi realizada no Laboratório de Difração de raios X do CBPF, em um difratômetro da marca PANalytical, modelo X'Pert PRO MPD. Foi utilizada fonte de cobre, corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV. A varredura foi realizada no intervalo $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$, com um passo de coleta de 1 segundo. Para a identificação dos difratogramas foi utilizado o programa X'Pert High Score Plus. Pelo refinamento de Rietveld das amostras, foi demonstrada a porcentagem das fases nas diferentes temperaturas.

3.5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais foi realizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR Prestige-21 Shimadzu) no CBPF. As amostras foram preparadas sob a forma de pastilhas transparentes com uma razão 1:100 para HA:KBr e os espectros foram obtidos na faixa de número de ondas entre 4000 e 400cm^{-1} e na resolução de 4cm^{-1} .

3.5.5 ESPECTROSCOPIA NO ULTRA VIOLETA (UV)

A determinação da concentração da solução de clorexidina antes e após o contato com as esferas de biocerâmica permitiu a quantificação do fármaco que foi absorvido pelas esferas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a caracterização da hidroxiapatita sintetizada, assim como a caracterização e comparação de 4 amostras de bioesferas produzidas e tratadas termicamente (Tab. 4.1).

TAB. 4.1: AMOSTRAS CARACTERIZADAS.

Descrição das Amostras	Biocerâmica	Solução de gotejamento	Temperatura
Esfera de HA no CaCl_2 a 900°C (HA_CaCl2_900)	Hidroxiapatita	Cloreto de Cálcio	900°C
Esfera de HA no Zn a 900°C (HA_Zn_900)	Hidroxiapatita	Nitrato de Zinco	900°C
Esfera de HA no CaCl_2 a 1250°C (HA_CaCl2_1250)	Hidroxiapatita	Cloreto de Cálcio	1250°C
Esfera de HA no Zn a 1250°C (HA_Zn_1250)	Hidroxiapatita	Nitrato de Zinco	1250°C

Fonte: Autor (2013).

4.1 ASPECTO FÍSICO E VISUAL

Foi observada uma maior retração das esferas de hidroxiapatita gotejadas em solução de nitrato de zinco do que as gotejadas em solução de cloreto de cálcio. Essa retração ocorreu imediatamente após o contato com a solução de nitrato de zinco e manteve-se após o tratamento térmico.

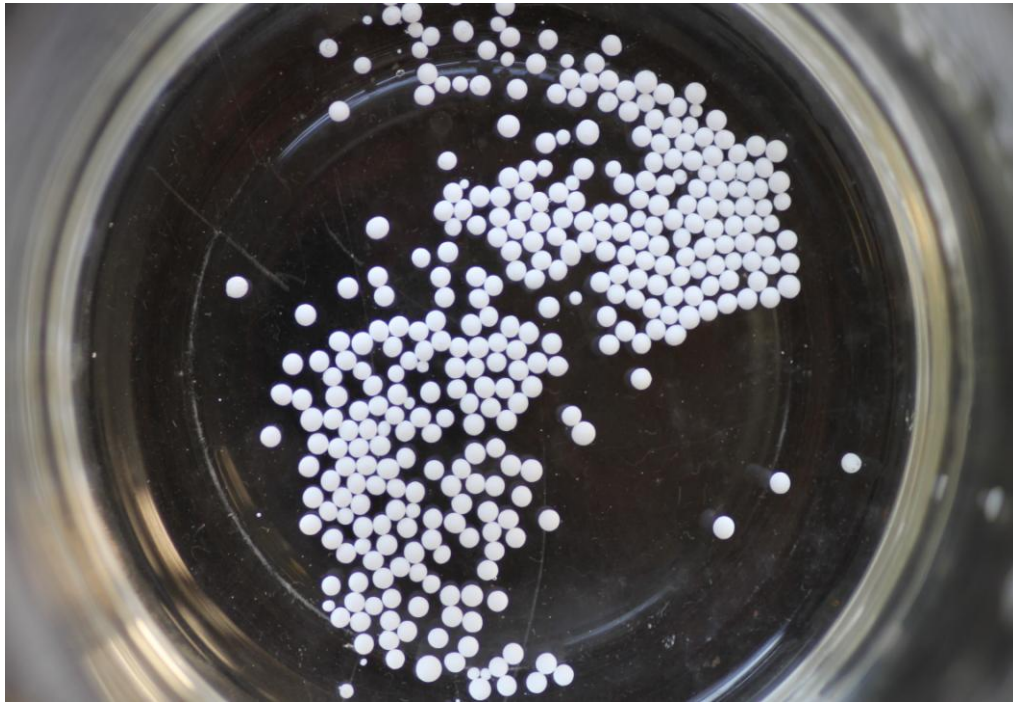


FIG. 4.1: Esferas de HA e alginato em solução de nitrato de zinco.

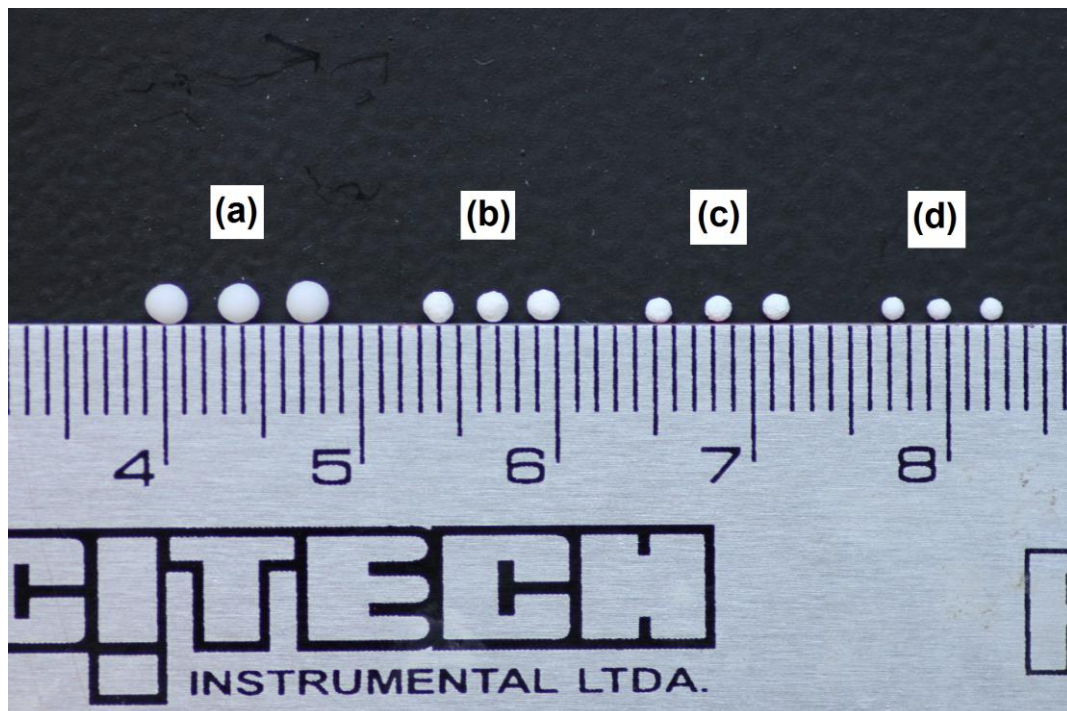


FIG. 4.2: Esferas de HA gotejadas em solução de cloreto de cálcio. (a) Esferas ainda úmidas, após 24 horas em contato com a solução. (b) Esferas secas após 24 horas na estufa. (c) Esferas calcinadas a 900°C. (d) Esferas sinterizadas a 1250°C.

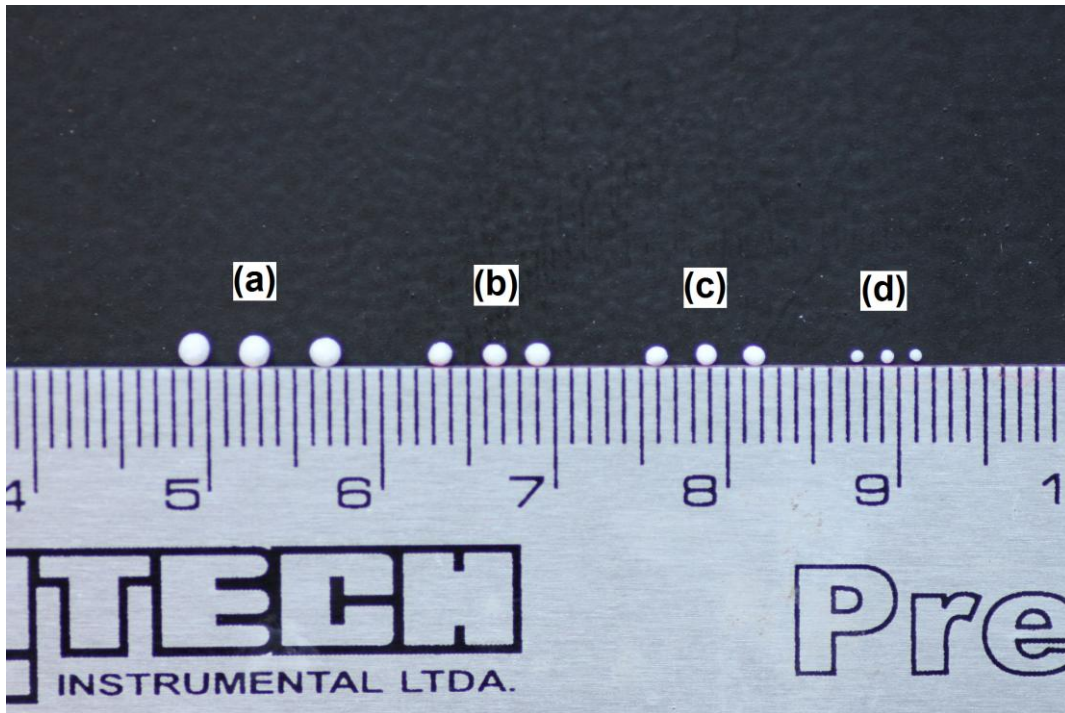


FIG. 4.3: Esferas de HA gotejadas em solução de nitrato de zinco. (a) Esferas ainda úmidas, após 24 horas em contato com a solução. (b) Esferas secas após 24 horas na estufa. (c) Esferas calcinadas a 900°C. (d) Esferas sinterizadas a 1250°C.

4.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV/EDS)

Durante o tratamento térmico, o aumento da temperatura determinou a retração das esferas. Esta característica pôde ser observada comparativamente a olho nu e por meio da microscopia eletrônica de varredura, realizando-se a medição das esferas em um aumento de 100 vezes (FIG. 4.4 a FIG. 4.7). Foram selecionadas 5 esferas de amostras gotejadas em solução 0,3M de cloreto de cálcio e 0,3M de nitrato de zinco, sendo cada esfera medida três vezes, utilizando-se o recurso de escala do MEV. As medições foram realizadas no MEV com as amostras secas, determinando o diâmetro inicial (D_o), e após tratadas termicamente, determinando o diâmetro final (D_f). Após as medições, calculou-se o diâmetro médio das esferas por meio de média aritmética simples, determinando o desvio padrão e a retração linear (TAB. 4.2).

TAB. 4.2: DIÂMETRO MÉDIO E DESVIO PADRÃO DAS BIOESFERAS ANTES E APÓS SEREM TRATADAS TÉRMICAMENTE.

	HA_CaCl2_900		HA_Zn_900		HA_CaCl2_1250		HA_Zn_1250	
	D _o	D _f	D _o	D _f	D _o	D _f	D _o	D _f
Média (mm)	1,44	1,22	1,20	1,13	1,53	0,97	1,21	0,68
Desvio Padrão (mm)	0,07	0,07	0,07	0,04	0,07	0,07	0,08	0,04
Retração Linear (%)	15,2%		5,8%		36,6%		43,8%	

Fonte: Autor (2013).

As esferas produzidas em solução de nitrato de zinco apresentaram um diâmetro inferior quando comparadas com as produzidas no cloreto de cálcio. Esta característica foi evidenciada imediatamente após o gotejamento na solução de nitrato de zinco. Devido o raio iônico do zinco (74 pm) ser menor do que o raio iônico do cálcio (100 pm), em um mesmo número de coordenação (WASASTJERNA, 1923), as esferas gotejadas em solução de nitrato de zinco, apresentam uma estrutura "egg box" de alginato de zinco mais compacta do que a estrutura criada pelo alginato de cálcio, já que o zinco ocupará um menor espaço quando comparado com o cálcio, permitindo uma maior aproximação da HA. Além disso, o zinco apresenta afinidade com os ácidos gulurônico e manurônico, enquanto que o cálcio se liga somente às cadeias de ácido gulurônico, o que também favorece a maior retração das esferas de alginato de zinco.

Com relação a retração linear, na temperatura de 900 °C, as esferas gotejadas em solução de cloreto de cálcio, apresentaram uma maior retração em relação às amostras gotejadas no nitrato de zinco. Este fato pode estar relacionado a energia despendida pela amostra HA_Zn_900 na transformação de fases, o que faz com que sobre pouca energia para retração. A 1250°C, a retração linear da HA_Zn_1250 supera a da HA_CaCl2_1250, devido a completa transformação de fase a 900°C, fazendo com que a energia seja utilizada na retração das esferas.

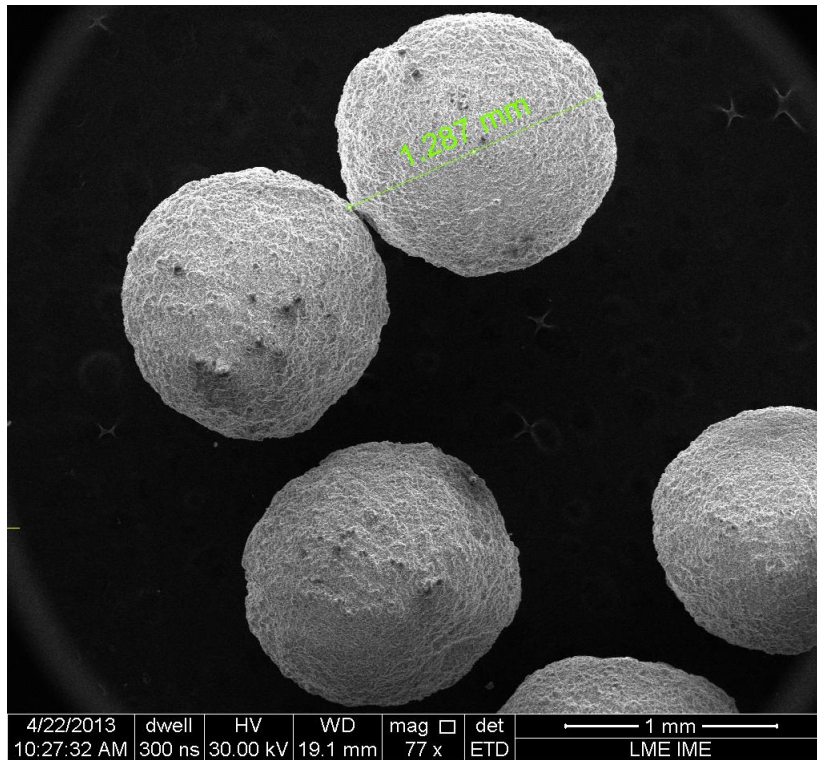


FIG. 4.4: Micrografia eletrônica (MEV) da HA_CaCl₂_900 em aumento de 100 vezes (77x).

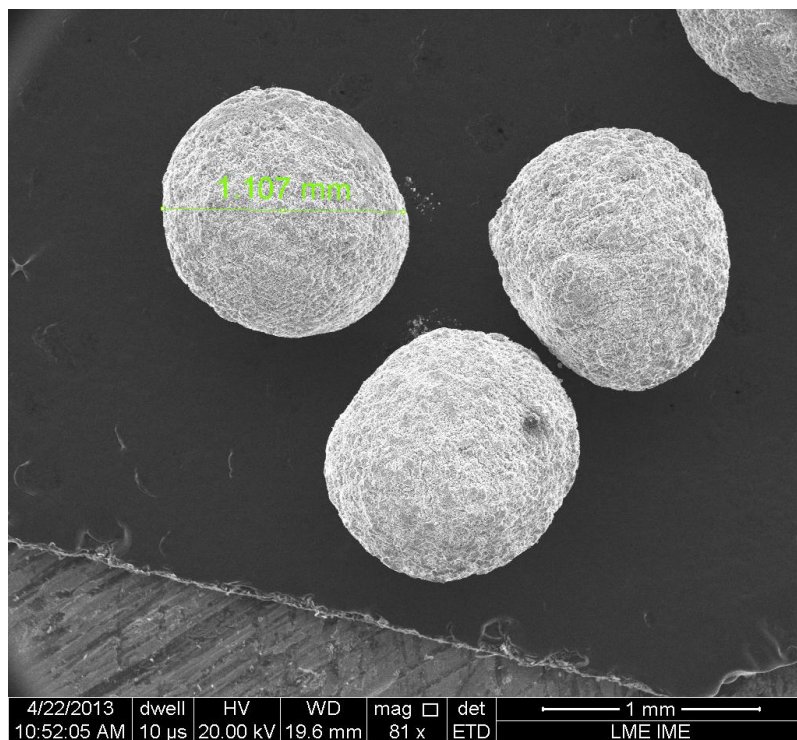


FIG. 4.5: Micrografia eletrônica da HA_Zn_900 (81x).

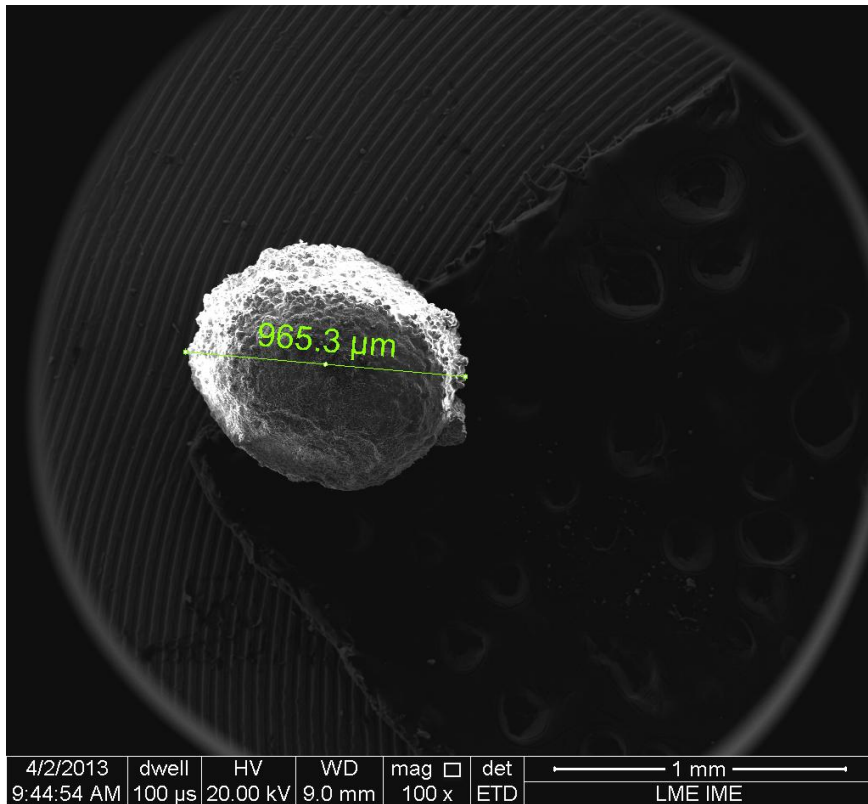


FIG. 4.6: Micrografia eletrônica da HA_CaCl₂_1250 (100x).

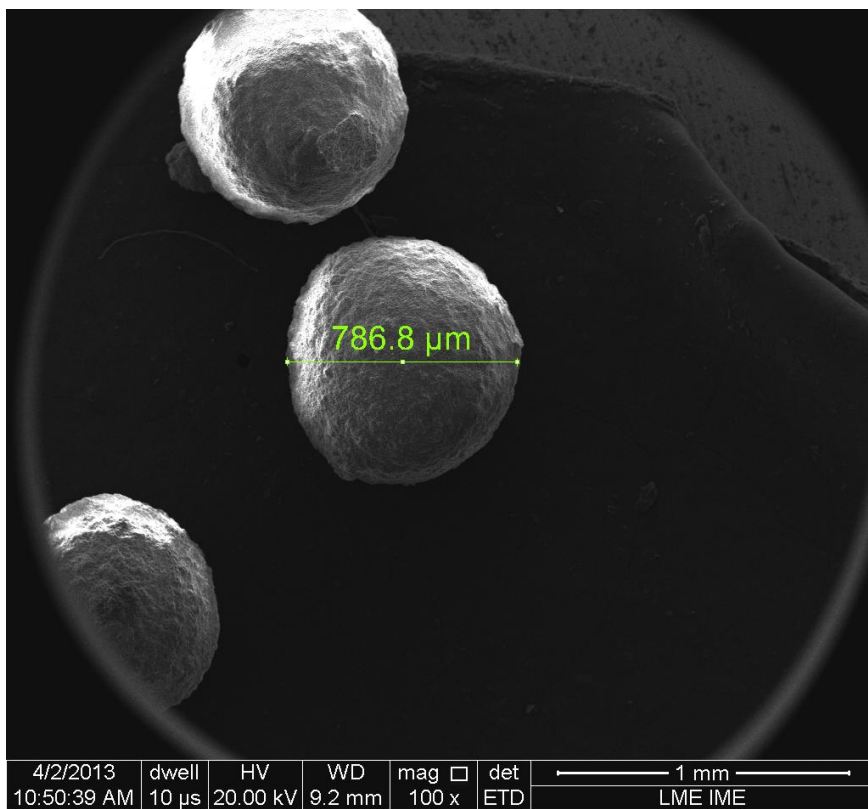


FIG. 4.7: Micrografia eletrônica da HA_Zn_1250 (100x).

Observando as amostras em MEV, foi possível determinar alguns fatores

decisivos na alteração da morfologia. Inicialmente, pode-se citar a influência do aumento da temperatura como fator determinante no processo de retração, aumento da cristalinidade e aumento do tamanho de grãos. Com isso, as amostras calcinadas a 900 °C (FIG. 4.8 e 4.9) apresentaram visualmente o aspecto de maior porosidade e maior quantidade de partículas, enquanto que as amostras sinterizadas a 1250 °C (FIG. 4.10 a 4.11) demonstraram um aspecto de maior densificação, apresentando um número menor de grãos e menor porosidade.

O íon zinco representa outro influenciador na morfologia das biocerâmicas. Devido ao fato de apresentar baixo raio iônico, este contribuiu para a maior aproximação das partículas cerâmicas (FIG. 4.9, 4.11 e 4.13), além de estimular a desestabilização da HA, favorecendo a formação de outras fases.

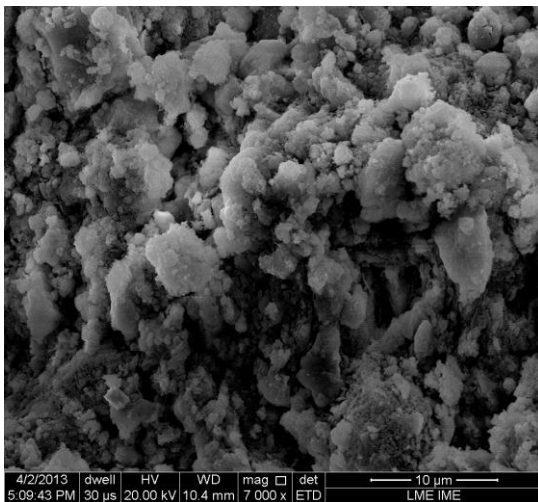


FIG. 4.8: MEV da HA_CaCl₂_900 (7000x).

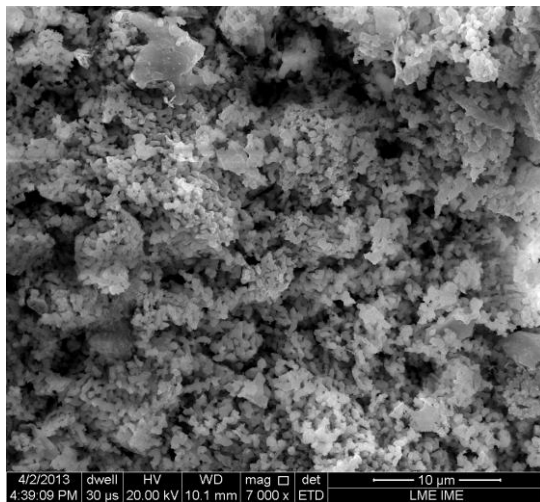


FIG. 4.9: MEV da HA_Zn_900 (7000x).

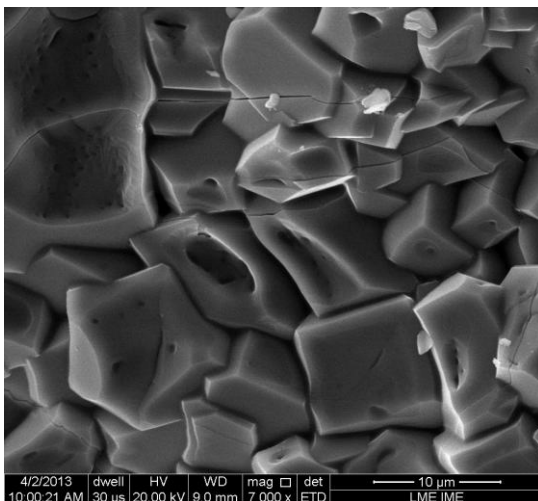


FIG. 4.10: MEV da HA_CaCl₂_1250 (7000x).

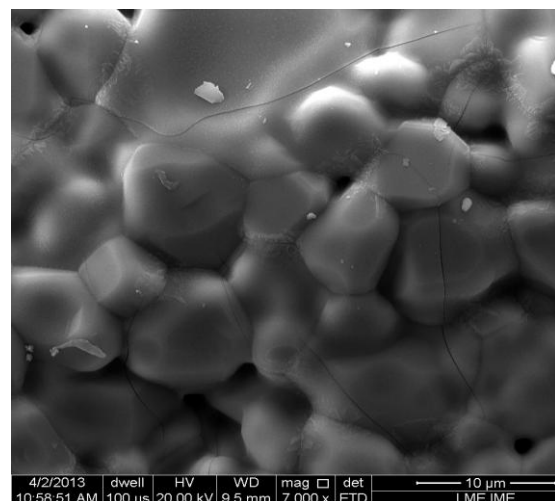


FIG. 4.11: MEV da HA_Zn_1250 (7000x).

Em um aumento de 20.000 vezes da HA_Zn_1250 foi possível observar a tendência de união dos grãos e a presença de uma estrutura diferenciada nas regiões de contornos de grãos, que são as áreas de mais alta energia (FIG. 4.12).

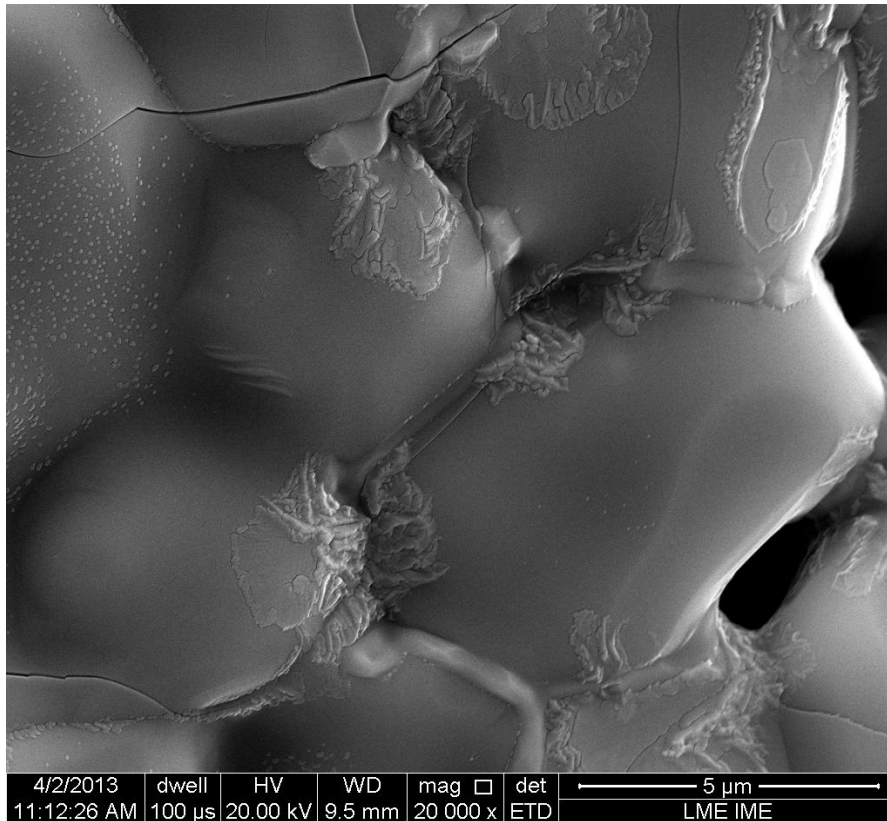


FIG. 4.12: MEV da HA_Zn_1250 (20.000x).

Com a análise dos resultados por EDS, pode-se observar a presença de quantidades significativas dos elementos cálcio e fósforo em todas as amostras analisadas (FIG. 4.13 a 4.17). Nas amostras gotejadas em solução de nitrato de zinco, tornou-se evidente a presença do elemento zinco (FIG. 4.14, 4.16 e 4.17).

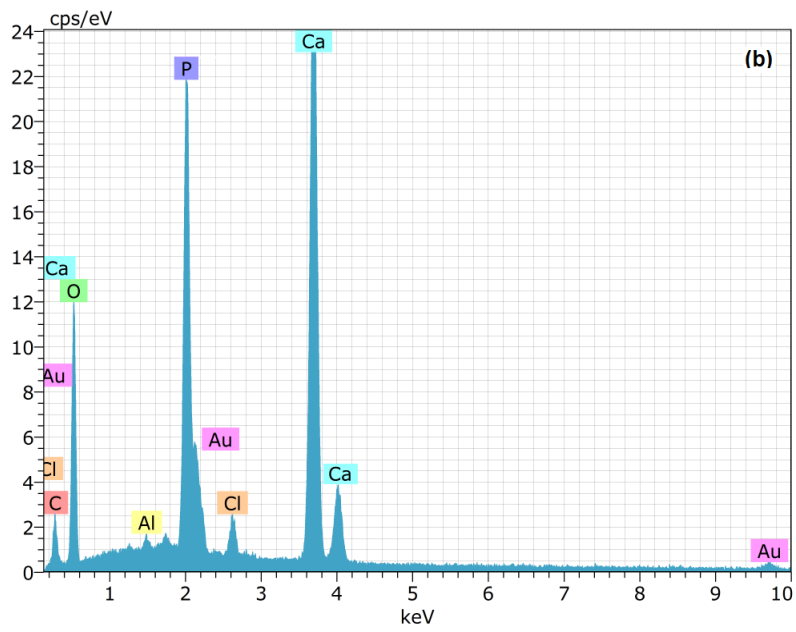
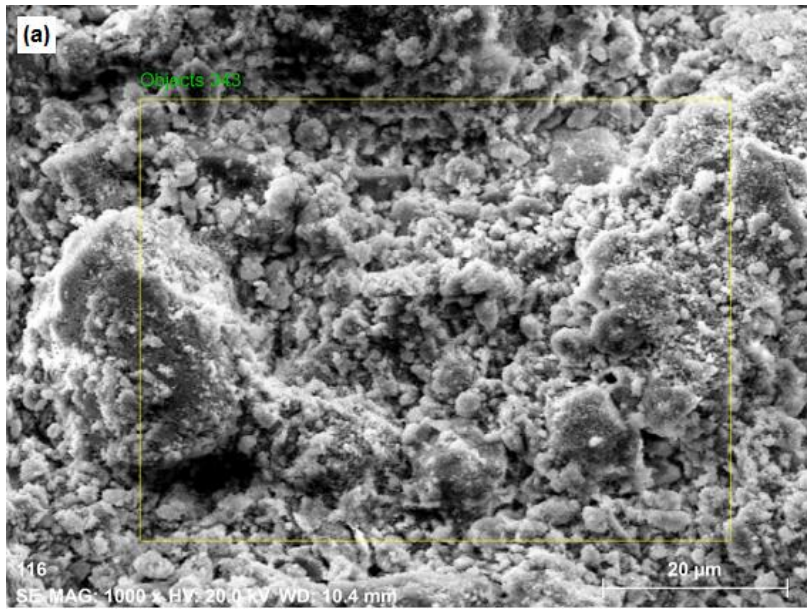


FIG.4.13: (a) MEV da região de análise por EDS da HA_CaCl₂_900. (b) EDS HA_CaCl₂_900.

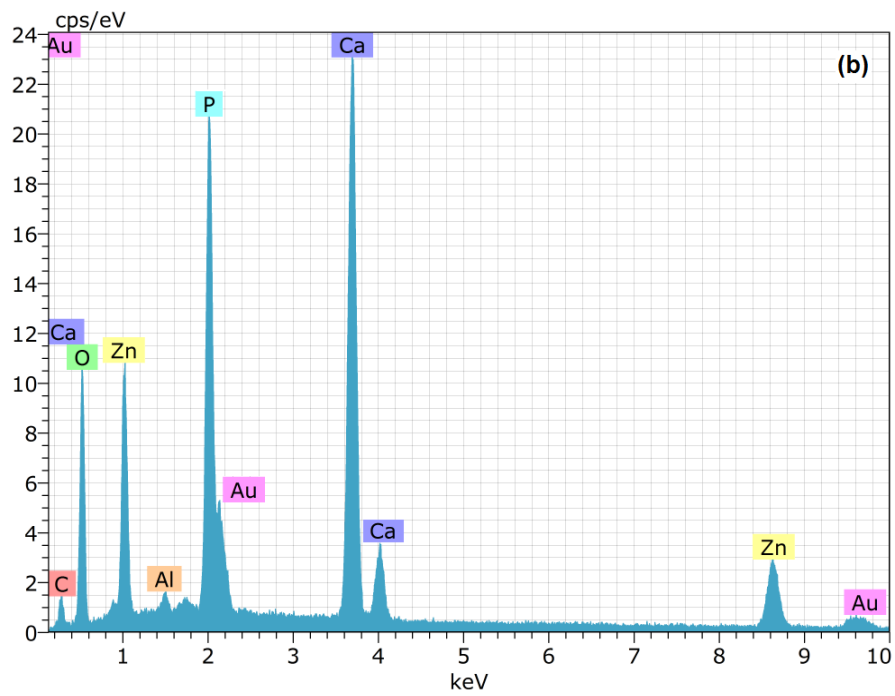
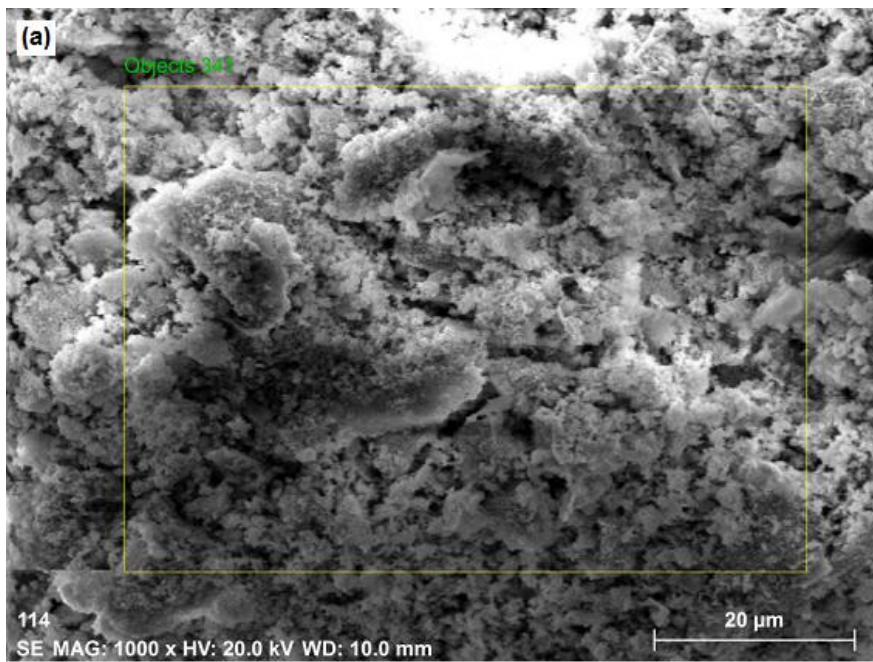


FIG.4.14: (a) MEV da região de análise por EDS da HA_Zn_900. (b) EDS HA_Zn_900.

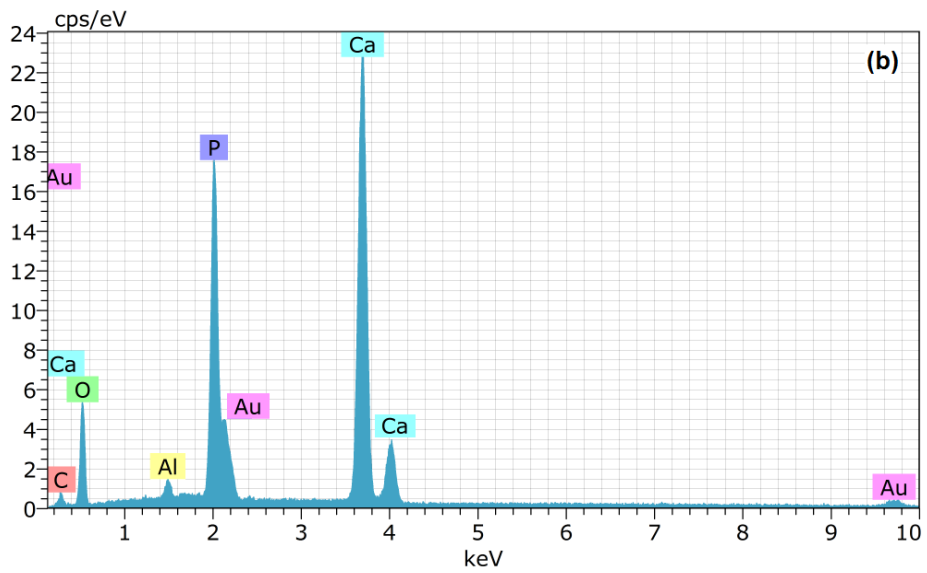
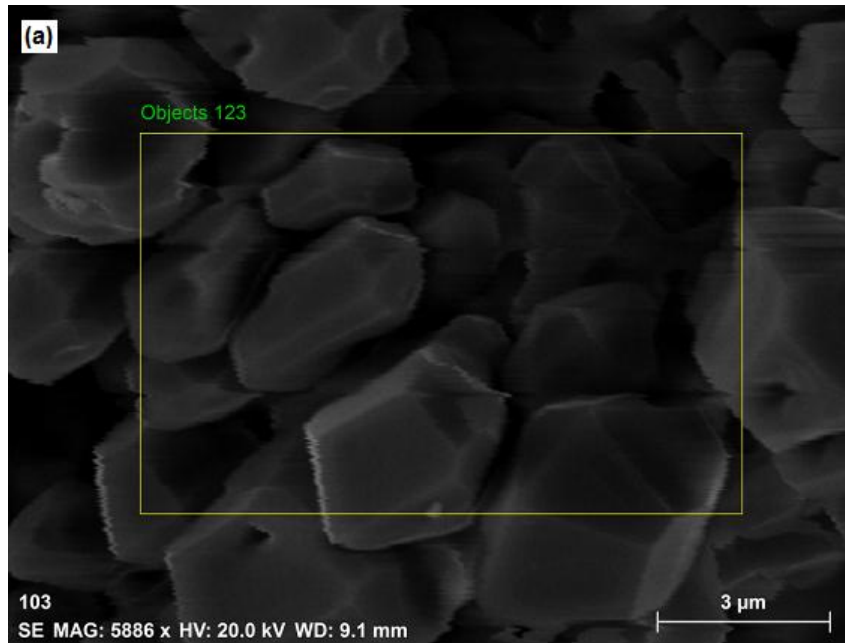


FIG.4.15: (a) MEV da região de análise por EDS da HA_CaCl₂_1250. (b) EDS HA_CaCl₂_1250.

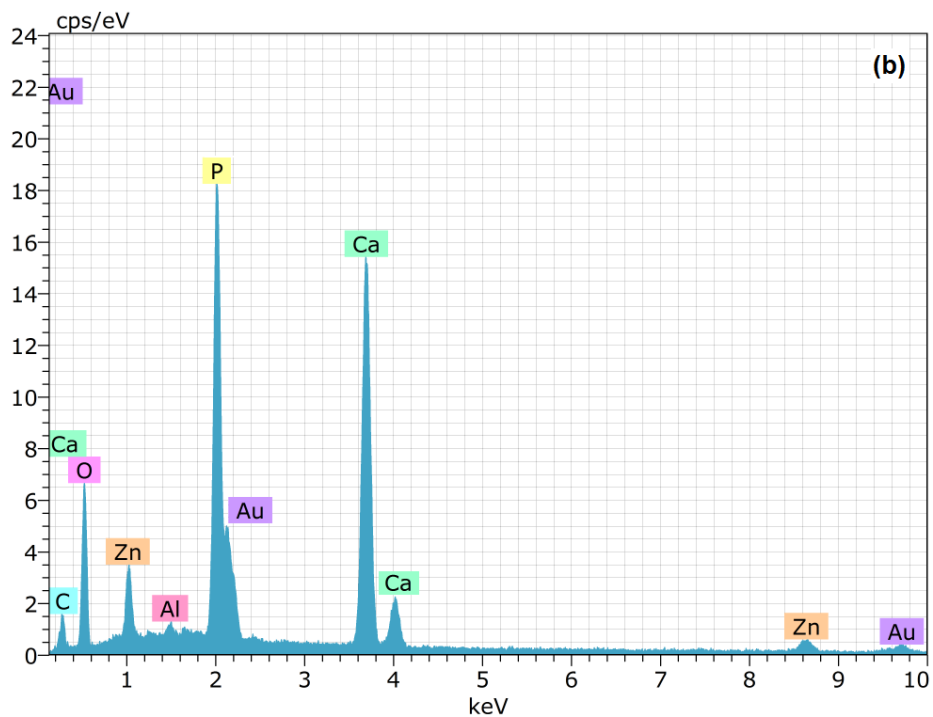
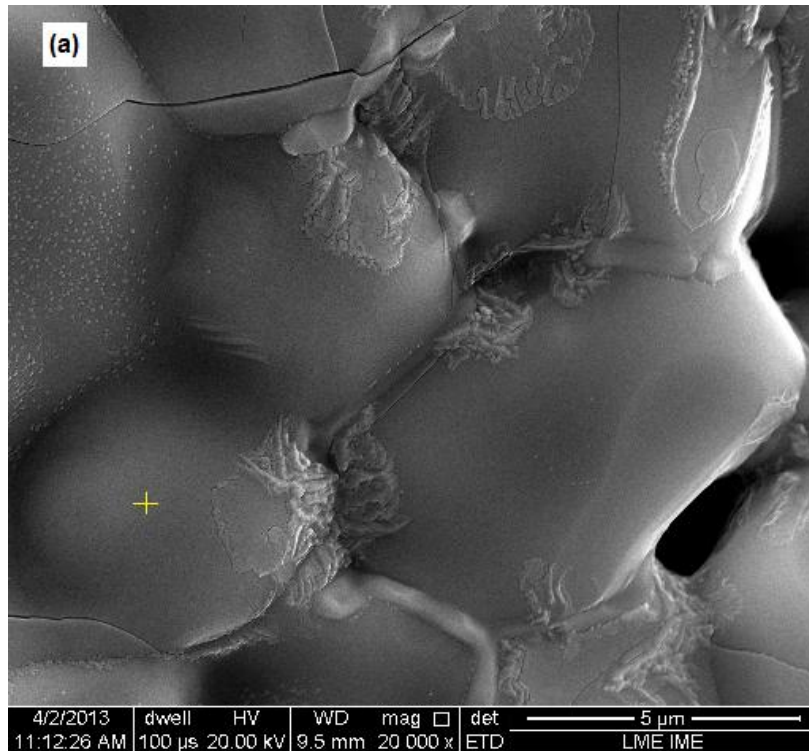


FIG.4.16: (a) MEV da região de análise por EDS da HA_Zn_1250. (b) EDS HA_Zn_1250.

Foi possível observar uma alta concentração de zinco em uma área de contorno de grão da amostra HA_Zn_1250, caracterizada possivelmente pela presença do fase óxido de zinco. Isto ocorre pois as regiões de contornos de grãos são repletas de defeitos cristalinos, como lacunas e discordâncias,

fazendo com que se tornem áreas de alta energia.

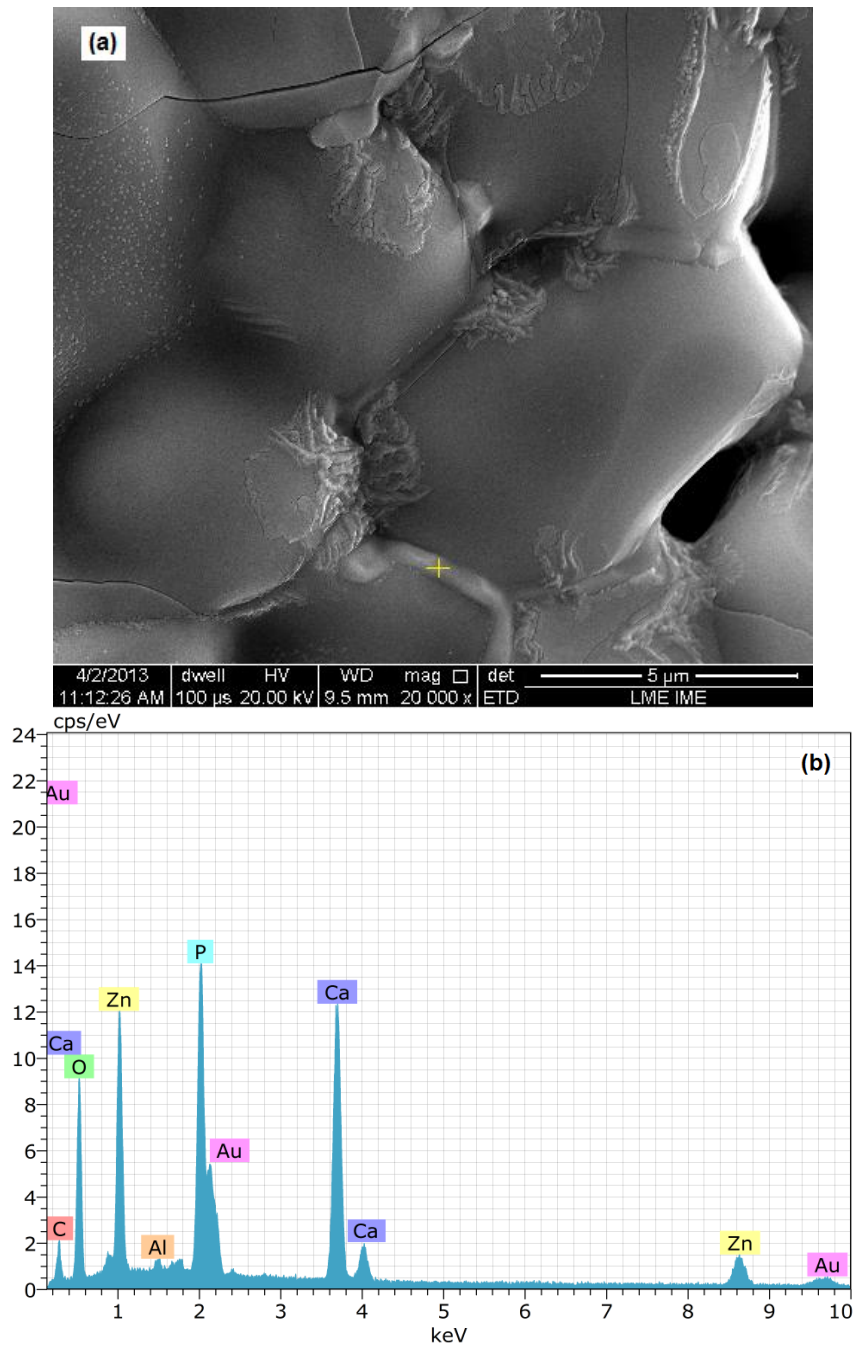


FIG.4.17: (a) MEV do ponto de análise por EDS da HA_Zn_1250. (b) EDS HA_Zn_1250.

4.3 ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Inicialmente, foi realizada a análise por difração de raios X da HA corpo verde, que identificou a presença de picos pouco definidos e com bandas alargadas, característico de uma hidroxiapatita pouco cristalina. A fase HA presente nesta amostra foi coincidente com a hidroxiapatita (FIG. 4.18).

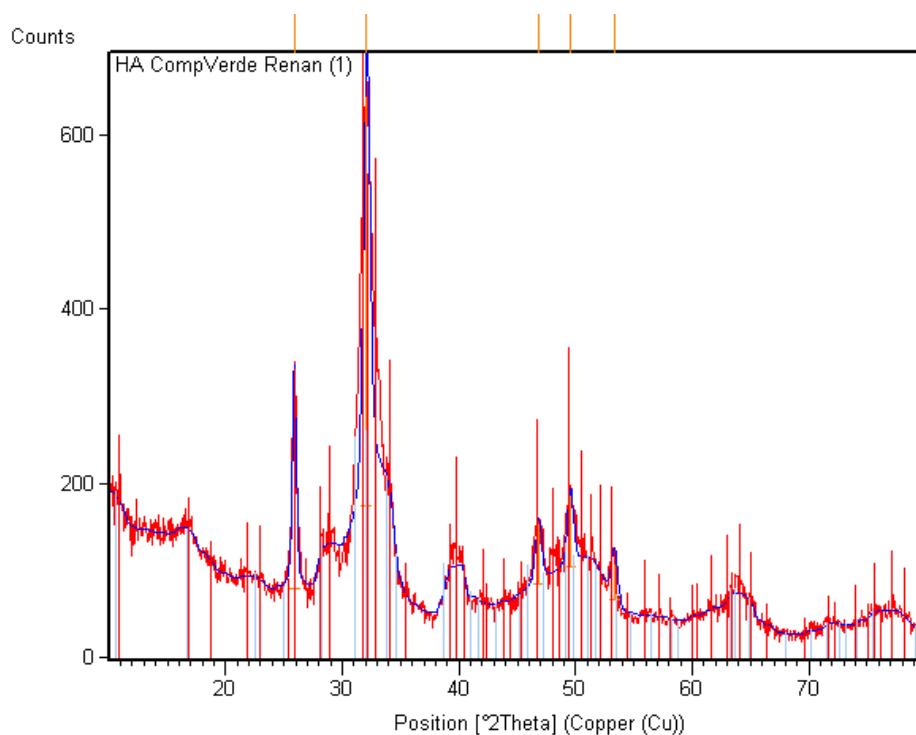


FIG.4.18: Difratoograma de raios X com a presença da fase hidroxiapatita na amostra de HA corpo verde

Após a produção e análise por DRX da amostra HA_CaCl₂_900, observou-se uma maior cristalinidade quando comparado com a amostra de HA corpo verde, caracterizada por picos mais bem definidos (FIG. 4.19 E 4.20). O refinamento pelo método de Rietveld indicou a porcentagem das fases nas diferentes temperaturas. Observou-se 100% da fase hidroxiapatita presente na amostra.

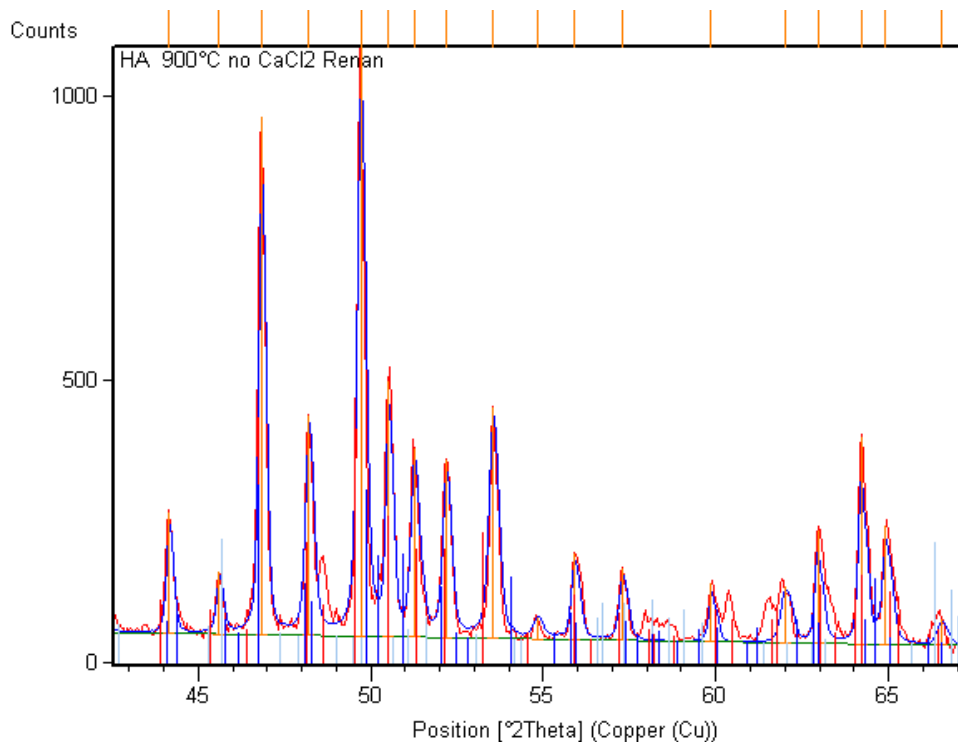


FIG.4.19: Difratoograma de raios X com a presença da fase hidroxiapatita na amostra HA_CaCl₂_900.

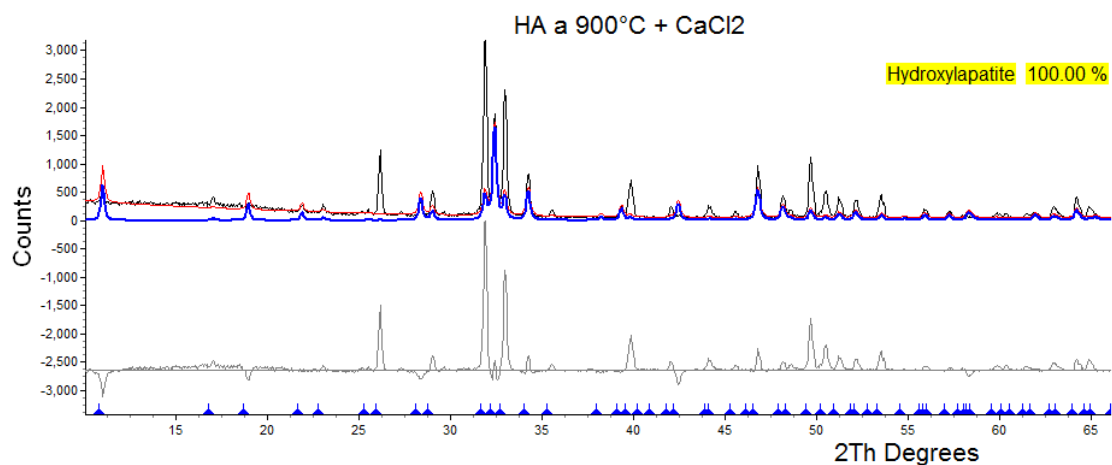


FIG.4.20: Difratoograma de raios X com a presença de 100% fase hidroxiapatita no refinamento da HA_CaCl₂_900.

A HA_Zn_900 apresentou as fases Witlockita (β -TCP), e zinicita (óxido de zinco) FIG. 4.21. A presença do zinco estabiliza a fase β -TCP, uma vez que este elemento altera a estrutura da HA favorecendo sua decomposição. O excesso de zinco presente na amostra pode favorecer também a formação de óxido de zinco (FIG. 4.23).

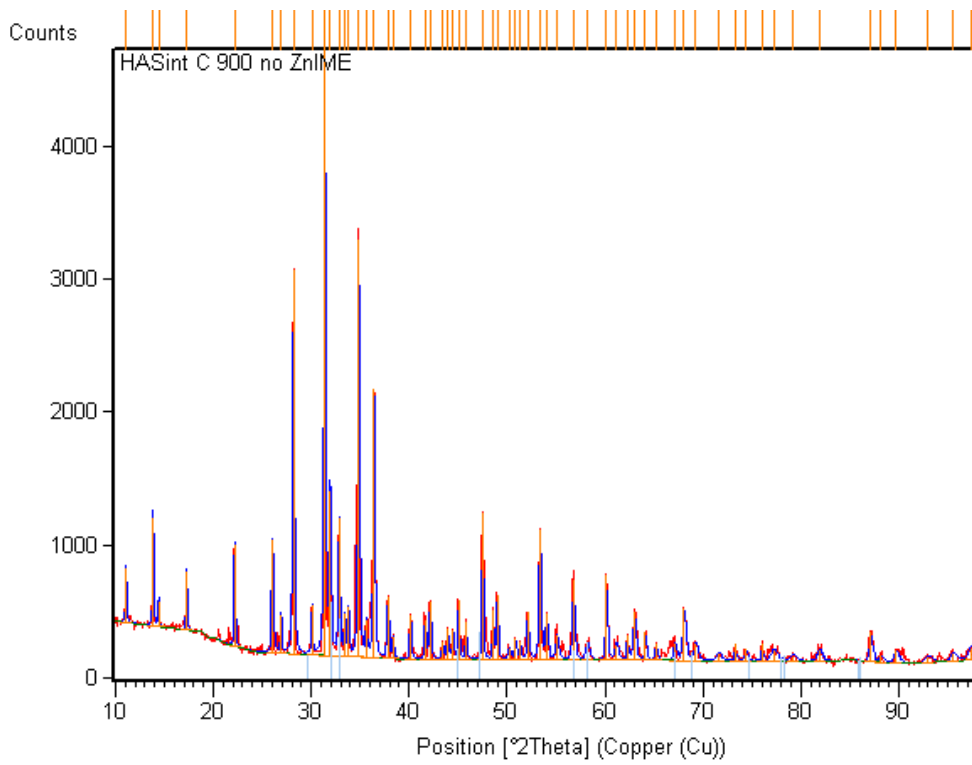


FIG.4.21: Difratoograma HA_Zn_900.

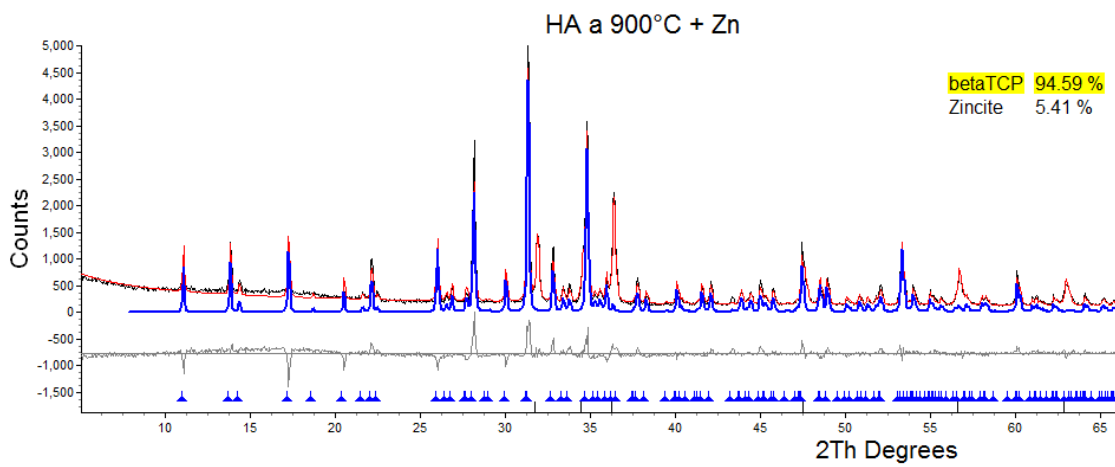


FIG.4.22: Difratoograma de raios X com a presença da fase Beta TCP no refinamento da HA_Zn_900.

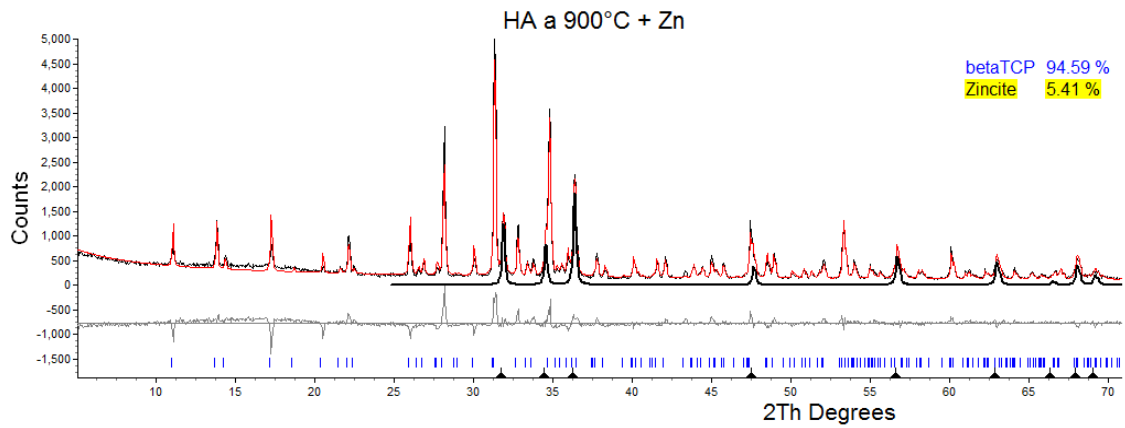


FIG.4.23: Difratoograma de raios X com a presença da fase Zincita (ZnO) no refinamento da HA_Zn_900.

A amostra HA_CaCl₂_1250 apresentou a formação somente da fase hidroxiapatita. (FIG. 4.24 e 4.25).

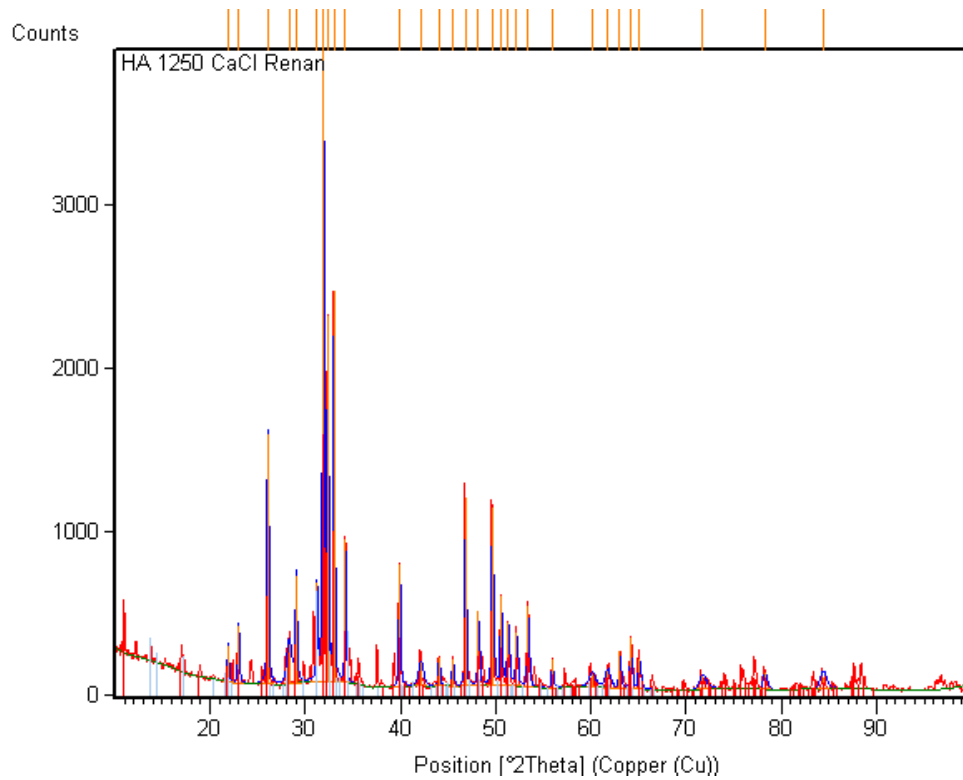


FIG. 4.24: Difratoograma de raios x da HA_CaCl₂_1250 evidenciando a presença da fase hidroxiapatita.

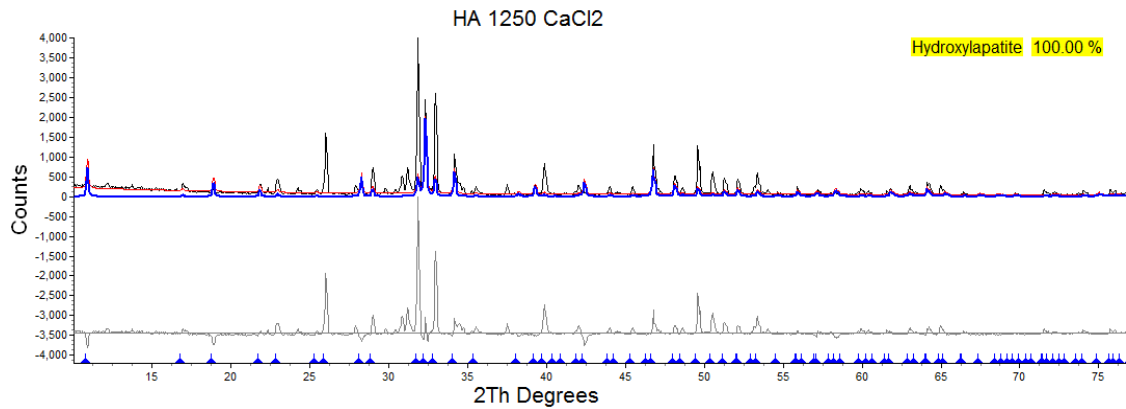


FIG. 4.25: Difratoograma de raios X com a presença da HA no refinamento da amostra HA_CaCl₂_1250.

As bioesferas com hidroxiapatita e zinco sinterizadas a 1250°C apresentaram a formação da fase Beta TCP, decorrente da substituição do zinco na hidroxiapatita. O excesso de zinco proporcionou a formação da fase zincita que corresponde ao óxido de zinco (FIG. 4.26, 4.27 E 4.28).

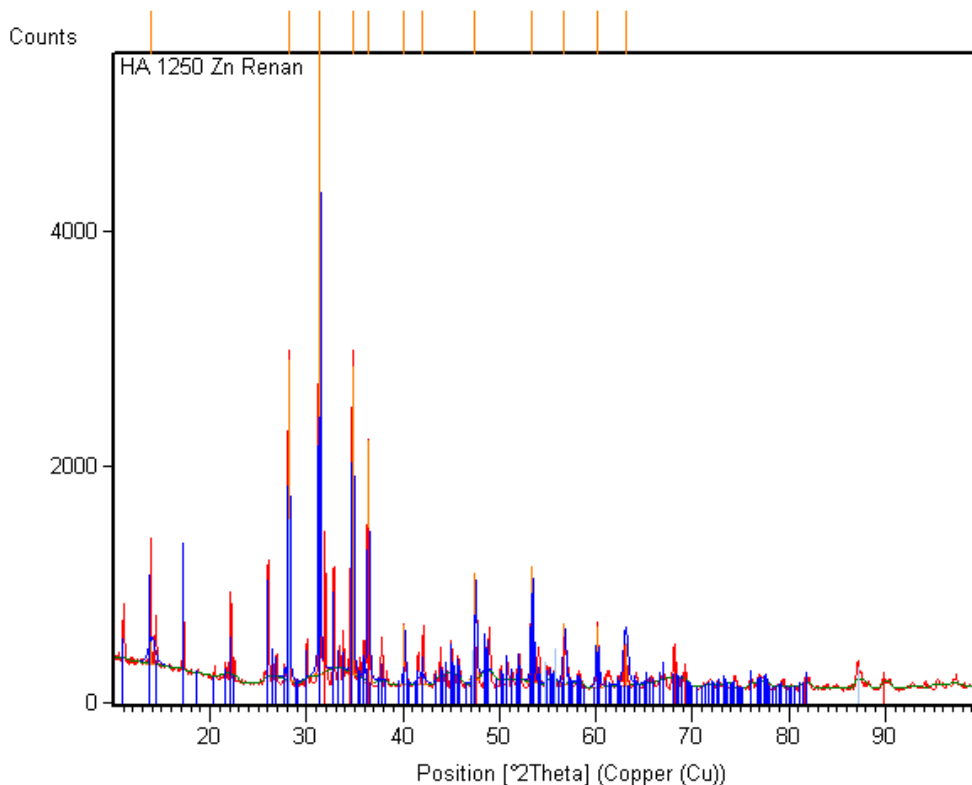


FIG.4.26: Difratoograma de raios x da amostra de HA gotejada em solução de nitrato de zinco e sinterizada a 1250°C.

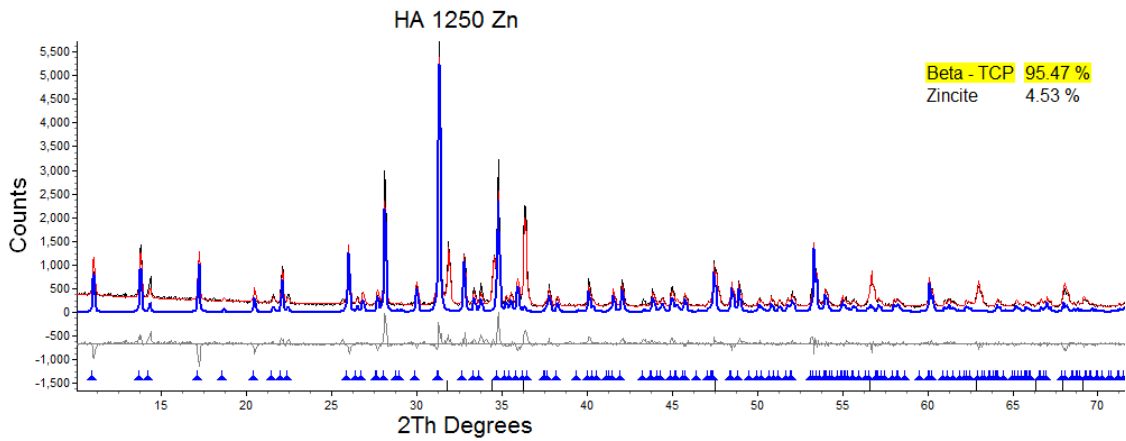


FIG.4.27: Difratoograma de raios X com a presença da fase Beta TCP no refinamento da amostra de HA gotejada em solução de nitrato de zinco e calcinada a 1250°C.

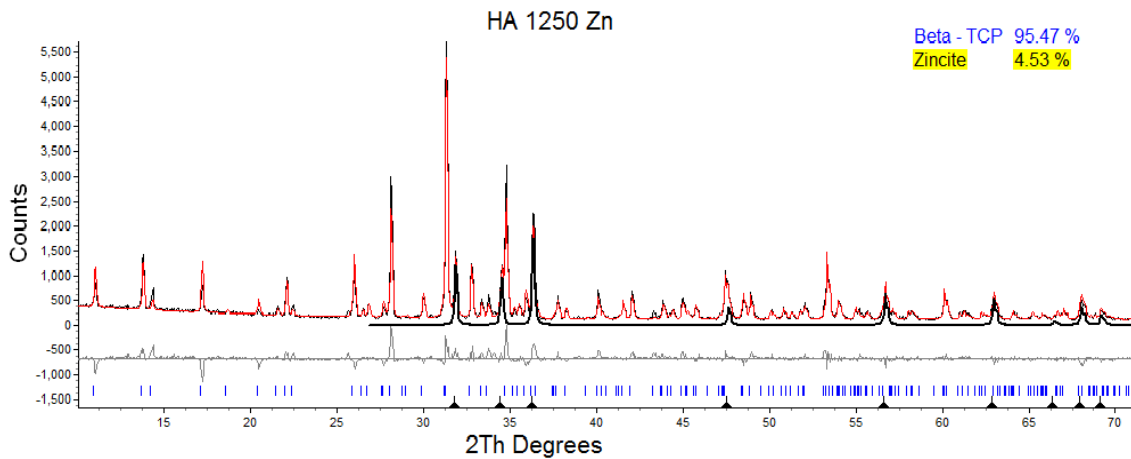


FIG.4.28: Difratoograma de raios X com a presença da fase Zincita (ZnO) no refinamento da amostra de HA gotejada em solução de nitrato de zinco e calcinada a 1250°C.

TAB. 4.3: DETERMINAÇÃO DAS FASES PRESENTES NAS AMOSTRAS ANALISADAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X.

Amostras	Fases Presentes
HA_CaCl ₂ _900	Hidroxiapatita
HA_Zn_900	Beta TCP, ZnO
HA_CaCl ₂ _1250	Hidroxiapatita
HA_Zn_1250	Beta TCP, ZnO

Fonte: Autor (2013).

4.4 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise por espectroscopia de infravermelho revelou a presença de bandas características da hidroxiapatita com a presença de grupos funcionais fosfatos, hidroxilas e carbonato na estrutura da HA (FIG. 4.29).

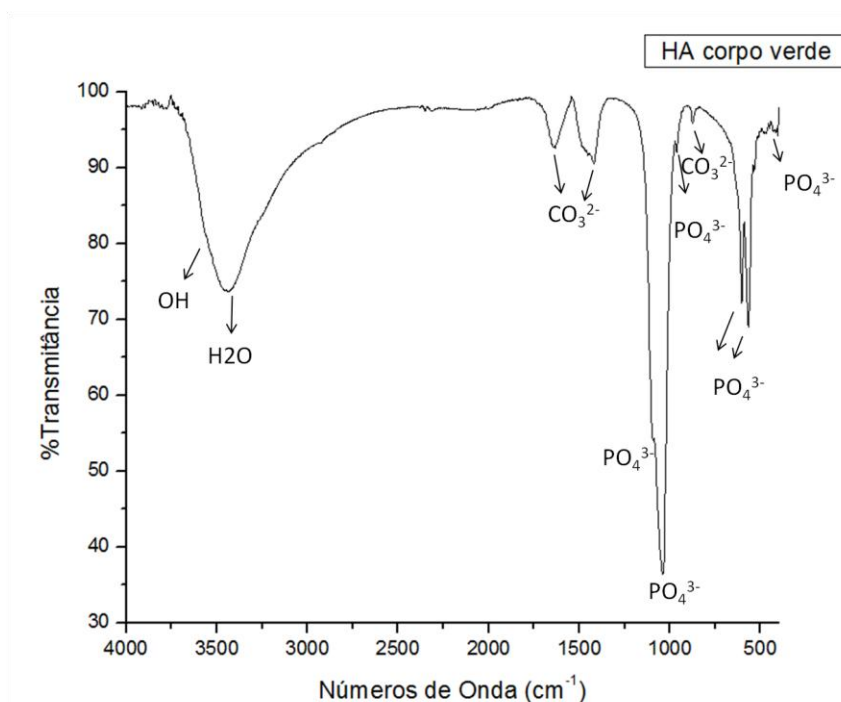


FIG. 4.29: Análise por FTIR da amostra de HA corpo verde, demonstrando os grupos funcionais característicos da hidroxiapatita.

Após o tratamento térmico das amostras, observou-se que as bandas presentes tornaram-se mais intensas e bem definidas, devido ao aumento da ordem estrutural e cristalinidade do material.

A ausência do grupo funcional OH na amostra gotejada no zinco ocorre devido à ausência de hidroxiapatita e a presença da fase beta-TCP, que não contém hidroxila na sua estrutura (FIG.4.31).

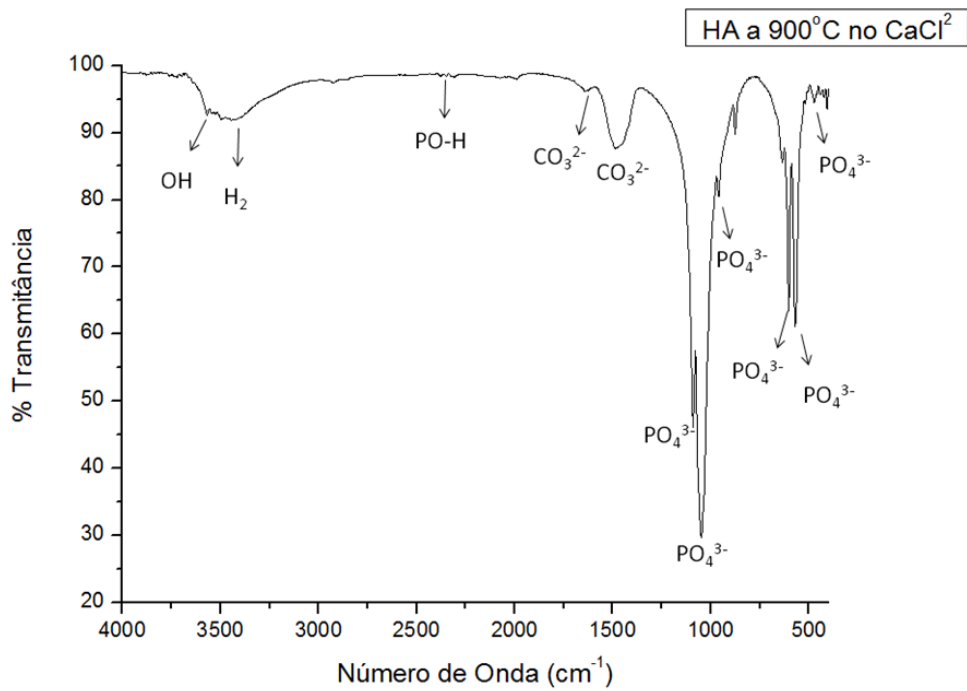


FIG. 4.30: Análise por FTIR da amostra de HA_CaCl₂_900.

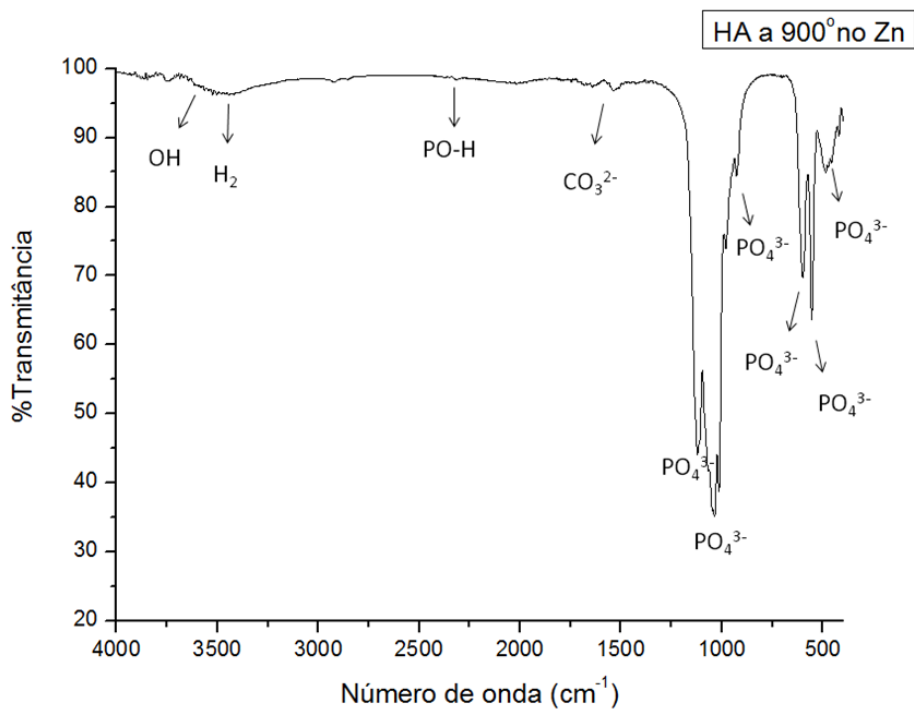


FIG. 4.31: Análise por FTIR da amostra de HA_Zn_900.

4.5 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA

Foi realizada a espectroscopia de ultravioleta da solução de clorexidina 2% antes do contato com as bioesferas, com objetivo de definir o comprimento de onda mais intenso característico da clorexidina e desenvolver uma curva padrão para o fármaco.

O comprimento de onda de 254 nm foi utilizado para quantificar a concentração do fármaco antes e após o contato com as bioesferas (FIG. 4.32). Devido a forte interação da clorexidina com o ultravioleta, fazendo com que o fármaco apresente uma alta absorbância, as soluções foram diluídas 1000 vezes para confecção da curva padrão e para a análise de adsorção as soluções foram diluídas 300 vezes (300 x).

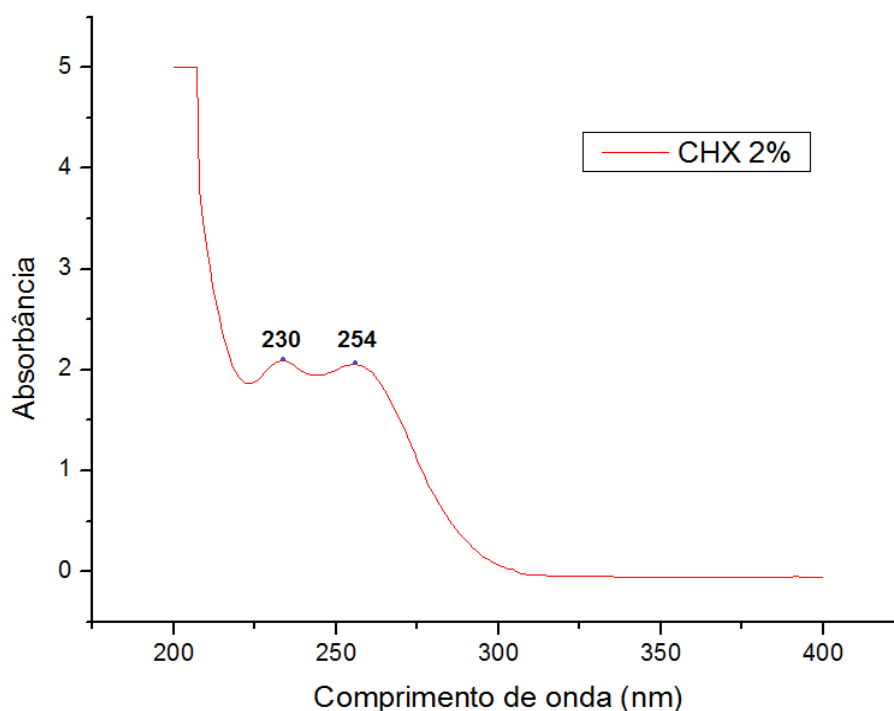


FIG.4.32: Espectro UV da solução de digluconato de clorexidina 2% diluída 300 vezes mostrando duas bandas com máximos em 230 nm e 254 nm.

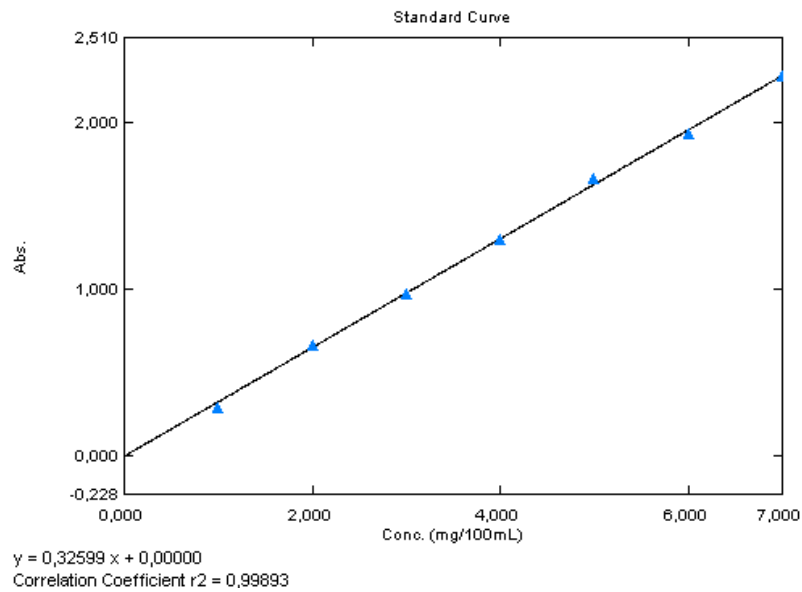


FIG 4.33: Curva padrão da solução de digluconato de clorexidina diluída 1000 vezes.

As amostras HA_CaCl₂_900 e HA_CaCl₂_1250 que formaram hidroxiapatita após o processo de tratamento térmico, foram as que apresentaram maior adsorção da clorexidina. Por outro lado, as amostras gotejadas em solução de nitrato de zinco, que formaram as fases beta-TCP e óxido de zinco, apresentaram menor adsorção da clorexidina. Outro fator determinante na adsorção do fármaco foi a temperatura de tratamento térmico. Comparando-se amostras gotejadas em uma mesma solução, quanto maior a temperatura de tratamento, maior a densificação das bioesferas, sendo menor a adsorção. A quantificação do fármaco após o contato com as bioesferas está descrito na tabela 4.4.

TAB. 4.4: QUANTIFICAÇÃO NO UV DA SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA 2% ANTES E APÓS 24 HORAS EM CONTATO COM AS BIOESFERAS.

Amostras (300 x diluídas)	Concentração de leitura (%)	Concentração real de CHX(%)	Absorção pelas Esferas (%)
Solução CHX 2%	6,56	1,968	
Solução CHX + HA_CaCl ₂ _900	2,737	0,821	58%
Solução CHX + HA_Zn_900	6,033	1,809	8%
Solução CHX + HA_CaCl ₂ _1250	4,41	1,323	33%
Solução CHX + HA_Zn_1250	6,282	1,884	4%

Fonte: Autor (2013).

Foi quantificada a liberação do fármaco pelas bioesferas após o período de 1 hora em contato com água ultrapura (TAB. 4.5). Observou-se que as esferas HA_CaCl₂_900 e HA_CaCl₂_1250 que mais adsorveram o fármaco, foram as que mais desorveram durante este período de tempo.

TAB. 4.5: QUANTIFICAÇÃO NO UV DA CLOREXIDINA DESSORVIDA PELAS BIOESFERAS APÓS 1 HORA.

Amostras (30 x diluídas)	Concentração de leitura (%)	Concentração real (%)
CHX + HA_CaCl ₂ _900	0,699	0,02097
CHX + HA_Zn_900	0,245	0,00735
CHX + HA_CaCl ₂ _1250	0,557	0,01671
CHX + HA_Zn_1250	0,018	0,00054

Fonte: Autor (2013).

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos foi possível observar que o zinco induz a formação da fase beta-TCP após tratamento térmico, o que é favorável, segundo a literatura, a um tempo de reabsorção de biocerâmica mais rápido quando comparado com esferas de HA, devido à maior taxa de reabsorção do beta-TCP quando comparado à HA sinterizada.

O zinco induziu a formação de bioesferas de menor diâmetro, uma vez que seu raio atômico é menor quando comparado ao do cálcio. Além do raio atômico menor do que o do cálcio, o zinco apresenta afinidade com os ácidos gulurônico e manurônico, enquanto que o cálcio se liga somente às cadeias de ácido gulurônico, o que favorece a maior retração das esferas de alginato de zinco.

A clorexidina apresentou adsorção e dessorção maior pelas esferas gotejadas em solução de cloreto de cálcio. Este fato pode estar relacionado a menor retração destas esferas quando comparadas com as gotejadas em solução de nitrato de zinco.

Os objetivos propostos foram alcançados com êxito durante a realização deste trabalho, através do desenvolvimento de um material biocerâmico com capacidade de liberar o agente microbiano clorexidina.

6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Para futuros trabalhos sugere-se:

- Análise por BET determinando a área superficial do material
- Análise de citotoxicidade
- Testes in vivo
- Incorporação do biovidro no material

7 REFERÊNCIAS

- AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. 1 ed. Tokyo: JAAS, 1991.
- AOKI, H.; **Medical Applications of Hydroxyapatite**. Ishiyaku EuroAmerican, Japan, 1994.
- BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. **Bioceramics: Processing Routes and Mechanical Evaluation**. Journal of the Ceramic of Japan, v. 110, n. 7, p. 601-608, 2002.
- BLAINE, M.G. **Experimental observations on absorbable alginate products in surgery**. Ann. Surg, Philadelphia, v.125, p. 102–114, 1947.
- BONAR, L.; LEES, S.; and MOOK, H. **Neutron diffraction studies of collagen in fully mineralized bone**. Journal of Molecular Biology, Volume 181, Issue 2, 20 January 1985, Pages 265–270.
- BOWERS GM, CHADROFF B, CARNEVALE R, MELLONIG J, CORIO R, EMERSON J, STEVENS M, ROMBERG E. **Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans**. J Periodontol. 1989 Dec;60(12):683-93.
- CACCIOTTI, I.; BIANCO, A.; LOMBARDI, M.; MONTANARO, L., 2009, **Mgsubstituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour**, Journal of the European Ceramic Society, v. available online, n.
- CHAPMAN, V.J.; CHAPAMAN, D.J. **Seaweeds and Their Uses**, Chapman and Hall. Amsterdam : Elsevier, New York, 1980, Capítulo 6.
- CLARK DC, GUEST J.L., **The effectiveness of three different strengths of chlorhexidine mouthrinse**. J Can Dent Assoc. 1994; 60(8):711-4.clin
- COHEN, S.; LOBEL, E.; TREVGODA A.; PELED,Y. **A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye**. J. Control. Release, Amsterdam, v. 44 , p. 201–208, 1997.
- CURREY, J.D. **Physical characteristics affecting the tensile failure properties of compact bone**. J. Biomech. 23, 837–844, 1990.
- EISELT, P.; YEH, J.; LATTALA, R.K.; SHEA, L.D.; MOONEY, D.J. **Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels**. Biomaterials, Surrey, v. 21, p. 1921-1927, 2000.
- ELLIOT, C. **Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry** 18, Elsevier Science,

1994.

FRANCESCHI RT, IYER BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1992;7:235–246.

GACESA, P. Alginates. *Carbohydr. Polym. Barking*, v. 8, p. 161–182, 1988.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. **Protein release from alginate matrices.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, San Diego, v. 31, p. 267- 285, 1998.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A.; LAQUERRIERE, P.; JALLOT, E.; NEDELEC, J. M. et al., 2006, **Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro**, *Biomaterials*, v. 27, n. 17, pp. 3195-3200

Habraken W, Wolke JGC, Jansen JA. **Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007;59:234e48.

HALL SL, DIMAI HP, FARLEY JR. **Effects of zinc on human skeletal alkaline phosphatase activity *in vitro*.** *Calcif Tissue Int.* 1999;64:163–172.

HASHIZUME M, YAMAGUCHI M. Effect of beta-alanyl-L-histidinato zinc on differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: increases in alkaline phosphatase activity and protein concentration. *Mol Cell Biochem.* 1994;131:19–24.

HASHIZUME, M.; YAMAGUCHI, M., **Stimulatory Effect of Beta-Alanyl-LHistidinato Zinc on Cell-Proliferation Is Dependent on Protein-Synthesis in Osteoblastic Mc3T3-E1 Cells**, *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 122, n. 1, pp. 59-64, 1993.

HENCH, L. L.; WILSON, J.; **Introduction to bioceramics.** World Scientific Singapore, 1993, p.1-15.

HENCH, L. L., **Biomaterials: a forecast for the future**, *Biomaterials*, v. 19, n. 16, pp. 1419-1423, 1998.

HOLLOWAY W. R, COLLIER F. M., HERBST R. E., HODGE J. M., and NICHOLSON G. C.. **Osteoblast-Mediated Effects of Zinc on Isolated Rat Osteoclasts: Inhibition of Bone Resorption and Enhancement of Osteoclast Number.** *Bone Vol.* 19, No. 2 August 1996:137-142.

HSIEH HS, NAVIA JM. **Zinc deficiency and bone formation in guinea pig alveolar implants.** *J Nutr.*1980;110:1581–1588.

HUGO WB, LONGWORTH AR. Some **aspects of the mode of action of chlorhexidine action.** *pharm pharmacol.* 1964 oct;16:655-62.

- JALLOT, E.; NEDELEC, J. M.; GRIMAUULT, A. S.; CHASSOT, E. et al., 2005, **STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids**, Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, v. 42, n. 3-4, pp. 205-210.
- JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
- K. KATSOFIDOU, S.G. YIANTSIOS, A.J. KARABELAS **Experimental study of ultrafiltration membrane fouling by sodium alginate and flux recovery by backwashing**. Journal of Membrane Science 300 (2007) 137–146.
- KAIGLER, D.; MOONEY, D. **Tissue engineering's impact on dentistry**. J. Dent. Educ., v.65, n.5, p.456-462, 2001.
- KAY, M.I., YOUNG, R.A. & POSNER, A.R. **Crystal structure hydroxyapatite**. Nature 204, 1050–1052, 1964.
- KIM, S-S. et al. **Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering**. Biomaterials, v.27, n.8, p.1399-1409, 2006.
- LEGEROS R.Z. **Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science**, v. 15, Switzerland: Karger, 1991.
- LEONARD, M.; RASTELLO DE BOISSESON, M.; HUBERT, P.; DALENÇON, F.; DELLACHERIE, E. **Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties**. J. Control. Release, Amsterdam, v.98, p. 395-405, 2004.
- LIEW, C. V., CHAN, L. W., CHING, L. A., HENG, P. W. S., **Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets**. Int. J. Pharm., Amsterdam, v. 309, p. 25-37, 2006.
- LIEW, C. V., CHAN, L. W., CHING, L. A., HENG, P. W. S., **Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets**. Int. J. Pharm., Amsterdam, v. 309, p. 25-37, 2006.
- LINDHE, J; KARRING, T; LANG NP. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. Guanabara Koogan, 4^a edição, 2005.
- LIU, X.; MA, P.X. **Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering**. Ann. Biomed. Eng., v.32, n.3, p.477-486, 2004.
- LIU,C.; HAN, Z. ; CZERNUSKA, J .T. **Gradient collagen/nanohydroxyapatite composite scaffold: Development and characterization**. Acta Biomater. , v.5, n.2, p.661-669, 2009.
- MANZANO, M et al. **Revisiting bioceramics: Bone regenerative and local drug delivery systems**. Progress in Solid State Chemistry 40 (2012) 17e30.

- NANDIYANTO; S.-G KIM; F. ISKANDAR; AND K. OKUYAMA . "**Synthesis of Silica Nanoparticles with Nanometer-Size Controllable Mesopores and Outer Diameters**". Microporous and Mesoporous Materials 120 (3): 447–453.doi:10.1016/j.micromeso.2008.12.019.
- NEISER, S.; DRAGET, K.I.; SMIDSDORT, O. **Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems**. Food Hydrocol., Oxford, v.13, p. 445-458, 1999.
- NIYIBIZI, C.; AND EYRE, D.;. **Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen**. Eur J Biochem. Sep 15;224(3):943-50 1994.
- ONER G, BHAUMICK B, BALA RM. **Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats**. Endocrinology. 1984;114:1860–1863.
- OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V. **Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations**. Pol. Gel and Networks, Amsterdam, v. 6, p. 393-408, 1988.
- PALARD, M.; CHAMPION, E.; FOUCAUD, S., 2008, **Synthesis of silicated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$** , Journal of Solid State Chemistry, v. 181, n. 1950-1960.
- PONTIER, C.;VIANA, M.;CHAMPION, M.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; CHULIA, D.; **About the use of stoichiometric hydroxyapatite in compression - incidence of manufacturing process on compressibility**. Eur J Pharm Biopharm, Vol51, p 249, 2001.
- PROKOPIEV, O. e SEVOSTIANOV, I.; **Dependence of the mechanical properties of sintered hydroxyapatite on the sintering temperature**. Mat Sci Eng A Vol 431, p. 218, 2006
- SIGMA ALDRICH. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9394?lang=pt®ion=BR>, 2013
- SNYDERS, R; MUSIC, D.; SIGUMORONG, S.; SCHELBERGER, J.; JENSEN, J.; SCHNEIDER, J.M.; **Experimental and *ab initio* study of the mechanical properties of hydroxyapatite**. Appl Phys Lett, Vol 90, p 193902, 2007
- TABATA, Y. **Biomaterial technology for tissue engineering applications**. J. R. Soc. Interface, v.6, p.S311-324, 2009.
- TAMM, T.; PELD, M., 2006, **Computational study of cation substitutions in apatites**, Journal of Solid State Chemistry, v. 179, n. 5, pp. 1581-1587.

- TAPIERO H, TEW KD. **Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins.** Biomed Pharmacother. 2003;57:399–411.
- TEN CATE, A. R., **Histologia Bucal, Desenvolvimento, Estrutura e Função.** 5^a edição, Guanabara Koogan, 1994.
- VAHDATY A, PITT FORD TR, WILSON RF. **Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro.** endod dent traumatol.1993 dec; 9(6): 243-8.
- VALLET-REGÍ M., GONZÁLEZ-CALBET, J.M. **Calcium Phosphate as Substitution of Bone Tissues.** Progress in solid State Chemistry, v.32, p. 1-31, 2004.
- VALLET-REGI, M. e ARCOS, D., 2005, **Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants,** Journal of Materials Chemistry, v. 15, n. 15, pp. 1509-1516.
- WASASTJERNA, J. A. . "On the radii of ions". *Comm. Phys.-Math., Soc. Sci. Fenn.* 1(38): 1–25, 1923.
- WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials.** Elsevier: New York, 1987.
- YAMAGUCHI M, OISHI H, SUKETA Y. **Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture.**Biochem Pharmacol. 1987;36:4007–4012.
- YAMAGUCHI M, YAMAGUCHI R. **Action of zinc on bone metabolism in rats: increases in alkaline phosphatase activity and DNA content.** Biochem Pharmacol. 1986;35:773–777.
- YAO, F.; LEGEROS, J. P.; LEGEROS, R. Z., 2009, **Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties,** Acta Biomater., v. 5, n. 6, pp. 2169-2177.
- ZHANG, F. J.; CHENG, G. X.; YING, X. G. **Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres.** Reactive and Functional Polymers, Amsterdam, v. 66, p. 712-719, 2006.
- ZHU, YF et al. **Comparison of the in vitro bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds.** Microporous and Mesoporous Materials (2009);118:176e82.