PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS
HIDROXIAPATITA-COLÁGENO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Lídia Ágata de Sena

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

_____
Prof[a]. Gloria de Almeida Soares, D.Sc.

_____
Dr. Alexandre Malta Rossi, D.Sc.

_____
Prof. Ericksson Rocha e Almendra, D.Sc.

_____
Prof[a]. Nilce Carbonel Campos da Rocha, D.Sc.

_____
Prof. José Mauro Granjeiro, D.Sc.

_____
Dr[a]. Virgínia da Conceição Amaro Martins, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
NOVEMBRO DE 2004

SENA, LÍDIA ÁGATA DE

Produção e caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas.

[Rio de Janeiro] 2004

XII, 95 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2004)

Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Biomaterial
2. Enxerto Ósseo
3. Compósito Hidroxiapatia-colágeno

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

AGRADECIMENTOS

✓ A Deus por conceder mais uma realização pessoal e profissional, obrigada pelas bênçãos diárias.

✓ À Prof[a]. Gloria Soares, por sua generosidade e acolhida desde o mestrado, sempre disposta a oferecer estímulos e, principalmente, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. Por sua amizade. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntas.

✓ Ao Alexandre Rossi, por sua forma crítica e criativa de argüir os resultados alcançados, facilitando o alcance de nossos objetivos. Pela confiança depositada e pelos anos de trabalho e amizade.

✓ Ao Prof. Gilberto Goissis (IQSC/USP), por ceder os colágenos utilizados neste trabalho e possibilitando a ampliação do mesmo.

✓ À Dra. Virgínia Martins (IQSC/USP), por sua solicitude e pelas muitas informações sobre o colágeno.

✓ Aos *Bioamigos* Andréa, Emanuel, Neide, Paola, Jorge, Renata, Marcio Conz, Dóris, Ingrid, Carla, Aline, Paola, José Fernandes, Vinícius e Guaracilei pela alegria e uma irmandade toda especial que partilhamos nestes anos de convívio. Pela sinceridade de nossa amizade acima de qualquer outra coisa.

✓Ao amigo Euler Araujo, sempre prestativo, por seu apoio permanente e ajuda valiosa.

✓ Ao modesto grupo de estudo do método de Rietveld (Valéria, Elizabeth e Jorge) pelas manhãs de convívio salutar. Em especial à Valéria e Elizabeth pela amizade irrestrita.

✓ Aos membros da banca pela honra da presença e oportunidade de enriquecimento do trabalho. À Prof. Nilce Rocha, responsável por minha vinda para o PEMM, obrigada pela torcida permanente.

✓ Ao Prof. Mauro Granjeiro, pelo seu exemplo profissional, que deixa transparecer todo amor e dedicação que tem pela profissão.

✓ À Mirta Mir (IFSC/USP) pelo cuidado na análise dos materiais por DRX. Ao Prof. Jean Dille por realizar as análises por MET. À Prof. Márcia Athias (Laboratório de Ultraestrutura Celular Herta Meyer/IB/UFRJ) por possibilitar análises por MEV-FEG.

✓ À Macia Sader pelo constante entusiasmo, disponibilidade irrestrita e paciência na aquisição das imagens por microscopia eletrônica.

✓ Ao José Dias Jr. pela preciosa ajuda, meus sinceros agradecimentos.

✓ Aos funcionários e técnicos do PEMM, em especial ao Jackson e Reinaldo.

✓ À minha família, por todo apoio, carinho e amor, especialmente à minha mãe, por sua abdicação do parco tempo de convívio familiar. No entanto, é ela mesma a razão disto tudo. Ao Ricardo pela torcida constante, a vitória é nossa.

✓ Ao CNPq, CAPES, FUJB, FAPERJ, FINEP pelo apoio financeiro concedido durante a execução deste trabalho. Este trabalho faz parte do projeto Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual (IMBT) financiado pelo CNPq.

✓ A todos, inclusive aqueles não citados, agradeço profundamente e dedico o resultado do trabalho.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS HIDROXIAPATITA-COLÁGENO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Lídia Ágata de Sena

Novembro/2004

Orientadores: Glória de Almeida Soares
Alexandre Malta Rossi

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A otimização e a aceleração da regeneração óssea são alcançadas quando se tem uma perfeita associação entre células, substâncias ativas e um arcabouço adequado. Arcabouços de compósitos de hidroxiapatita (HA) e colágeno do tipo I foram produzidos pelo método de precipitação utilizando condições de pH, temperatura próximas à fisiológica. Foram empregados dois tipos de colágeno: colágeno nativo (CN) e colágeno aniônico (CA) oriundos de tendão bovino. Foi avaliada a influência do tratamento de hidrólise na molécula de colágeno nas propriedades químicas e estruturais da fase mineral formada. Os compósitos obtidos foram caracterizados quanto à morfologia (MEV, MEV-FEG e MET), microestrutura (DR-X) e química (IV-RD). Em todas as amostras analisadas a parte mineral foi caracterizada como hidroxiapatita carbonatada. Foi verificado que a morfologia e o tamanho dos cristais de HA são fortemente influenciados pela presença do colágeno, sendo este efeito mais pronunciado no compósito contendo colágeno nativo do que no compósito contendo colágeno aniônico, provavelmente em função das diferenças observadas na fibrilogênese dos dois tipos de colágenos empregados. O comportamento de osteoblastos cultivados em dois compósitos (HA/C – 10/90) sugere que esses materiais possam ser adequadamente empregados como arcabouços para Engenharia de Tecidos Ósseos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF HYDROXYAPATITE-COLLAGEN COMPOSITES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Lídia Ágata de Sena

November/2004

Advisors: Glória de Almeida Soares
Alexandre Malta Rossi

Department: Metallurgical and Materials Science Engineering

The optimization and the acceleration of the bone regeneration are dependent on the association among cells, active substances and an appropriate scaffold. Hydroxyapatite (HA) and type I collagen composites scaffolds were produced by the precipitation method under conditions close to the physiological environment one. Two types of collagen were used: native collagen (CN) and anionic collagen (CA) derived from the bovine tendon. The influence of the hydrolysis treatment in the collagen molecule in the chemical and structure properties of the formed mineral phase was evaluated. The obtained composites were characterized by using SEM, SEM-FEG, TEM, XRD, IR-DR. For all experimental conditions a carbonated hydroxyapatite was obtained as the mineral phase. The morphology and size of the HA crystals are strongly influenced by the presence of collagen. This effect is more pronounced with native collagen than with anionic collagen, probably in function of the differences observed in the fibrilogenesis of the two types of collagens employed. The behavior of osteoblast cells cultured on two composites (HA/C – 10/90) suggest that these material may be used as scaffold for bone tissue engineering.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO 1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1 -Tecido Ósseo 4
2.2 - Remodelação Óssea 7
2.3 - Apatita Biológica 9
2.4 - Colágeno no Tecido Biológico 10
2.4.1 - Tipos de Colágeno 11
2.4.2 - Colágeno do Tipo I 12
2.5 - Engenharia de Tecido Ósseo 16
2.6 - Biomateriais Usados na Engenharia de Tecido Ósseo 19
2.6.1 - Fosfatos de Cálcio 19
2.6.1.1 - Preparação da Hidroxiapatita 22
2.6.2 – Colágeno em Arcabouços 23
2.7 - Compósito Fosfato de Cálcio/Colágeno 25
2.8 - Interação Célula-Biomaterial 28
2.9 - Técnicas de Caracterização dos Materiais 29
2.9.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 29
2.9.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 30
2.9.3 - Difração de Raios-X (DR-X) 31
2.9.3.1 – Análise da Microestrutura por DRX pelo Método de Rietveld 32
2.9.4 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF) e com Estágio de Refletância Difusa (IV-RD) 36
3 - OBJETIVOS 37
3.1 - Objetivo Geral 37
3.2 - Objetivos Específicos 37
4 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL 38
4.1 - Caracterização dos Colágenos 38
4.2 - Preparação Dos Compósitos HA/Colágeno 39
4.3 - Cultura de Células sobre os Compósitos 41
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
5.1 - Caracterização Estrutural e Química 42
5.1.1 – Colágenos 42
5.1.2 - Hidroxiapatita Sintética (HA) 45
5.1.3 – Compósito Hidroxiapatita-Colágeno 49
5.1.3.1 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (80:20) – HA/CN-80/20 49
5.1.3.2 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/Colágeno Aniônico (50:50) – HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50 55
5.1.3.3 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (20:80) – HA/CN-20/80 60
5.1.3.4 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/Colágeno Aniônico (10:90) – HA/CN-10/90 E HA/CA-10/90 62
5.2 - Caracterização Morfológica 66
5.2.1 – Colágenos 66
5.2.2 – Compósitos Hidroxiapatita/Colágeno 67
5.2.2.1 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (80:20) – HA/CN-80/20 67
5.2.2.2 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/Colágeno Aniônico (50:50) – HA/CN-50/50 E HA/CA-50/50 68
5.2.2.3 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (20:80) – HA/CN-20/80 71

5.2.2.4 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/Colágeno Aniônico (10:90) – HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90 71
5.3 - Cultura de Osteoblastos nos Compósitos HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90 75
5.4 - Considerações Gerais 78
6 - CONCLUSÕES 85
7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 86
8 - REFERÊNCIAS 87
ANEXO I 95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Número de doadores de tecido músculo-esqueletal nos EUA (GREENWALD *et al.*, 2002). 2

Figura 2.1 – Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical (LIFE, 2002). 4

Figura 2.2 – Organização estrutural do osso (RHO et al, 1998). 7

Figura 2.3 – Estrutura do cristal de HA. Projeção no plano (0001) (IVANOVA *et al.*, 2001). 9

Figura 2.4 – Esquema da localização do colágeno no tecido ósseo (LAWSON & CZERNUSKA, 1998). 11

Figura 2.5 – Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Cadeia peptídica; (b) Enovelamento em tripla hélice; (c) Microfibrilas (FRIESS, 1998). 13

Figura 2.6 – Estrutura terciária do colágeno (BENTHAN, 2002). 14

Figura 2.7 – Representação esquemática das microfibrilas, onde cada seta corresponde a uma molécula de tropocolágeno (CUERONET, 2002). 14

Figura 2.8 – Número de publicações onde a Engenharia de Tecidos é listada como palavra-chave (BONASSAR & VACANTI, 1998). 17

Figura 2.9 – Ilustração de um procedimento da Engenharia de Tecidos (KASEMO, 2002). 18

Figura 2.10 – Eventos ocorridos na formação de ligações cruzadas entre o glutaraldeído e a molécula de colágeno (SHEU *et al.*, 2001). 24

Figura 5.1 – Difratogramas de Raios-X dos colágenos: (a) nativo – CN; (b) aniônico – CA. 43

Figura 5.2 – Espectro de infravermelho obtido por refletância difusa dos colágenos submetidos à condição de preparação do compósito, sem formar fase mineral: (a) CN e (b) CA. 44

Figura 5.3 – Difratograma da Hidroxiapatita (HA) obtida. 46

Figura 5.4 – Diagrama de Rietveld da HA (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado). 47

Figura 5.5 – Espectro de infravermelho obtido por refletância difusa da hidroxiapatita (HA). 48

Figura 5.6 – Foto do bloco do compósito (HA/CN-80/20 B) seco por liofilização. 49

Figura 5.7 – Difratogramas das fases obtidas: (a) HA/CN-80/20 B; (b) HA/CN-80/20 P. 51

Figura 5.8 – Diagramas de Rietveld obtidos para as fases presentes no compósito: (a) HA/CN-80/20 B; (b) HA/CN-80/20 P. (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado). 52

Figura 5.9 - Espectros de infravermelho por refletância difusa das fases presentes no compósito: (a) HA/CN-80/20 B; (b) HA/CN-80/20 P. 54

Figura 5.10 – Difratogramas dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50; (b) HA/CA-50/50. 56

Figura 5.11 – Diagramas de Rietveld dos compósitos: (a) HA/CN-50/50 e (b) HA/CN-50/50 (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado). 57

Figura 5.12 – Novelo formado pela fibrilogênese do colágeno nativo. 58

Figura 5.13 – Espectros de infravermelho dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50; (b) HA/CA-50/50. 59

Figura 5.14 – Difratograma do compósito HA/CN – 20/80. 60

Figura 5.15 – Diagrama de Rietveld do compósito HA/CN – 20/80 (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado). 61

Figura 5.16 – Espectro de infravermelho do compósito HA/CN – 20/80. 62

Figura 5.17 - Difratogramas dos compósitos: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 com 0h de digestão; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 com 6h de digestão. 63

Figura 5.18 – Espectros de infravermelho por refletância difusa dos compósitos: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 com 0h de digestão; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 com 6h de digestão. 64

Figura 5.19 – Micrografias dos colágenos submetidos à condição de preparação do compósito, sem formar fase mineral: (a) CN liofilizado; (b) CA liofilizado; (c) CN seco por ponto crítico; (d) CA seco por ponto crítico. Ampliação de x10000. 66

Figura 5.20 – Micrografias do compósito HA/CN-80/20 seco por liofilização: (a) x500 e (b) x1000 de ampliação. 67

Figura 5.21 – Micrografias dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50 (x500); (b) HA/CA-50/50 (x500) (c) HA/CN-50/50 (x19000); (d) HA/CA-50/50 (x19000) secos por liofilização. 69

Figura 5.22 – Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão e padrões de difração de elétrons dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50; (b) HA/CA-50/50. 70

Figura 5.23 – Micrografias do compósito HA/CN – 20/80 seco por ponto crítico: (a) 2000; (b) 19000 vezes de ampliação. 71

Figura 5.24 – Micrografias dos compósitos obtidos com 0h de digestão: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 secos por ponto crítico. Ampliação de X19000. 72

Figura 5.25 – Micrografias dos compósitos obtidos com 6h de digestão: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 secos por liofilização; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 secos por ponto crítico. Ampliação x19000. 73

Figura 5.26 – Micrografias (MEV-FEG) dos compósitos obtidos por secagem por ponto crítico: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 com 0h de digestão; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 com 6h de digestão. 74

Figura 5.27 – Micrografias (MEV) dos materiais cultivados com osteoblastos (setas) após 4 h (a;d;g), 7 d (b;e;h) e 14 d (c;f;i). 76

Figura 5.28 – Micrografias mostrando osteoblastos (setas) penetrando o 77

material pelos poros: (a) HA/CN – 10/90; (b) HA/CN – 10/90.

Figura 5.29 – Tamanho médio dos cristais nas direções 002 e 300 (a) e fator de forma dos cristais na HA pura e nos compósitos (b). (HA – HA pura; HA80 P – fase pó do compósito HA/CN 80/20 P; HA80 B – bloco do compósito HA/CN 80/20 B; HA50 – compósito HA/CN 50/50 e HA20 - HA/CN 20/80). 81

Figura 5.30 – Tamanho médio dos cristais nas direções 002 e 300 (a) e fator de forma dos cristais (b) na HA pura e nos compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50. 83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Distribuição e tipos de colágeno no corpo (modificado de FRIESS, 1998) 12

Tabela 2.2 – Características do colágeno como biomaterial (KUKUROVA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2001). 16

Tabela 2.3 – Principais fosfatos de cálcio (modificado de BOHNER, 2000). 20

Tabela 2.4 – Logaritmo da constante do produto de solubilidade de vários fostatos de cálcio (modificado de DOROZHKIN & EPPLE, 2002). 21

Tabela 4.1 – Condições de síntese do compósito HA/Colágeno. 40

Tabela 5.1 - Modos vibracionais característicos dos grupamentos funcionais presentes nos colágenos apresentados na figura 5.2. 45

Tabela 5.2 – Índices de concordância finais do refinamento da HA. 47

Tabela 5.3 – Resultados estruturais finais do refinamento da HA. 47

Tabela 5.4 - Índices de concordância finais do refinamento do compósito HA/CN-80/20. 50

Tabela 5.5 – Resultados estruturais finais do refinamento das fases presentes no compósito HA/CN-80/20. 53

Tabela 5.6 – Índices de concordância finais do refinamento dos compósitos HA/CN-50/50 (a) e HA/CN-50/50. 56

Tabela 5.7 – Resultados estruturais finais do refinamento dos compósitos HA/CN-50/50 (a) e HA/CN-50/50. 58

Tabela 5.8 - Índices de concordância finais do refinamento do compósito HA/CN-20/80. 60

Tabela 5.9 – Resultados estruturais finais do refinamento do compósito HA/CN-20/80. 61

Tabela 5.10 – Principais modos vibracionais dos grupamentos funcionais encontrados na HA e compósitos obtidos. 65

Tabela 5.11 – Parâmetros da HA sintetizada com e sem a presença de colágeno 80

1 - INTRODUÇÃO

De acordo com o *Censo Norte-Americano* estima-se que a população entre 55-75 anos alcançará a marca de 74,6 milhões de pessoas nos próximos 20 anos somente nos EUA. Entre os países que terão as maiores populações de idosos daqui a menos de 30 anos, oito se situam na categoria de países em desenvolvimento. Segundo as projeções estatísticas da Organização Mundial da Saúde, a população de idosos no Brasil será a sexta população de idosos do mundo. A senilidade, fato cada vez mais comum nas sociedades desenvolvidas, tem despertado a preocupação das autoridades para o desenvolvimento de terapias que visem a garantir qualidade de vida. Em relação ao envelhecimento, objetiva-se estender por mais tempo possível as propriedades e funcionalidades dos tecidos, os quais são mais propensos a falhas e desenvolvimento de doenças. A osteoporose, a mais comum das doenças metabólicas ósseas, é um dos maiores problemas de saúde pública da população senil, causando freqüentes casos de morbidez e mortalidade. Ao mesmo tempo, o elevado número de acidentes automobilísticos provoca uma demanda suplementar de materiais músculo-esqueletal substitutos (SAÚDE, 2002; BIOMET, 2004).

As Nações Unidas já declararam que o período entre 2000-2010 é a "Década do Osso e da Junta" (BOSKEY, 2001). Estima-se que mais de 500.000 procedimentos com enxerto ósseo são realizados anualmente, somente nos Estados Unidos, e que o dobro de procedimentos seja realizado no resto do mundo. No entanto, podemos verificar na Figura 1.1 que o número de doadores de tecidos músculo-esqueletal tradicionalmente usados nessas reconstruções é insuficiente frente às necessidades atuais e futuras (GREENWALD *et al.*, 2002).

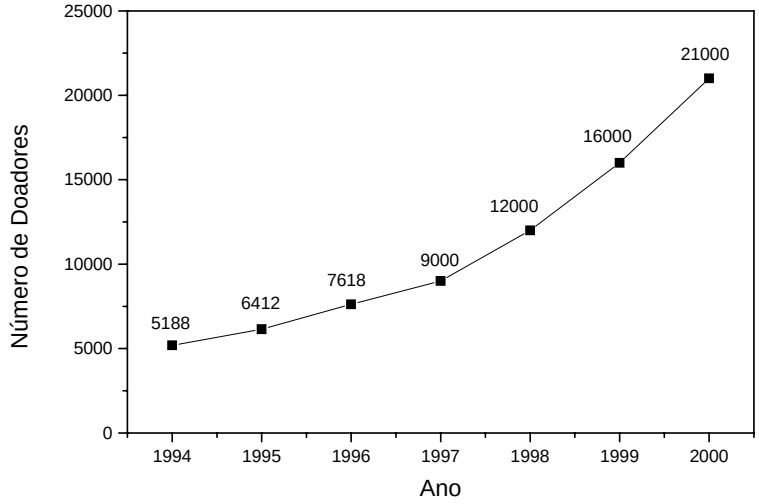


Figura 1.1 – Tendência do número de doadores de tecido músculo-esqueletal nos EUA (GREENWALD *et al.*, 2002).

Essa realidade tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas que visam à produção de materiais sintéticos que possam suprir essa demanda. Além disso, avanços tecnológicos e de materiais têm proporcionado o aumento da expectativa e da qualidade de vida de pessoas que, por motivo de doença degenerativa ou trauma por acidente, ficariam incapacitadas de manter o mesmo nível de atividade e produtividade. Os investimentos na produção de materiais que substituam os tecidos músculo-esqueletais giram em torno de 20 bilhões de dólares, sendo metade somente nos Estados Unidos (BIOMET, 2004). No Brasil, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o mercado de próteses ortopédicas é estimado em US$ 64 milhões, sendo o Sistema Único de Saúde (SUS) responsável por 1/3 do investimento. Ainda que o potencial do mercado brasileiro seja grande, o acesso aos serviços médicos, principalmente no que se refere à tecnologia de ponta, fica limitado a uma pequena parcela da população.

Um dos setores que mais vem recebendo investimentos é o da Engenharia de Tecidos, que é composta por duas áreas de pesquisas: a regeneração tecidual e a substituição de órgãos (órgãos artificiais). No primeiro caso, tecidos podem ser regenerados *in vitro* pela associação de materiais arcabouços, células e substâncias ativas como proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's) e fatores de crescimento promovendo a adesão, proliferação e diferenciação celular (TABATA, 2000).

Na Engenharia de Tecidos Ósseos, o desenvolvimento de arcabouços compostos de hidroxiapatita (HA) sintética ou natural e colágeno (Col) têm se destacado. Um dos principais motivos é a semelhança química destes componentes com os presentes na matriz óssea natural. A HA e o Col do tipo I são os principais componentes das fases inorgânica e orgânica presentes no tecido ósseo duro, respectivamente. Pesquisas têm mostrado que a organização estrutural entre estes compostos ocorre de forma altamente específica (PARRY, 1988; LAWSON & CZERNUSKA, 1998; TABATA, 2000).

Os materiais comerciais utilizados para o reparo ou substituição de tecidos não conseguem atender todas as exigências químicas e estruturais da área médico-odontológica, estimulando o desenvolvimento de novos biomateriais. A proposta deste trabalho foi a produção de compósitos à base de HA/colágeno do tipo I para utilização como enxertos ósseos ou como arcabouços para Engenharia de Tecidos. Foram efetuadas modificações nas variáveis de preparação a partir de dados fornecidos na literatura e também da experiência já adquirida na produção da hidroxiapatita pura.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Tecido Ósseo

O esqueleto humano é constituído por mais de 200 ossos de tamanho, forma e composição variáveis. Além de sua função estrutural, que dá forma e rigidez ao corpo, os ossos são responsáveis pela proteção de órgãos vitais, como o cérebro e órgãos sensoriais; pela fabricação de células sangüíneas, que ocorre na medula óssea vermelha situada no tecido esponjoso e pela homeostase que ajuda manter constante o nível de cálcio no sangue (SIKAVITSAS *et al.*, 2001).

Didaticamente, o esqueleto pode ser dividido anatomicamente em dois tipos de tecidos ósseos: osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso. O osso cortical corresponde à cerca de 85% da massa óssea e um terço do volume do esqueleto. Consiste de uma camada compacta e densa que se localiza na região externa dos ossos longos apresentando diversas lamelas intensamente empacotadas (ósteons), na forma de dutos cilíndricos, dispostos paralelamente ao eixo principal nos ossos longos. É encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo possuindo uma camada de espessura variável. O osso cortical é envolvido externamente por um tecido conjuntivo chamado periósteo rico em colágeno e células osteoprogenitoras (Figura 2.1). Possui baixas porosidade e relação superfície/volume e remodela-se anualmente cerca de 2-3%.

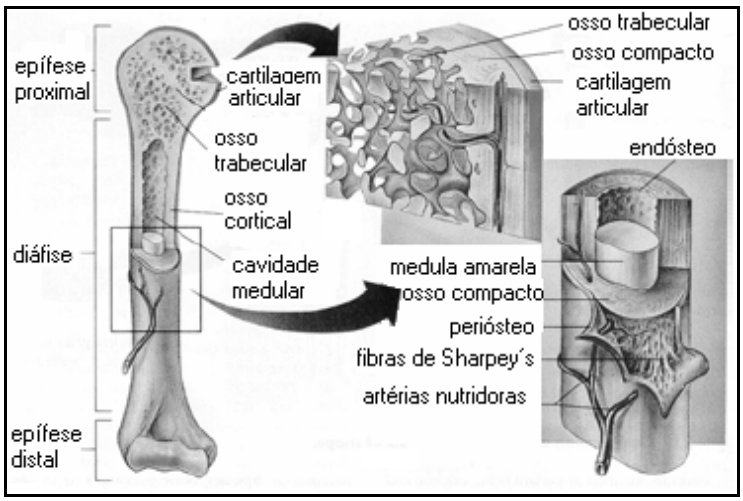


Figura 2.1 – Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical (LIFE, 2002).

O osso trabecular corresponde a cerca de 15% da massa óssea e dois terços do volume total do esqueleto. É encontrado principalmente nas epífises dos ossos longos (Figura 2.1) e nos ossos chatos, sendo revestido por uma camada unicelular chamada endósteo. Possui elevadas porosidade e relação área/volume, o que acarreta uma maior atividade metabólica, e remodela-se anualmente cerca de 24% (SIMÕES *et al.*, 1995).

O tecido ósseo é composto de (SIMÕES *et al.*, 1995):

- Células
    - Osteoprogenitoras; Osteoblastos; Osteócitos e Osteoclastos
- Matriz extracelular
    - Parte Inorgânica (65%):
        - Hidroxiapatita (HA), com a presença de íons substituintes tais como: CO_3^{2-}, Mg^{2+}, F^-, Sr^{2+}, etc.
    - Parte orgânica (35%)
        - Colágeno (Col) tipo I (85-90%)
        - Proteínas não-colágenas (10-15%)
            - Osteocalcina (grande afinidade com o íon Ca^{+2}); Osteonectina; Fribronectina; Sialoproteínas; Fatores de Crescimento e Proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's).
- Substância Fundamental
    - Glicoproteínas, Glicosaminoglicanas, Proteoglicanas, Fosfoproteínas, Água.

As células osteoprogenitoras são células indiferenciadas que se dividem para produzir osteoblastos. São importantes no reparo do osso danificado e localizam-se na camada interna do periósteo, no revestimento de cavidades medulares e no revestimento de passagens vasculares que se estendem através da matriz extracelular (SIMÕES *et al.*, 1995).

Os osteoblastos derivam-se das células mesenquimais indiferenciadas, sendo responsáveis pela produção da matriz óssea, rica em colágeno (principalmente do tipo I) e essencial para a posterior mineralização, por aderência de cristais de hidroxiapatita de cálcio, íons magnésio, potássio, sódio e carbonato nas fibrilas de colágeno. São ricos em

fosfatase alcalina, que possui valor elevado nos períodos de formação óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; SIMÕES *et al.*, 1995). O processo de formação de novo osso intermediado pelos osteoblastos é chamado de osteogênese. É conhecido que os osteoblastos ligam-se diretamente ao colágeno por meio de sítios de interação integrina-RDG (-Arg-Gly-Asp-) (ROCHA *et al.*, 2002).

Durante a mineralização da matriz orgânica ocorre o enclausuramento dos osteoblastos, que passam a se chamar osteócitos. Os osteócitos possuem a capacidade de síntese e consumo da matriz limitados, participando também no processo de reparo do tecido ósseo. A comunicação com a superfície óssea e entre os osteócitos ocorre através de canais denominados dendritos. Estes são responsáveis pela manutenção e monitoramento da quantidade de proteína e mineral na matriz (SIKAVITSAS, 2001).

Os osteoclastos derivam-se de células mononucleadas da linhagem monocítica da medula óssea (pré-osteoclastos), tendo como função a desmineralização óssea e a digestão da matriz do osso. Essas células usam ácidos e enzimas para dissolver a matriz e liberam minerais no processo chamado osteólise (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

A matriz extracelular é uma mistura complexa de proteínas estruturais e funcionais, glicoproteínas e proteoglicanas arranjadas numa estrutura tridimensional única e específica. Essas proteínas atuam no fornecimento de suporte e resistência à tração, sítios de adesão para receptores de superfícies celulares e como reservatórios para sinalização de fatores que modulam tais processos, como a angiogênese, a vasculogênese, a migração, proliferação e orientação celular e o reparo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995; BADYLAK, 2002).

A fim de entender as propriedades do osso, torna-se necessário conhecer as propriedades mecânicas dos seus componentes e a relações estruturais entre elas nos vários níveis de organização (Figura 2.2). Estes níveis e estruturas são divididos em: macroestrutura (osso cortical e esponjoso); microestrutura (sistema Harvesiano, ósteons, trabéculas individuais), sub-microestrurura (lamelas); nanoestrurura (colágeno fibrilar com fase mineral) e sub-nanoestrutura (estrutura molecular dos elementos constituintes, tais como o mineral, o colágeno e as proteínas não-colágenas). Essa estrutura

hierarquicamente organizada possui um arranjo e orientação de componentes irregulares, contudo aperfeiçoados, produzindo um material heterogêneo e anisotrópico (RHO *et al*, 1998).

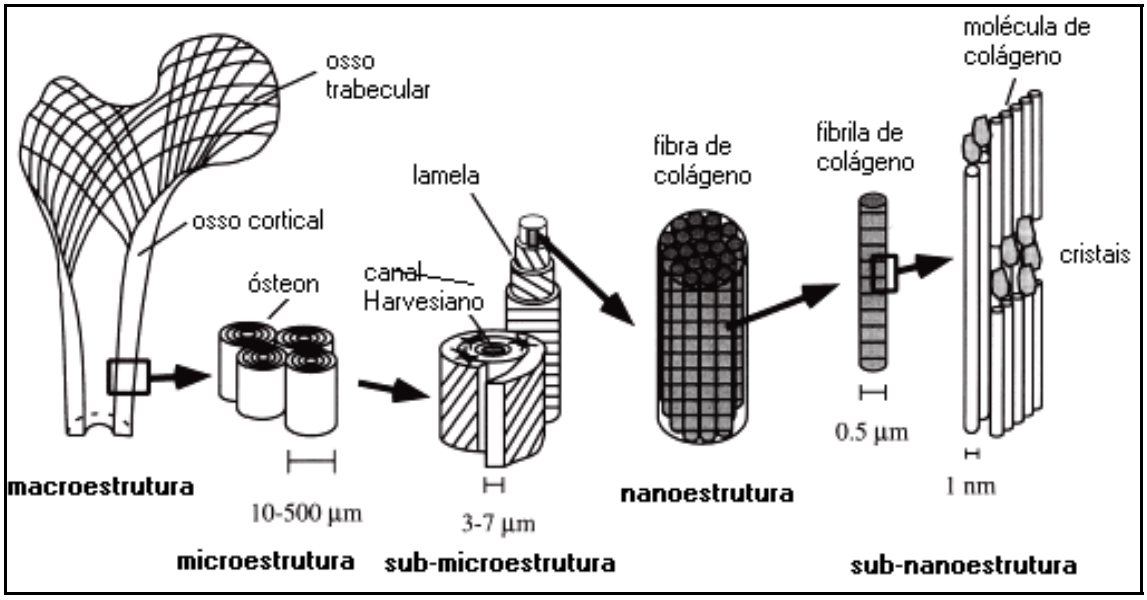


Figura 2.2 – Organização estrutural do osso (RHO *et al*, 1998).

Quando as fibras de colágeno são distribuídas num arranjo planar tem-se uma lamela (3-7 µm de espessura). Em alguns casos, essas lamelas de fibras de colágeno mineralizadas formam camadas concêntricas (3-8 lamelas) ao redor de um canal para criar o que é conhecido como ósteon ou canal harvesiano (RHO *et al.* 1998).

Cristais de apatita semelhantes a placas estão dispostos em espaços discretos, dentro das fibrilas de colágeno, portanto limitando o possível crescimento primário dos cristais e forçando-os a serem discretos e descontínuos. Os cristais crescem numa orientação cristalina específica, com o eixo c dos cristais aproximadamente paralelos ao eixo de comprimento das fibrilas de colágeno. A dimensão média da fase mineral é de 50x25x3 nm^3 (RHO *et al.*, 1998).

2.2 - Remodelação Óssea

A remodelação óssea consiste na retirada de uma quantidade pré-determinada de tecido ósseo, pelos osteoclastos, seguida da formação do novo osso na cavidade

formada pelos osteoblastos. Essa seqüência de eventos é regulada e estereotipada (SIKAVITSAS *et al.*, 2001).

Vários fatores são responsáveis pelo controle da formação e manutenção óssea, estando entre estes: a genética, a dieta, a atividade física e o sistema hormonal (SIMÕES *et al.*, 1995).

O ciclo de remodelação óssea consiste nas seguintes etapas (SIKAVITSAS *et al.*, 2001):

I) Ativação ⇒ os pré-osteoclastos são diferenciados e estimulados a diferenciar-se em osteoclastos maduros quando influenciado por citocininas e fatores de crescimento.

II) Reabsorção ⇒ os osteoclastos secretam ácido clorídrico que dissolve a matriz mineral do osso "velho", enquanto proteases degradam a porção orgânica. A reabsorção ocorre principalmente por ação dos osteoclastos, mas os osteócitos também podem reabsorver localizadamente matriz óssea.

III) Inversão ⇒ ao alcançar certa profundidade a reabsorção é interrompida. Em seguida, células derivadas de monócitos recobrem a cavidade formada, prevenindo uma erosão óssea adicional.

IV) Formação ⇒ há a atração de osteoblastos para cavidade de reabsorção e, sob influência de vários hormônios e fatores de crescimento, diferenciam-se em osteoblastos ativos para preenchê-la com o novo osso. A ausência de vitamina D3 nessa etapa provoca uma mineralização defeituosa, o que é chamado de osteomalácia.

O processo de biomineralização é muito complexo e requer a interação de um grande número de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanas e moléculas inorgânicas. Tudo isso produz como também mantém o tecido normal estruturalmente e funcionalmente (MYTHILI *et al*., 2000).

Somente 5 a 20% da superfície óssea sofrem remodelamento num determinado momento, o restante permanece na fase quiescente, ou seja, em repouso. O processo de remodelamento demora de 3 a 4 meses, começa pela ativação dos osteoclastos e finaliza-se com formação do novo osso pelos osteoblastos.. Numa pessoa saudável de 4

a 10 % de substância óssea são substituídas anualmente. Quando o processo de reabsorção óssea ocorre mais intensamente que o de formação temos a osteoporose (SIMÕES *et al.*, 1995).

2.3 - Apatita Biológica

A hidroxiapatita (HA) foi identificada como sendo componente mineral do osso pela primeira vez em 1926. Dejong realizou o primeiro estudo de Difração de Raios-X (DRX) do osso e reconheceu que sua fase inorgânica assemelha-se às estruturas minerais conhecidas como apatitas (CHAI & BEN-NISSAN, 1999). Na Figura 2.3 é mostrada a estrutura do cristal de HA estequiométrica (sistema hexagonal e grupo espacial $P6_3/m$).

As apatitas biológicas diferem da HA pura em composição, tamanho do cristal, morfologia e estequiometria. A razão Ca/P da HA pura é de 1,67, mas em geral, as apatitas biológicas são não-estequiométricas (1,63 e 1,61 para o esmalte e a dentina e 1,71 para o osso). A deficiência em cálcio nas apatitas é refletida pela formação de β-fosfato tricálcico (β-TCP) após calcinação a partir de 700^{o}C (LEGEROS, 1994).

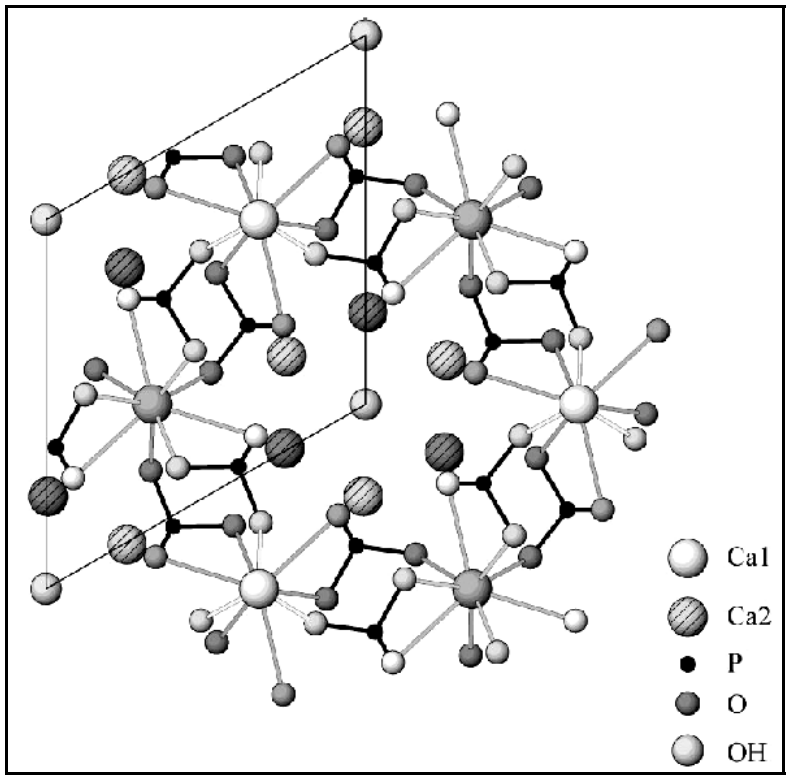


Figura 2.3 – Estrutura do cristal de HA. Projeção no plano (001) (IVANOVA *et al.* ,2001).

Dentre as numerosas possibilidades de substituições iônicas na estrutura da HA, apresenta extrema importância as substituições de grupos aniônicos da HA pelo íon carbonato (CO_3^{2-}). Vários trabalhos têm mostrado que íons carbonatos estão presentes em apatitas sintéticas e naturais, em dois tipos de sítios aniônicos da estrutura. Chama-se *hidroxiapatita carbonatada do tipo A* (CHA-tipo A) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon hidroxila (OH^-, sítio monovalente) e *hidroxiapatita carbonatada do tipo B* (CHA-tipo B) a apatita cujo íon carbonato substitui o íon fosfato (PO_4^{3-}, sítio trivalente). As CHA-tipo B são semelhantes às apatitas encontradas no esmalte dentário e no osso cortical. A incorporação de íons carbonato na apatita provoca mudanças na morfologia, parâmetros de rede, tamanho do cristal, deformação e maior solubilidade (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1994).

A presença de íons carbonatos na estrutura da hidroxiapatita provoca um aumento da solubilidade e reatividade química, sendo observada uma diminuição na sua estabilidade térmica. Biologicamente, quanto maior o teor de carbonato incorporado à apatita tanto maior é sua atividade metabólica (IVANOVA *et al.*, 2002). Outros íons também presentes na apatita biológica são: Na^+, K^+, Mg^{2+}, Cl^-, F^-, HPO_4^{2-} (TADIC *et al*, 2002).

No osso podemos encontrar fosfatos de cálcio tanto na forma cristalina quanto na forma amorfa. A presença da fase amorfa causa um aumento na taxa de dissolução em razão de sua maior solubilidade (DOROZHKIN & EPPLE, 2002).

2.4 - Colágeno no Tecido Biológico

O colágeno é reconhecido como a proteína mais abundante presente nos vertebrados, constituindo cerca de 90% da parte orgânica da matriz extracelular. Devido à sua complexidade estrutural, o termo colágeno é aplicado genericamente, podendo descrever moléculas individuais, uma fibrila natural *in vitro* ou *in situ* e agregados (FRIESS, 1998).

O colágeno e seu derivado, a gelatina, têm sido largamente empregados em produtos médicos, farmacêuticos e de consumo por mais de 100 anos (PARRY, 1988).

O colágeno é um material extracelular produzido por células, como os fibroblastos, quando a hélice tripla é secretada por estas células. Suas terminações são clivadas, resultando em um arranjo de moléculas insolúveis, as fibras de colágeno (CUERONET, 2002). Um esquema mais detalhado de sua localização no osso é mostrado na Figura 2.4.

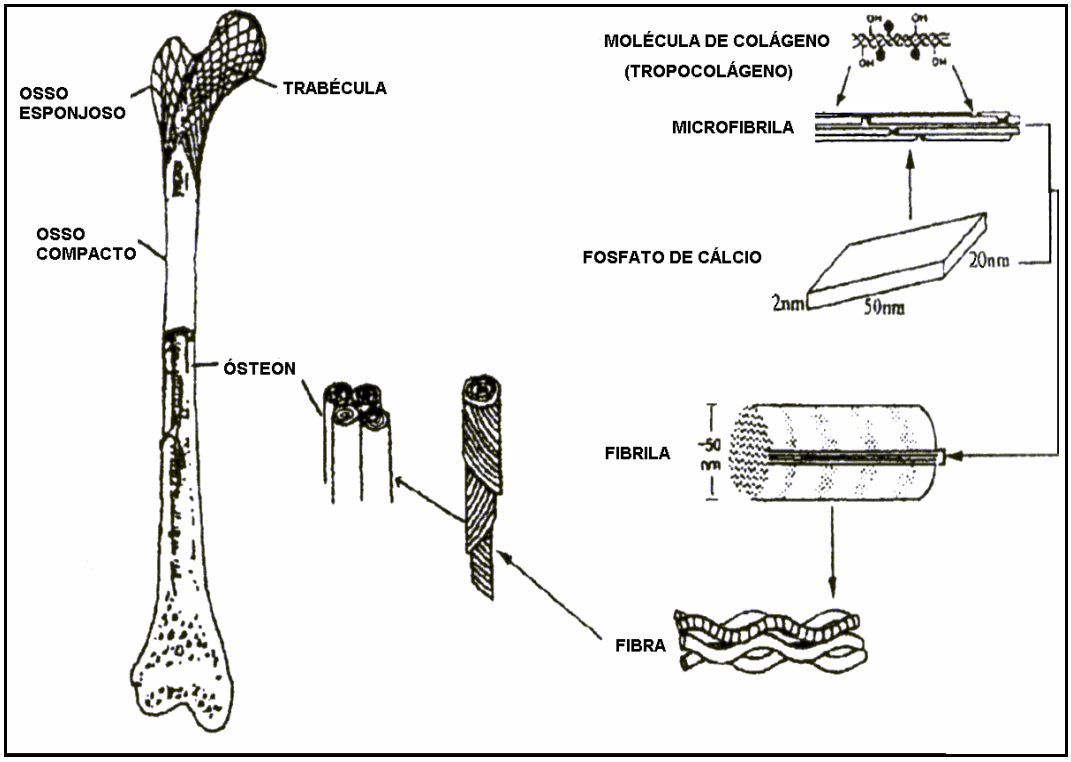


Figura 2.4 – Esquema da localização do colágeno no tecido ósseo (LAWSON & CZERNUSKA, 1998).

2.4.1 - Tipos de Colágeno

Existem mais de 20 espécies diferentes de colágeno (KUKUROVA *et al.*, 1999, BADYLAK, 2002), destas somente 13 são bem conhecidas (Tabela 2.1).

Ao contrário dos polímeros sintéticos, que apresentam misturas de cadeias compostas com um comprimento variável de unidades repetitivas, o colágeno possui tamanho, estrutura e uma seqüência específica de aminoácidos (FRIESS, 1998).

Dentre todos os tipos de colágenos existentes, o colágeno do tipo I tem despertado muita atenção por ser a proteína extracelular mais abundante, sendo também apontado como responsável pela manutenção da resistência mecânica nos ossos.

Tabela 2.1 – Distribuição e tipos de colágeno (modificado de FRIESS, 1998).

Tipo de Colágeno	Distribuição no Tecido
I	Pele, tendão, osso, córnea, dentina, fibrocartilagem, grandes vasos, intestino, útero, derme, ligamentos
II	Cartilagem hialina e elástica, notocórdio e disco intervertebral
III	Grandes vasos, parede uterina, derme, intestino, válvula do coração, gengiva (geralmente coexiste com o tipo I exceto no osso, tendão e na córnea)
IV	Lâminas basais, cápsula do cristalino
V	Córnea, membranas da placenta, osso, grandes vasos, cartilagem hialina, gengiva
VI	Pele, músculo do coração
VII	Pele, placenta, pulmão, cartilagem, córnea
VIII	Produzido pelas células endoteliais
IX	Cartilagem
X	Cartilagem hipertrópica e mineralizada
XI	Cartilagem, disco intervertebral, humor vítreo
XII	Tendão embrionário de frango, ligamento periodontal bovino
XIII	Pele fetal, mucosa intestinal

2.4.2 - Colágeno do Tipo I

A molécula de colágeno consiste em três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, formando uma estrutura chamada hélice tripla (Figuras 2.4 e 2.5). Cada cadeia polipeptídica possui aproximadamente 1038 resíduos de aminoácidos (Figura 2.5a). Esta seqüência adota uma estrutura orientada à esquerda com três aminoácidos por volta (Figura 2.5b). A estrutura da hélice tripla (Figura 2.5b) é permitida devido a uma seqüência de aminoácidos repetitiva chamada $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, onde Gly é glicina, X freqüentemente prolina (Pro) e Y hidroxiprolina (Hyp). Para a molécula de colágeno do tipo I, duas cadeias são idênticas, denominadas α_1, e uma é homóloga, mas quimicamente distinta, denominada α_2 (PARRY, 1988; FRIESS, 1998; ZANABONI *et al.*, 2000; SIVAKUMAR & RAO, 2002).

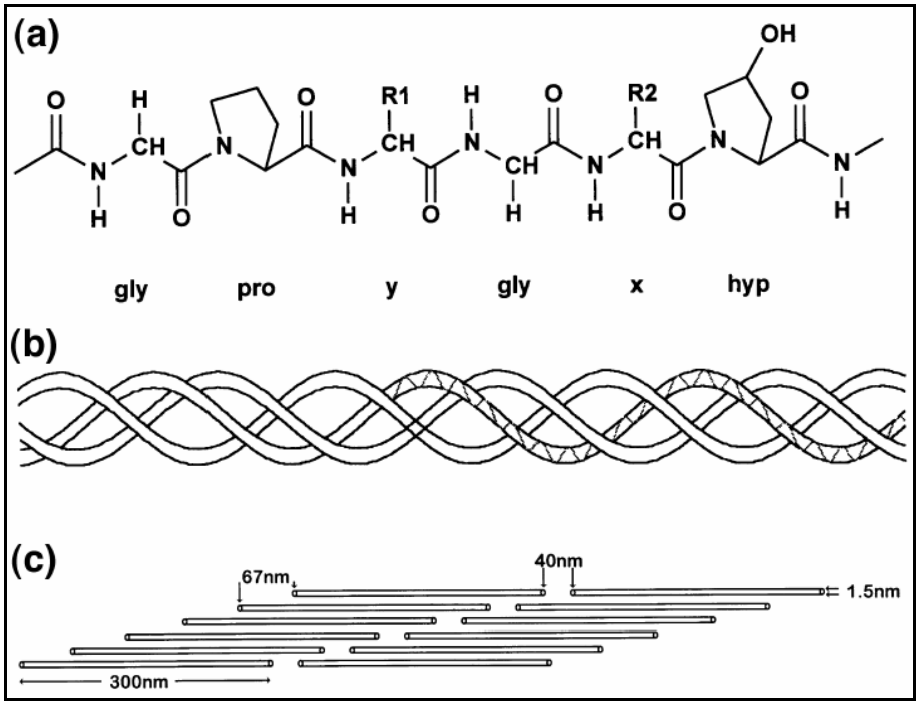


Figura 2.5 – Estrutura química do colágeno do tipo I. (a) Cadeia peptídica; (b) Enovelamento em tripla hélice; (c) Microfibrilas (FRIESS, 1998).

A formação da estrutura hélice tripla estável nos tecidos requer a modificação do aminoácido prolina (Pro), pela atividade da enzima prolil-hidroxilase (hidroxilação), para formar hidroxiprolina (Hyp) na cadeia do colágeno (FRIESS, 1998). É conhecido que a hidroxiprolina desempenha papel fundamental na estabilização da hélice tripla, pois defeitos na hidroxiprolina podem refletir na desorganização da hélice tripla, e, portanto, de todo colágeno (FRIBROGEN, 2002; CUERONET, 2002).

A estrutura formada pela três cadeias polipeptídicas entrelaçadas é o tropocolágeno. Tem a forma de um bastão com comprimento e largura de aproximadamente 300 e 1,5nm, respectivamente (Figura 2.5b e 2.6), e peso molecular de 300kD. Os telopeptídeos constituem os terminais não-helicoidais das moléculas de tropocolágeno, não contendo a seqüência característica Gly-Pro-Hyp (Figura 2.6). Estes são geralmente retirados por reações com pepsina uma vez que podem induzir uma resposta imune ao paciente (PARRY, 1988; FRIESS, 1998; HSU *et al.*, 1999; CUERONET, 2002).

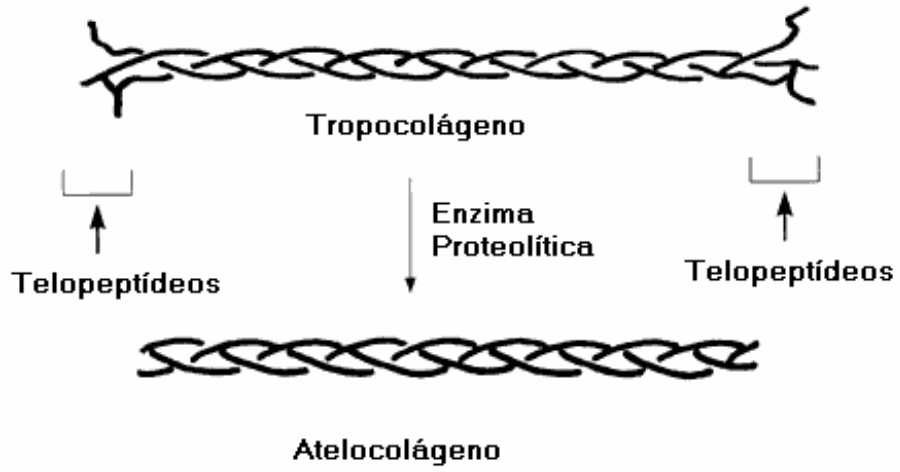


Figura 2.6 – Estrutura terciária do colágeno (BENTHAN, 2002).

O empacotamento ordenado das moléculas de tropocolágeno para formação das microfibrilas ocorre de forma regular e específica, onde a quinta molécula coincide com a primeira (Figura 2.7). Esta configuração é alcançada principalmente devido à presença de interações de grupos hidrofóbicos e polares. Essas forças são suficientes para juntar as microfibrilas, mas não dão ao colágeno estabilidade mecânica suficiente. Essa última é alcançada pela formação de ligações cruzadas covalentes, que pode ser intramolecular (entre a mesma unidade de tropocolágeno) ou intermolecular (entre unidades de tropocolágenos). A quantidade e tipo de ligação cruzada no colágeno natural variam com a função e a idade do tecido. As ligações cruzadas podem ser produzidas artificialmente utilizando-se reagentes químicos como o glutaraldeído (LAWSON & CZERNUSZKA, 1998).

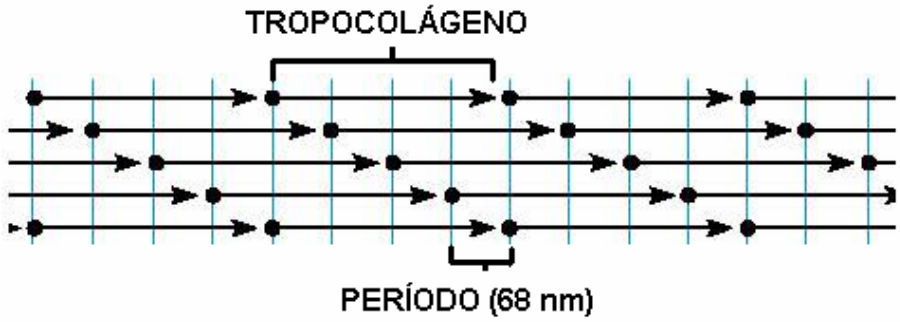


Figura 2.7 – Representação esquemática das microfibrilas, onde cada seta corresponde a uma molécula de tropocolágeno (CUERONET, 2002).

Fibrilas não se formam em meio ácido, isso porque as forças de interação entre as hélices triplas não possuem componente de atração em qualquer distância inter-helicoidal. Entretanto, em condições de pH e força iônica próximos ao fisiológico o processo de mudança da hélice tripla é acompanhado pela formação de fibrilas, esse processo é chamando de fibrilogênese (ZANABONI *et al.*, 2000).

A gelatina é essencialmente o colágeno desnaturado e pode ser obtida por processos químicos, enzimáticos ou térmicos (FIBROGEN, 2002). A desnaturação é a perda da estrutura tridimensional do colágeno. Os principais agentes de desnaturação são: mudanças no pH (altera as interações eletrostáticas entre aminoácidos carregados); mudanças na concentração do sal – força iônica (devido à mesma razão) e mudanças na temperatura (altas temperaturas reduzem a força das ligações de hidrogênio). Em alguns casos é possível a renaturação do colágeno, ou seja, a recuperação de sua estrutura em hélice tripla (LENNIGER, 1998).

Vantagens e desvantagens do uso de colágeno como biomaterial são apresentadas na Tabela 2.2.

A caracterização do colágeno por meio da determinação da composição de aminoácidos, Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e análise físico-química das soluções vêm ajudando a desvendar sua estrutura molecular.

Padrões de DRX e micrografias de transmissão de elétrons da fibrila de colágeno no tendão revelam que este apresenta uma periodicidade axial (D) de aproximadamente 68nm como esquematizado nas Figuras 2.5 e 2.7. Essa periodicidade é perdida quando fibras de colágeno são colocadas em meio de ácido acético diluído, ocorrendo a dissolução das fibras e restando a unidade que as constitui, o tropocolágeno. Ao se neutralizar esse meio com um álcali, pode-se reconstituir a periodicidade característica das fibras de colágeno (CUERONET, 2002).

Tabela 2.2 – Características do colágeno como biomaterial (KUKUROVA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2001).

Vantagens	Desvantagens
⌦ Disponível abundantemente e facilmente purificado de organismos vivos (constitui mais que 30% dos tecidos de vertebrados); ⌦ Não-alergênico; ⌦ Biodegradável e bioreabsorvível; ⌦ Baixa antigenicidade; ⌦ Não-tóxico e biocompatível; ⌦ Sinérgico com componentes bioativos; ⌦ Plástico biológico devido à alta resistência mecânica; ⌦ Boa compatibilidade com células (adesão, crescimento e migração); ⌦ Hemostático – promove a coagulação sangüínea; ⌦ Sua biodegradabilidade pode ser regulada por ligações cruzadas; ⌦ Pode ser preparado em diferentes formas, tais como tiras, placa, esponjas, partículas. ⌦ Compatível com polímeros sintéticos.	⌦ Variabilidade do colágeno isolado (e.x. densidade de ligações cruzadas, tamanho da fibra, traços de impureza, etc.); ⌦ Hidrofílico, o que leva ao intumescimento e mais rápida liberação (no caso do uso em dispositivos de liberação controlada); ⌦ Variabilidade na taxa de degradação quando comparado com a degradação hidrolítica; ⌦ Propriedades de manuseio complexas; ⌦ Efeitos secundários, tais como a possibilidade de transmissão de encefalopatia bovina (‘vaca louca’).

2.5 - Engenharia de Tecidos Ósseos

A Engenharia de Tecidos é uma das novas áreas de pesquisa que mais tem gerado publicações (Figura 2.8) e recebido investimentos. Ela se baseia no conceito de que o reparo ou regeneração de tecidos biológicos pode ser guiado pela associação de materiais sintéticos (arcabouços), células e proteínas quimioativas (proteínas ósseas morfogenéticas e fatores de crescimento). A Engenharia de Tecidos é um campo multidisciplinar e requer a interação de profissionais da área biológica, química e engenharias (BONASSAR & VACANTI, 1998).

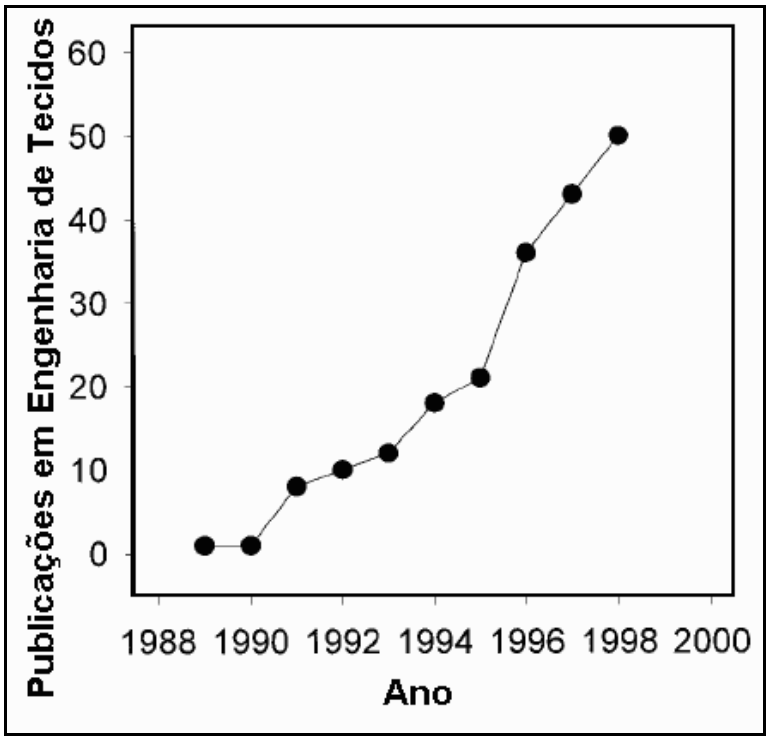


Figura 2.8 – Número de publicações onde a Engenharia de Tecidos é listada como palavra-chave (BONASSAR & VACANTI, 1998).

Um esquema simplificado da Engenharia de Tecidos é mostrado na Figura 2.9. Para a criação do tecido substituto, é necessário um pequeno número de células que pode ser colhido do paciente e cultivado até um número adequado em laboratório. Essa etapa é de extrema importância, pois envolve a seleção apropriada de células que estejam num estágio ótimo de desenvolvimento. Essas células são necessárias para a geração do novo tecido pela produção de matriz extracelular, sendo responsáveis pela manutenção a longo prazo dessa matriz (BOSKEY, 2001).

Em seguida, as células podem ser então expandidas num arcabouço (molde), natural ou sintético, que forneça estabilidade mecânica a curto prazo e uma organização tridimensional para a fabricação do tecido. Conforme sejam estabelecidos sinais e condições adequadas, as células secretarão vários componentes da matriz extracelular possibilitando a formação de um tecido vivo que poderá ser implantado no sítio defeituoso do paciente. A fim de se extinguir riscos de rejeição a longo prazo, o arcabouço deve se degradar na medida que o tecido substituto seja formado (BONASSAR & VACANTI, 1998).

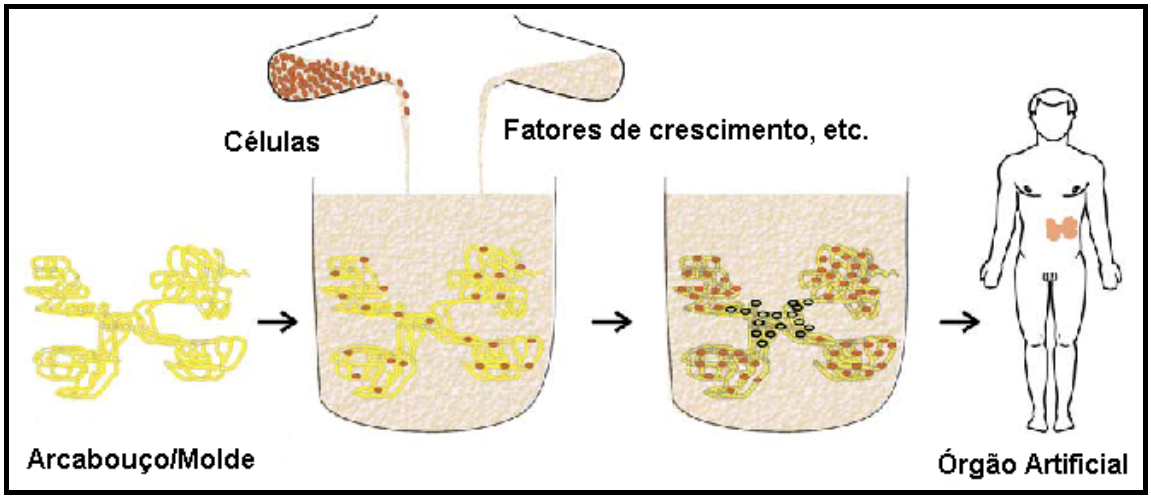


Figura 2.9 – Ilustração de um procedimento da Engenharia de Tecidos (KASEMO, 2002).

Uma das linhas de pesquisa mais importantes na engenharia de tecido ósseo é o desenvolvimento de novos e mais sofisticados arcabouços (*scaffolds*), que tenham uma função mais ativa no desenvolvimento da migração e infiltração celular. Ao invés de meramente comportar as células, essas matrizes bioativas devem ser projetadas para incentivar a adesão e proliferação celular sobre sua superfície por meio de proteínas de adesão (BONASSAR & VACANTI, 1998).

Uma das características desse material é sua biodegradação. A taxa de biodegradação do arcabouço deve ser controlada para permitir a contínua reconstrução do tecido. Além disso, um material substituto ideal para defeitos ósseos, associado por exemplo à cirurgia ortopédica reconstrutiva, deve conter poros de tamanhos adequados para manutenção da forma e função celular, ser inicialmente flexível e facilmente moldável, mas que endureça rapidamente uma vez implantado (BURG *et al.*, 2000; SHEU *et al.*, 2001; NOAH *et al.*, 2002). Embora se tenha clareza das propriedades requeridas para um arcabouço, não existe ainda um produto comercial que atenda a todas essas exigências.

2.6 - Biomateriais Usados na Engenharia de Tecidos Ósseos

Um material para ser empregado na engenharia de tecidos deve ter como características principais: uma baixa toxicidade; boas propriedades mecânicas nas condições fisiológicas; porosidade que permita um ancoramento das células; baixa imunogenicidade; bioatividade e/ou biodegradabilidade.

Os materiais poliméricos sintéticos possuem um amplo potencial devido a suas boas características de processamento. Podem ser produzidos em formas variadas, como retículos fibrosos, esponjas ou espumas e hidrogéis. O poliácido lático (PLA), poliácido glicólico (PGA), polietilenoglicol (PEG) e a policaprolactona (PCL) estão entre os materiais poliméricos mais utilizados (BONASSAR, 1998).

Os materiais cerâmicos, em especial as cerâmicas bioativas, tais como os biovidros, vitro-cerâmicas e fosfatos de cálcio, também são fortes candidatos para o desenvolvimento de matrizes para a engenharia de tecidos. Estudos vêm sendo desenvolvidos na produção de arcabouços de vidros bioativos para aplicação na engenharia de tecidos (NIEDERAUER *et al.*, 2000; ROETNER *et al*., 2002).

2.6.1 - Fosfatos de Cálcio

Os compostos de fosfato de cálcio têm sido estudados para uso em diversas áreas, apresentando destaque como material para reparo ósseo há pelo menos 80 anos. O primeiro material utilizado *in vivo* foi o fostato tricálcico (TCP) por Albee e Morrisson em 1920 (LEGEROS, 2002; BOHNER, 2000).

Comercialmente, podemos encontrar fosfatos de cálcio com diferentes características, tais como:

- Origem (natural ou sintética);
- Composição (hidroxiapatita, ß-fosfato tricálcico, fosfato de cálcio bifásico);
- Forma física (particulados, blocos densos e porosos, cimentos, recobrimentos sobre metais, compósitos com polímeros);
- Propriedades físico-químicas.

Podemos dividir os fosfatos de cálcio em duas categorias: (i) os que são obtidos pelo método de precipitação em solução aquosa próximo à temperatura ambiente (os 6 primeiros compostos apresentados na Tabela 2.3) e (ii) os que são obtidos por síntese térmica ou decomposição (os 6 últimos compostos apresentados na Tabela 2.3) (BOHNER, 2000).

Tabela 2.3 – Principais fosfatos de cálcio (modificado de BOHNER, 2000).

Nome	***Fórmula***	***Ca/P***	***Mineral***	***Símbolo***
Dihidrogeno fosfato de cálcio monohidratado	$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$	0.50	-	MCPM
Monohidrogeno fosfato de cálcio	$CaHPO_4$	1.00	Monetita	DCP
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	$CaHPO_4.2H_2O$	1.00	Brushita	DCPD
Fosfato octacálcico	$Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$	1.33	-	OCP
Hidroxiapatita Deficiente	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_2$	1.50-1.67	-	CD-HA
Fosfato de cálcio amorfo n = 3-4.5; 15-20% H_2O	$Ca_3(PO_4)_2.nH_2O$	1.5	-	ACP
Dihidrogeno fosfato de cálcio	$Ca(H_2PO_4)_2$	0.5	-	MCP
α-Fosfato tricálcico	α-$Ca_3(PO_4)_2$	1.5	-	α-TCP
β-Fosfato tricálcico	β-$Ca_3(PO_4)_2$	1.5	-	β-TCP
Hidroxiapatita sinterizada (800 ^oC)	$Ca_5(PO_4)_3OH$	1.67	Hidroxiapatita	HA
Oxiapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	1.67	-	OXA
Fosfato tetracálcico	$Ca_4(PO_4)_2O$	2.00	Hilgentockita	TetCP

Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio é sua solubilidade em água, uma vez que o comportamento *in vivo* é dependente, em grande parte, de sua solubilidade. Valores do logaritmo da constante do produto de solubilidade são apresentados na tabela 2.4, quanto maior o valor menor a solubilidade do material.

Tabela 2.4 – Logaritmo da constante do produto de solubilidade de vários fostatos de cálcio[a] (modificado de DOROZHKIN & EPPLE, 2002).

Nome	***-log(K_{sp}) a 25^{o}C***	***-log(K_{sp}) a 37^{o}C***
Dihidrogeno fosfato de cálcio anidro	1,14	-
Dihidrogeno fosfato de cálcio monohidratado	1,14	-
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	6,59	6,63
Monohidrogeno fosfato de cálcio	6,90	7,02
α-Fosfato tricálcico	25,5	25,5
β-Fosfato tricálcico	28,9	29,5
Fosfato de cálcio amorfo n = 3-4,5; 15-20% H_2O	[b]	[b]
Fosfato tetracálcico	38-44	37-42
Hidroxiapatita deficiente	≈ 85,1	≈ 85,1
Fosfato octacálcico	96,6	95,9
Hidroxiapatita sinterizada (800 ^{o}C)	116,8	117,2

[a] A solubilidade é relacionada como o logaritmo da constante do produto de solubilidade para dado composto (excluindo-se a água de hidratação), com concentrações em mol.L^{-1}; [b] Não pode ser medido precisamente. Entretanto, encontram-se os seguintes valores na literatura: 25,7 (pH 7,40), 29,9 (pH 6,00) e 32,7 (pH 5,28).

Mesmo que todos os parâmetros, exceto a composição, permaneçam constantes, essa ordem apresentada na Tabela 2.4 não é sempre observada experimentalmente. Isto ocorre porque a superfície do fosfato de cálcio, altamente solúvel, é reativa e pode formar uma camada de um fosfato de cálcio pouco solúvel, assim reduzindo a taxa de degradação (BOHNER, 2000).

Embora as cerâmicas inorgânicas não exibam capacidade osteoindutiva, elas certamente possuem capacidade osteocondutiva, assim como uma extraordinária capacidade de se ligar diretamente ao osso (BURG *et al.* 2000).

2.6.1.1 - Preparação da Hidroxiapatita

Em função da alta complexidade e diversificação na química dos fosfatos de cálcio, pode-se facilmente modificar as características do material variando-se o método utilizado na sua preparação. Por isso, a escolha e o controle da metodologia adotada no preparo do material é fundamental para cada aplicação do produto final.

A hidroxiapatita pode ser sintetizada a partir de meios aquosos (por precipitação em solução aquosa, síntese hidrotérmica e hidrólise de outros fosfatos de cálcio) e não aquosos (reação em fase sólida). Dependendo da técnica, materiais com variada morfologia, estequiometria e cristalinidade podem ser obtidas. Reações em fase sólida geralmente geram produtos estequiométricos, cristalinos e puros, porém requerem temperaturas relativamente altas por um longo tempo. Além disso, a sinterabilidade dos pós é geralmente baixa. No caso da precipitação em solução aquosa, onde a temperatura não excede 100^{o}C, podem-se preparar cristais de tamanho nanométricos. Sua cristalinidade e razão Ca/P dependem fortemente das condições de preparação. A síntese hidrotérmica, utilizando temperatura elevada em soluções sob alta pressão, promove a formação de cristais com alto grau de cristalinidade e com razão Ca/P próximo ao valor estequiométrico (Ca/P = 1,67) (ELLIOT, 1994).

O tamanho de cristais obtidos nas preparações pode variar na escala de nanômetros a milímetros (ELLIOT, 1994).

Várias são as metodologias desenvolvidas para produção da HA, os principais métodos de preparação a partir de meios aquosos são:

- Método de precipitação por titulação, onde são utilizados como reagentes soluções de $Ca(OH)_2$ e H_3PO_4, seguindo a reação abaixo (BETT, *et al.*, 1967; AOKI, 1994; PANDA, 2002):

$$10\ Ca(OH)_2 + 6\ H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18\ H_2O \qquad (2.1)$$

- Reação por precipitação, utilizando-se como reagentes soluções de $Ca(NO_3)_2$ e $(NH_4)_2HPO_4$, seguindo a reação abaixo (AOKI, 1994; LANGSTAFF *et al.*, 1999; RAYNAUD, 2002):

$$10\ Ca(NO_3)_2 + 6\ (NH_4)_2HPO_4 + 8\ NH_4OH \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20\ NH_4NO_3 + 6\ H_2O \quad (2.2)$$

- Biomimético, onde são utilizadas concentrações iônicas próximas às do plasma sangüíneo (RHEE & TANAKA, 1998). Na realidade, este procedimento foi desenvolvido por Kokubo visando formar um recobrimento de apatita numa superfície metálica previamente tratada (KIM *et al*., 1996).

O conhecimento da microestrutura da hidroxiapatita sintética é importante por vários aspectos. Primeiro porque, como foi dito anteriormente, a HA é um dos principais componentes do tecido ósseo, sendo assim o estudo da nucleação e crescimento dos cristais de HA sob condições próximas das condições do ambiente biológico (temperatura de ~37^{o}C, pH 7,4 e concentração baixa) nos dá a possibilidade de modelar os processos de biomineralização e desmineralização, que é a remodelação óssea. Segundo, como a HA é um material de implante biocompatível, a determinação da correlação entre morfologia e estrutura das partículas por um lado e as condições de crescimento por outro, nos permitem definir quais condições de temperatura, concentração e pH seriam fundamentais para uma síntese direta e racional que gere uma morfologia e tamanho de partícula desejado (SUVOROVA & BUFFAT, 1999).

2.6.2 – Colágeno como Arcabouços

Alguns trabalhos relatam o uso de arcabouços de colágeno no reparo de lesões de tecidos ósseos (CHEVALLAY & HERBAGE, 2000; LEE *et al*., 2002; NOAH *et al*., 2002; ROCHA *et al*., 2002). Estudos realizados por SILVER *et al.* (1995) revelam que na substituição de tendão e ligamento, a biodegradação ótima dos arcabouços ocorre cerca de 20 semanas após sua implantação, porém a perda inicial de cerca de 75% da resistência à tração acontece em aproximadamente 4 semanas. Modificações no colágeno têm sido realizadas a fim de maximizar a resistência à tração inicial para compensar a rápida perda das propriedades mecânicas do implante.

O processo de tratamento químico tem como objetivo principal o controle da taxa de degradação e a modificação da imunogenicidade do colágeno (BMME, 2002). O glutaraldeído (GA, $OHCCH_2CH_2CH_2CHO$) é o agente reticulador mais utilizado em

materiais à base de colágeno. A introdução das ligações cruzadas ocorre via base de Schiff entre os grupos ε-amino das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos lisina e hidroxilisina presentes na estrutura primária da proteína. Tem como objetivo minimizar a contração de matrizes de colágeno durante o crescimento celular, porém seu uso está associado a uma marcante citotoxicidade. Um esquema do mecanismo envolvido no processo de ligação cruzada entre a molécula de colágeno e o glutaraldeído é mostrado na Figura 2.10 (SHEU *et al.*, 2001).

Estudos sugerem que modificações no arranjo do colágeno podem levar a significativas variações na integridade mecânica do osso. Foi mostrado que a diminuição da concentração de ligações cruzadas está associada com o decréscimo no enrijecimento ósseo e na sua capacidade de absorver energia numa fratura (WANG *et al.*, 2001).

No estudo realizado por SHEU e colaboradores (2001) utilizando concentrações de glutaraldeído variando entre 0 e 0,2%, foi verificado um aumento na resistência à deformação das matrizes de colágeno com o aumento das ligações cruzadas. Foi concluído que, numa solução de colágeno em ácido acético 1% (p/p), a concentração de glutaraldeído de 0,12% produz uma maior resistência à deformação.

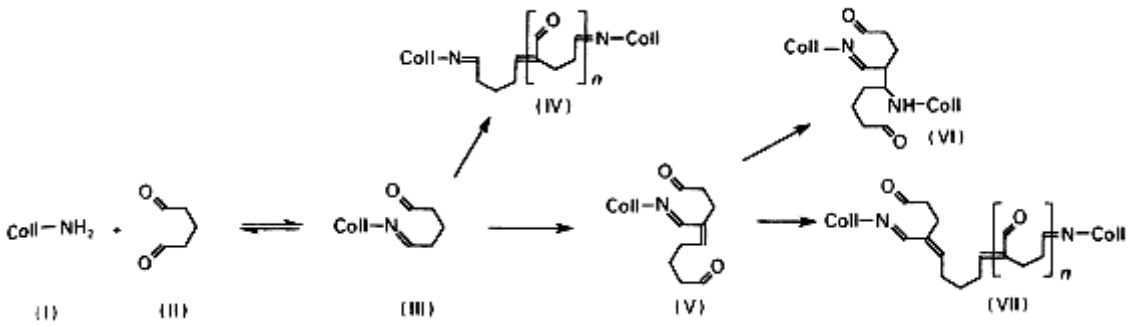


Figura 2.10 – Eventos ocorridos na formação de ligações cruzadas entre o glutaraldeído e a molécula de colágeno (SHEU *et al.*, 2001).

Outros tratamentos químicos que promovem a formação de ligações cruzadas são: esterificação, acilação, deaminação do grupo ε-amino da lisina e o impedimento de grupos guanidina de resíduos de arginina (BET *et al.*, 2001).

MARTINS & GOISSIS (1996) desenvolveram o colágeno aniônico, onde o colágeno natural é modificado quimicamente por hidrólise seletiva dos grupos carboxiamida de resíduos de Asn (Asparagina) e Gln (Glutamina) presentes nas cadeias polipeptídicas. Estes grupos são os únicos, exceto pela ligação peptídica, susceptíveis de alteração química, nas condições de formação de fosfato de cálcio. Como resultado, tem-se um aumento significativo da densidade de carga dentro do período (Figura 2.7).

Outro fator importante no colágeno aniônico é o efeito piezoelétrico presente, provavelmente devido o aumento do número dos sítios com carga negativa. Sabe-se que para se promover a formação de osso saudável é essencial à presença de uma estimulação mecânica que seja capaz de impulsionar a modelagem, remodelagem e a mineralização de forma eficiente. Alguns grupos vêm estudando a capacidade piezoelétrica do colágeno aniônico e de seu compósito com a hidroxiapatita (SILVA *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2002)

BET e colaboradores (2001) verificaram que embora a estrutura hélice tripla seja preservada, a presença de uma maior quantidade de sítios negativos nas moléculas de colágeno provoca um decréscimo na estabilidade térmica e uma perda gradual da capacidade dessas moléculas formarem fibrilas.

2.7 - Composito Fosfato de Cálcio/Colágeno

Existem algumas desvantagens específicas que ainda limitam o uso da HA cerâmica para substituição de tecidos duros, tais como sua natureza frágil, a realidade conflitante entre porosidade e resistência mecânica e o problema de migração das partículas. Devido o osso ser um tecido que requer algum grau de tensão mecânica para manter sua vitalidade, a segurança a longo prazo de um implante permanente de HA é questionável. A fim de minimizar, ou até mesmo superar estes problemas, uma solução seria misturá-la a um ligante adequado. Nesse sentido, têm sido empregados vários biopolímeros, tais como colágeno, cola de fibrila, gelatina, quitosana e o alginato (BAKOS *et al.*, 1999; HSU *et al.*, 1999; DU *et al*., 2000; SIVAKUMAR & RAO, 2002).

Os compósitos, de um modo geral, têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido à possibilidade de se combinar as vantagens de diferentes materiais. O compósito de HA/colágeno apresenta característica singular, uma vez que são os principais constituintes da fase mineral e orgânica do osso, respectivamente (SIVAKUMAR & RAO, 2002). No osso, a interação fosfato de cálcio/colágeno possui papel importante na determinação das suas propriedades mecânicas (LAWSON & CZERNNUSZKA, 1998).

Um aspecto fundamental na síntese do compósito HA/colágeno é o crescimento do fosfato de cálcio sobre a matriz de colágeno em meio aquoso de forma semelhante ao osso natural, estruturalmente e composicionalmente. Alguns estudos mostram que as propriedades mecânicas dos compósitos produzidos são de menor alcance que os valores obtidos para o osso (KANNAN *et al.*, 2001).

Em 1995, TENHUISEN *et al.* produziram compósitos contendo hidroxiapatita deficiente em cálcio microcristalina e colágeno. Nesse estudo foi realizada uma reação ácido-base entre precursores do fosfato de cálcio ($CaHPO_4$ e $Ca_4(PO_4)_2O$), na presença de uma matriz de colágeno a 38^oC. As razões em peso entre HA:Colágeno nos compósitos obtidos foi de 4,5:1, 11:1, 22:1. Verificou-se que a taxa de formação da HA aumenta à medida que a concentração de colágeno aumenta, e que a presença de colágeno afeta o pH e as concentrações de cálcio e fosfato.

Alguns pesquisadores acreditam que para alcançar propriedades similares ao osso é essencial mimetizar não somente a composição, como também sua estrutura. BRADT *et al.* (1999), promoveram a formação de fosfato de cálcio sobre fibrilas de colágeno. Nesse estudo a formação das fibrilas de colágeno e a mineralização ocorrem num único processo. Ambas reações são iniciadas pela mistura simultânea de um ácido a uma solução de colágeno contendo cálcio e um tampão neutralizador contendo fosfato. Além disso, foi estudada a influência do poliaspartato na mineralização. Verificou-se que a adição de poliaspartato melhora a interação entre o fosfato de cálcio e o colágeno.

DU e colaboradores (2000), apresentaram um método simples para produzir a matriz de fosfato de cálcio/colágeno. Pelo ajuste das condições de reação, obtiveram

vários tipos de compósitos, incluindo os compósitos de fosfato de cálcio não-cristalino/colágeno, hidroxiapatita carbonatada pouco cristalina/colágeno e hidroxiapatita carbonatada pouco cristalina + fosfato tricálcico/colágeno. Testes histológicos destes materiais revelaram uma resposta tecido-célula promissora para o compósito hidroxiapatita carbonatada pouco cristalina + fosfato tricálcico/colágeno (KANNAN *et al.*, 2001).

O grupo coordenado pelos professores Kikuchi e Tanaka, talvez seja o que tenha chegado mais próximo de uma configuração composicional e estrutural do compósito HA/colágeno semelhante ao osso (KIKUCHI *et al.*, 1999; KIKUCHI *et al.*, 2001; CHANG & TANAKA, 2002a). Para produção do compósito HA/colágeno foi utilizado o método de precipitação por titulação, utilizando-se como reagentes uma solução de $Ca(OH)_2$ (61,3 mmol.L^{-1} de H_2O) e uma solução de H_3PO_4 (99,6 mmol.L^{-1} de H_2O) contendo 5g de colágeno. A razão em peso de HA/colágeno utilizada foi fixada em 4:1, e variou-se a temperatura e pH de síntese entre 25-40^oC e 7-9, respectivamente. Nanocristais de HA alinhados ao longo do eixo c de fibras de colágeno foram obtidos em pH 8-9 e 40^oC de forma semelhante aos encontrados no osso natural. Testes mecânicos realizados apresentaram variação com o grau de organização do compósito: os valores máximos encontrados para resistência à flexão em 3 pontos e módulo de Young foram 39,5±0,88 MPa e 2,5±0,38 GPa, respectivamente. CHANG & TANAKA (2002b) usaram a Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS) para avaliar esses compósitos, confirmando a formação de uma ligação covalente entre o Ca^{2+} da HA e grupamentos $RCOO^-$ da molécula de colágeno.

Outros trabalhos publicados não avançaram em relação aos resultados já obtidos. ROVERI e colaboradores (2003) produziram o compósito HA/Col tipo I (razão em peso 80/20) pelo processo de neutralização usando solução de $Ca(OH)_2$ e H_3PO_4. O pH da reação foi ajustado entre 9-10 e a temperatura em 25^oC. Foi verificado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) que os nanocristais de HA estão alinhados com seus eixos c ao longo do comprimento das fibras de colágeno.

No mercado brasileiro existe comercialmente à disposição um compósito HA/colágeno em forma esponjosa. É um material composto de 25% de colágeno e 75% de HA. Segundo o fabricante JHS, o processo de fabricação mantém intacta a

configuração helicoidal das moléculas de colágeno, assim como sua estrutura fibrosa. Este material é comercializado em embalagem, contendo de uma a três mantas com volumes médios de 0,9 ou 0,3 cm^3, selada e esterilizada em óxido de etileno, (JHS, 2002).

2.8 - Interação Célula-Biomaterial

Estudos *in vitro* utilizando cultura de células são usados rotineiramente para determinação de biocompatibilidade e para investigar a interação entre células e biomaterial. Osteoblastos, células responsáveis pela formação de tecido ósseo, são as mais freqüentemente utilizadas (LEGEROS, 2002). Células mesenquimais isoladas da medula óssea também podem ser utilizadas uma vez que se diferenciam em osteoblastos quando estímulos certos são fornecidos (SIEBES *et al*., 2004). Os fenômenos envolvidos na interação célula-material são adsorção, adesão, espalhamento e diferenciação.

Quando um material é inserido num defeito tecidual (*in vivo*) ou em meio de cultura (*in vitro*), entra em contato imediatamente com os componentes do fluído biológico ou meio de cultura. A superfície do material é envolvida por componentes do sangue ou por proteínas do soro que é adicionado ao meio de cultura. Portanto, seja *in vivo* ou *in vitro*, as células nunca estabelecem contato direto com a superfície do material, mas sim com a camada protéica que se forma sobre a superfície. Para que haja formação do tecido ósseo é necessário que ocorra uma série de eventos que envolvem a mineralização de proteínas da matriz extracelular (colágeno) mediada por osteoblastos com funções específicas de manter a integridade do tecido. As moléculas envolvidas nesse processo de adesão celular são as integrinas, que podem passar informações da matriz extracelular para as células e vice-versa. Esse caminho de sinalização que regula o comportamento celular será definido pelo material a ser utilizado (LEGEROS, 2002; SIEBERS *et al.*, 2004). Após a fase de adesão, a fase de espalhamento estabelece o primeiro contato entre a célula e material. A partir desse momento a célula passa a expressar seu fenótipo, sintetizando proteínas da matriz extracelular e adquirindo forma específica (CHESMEL *et al*., 1995).

2.9 - Técnicas de Caracterização dos Materiais

2.9.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica dos materiais é de fundamental importância para se definir seu comportamento, sendo assim, a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem se demonstrado essencial na observação e 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. A interação feixe-amostra gera uma série de sinais, como elétrons secundários, por exemplo, que são captados por um detector. Após a amplificação, o sinal gerado modula o brilho de um tubo de raios catódicos (TRC), que é varrido de forma sincronizada com a varredura da superfície da amostra, gerando uma imagem ponto a ponto da superfície examinada. O MEV é geralmente utilizado para observação de amostras espessas, ou seja, não transparentes a elétrons. 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.

A imagem no MEV pode ser formada a partir de diversos mecanismos de contraste, como o contraste topográfico e o contraste de número atômico (ou composicional). O contraste topográfico é o mecanismo mais utilizado, sendo indicado para observações do relevo das superfícies. Utiliza sinais produzidos pelos elétrons secundários, elétrons com baixa energia oriundos da superfície da amostra, permitindo visualização de detalhes topográficos com elevada definição. O contraste de elétrons retroespalhados é usado na identificação de fases com composições químicas diferentes, sendo dependente do número atômico das espécies envolvidas. Os elétrons retroespalhados são elétrons de maior energia oriundos de uma maior profundidade da amostra.

Dois são os processos empregados usualmente para a geração de elétrons: fonte termo-iônica e fonte de emissão por efeito de campo (FEG – *Field Emission Gun*). A

fonte termo-iônica apóia-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. Por ter menor custo e maior estabilidade, é a fonte 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. Esta última característica é particularmente útil no estudo de filmes finos, pois faz com que a imagem de elétrons secundários seja formada por elétrons arrancados predominantemente das camadas superficiais do material.

2.9.2 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica de alto poder resolutivo para a observação direta de estruturas, formando imagens em níveis atômicos.

A emissão de elétrons pelo catodo permite a formação da imagem do objeto na objetiva quando defletidos por lentes eletromagnéticas, e, de maneira semelhante ao que ocorre no microscópio óptico, o condensador focaliza o feixe no plano do objeto. Pelo fato dos elétrons serem facilmente desviados pelo objeto, é necessário utilizar cortes muitos finos (20 a 100 nanômetros) que são produzidos em ultramicrótomos. A preparação da amostra é a maior limitação do MET, pois esta deve ser suficientemente fina para que a intensidade de feixe que a atravessa consiga gerar uma imagem interpretável. Além disso, o processo utilizado na preparação da amostra pode afetar sua estrutura e composição.

Enquanto no microscópio óptico a luz é absorvida pelas estruturas coradas, no eletrônico os elétrons são desviados por porções do objeto que contenham átomos de elevado peso atômico. Como resultado, as estruturas que desviam os elétrons, chamadas de elétron-densas, aparecem escuras na tela fluorescente. A capacidade de desviar os elétrons depende do número atômico, por isso, no caso de materiais biológicos, se

costuma impregnar os cortes com metais pesados a fim de aumentar o contraste, resultando assim uma imagem nítida e bem visível. Os íons metálicos mais usados para essa "coloração eletrônica" são ósmio, chumbo e urânio.

A difração de elétrons é o fenômeno de espalhamento mais importante em MET. Pela posição do feixe de elétrons difratado é possível determinar o tamanho e forma da célula unitária, bem como o espaçamento entre os planos cristalinos. A distribuição, quantidade e tipo dos átomos na amostra podem ser definidos por intermédio de sua intensidade.

A análise por difração de elétrons de alta energia, normalmente 100 a 200 KeV, é realizada colocando-se um filme muito fino da amostra sólida no caminho do feixe de elétrons.

2.9.3 - Difração de Raios-X (DR-X)

Trata-se da principal técnica para a caracterização de materiais, sendo possível determinar as diferentes substâncias e fases cristalográficas presentes, assim como os parâmetros de rede da célula unitária.

Os raios-X são produzidos quando elétrons são acelerados a partir do cátodo (um filamento de tungstênio) e atingem o ânodo metálico (CuKα, λ= 1.5418), 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 ICDD (*International Center for Diffraction Data*, antigo JCPDS- *Joint Committee of Powder Diffraction Standards*) da ASTM para os vários fosfatos de cálcio. Tratamentos matemáticos possibilitam a identificação precisa dessas fases, do grau de cristalinidade do material e do tamanho médio dos cristais.

O espaçamento dos átomos numa grade cristalina pode ser determinado pela medida dos ângulos e intensidade pelos quais um feixe de raios-X, de um dado

comprimento de onda, é difratado pelas camadas de elétrons ao redor dos átomos. O espaçamento dos diferentes tipos de átomos em moléculas orgânicas complexas, mesmo aquelas muitos grandes como as proteínas, também pode ser analisado por métodos de difração de raios-X. Entretanto, esta é uma tarefa de execução muito mais difícil do que para cristais simples, devido ao grande número de átomos na molécula de proteína liberar milhares de pontos de difração, que precisam ser analisados por computadores (LENNINGER, 1998).

2.9.3.1 – Análise da Microestrutura por DR-X pelo Método de Rietveld

Vários são os métodos de caracterização de materiais que empregam a difração de raios-X para fazer indexação de fases cristalinas; refinamentos de cela unitária; análise de fases; determinação e refinamento de estruturas cristalinas; determinação de tamanho de cristalito, microestrutura e orientação preferencial.

O método de Rietveld foi uma das primeiras técnicas analíticas de difração de agregados policristalinos, usado para o refinamento da estrutura cristalina e das características do perfil da reflexão e do fundo (YONG, 1995). O método de Rietveld permite realizar simultaneamente o refinamento de cela unitária, estrutura cristalina, análise quantitativa de fases, e determinação de orientação preferencial. A estrutura cristalina é refinada de forma que a diferença entre o difratograma calculado com base na estrutura cristalina e o difratograma observado é mínima possível, ou seja, a convergência seja alcançada.

O modelo estrutural adotado por Rietveld inclui vários tipos de parâmetros. Os *Parâmetros da estrutura cristalina* são: coordenadas (x,y,z) da posição dos átomos na célula unitária; deslocamentos vibratórios dos átomos; densidade ocupacional das posições atômicas; dimensões (a,b,c) da célula unitária e ângulos (α,β,γ) entre os vetores. Os *Parâmetros do perfil das reflexões* são: largura das reflexões, assimetria e forma. Os *Parâmetros globais* são: a função de fundo que engloba o comprimento de onda (α1, α2) e o zero da escala 2θ. Os *Parâmetros da intensidade* incluem o fator de escala, que ajusta a altura de todas reflexões do difratograma observado, e o *Parâmetro de correção da orientação preferencial dos cristalitos da amostra* (CASTRO & FERREIRA, 1998).

As deformações micro-estruturais são freqüentemente estudadas por DRX, estas afetam a forma e a largura das reflexões de Bragg podendo ser atribuídas a dois fatores: variação do parâmetro de rede e tamanho dos cristalitos. A escolha do modelo adotado deve levar em consideração tais fatores para que o ajuste obtido seja o melhor possível.

A largura das reflexões a meia altura (FWHM do inglês: *full width at half height*) pode ser atribuída à soma das larguras geradas pelas condições e características do equipamento, chamadas de condições instrumentais, e as intrínsecas da amostras, dada pela expressão:

$$FWHM_{Total} = \beta_{total} = \beta_{instrumental} + \beta_{intrínseco} \quad (2.3)$$

Da mesma maneira, o alargamento devido à condição intrínseca da amostra deve ser considerado como a soma da contribuição do tamanho dos cristais (β_{tc}) e de possíveis formações mecânicas internas da cela unitária associadas à existência de tensões residuais (β_{def}), ou seja,

$$\beta_{intrínseco} = \beta_{tc} + \beta_{def} \quad (2.4)$$

Entre as funções utilizadas como modelo para ajustar o difratograma gerado pela amostra, a função pseudo-Voigt conforme modificada por Thompson é a mais utilizada. A largura dos picos a meia altura é dada pela seguinte equação:

$$\Gamma = \Gamma_G^5 + 2{,}69269\Gamma_G^4\Gamma_L + 2{,}42843\Gamma_G^3\Gamma_L^2 + 4{,}47163\Gamma_G^2\Gamma_L^3 + 0{,}07842\Gamma_L^4 + \Gamma_L^5)^{1/5} \quad (2.5)$$

onde $FWHM_{Total} = \Gamma$ e é representada por um polinômio da largura a meia altura da Gaussiana (Γ_G) e da Lorentziana (Γ_L) pelas expressões abaixo:

$$\Gamma_G^2 = U\tan^2\theta + V\tan\theta + W + \frac{I_G}{\cos^2\theta} \quad (2.6)$$

e

$$\Gamma_L = X\tan\theta + \frac{Y}{\cos\theta} \quad (2.7)$$

onde os parâmetros U, V, W, I_G, X e Y podem ser refinados para obter um bom ajuste do perfil da reflexão.

No caso de materiais com comportamento anisotrópico, é possível introduzir diferentes funções para calcular a contribuição produto das deformações ou do tamanho de partículas ao perfil da reflexão. Com isso as expressões 2.6 e 2.7 ficarão:

$$\Gamma_G^2 = (U + D_{ST}^2)\tan^2\theta + V\tan\theta + W + \frac{I_G}{\cos^2\theta} \tag{2.8}$$

e

$$\Gamma_L = X\tan\theta + \frac{Y + F_z}{\cos\theta} \tag{2.9}$$

onde D_{ST} e F_z são funções que podem ter diferentes expressões dependendo do modelo utilizado.

O tamanho médio dos cristalitos ($TC_{lorentziana}$) em um material isotrópico, como é o caso deste trabalho, é calculado mais precisamente pelo ajuste do difratograma utilizando o parâmetro Y da equação 2.7. No caso dos materiais com comportamento anisotrópico, o tamanho das partículas podem ser calculado utilizando os parâmetros da função F_x presente na equação 2.9.

O fim do refinamento é alcançado quando os parâmetros refinados não variam mais e a função de minimização atingiu o valor mínimo. Os indicadores que são monitorados durante o processo do refinamento e que fornecem um subsídio para tomar decisões sobre o prosseguimento são: o R ponderado (R_{wp}), o "Goodness-of-fit-index" (Chi^2), que estão relacionados com o perfil do difratograma, e o R_{BRAGG}, que está relacionado com a estrutura cristalina.

O R ponderado, R_{wp}, é definido como:

$$R_{wp} = 100.\ [\ (\Sigma_j\ w_j\ (y_{oj} - y_i)^2) / \Sigma_j\ w_j\ y^2_{oj}\ ]^{1/2} \tag{2.10}$$

onde y_{oj} e y_j, são as intensidades observadas e calculadas no ponto i do difratograma de difração e w_i é o valor ponderado das intensidades.

O R_{wp} é o índice que deve ser monitorado para verificar se o refinamento está convergindo. Se o R_{wp} está diminuindo, então o refinamento está sendo bem sucedido. Se o R_{wp} está aumentando, então algum(ns) parâmetro(s) está(ão) divergindo do valor real, ou seja, está(ão) se afastando do valor que fornece uma função de minimização mínima e o refinamento deve ser interrompido para uma análise mais detalhada dos parâmetros que estão sendo refinados.

O índice de ajuste ou qualidade de refinamento (Chi^2) *é* dado pela expressão:

$$Chi^2 = R_{wp}/R_e \tag{2.11}$$

onde o R_e é o valor estatisticamente esperado para o R_{wp}.

Normalmente, a ordem de grandeza de R_{wp} situa-se entre 20 e 30%, para refinamentos com Raios-X. Estes valores dependem do tempo de contagem, do número de impulsos conveniente para uma boa estatística de contagem (5000-20000), da orientação preferencial e do número de parâmetros variáveis (REIS & FERREIRA, 1998). Teoricamente, o Chi^2 deve ser próximo de 1.0 ao final do refinamento, significando que R_{wp} atingiu o limite que se pode esperar para aqueles dados de difração medidos.

O R_{BRAGG} é uma função das intensidades integradas dos picos, utilizado para avaliar a qualidade do modelo estrutural refinado segundo a equação abaixo:

$$R_{BRAGG} = 100.\ [\Sigma(|\text{“}I_o\text{”} - I_c|) / (\Sigma\text{“}\ I_o\text{”})] \tag{2.12}$$

onde a intensidade integrada está relacionada com a estrutura cristalina (tipos de átomos, posições e deslocamentos atômicos.

A adoção de um modelo adequado e a qualidade do difratograma são requisitos essenciais para obtenção de um ajuste perfeito no refinamento. Por exemplo, largura das reflexões individuais do difratograma é fortemente influenciada pelas características do equipamento, que introduz um componente instrumental, cuja determinação é necessária quando se pretende calcular tamanho e as tensões dos cristalitos (REIS & FERREIRA, 1998).

2.9.4 - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (IV-TF) e com Estágio de Refletância Difusa (IV-RD)

A radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O fato de cada grupo funcional absorver uma dada freqüência característica permite que por meio de um gráfico de intensidade de radiação versus freqüência, o espectro de IV, seja possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido (CIENFUERGOS & VAITSMAN, 2000).

Acessórios como o ATR (*Attenuated Total Refletance*) permitem uma maior energia superficial no sistema, com isso a resposta do detector do espectrômetro IV-TF é maior, resultando em uma maior sensibilidade (CIENFUERGOS & VAITSMAN, 2000). A aquisição de dados pelo método de refletância difusa permite analisar a superfície do material de forma não destrutiva, numa profundidade de aproximadamente 0,5μm, podendo-se detectar teores na ordem de uma parte por milhão dos compostos presentes (HENCH, 1982).

A espectroscopia no infravermelho permite identificar algumas substituições ou alterações importantes na composição da HA, particularmente nos grupos fosfatos e hidroxila. Essas informações são obtidas pela excitação dos modos de energia vibracionais destes grupos moleculares dentro da estrutura dos sólidos. Pode-se diferenciar a substituição dos grupos OH^- e $(PO_4)^{3-}$ pelos grupos $(CO_3)^{2-}$ por meio da presença de bandas em 873, 1465, 1534cm^{-1} e 874, 1420, 1455cm^{-1}, respectivamente (ELLIOT, 1994).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Produzir e caracterizar compósitos de HA/Colágeno do tipo I para utilização como enxertos ósseos ou como arcabouços para Engenharia de Tecidos.

3.2 - Objetivos Específicos

1) Caracterização físico-química e textural dos compósitos.

2) Verificar a influência do tratamento de hidrólise na molécula de colágeno nas propriedades químicas e estruturais da fase mineral formada.

3) Avaliar a morfologia de osteoblastos cultivados sobre os compósitos formados, nos tempos de 4 horas, 7 dias e 14 dias de cultivo.

4 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 - Caracterização dos Colágenos

O trabalho na sua fase inicial envolveu o uso de diferentes formas de colágeno: gel em meio ácido, mantas e blocos cilíndricos liofilizados. Como resultado foi verificado que a utilização do colágeno na forma de gel proporciona uma interação mais efetiva entre a molécula de colágeno e a fase mineral formada (SENA, 2003). Em função disto, a produção dos compósitos nas etapas seguintes foi realizada utilizando-se colágeno do tipo I, oriundo de tendão bovino, na forma de gel. Os colágenos utilizados, fornecidos pelo grupo coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto Goissis, do Instituto de Química da USP de São Carlos, foram: os colágenos nativo (CN) e aniônico (CA) na forma de gel em solução de ácido acético pH 3,5. O colágeno aniônico (CA) possui um incremento de cerca de 46 grupos carboxílicos por molécula de tropocolágeno. Este resultado é obtido da titulação potenciométrica do colágeno natural submetido ao tratamento de hidrólise (MARTINS & GOISSIS, 1996).

As técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, Zeiss, DMS 940A) e Espectroscopia no Infravermelho com Estágio de Refletância Difusa (IV-RD, NICOLET, MagnaIR-760) foram empregadas para caracterizar os materiais de partida. Para isso foi necessária substituição do meio de ácido acético para aquoso por meio de diálise seguido de posterior liofilização para determinação da concentração do colágeno em solução de ácido fosfórico.

A caracterização morfológica dos materiais foi realizada por MEV. Para obter melhor contraste das imagens foi indispensável recobrir as amostras com ouro (BALZERS). O material também foi analisado por DR-X conforme condições descritas a seguir para o compósito.

A fim de verificar uma possível alteração nas propriedades químicas e estruturais das moléculas dos colágenos (CN e CA) em função das condições de síntese, foi realizada uma exposição do colágeno à temperatura, tempo de digestão e pH típicos da síntese do compósito (Tabela 4.1). Além da secagem por liofilização, o produto final

também foi seco no aparelho de ponto crítico de CO_2 (BAL-TEC CPD 030) para se preservar a estrutura das fibras.

4.2 - Preparação dos Compósitos HA/Colágeno

Experimentos preliminares realizados mostraram que a metodologia de síntese adotada está ligada à forma do colágeno utilizada. Conforme foi dito anteriormente, a utilização do colágeno na forma de gel proporciona um contato mais íntimo entre a fase mineral formada e a molécula de colágeno. Na tabela 4.1 são apresentadas as condições de síntese do compósito. As razões em peso dos compósitos HA/Colágeno produzidos foram de: 80:20; 50:50 e 10:90. Com o colágeno nativo foi adicionalmente produzido o compósito HA/CN com razão 20:80. A concentração dos reagentes, que está relacionada com a razão entre as fases, inicialmente foi baseada no trabalho desenvolvido por KIKUCHI *et al*. (1999). Posteriormente, a escolha das razões entre as fases foi feita objetivando-se maximizar a interação da HA com a molécula de colágeno. Antes da realização da síntese foi necessário proceder a uma diálise, passando o colágeno de um meio de ácido acético para um meio de ácido fosfórico.

Na preparação do compósito, os reagentes (H_3PO_4 + Colágeno) e $Ca(OH)_2$ foram adicionados simultaneamente, com auxílio de bombas peristálticas, à 25mL de H_2O MilliQ. A reação envolvida no processo de síntese da HA é a seguinte (LEGEROS, 1994):

$$10\ Ca(OH)_2 + 6\ H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18\ H_2O \qquad (3.1)$$

Para ajustar o pH na faixa desejada foi necessária a adição de solução de NH_4OH concentrada. Após a digestão, o material foi filtrado e lavado com H_2O MilliQ até que o pH do filtrado ficasse em torno de 7. Posteriormente alíquotas do material foram retiradas e fixadas em solução de glutaradeído 2,5%. O material fixado foi dividido em duas partes: uma para preparação por secagem no aparelho de ponto crítico de CO_2 para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, Zeiss, DMS 940A, PEMM) e a outra para inclusão em resina e cortes no ultramicrótomo (RMC XT 6000-XL, Research and Manufacturing Co.) para análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET, Phillips CM20). O procedimento de preparação das amostras está

descrito no Anexo I. O restante de material não fixado foi inserido em molde plástico e liofilizado (FTS SYSTEM, Flexi-Dry FD-1-54A).

Tabela 4.1 – Condições de síntese do compósito HA/Colágeno.

CONDIÇÕES DE SÍNTESE
Temperatura: 37^{o}C
pH: 8 – 9
Tempo de Digestão: 6h
Agitação média (180 rpm)
Ca/P teórica: 1,67
Soluções de $Ca(OH)_2$ e H_3PO_4, concentrações dependentes da quantidade de HA formada

Os compósitos obtidos, bem como a hidroxiapatita (HA) preparada nas mesmas condições, foram caracterizados por MEV para avaliação morfológica; Difração por Raios-X (DR-X, RIGAKU ROTAFLEX, IF/USP São Carlos) para determinação das fases cristalinas presentes e Espectroscopia no Infravermelho com estágio de Refletância Difusa (IV-RD, Spectra Tech) para identificação de grupamentos químicos tanto da fase inorgânica quanto da fase orgânica, além da detecção de impurezas.

As medidas de DR-X foram processadas num difratômetro de pó operando com radiação de CuKα (λ = 1,5418Å) a 30kV e 15mA. Os difratogramas foram obtidos no intervalo angular de 10 a 100 graus em 2θ, no passo de 0,02 graus por 5s. Inicialmente, a identificação da(s) fase(s) foi feita com auxílio de fichas ICDD (*International Center for Diffraction Data*).

Para analisar mais precisamente os padrões de difração, foi feito o refinamento dos difratogramas da HA pura e dos compósitos obtidos para determinação do tamanho de cristal. O método de Rietveld foi empregado utilizando-se o programa *FullProf_Suite*. Para quantificar o alargamento instrumental causado pelo equipamento ou por condições instrumentais, a amostra padrão LaB_6 (Aldrich, partículas < 10μm) foi processada nas mesmas condições dos compósitos e da HA. A função resolução instrumental foi obtida refinando-se os parâmetros U, V, W, X e Y do difratograma do padrão.

Foi feita uma análise anisotrópica nos difratogramas das amostras de HA e compósitos, ou seja, foi utilizado o I*sizeModel* = -1 e direção preferencial (001), onde se assumem domínios em forma de agulhas. Os seguintes parâmetros foram refinados: escala, ruído de fundo, zero, fatores referentes ao tamanho e microdeformação (Y e U), parâmetros de cela (a,b,c e gama), GauSize, LorSize. Inicialmente o refinamento foi executado em toda faixa de ângulo processado, ou seja, de $\theta = 10^o$ a $\theta = 100^o$. Verificou-se que a exclusão da região entre $\theta = 10^o$ e $\theta = 18^o$, de forte influência devido à presença do colágeno ou até de cristais amorfos, possibilitou melhores ajustes dos índices de concordância. Esse procedimento não influenciou no refinamento da HA pura.

Os compósitos HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90 secos no aparelho de ponto crítico também foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG, JEOL JSM-6340F equipado com um canhão de elétrons por efeito de campo, ICB/UFRJ).

4.3 - Cultura de Células sobre os Compósitos

Para realização desta etapa do trabalho foram utilizados os compósitos HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90 secos por liofilização. Seções cilíndricas de aproximadamente 10mm de diâmetro e 2mm de altura foram empregadas. Esses materiais foram esterilizados com óxido de etileno. Para promover uma melhor adesão celular e estabilizar o pH inicial do meio de cultivo, os compósitos foram colocados em placas de cultivo e imersos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 48 horas. Posteriormente, a solução PBS foi retirada e células foram inoculadas sobre as superfícies dos materiais, sendo em seguida introduzido meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB).

O experimento foi realizado utilizando-se osteoblastos na sexta passagem, sendo inoculadas aproximadamente $1{,}0\times10^5$ células sobre os compósitos. As células foram monitoradas em 4h, 7dias e 14dias em cultivo. Lamínulas de vidro foram utilizadas como superfície controle. Todo o procedimento com células foi conduzido no Banco de Células do Rio de Janeiro do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ.

A morfologia das células sobre os materiais foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM 6460LV, PEMM). O procedimento de preparação das amostras é apresentado no Anexo 1.

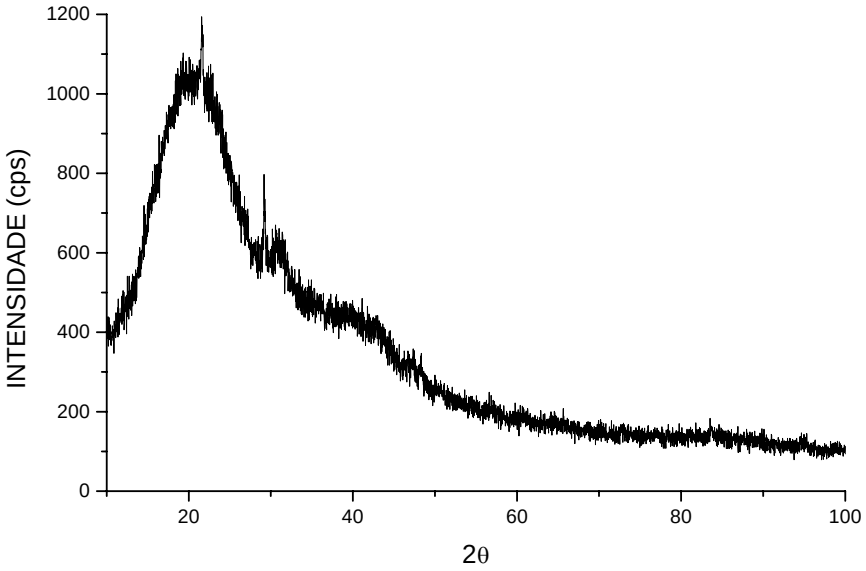
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização Estrutural e Química

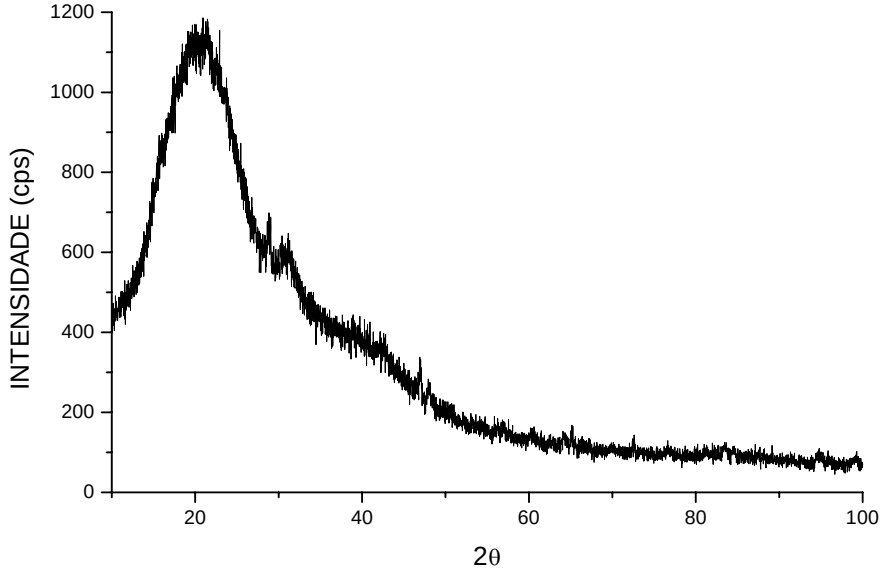
5.1.1 – Colágenos

A Figura 5.1 apresenta os difratogramas de Raios-X dos colágenos nativo (CN) e aniônico (CA). Ambos os materiais apresentaram um pico amorfo na região entre 10-60^{o}. Este resultado é compatível com o encontrado por MARTINS & GOISSIS (1996). Não é possível verificar nenhuma diferença entre os perfis obtidos.

A Figura 5.2 mostra os espectros de infravermelho por refletância difusa dos colágenos CN e CA submetidos às condições de síntese, e na Tabela 5.1 são indicados os modos vibracionais presentes. Os espectros apresentam bandas características de uma proteína: em torno de 1600-1700 cm^{-1} indica o estiramento de uma carbonila; em 1560 cm^{-1} é associada a vibrações da amida II no plano da ligação N-H; em 1450 cm^{-1} indica a presença dos anéis pirrolidínicos da prolina e hidroxiprolina, e a banda próxima a 3400 cm^{-1} devido ao estiramento O-H. Também é possível verificar a presença de bandas características dos grupos PO_4^{3-}, incorporados durante o processo de extração do colágeno. Embora existam algumas variações em relação à intensidade dos modos vibracionais detectados, os valores obtidos estão de acordo com os mencionados na literatura (BET *et al.*, 2001; TONHI & PEPLIS, 2002). Além disso, a razão de intensidade relativa das bandas 1240 e 1450 cm^{-1} próxima a 1, em ambos materiais é, segundo SYLVESTER (1989), indicativa da preservação da estrutura secundária em tripla hélice da molécula de tropocolágeno.

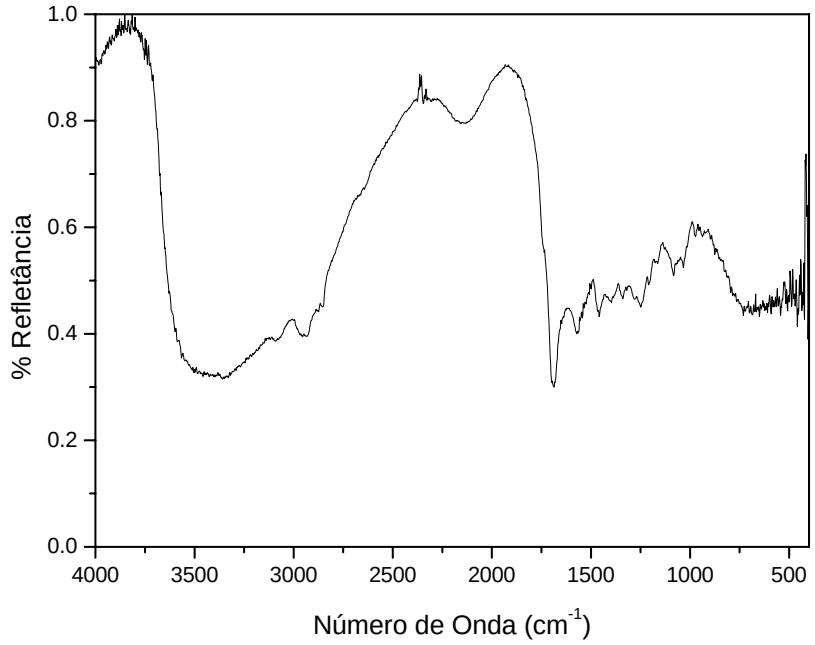


(a)

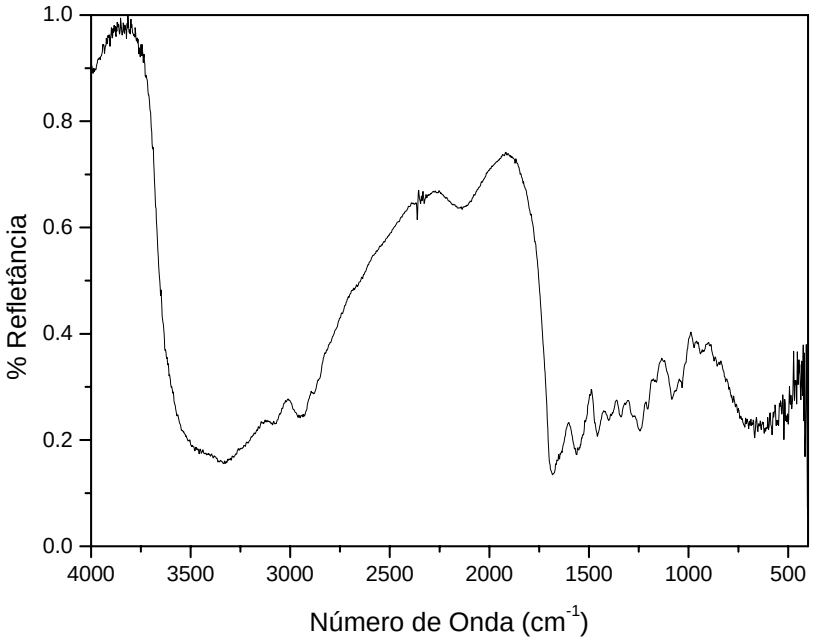


(b)

Figura 5.1 – Difratogramas de Raios-X dos colágenos: (a) nativo – CN; (b) aniônico – CA.



(a)



(b)

Figura 5.2 – Espectros de infravermelho obtido por refletância difusa dos colágenos submetidos à condição de preparação do compósito, sem formar fase mineral: (a) CN e (b) CA.

Tabela 5.1 - Modos vibracionais característicos dos grupamentos funcionais presentes nos colágenos apresentados na Figura 5.2[a].

Grupamento	CN	CA
O-H, N-H (Amida A)	3360	3333
C-H (Amida B)	3092	3089
	2954	2950
C=O (Amida I)	1687	1682
N-H (Amida II)	1572	1562
Anel pirrolidínico	1458	1458
	1396	1400
$-COO^-$	1340	1337
Amida III	1274	1277
C-N (Amida III), N-H (Amida I)	1245	1245
$\mathbf{PO_4^{3-}}$	1083	1081
$\mathbf{PO_4^{3-}}$	1034	1058
$\mathbf{PO_4^{3-}}$ $\boldsymbol{\nu_1}$	975	970
$\mathbf{PO_4^{3-}}$	929	940
$\mathbf{PO_4^{3-}}$ $\boldsymbol{\nu_4}$	[b]	[b]
$\mathbf{PO_4^{3-}}$ $\boldsymbol{\nu_4}$	[b]	[b]
$\mathbf{PO_4^{3-}}$ $\boldsymbol{\nu_2}$	[b]	[b]

[a] Resultados em números de onda (cm^{-1}).
[b] Região apresenta ruído intenso.

5.1.2 - Hidroxiapatita Sintética (HA)

A Figura 5.3 apresenta o difratograma de Raios-X da hidroxiapatita (HA) obtida nas mesmas condições de preparação dos compósitos, mas sem a presença de colágeno. Pela comparação do difratograma padrão disponível no banco de dados ICDD (Ficha 9-432), observa-se a presença dos picos característicos da hidroxiapatita. O difratograma apresenta um perfil composto de bandas largas que pode estar associado a diferentes características do material: presença de cristais com dimensões nanométricas, presença

de defeitos na estrutura e baixa cristalinidade do pó formado (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1994). Não foram detectadas reflexões referentes a outras fases de fosfatos de cálcio.

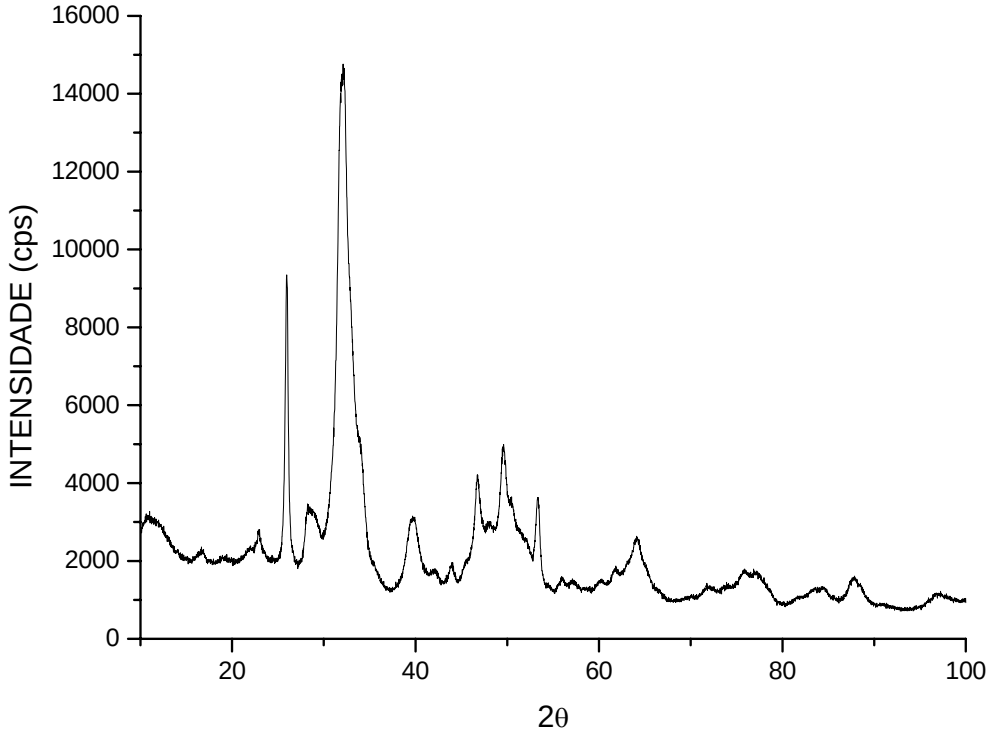


Figura 5.3 – Difratograma da Hidroxiapatita (HA) obtida.

A Figura 5.4 apresenta o diagrama de Rietveld obtido pela análise do difratograma da Figura 5.3. A região de 10-18^{o} foi excluída do refinamento para evitar a interferência do pico largo de difração do colágeno quando presente. A Tabela 5.2 contém os índices de concordância finais obtidos no refinamento. Os valores encontrados são compatíveis com os apresentados na literatura (REIS & FERREIRA, 1998; BAIG *et al*., 1999).

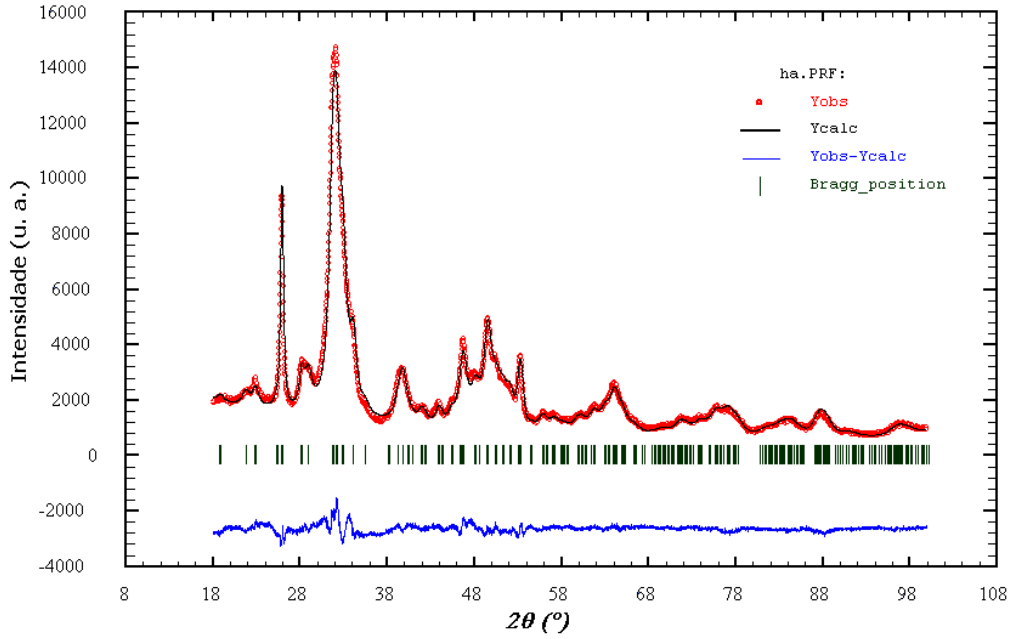


Figura 5.4 – Diagrama de Rietveld da HA (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).

Tabela 5.2 – Índices de concordância finais dos refinamentos da HA.

	R_{wp} (%)	R_{Bragg} (%)	R_p (%)	R_e (%)	Chi^2
HA	8,96	3,65	4,25	2,22	5,82

Os resultados estruturais obtidos no refinamento são apresentados na Tabela 5.3. Os cristais formados possuem dimensões nanométricas e um crescimento preferencial segundo a direção 002. A dificuldade de ajuste das reflexões nas regiões de 25° e entre 31-34° pode estar relacionada à presença de grupamentos carbonatos na estrutura da HA formada, uma vez que as reflexões para HA e para hidroxiapatita carbonatada são: 25,90; 31,80 e 32,93 (Ficha JCPDS 9-432) e 25,75; 32,19 e 33,43 (Ficha JCPDS 19-272), respectivamente.

Tabela 5.3 – Resultados estruturais finais do refinamento da HA.

	L_{002} (Å)	L_{300} (Å)	L_{002}/L_{300}	$L_{médio\ aparente}$ (Å)
HA	160,28	58,61	2,73	70,67

O espectro de infravermelho por refletância difusa da hidroxiapatita (HA) sintetizada, sem a presença de colágeno, é apresentada na Figura 5.5. Os modos vibracionais dos grupos funcionais presentes estão listados na Tabela 5.10, presente à página 65.

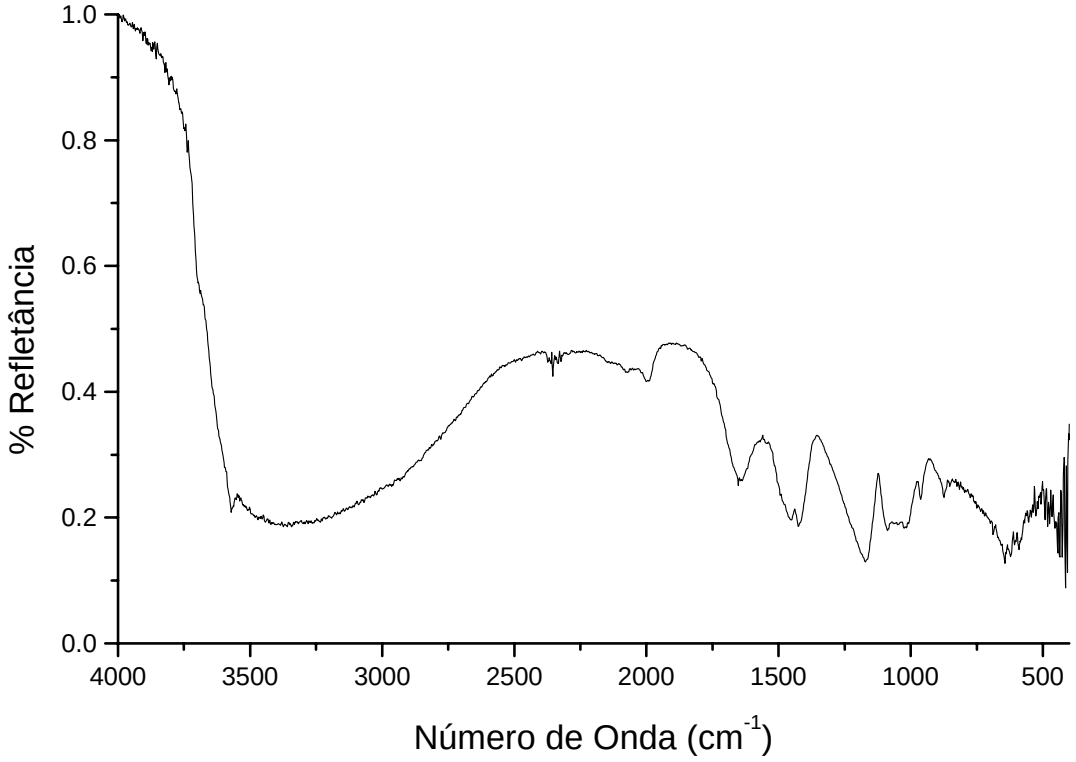


Figura 5.5 – Espectro de infravermelho obtido por refletância difusa da hidroxiapatita (HA).

O espectro de infravermelho da HA mostra bandas em torno de: 3571 cm^{-1} indicando a presença do estiramento da ligação O-H estrutural; 1172, 1088, 1025 e 963 cm^{-1} indicando a presença dos grupos PO_4^{3-}, que são típicas àquelas descritas para a HA (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1994). A presença de uma banda larga em torno de 3360 cm^{-1} e outra banda de média intensidade em 1653 cm^{-1} aponta a presença de água adsorvida. A existência de uma banda em 873 cm^{-1} e de duas bandas em 1425 e 1452 cm^{-1} deve-se a presença do grupo $(CO_3)^{2-}$ substituindo o sítio dos grupos $(PO_4)^{3-}$, característicos da hidroxiapatita carbonatada do tipo B. A banda presente em 873 cm^{-1} também pode ser atribuída a presença do grupo HPO_4^{2-}, pelo estiramento da ligação P-OH, sugerindo a formação de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio (CD-HA)

(ELLIOT, 1994). De acordo com TADIC *et al*. (2002), informações sobre cristalinidade do material podem ser obtidas pelo espectro de infravermelho, especialmente pela presença de bandas que se localizam nas regiões 590-610 cm^{-1} e 1000 cm^{-1}. A HA formada possui bandas largas e mal definidas nestas regiões indicando baixa cristalinidade do material formado.

5.1.3 – Compósitos Hidroxiapatita/Colágeno

5.1.3.1 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (80:20) – HA/CN-80/20

A escolha da proporção inicial entre as fases foi baseada em dados da literatura (KIKUCHI *et al.*, 1999; CHANG & TANAKA, 2002a; ROVERI *et al.* 2003). No entanto, durante preparação do compósito foi verificado que nem toda fase mineral formada interagiu com o colágeno no meio reacional, resultando a presença de duas fases distintas: um pó de HA disperso no meio reacional (HA/CN-80/20 P) e o compósito formado por HA e colágeno que após secagem por liofilização ficou com a forma de um bloco (HA/CN-80/20 B, Figura 5.6). Em função da quantidade excessiva de HA produzida no compósito HA/CN-80/20, optou-se por não realizar a preparação do compósito HA/CA-80/20. A caracterização do compósito HA/CN-80/20 englobou a caracterização das fases pó (HA/CN-80/20 P) e do bloco (HA/CN-80/20 B).

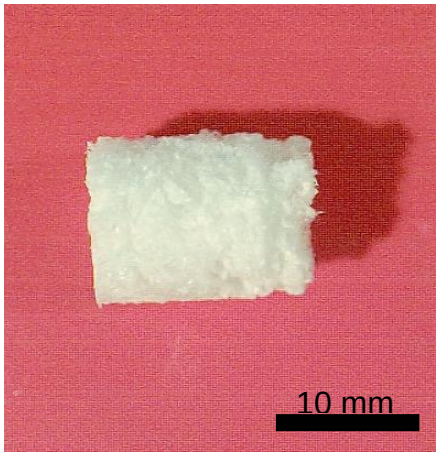
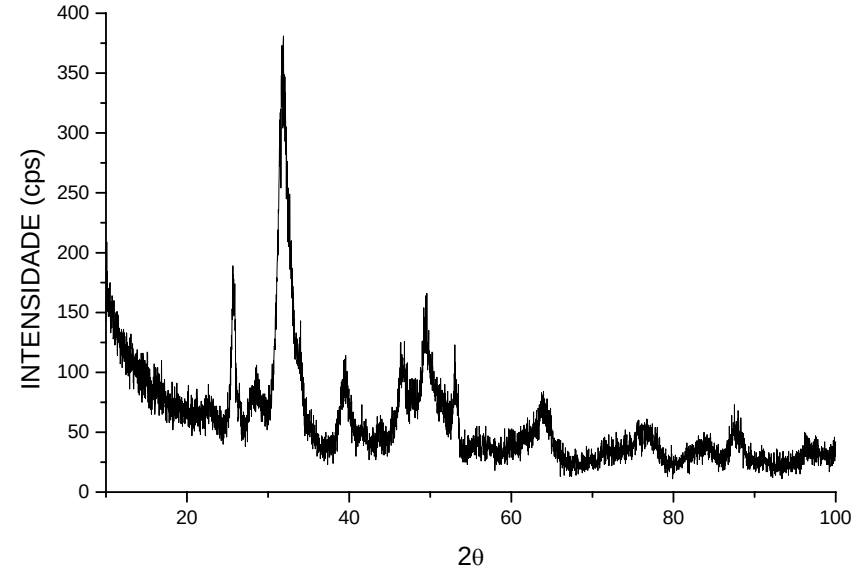


Figura 5.6 – Foto do bloco do compósito (HA/CN-80/20 B) seco por liofilização.

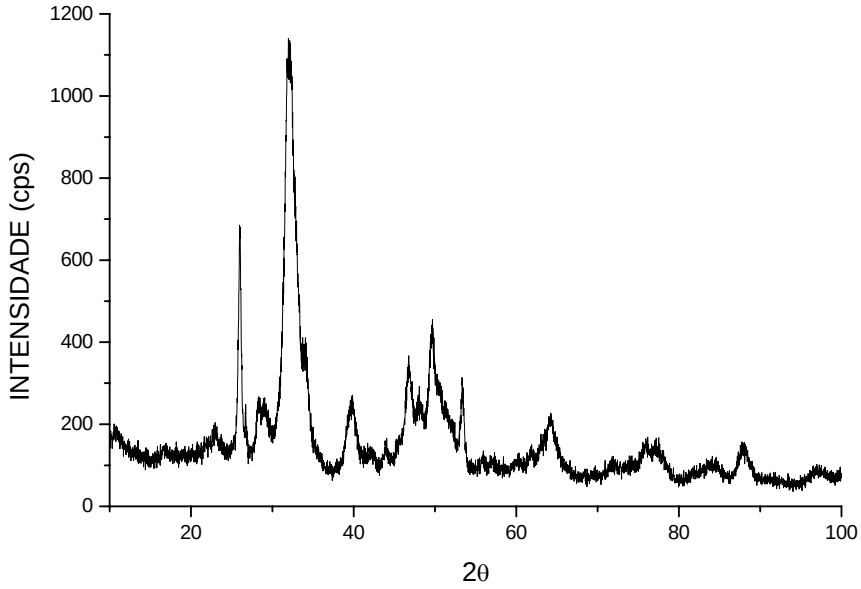
Os difratogramas de Raios-X das fases obtidas na preparação do compósito HA/CN-80/20 são mostrados na Figura 5.7. Os perfis de difração do pó (HA/CN-80/20 P) e do compósito (HA/CN-80/20 B) obtidos são fundamentalmente os mesmos e correspondente a hidroxiapatita. Conforme discutido para HA precipitada na ausência de colágeno (Figura 5.3), a fraca resolução dos picos de difração esta relacionada com a natureza ultrafina do pó. Os diagramas de Rietveld obtidos pelo refinamento dos difratogramas são mostrados na Figura 5.8. Confirmando os resultados encontrados para a HA, os cristais formados apresentam dimensões namométricas e a diferença no ajuste nas regiões de 25^{o} e entre 31 e 34^{o} deve estar relacionado com a formação de uma hidroxiapatita carbonatada. Os índices de concordância do refinamento são apresentados na Tabela 5.4. Os valores encontrados são compatíveis com os apresentados na literatura (REIS & FERREIRA, 1998; BAIG *et al.*, 1999). A presença do colágeno como fase amorfa faz com que se obtenha índices um pouco mais elevados.

Tabela 5.4 - Índices de concordância finais dos refinamentos do compósito HA/CN-8020.

	R_{wp} (%)	R_{Bragg} (%)	R_p (%)	R_e (%)	Chi^2
HA/CN-80/20 B	15,1	8,79	11,7	13,48	1,26
HA/CN-80/20 P	9,87	4,31	7,64	8,15	1,47

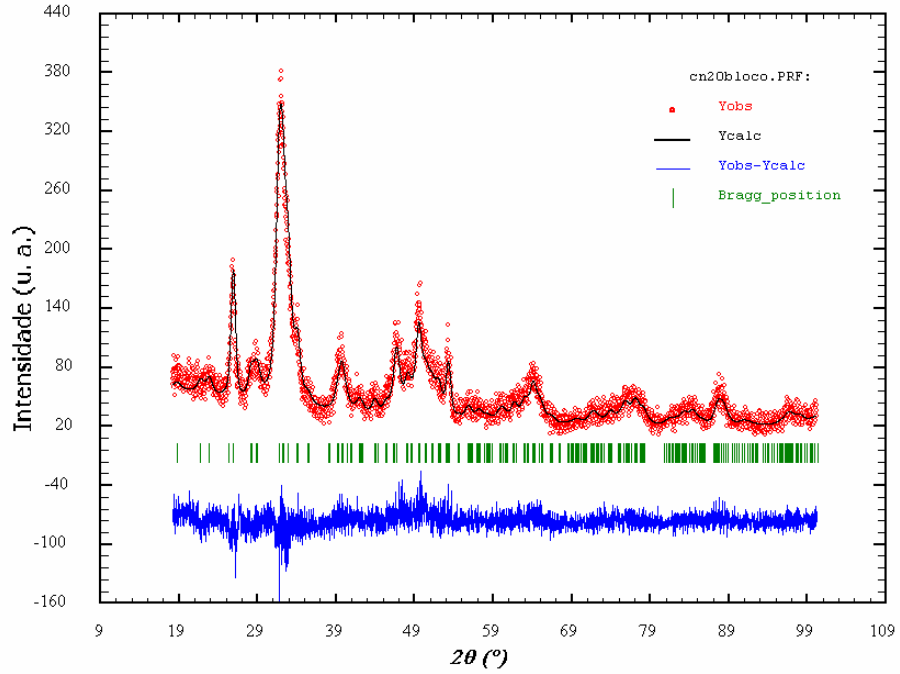


(a)

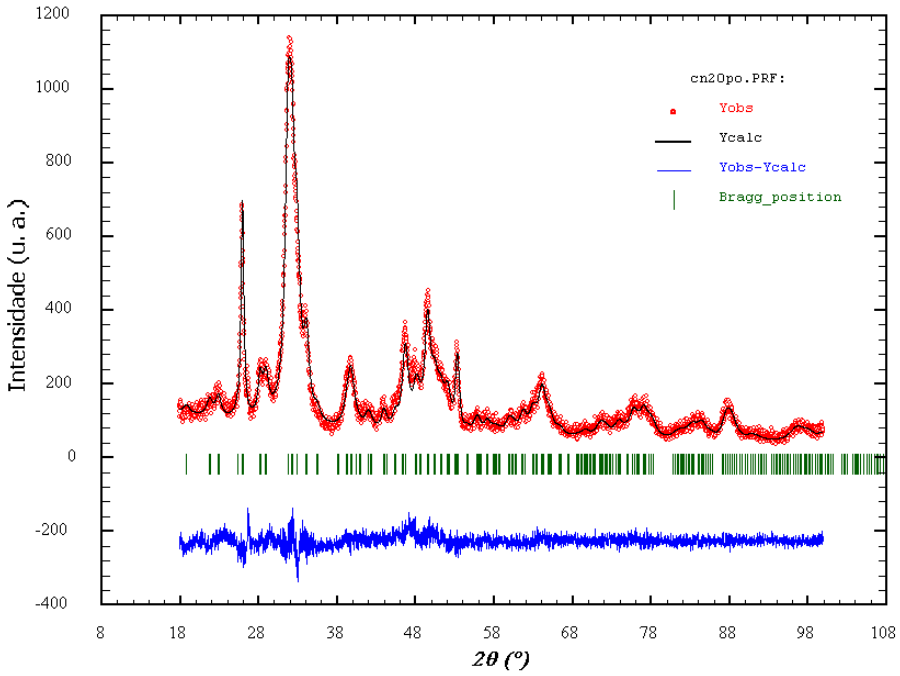


(b)

Figura 5.7 – Difratogramas das fases obtidas: (a) HA/CN-80/20 B; (b) HA/CN-80/20 P.



(a)



(b)

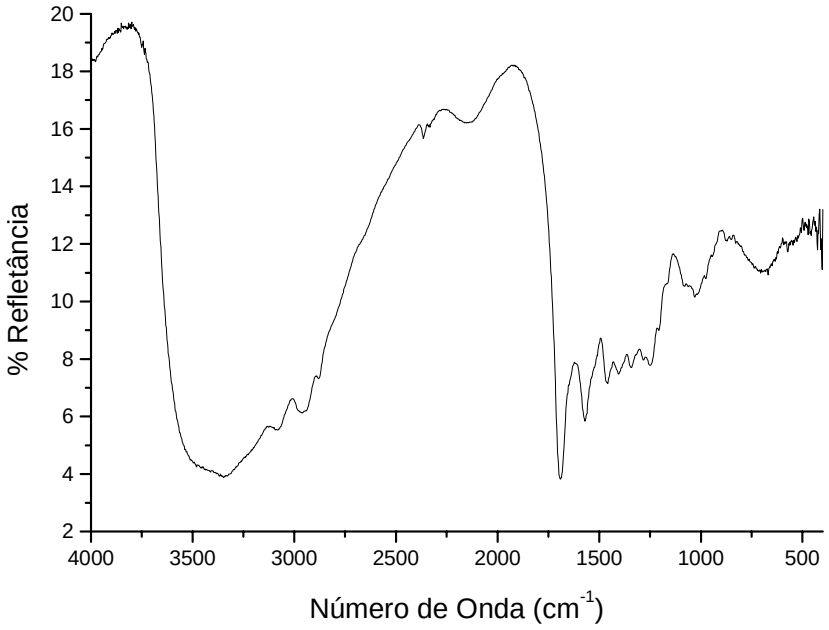
Figura 5.8 – Diagramas de Rietveld obtidos para as fases presentes no compósito: (a) HA/CN-80/20 B; (b) HA/CN-80/20 P (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).

Os resultados estruturais obtidos no refinamento são apresentados na Tabela 5.5. Apesar do tamanho de cristal médio aparente ser bem próximo do obtido para HA, a dimensão média dos cristais segundo a direção (002) teve uma ligeira diminuição para a fase pó formada e uma diminuição mais significativa para o compósito. Da mesma forma, o fator de forma (L_{002}/L_{300}) do cristal diminuiu um pouco para a fase pó formada e teve uma diminuição maior para o compósito em relação a HA pura. Alguns trabalhos apontam para a diminuição do tamanho dos cristais devido à influência de moléculas orgânicas (LEGEROS, 1994; van der HOUWEN *et al.*, 2003). Van der HOUWEN *et al.* (2003) estudaram a influência de ligantes carboxilatos, especificamente de acetatos e citratos, na qualidade dos precipitados de fosfatos de cálcio formados sob condições críticas de supersaturação. O estudo revelou que todos os materiais produzidos eram hidroxiapatitas deficientes em cálcio contendo íons CO_3^{2-}, HPO_4^{2-}, Na^+ e Cl^- como impurezas. Além disso, a presença de citrato resultou no decréscimo do tamanho de cristal, aumento na quantidade de íons CO_3^{2-} presentes e imperfeição da HA precipitada.

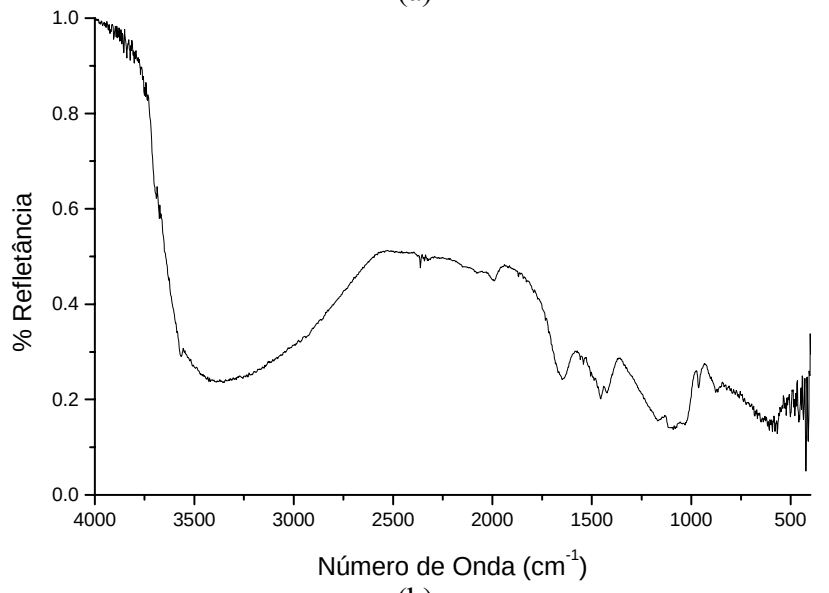
Tabela 5.5 – Resultados estruturais finais do refinamento das fases presentes no compósito HA/CN-8020.

	L_{002} (Å)	L_{300} (Å)	L_{002}/L_{300}	$L_{médio\ aparente}$ (Å)
HA/CN-80/20 P	140,99	62,37	2,25	72,39
HA/CN-80/20 B	112,7	63,81	1,77	71,22

Os espectros de infravermelho obtidos por refletância difusa das fases presentes no compósito são mostrados na Figura 5.9. Os modos vibracionais dos grupos funcionais presentes estão listados na Tabela 5.10.



(a)



(b)

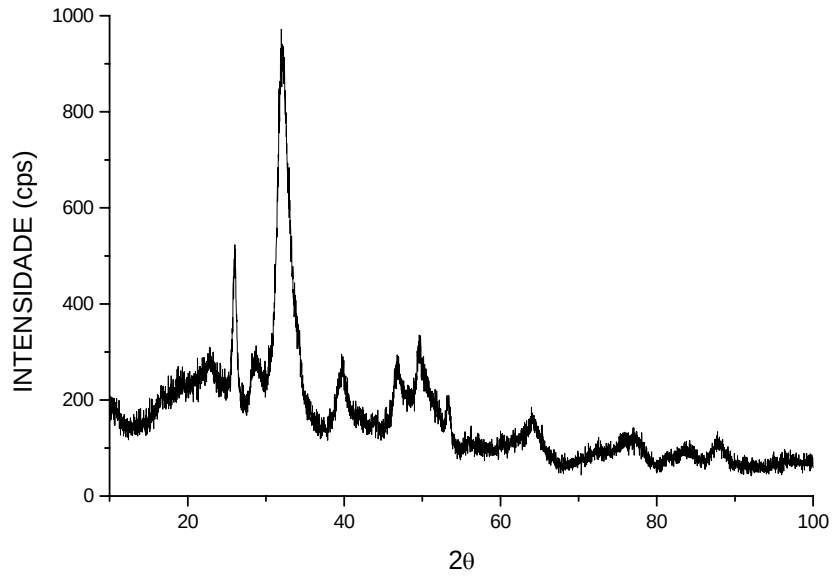
Figura 5.9 - Espectros de infravermelho por refletância difusa das fases presentes no compósito: (a) HA/CN-80/20 B; (b) HA/CN-80/20 P.

O espectro de infravermelho do bloco (Figura 5.9a) apresenta bandas em 3390, 3075, 2958, 2873, 1689, 1565, 1457, 1340, 1278, 1247 cm^{-1} características do colágeno (Tabela 5.1) e bandas 1165, 1080, 1057, 1018 e 960 cm^{-1} de grupos PO_4^{3-}. A banda em 870 cm^{-1} sugere a presença de grupos HPO_4^{2-}, indicando uma hidroxiapatita deficiente em cálcio. No espectro de infravermelho do pó (Figura 5.9b), o pico em 3570 cm^{-1} pode ser observado de forma nítida e indica a presença do estiramento da ligação O-H estrutural típico da hidroxiapatita. A presença de bandas em torno de 1165, 1088, 1034, 960 cm^{-1} indica a presença dos grupos PO_4^{3-}. A existência de uma banda em 873 cm^{-1} e de duas bandas em torno de 1420 e 1455 cm^{-1} indicam a presença do grupo CO_3^{2-}, característicos da hidroxiapatita carbonatada do tipo B.

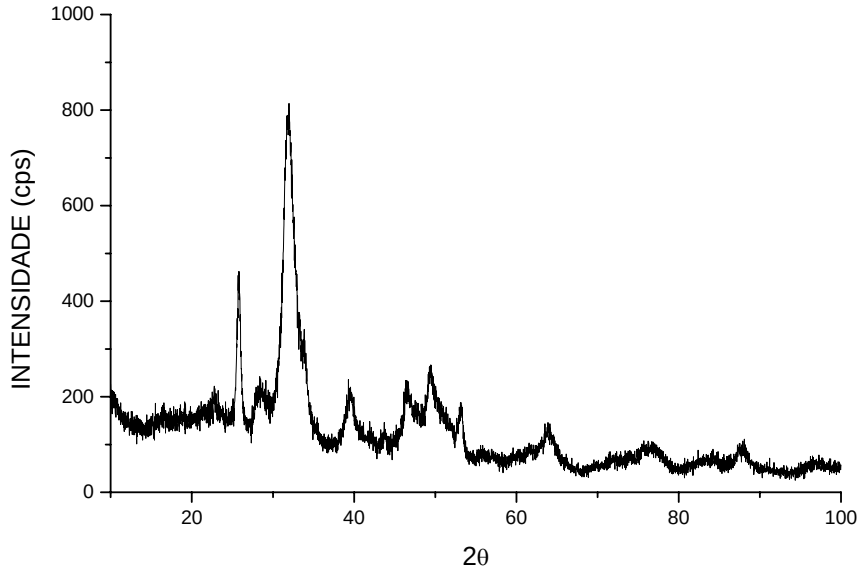
5.1.3.2 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/ Colágeno Aniônico (50:50) – HA/CN-50/50 E HA/CA-50/50

Os difratogramas de Raios-X dos compósitos obtidos estão mostrados na Figura 5.10. Além da presença dos picos característicos da HA foi possível observar no compósito HA/CN-50/50 (Figura 5.10a) um pico largo e evidente pertencente ao colágeno na região entre 10^o e 22^o.

A Figura 5.11 mostra os diagramas obtidos como refinamento dos compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50. Os índices de concordância apresentados na Tabela 5.6 são próximos e compatíveis com os apresentados na literatura (REIS & FERREIRA, 1998; BAIG *et al*., 1999).



(a)

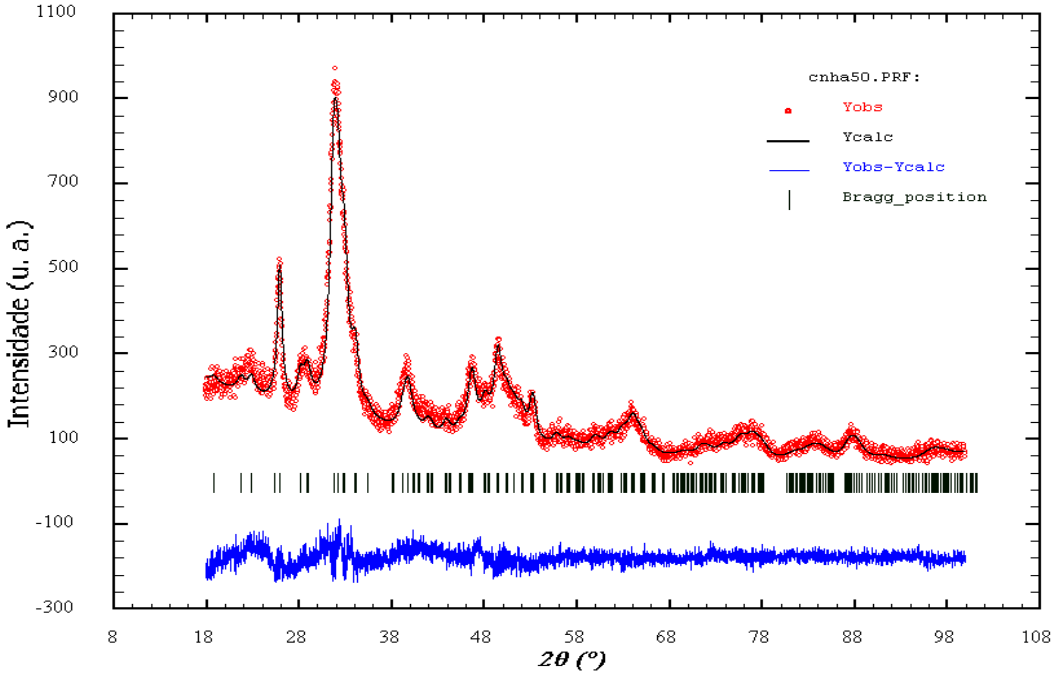


(b)

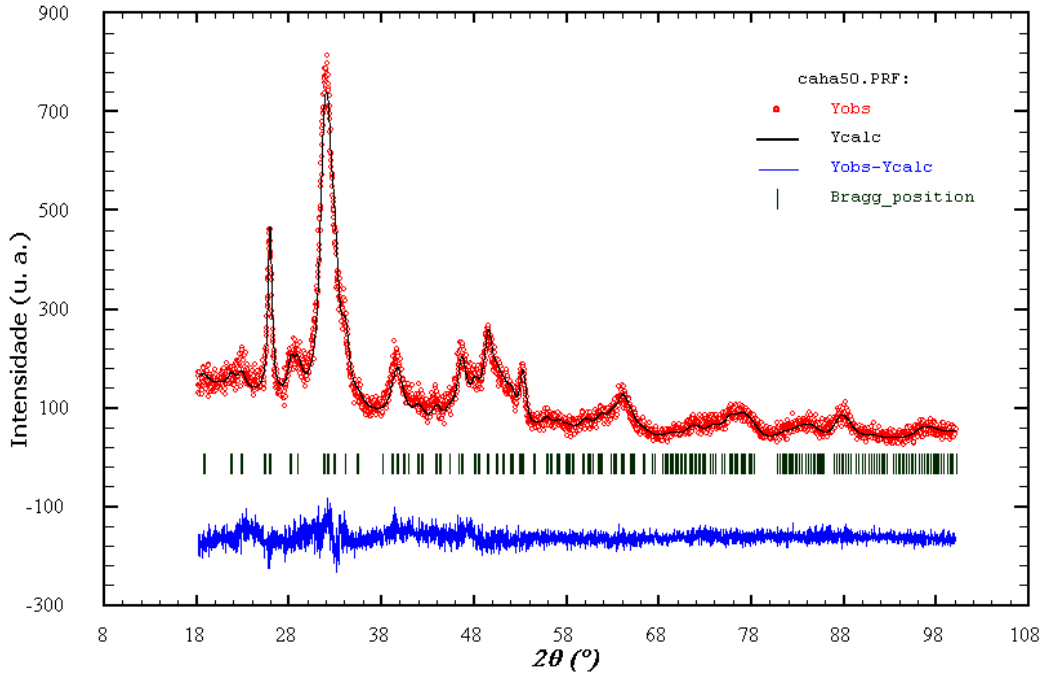
Figura 5.10 – Difratogramas dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50; (b) HA/CA-50/50.

Tabela 5.6 – Índices de concordância finais do refinamento dos compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50.

	R_{wp} (%)	R_{Bragg} (%)	R_p (%)	R_e (%)	Chi^2
HA/CA-50/50	18,5	5,38	15,5	16,20	1,30
HA/CN-50/50	18,8	5,23	8,07	16,25	1,33



(a)



(b)

Figura 5.11 – Diagramas de Rietveld dos compósitos: (a) HA/CN-50/50 e (b) HA/CN-50/50 (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).

Os resultados estruturais obtidos no refinamento são apresentados na Tabela 5.7. Observa-se uma queda mais pronunciada nas dimensões do cristal para o compósito HA/CN-50/50. O compósito HA/CA-50/50 possui maior dimensão na direção (002). Estes resultados podem estar relacionados com o comportamento de fibrilogênese dos colágenos durante a preparação dos compósitos. As fibras de colágeno nativo formam-se rapidamente, e os cristais de HA nucleados são atraídos para a superfície das fibras de colágeno formadas. Nos primeiros minutos da preparação ocorre uma associação entre os cristais de HA e fibras de colágeno nativo formando um novelo ao redor da haste do agitador mecânico e criando um ambiente confinado para os cristais, o que possivelmente os dificulta de crescer (Figura 5.12). Durante a preparação com o colágeno aniônico, as fibras formadas se dispersam no meio reacional sem formar um novelo em torno da haste de agitação. Com as fibras mais dispersas, os cristais formados têm um maior contato com o meio reacional, permitindo assim o seu crescimento.

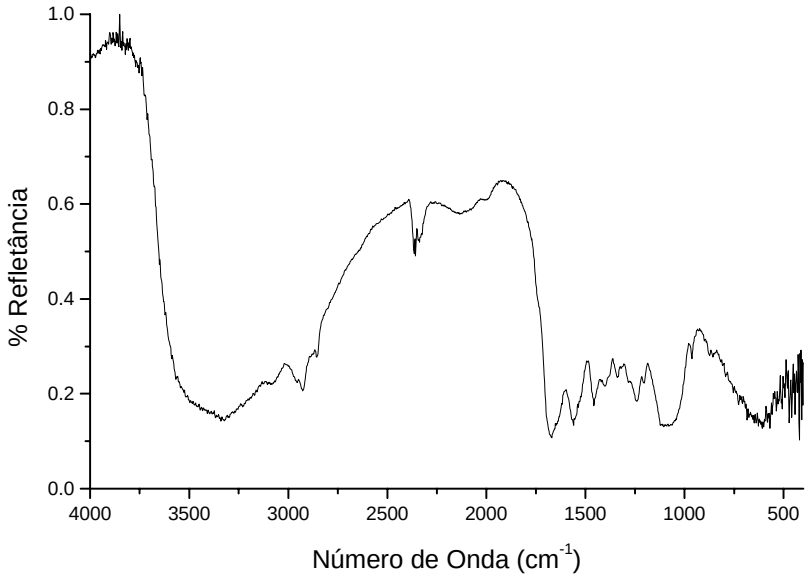
Figura 5.12 – Novelo formado pela fibrilogênese do colágeno nativo.

Tabela 5.7 – Resultados estruturais finais do refinamento dos compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50.

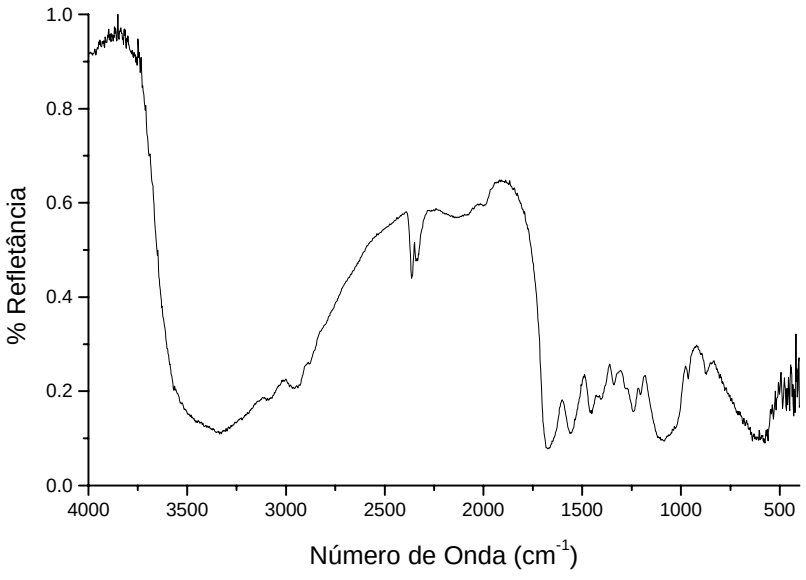
	L_{002} (Å)	L_{300} (Å)	L_{002}/L_{300}	$L_{médio\ aparente}$ (Å)
HA/CA-50/50	143,08	55,43	2,58	65,9
HA/CN-50/50	108,17	51,12	2,12	58,98

Os espectros de infravermelho obtidos por refletância difusa dos compósitos são mostrados na Figura 5.13. Os modos vibracionais dos grupos funcionais presentes estão

listados na Tabela 5.10. Os perfis dos compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50 são semelhantes, apresentando bandas características do colágeno e da HA, já comentados anteriormente.



(a)



(b)

Figura 5.13 – Espectros de infravermelho dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50; (b) HA/CA-50/50.

5.1.3.3 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (20:80) – HA/CN-20/80

A Figura 5.14 apresenta o difratograma de Raios-X do compósito HA/CN - 20/80. Apesar da grande quantidade de colágeno presente no compósito ainda é possível visualizar claramente os picos característicos da hidroxiapatita.

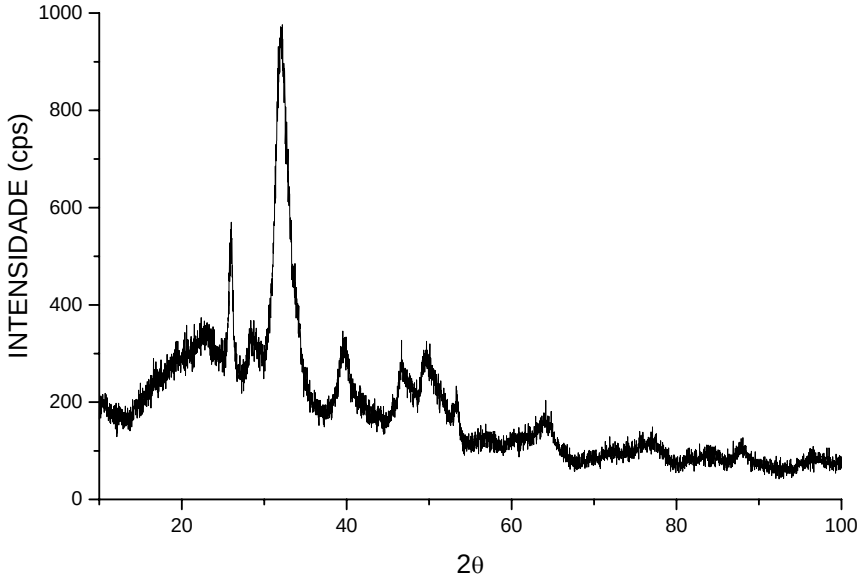


Figura 5.14 – Difratograma do compósito HA/CN – 20/80.

A Figura 5.15 mostra o diagrama obtido com refinamento do difratograma do compósito HA/CN-20/80, os índices de concordância são apresentados na Tabela 5.8. Em função da grande quantidade de colágeno presente no compósito, que dificulta o ajuste das reflexões calculada e observada, os índices de concordância obtidos são bem maiores que os encontrados nas outras composições, mas ainda assim estão dentro do limite aceitável descrito na literatura (REIS & FERREIRA, 1998).

Tabela 5.8 – Índices de concordância finais do refinamento do compósito HA/CN-20/80.

	R_{wp} (%)	R_{Bragg} (%)	R_p (%)	R_e (%)	Chi^2
HA/CN-20/80	30,20	12,12	18,07	10,31	2,93

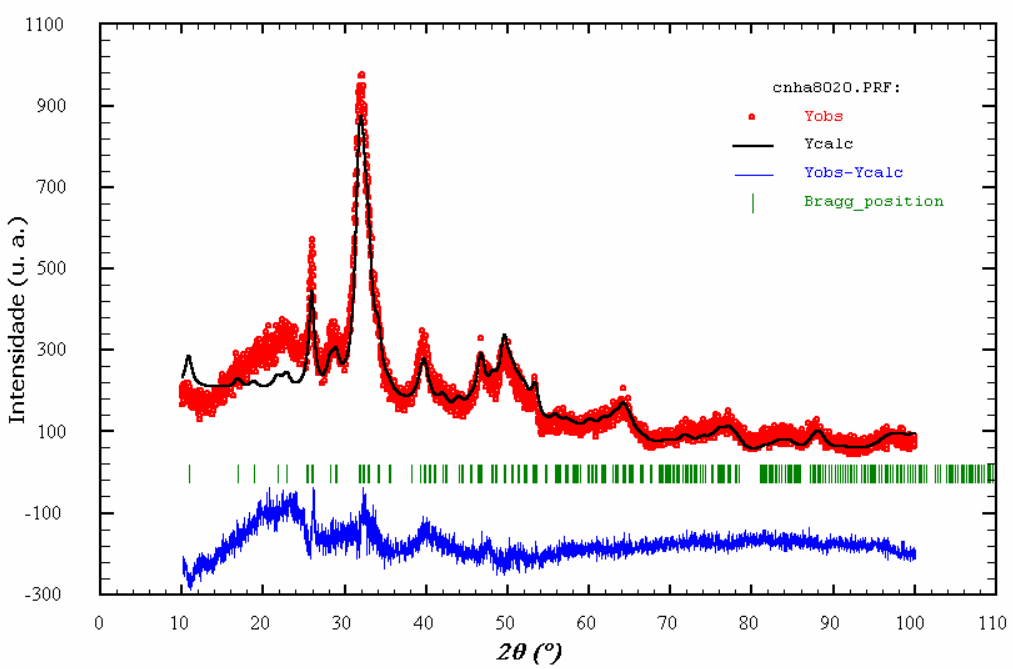


Figura 5.15 – Diagrama de Rietveld do compósito HA/CN-20/80 (vermelho - o difratograma obtido experimentalmente; preto - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).

Os resultados estruturais obtidos no refinamento são apresentados na Tabela 5.9. Confirmando os resultados obtidos anteriormente, verifica-se uma tendência de diminuição e esfereoidização dos cristais à medida que a quantidade de hidroxiapatita no compósito diminui.

Tabela 5.9 – Resultados estruturais finais do refinamento do compósito HA/CN-20/80.

	L_{002} (Å)	L_{300} (Å)	L_{002}/L_{300}	$L_{médio\ aparente}$ (Å)
HA/CN 20/80	90,56	60,09	1,51	63,75

O espectro de infravermelho obtido por refletância difusa do compósito é mostrado na Figura 5.16. Os modos vibracionais dos grupos funcionais presentes estão listados na Tabela 5.10. Os modos vibracionais são os típicos da hidroxiapatita e do colágeno, já mencionados anteriormente.

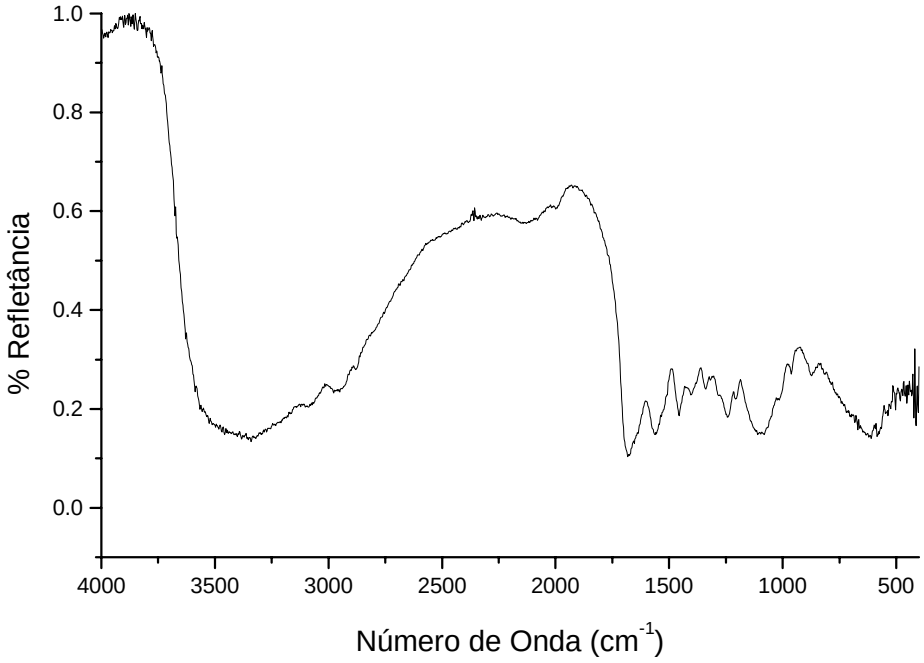


Figura 5.16 – Espectro de infravermelho do compósito HA/CN-20/80.

5.1.3.4 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/ Colágeno Aniônico (10:90) – HA/CN-10/90 E HA/CA-10/90

Durante a preparação dos compósitos HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90 foi retirada uma alíquota logo após adição dos reagentes, ou seja, no início da fase da digestão (0h digestão). Esta alíquota foi então fixada em solução aquosa de glutaraldeído 2,5%, parte do material foi seco por ponto crítico para análise por MEV.

Os difratogramas dos compósitos são apresentados na Figura 5.17. Devido à predominância de colágeno nos compósitos, os picos principais da HA são pouco definidos não sendo possível fazer o refinamento dos difratogramas. Os picos cristalinos presentes em 44, 64, 81 e 98^{o} pertencem ao porta-amostra.

Os espectros de infravermelho obtidos por refletância difusa dos compósitos são mostrados na Figura 5.18. Os modos vibracionais dos grupos funcionais presentes estão listados na Tabela 5.10. Não foram detectadas modificações nos modos de vibração em relação aos resultados obtidos nos outros compósitos.

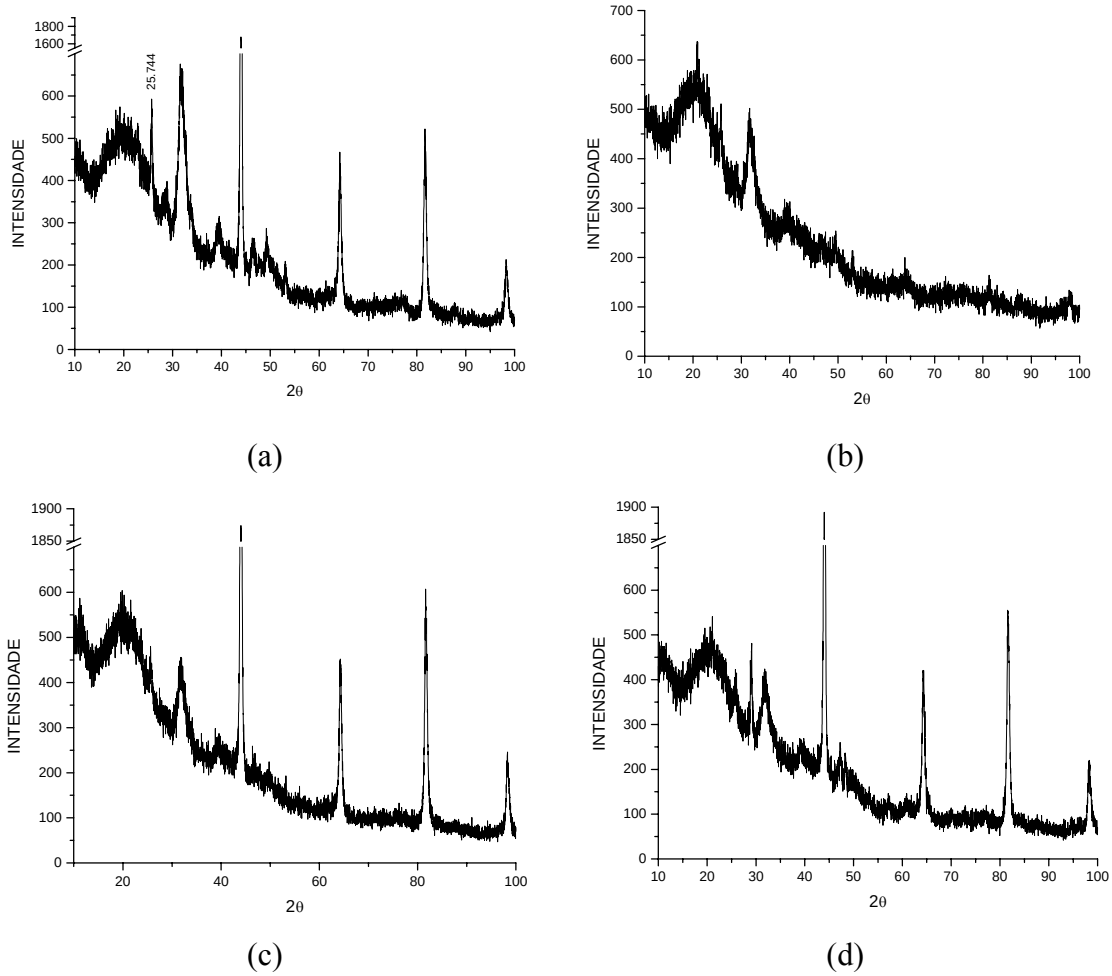


Figura 5.17 – Difratogramas dos compósitos: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 com 0h de digestão; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 com 6h de digestão.

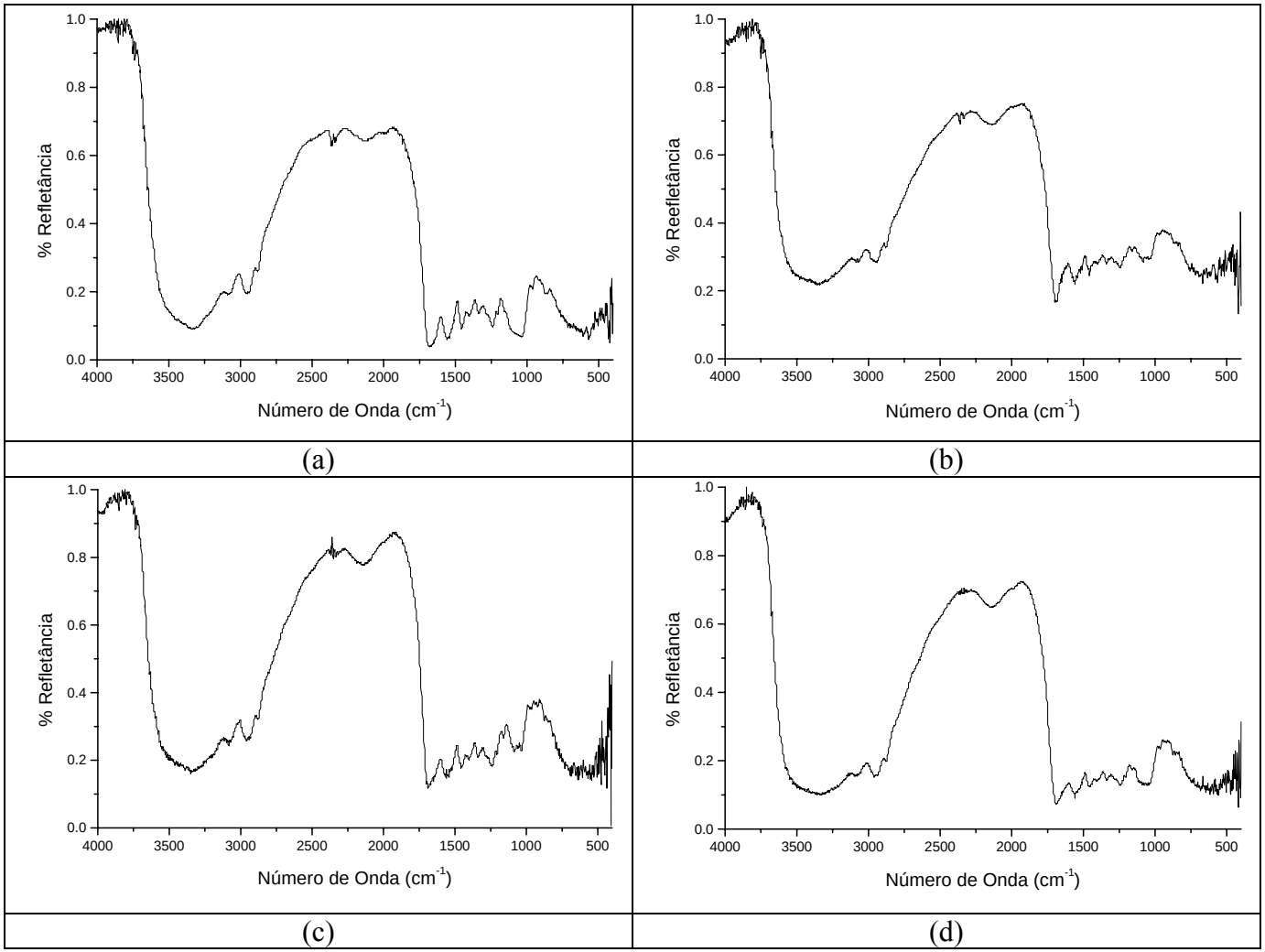


Figura 5.18 – Espectros de infravermelho por refletância difusa dos compósitos: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 com 0h de digestão; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 com 6h de digestão.

Tabela 5.10 – Principais modos vibracionais dos grupamentos funcionais encontrados na HA e compósitos obtidos [a].

	HA	HA/CN - 80/20 P	HA/CN - 80/20 B	HA/CN - 50/50	HA/CA - 50/50	HA/CN - 20/80	HA/CN- 10/90 (0h digestão)	HA/CN- 10/90 (6h digestão)	HA/CA- 10/90 (0h digestão)	HA/CA- 10/90 (6h digestão)
OH estrutural	3571	3570	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2O, N-H (Amida A)	3360	3382	3390	3321	3339	3341	3335	3350	3355	3334
C-H (Amida B)	-	-	3075	3085	3085	3089	3090	3085	3084	3080
	-	-	2958	2961	2961	2978	2961	2961	2958	2959
H_2O, C=O (Amida I)	1653	1644	1689	1670	1674	1681	1683	1685	1688	1686
N-H (Amida II), C-N	-	-	1565	1560	1558	1563	1560	1565	1560	1559
CO_3^{2-} ν_3, Anel pirrolidínico	1452	1455	1457	1446	1449	1456	1456	1461	1459	1459
CO_3^{2-} ν_3	1425	1420	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	1404	1405	1404	1402	-	-	1404
$-COO^-$	-	-	1340	1341	1340	1339	1338	1345	1338	1341
C-N (Amida III), N-H (Amida I)	-	-	1247	1240	1242	1243	1240	1242	1246	1247
PO_4^{3-}	1172	-	1165	1140	1128	1110	1117	1149	1161	1159
PO_4^{3-} ν_3	1088	1088	1080	1080	1084	1081	1080	1085	1082	1082
PO_4^{3-} ν_3	1025	1034	1018	1017	1011	1017	1035	1035	1034	-
PO_4^{3-} ν_1	963	960	960	960	960	960	961	-	-	-
CO_3^{2-} ν_2, HPO_4^{2-}	873	870	873	871	872	872	878	[b]	[b]	[b]
PO_4^{3-} ν_4	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]
PO_4^{3-} ν_4	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]
PO_4^{3-} ν_2	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]	[b]

[a] Resultados em números de onda (cm^{-1}) [b] Região apresenta ruído intenso

5.2 - Caracterização Morfológica

5.2.1 – Colágenos

A morfologia das fibras dos colágenos que passaram pelo mesmo procedimento de síntese do compósito, secos por liofilização e ponto crítico, obtida por MEV, pode ser observada na Figura 5.19. A micrografia do colágeno nativo (CN) liofilizado (Figura 5.19a) mostra fibras de colágeno com forma cilíndrica parcialmente preservada.

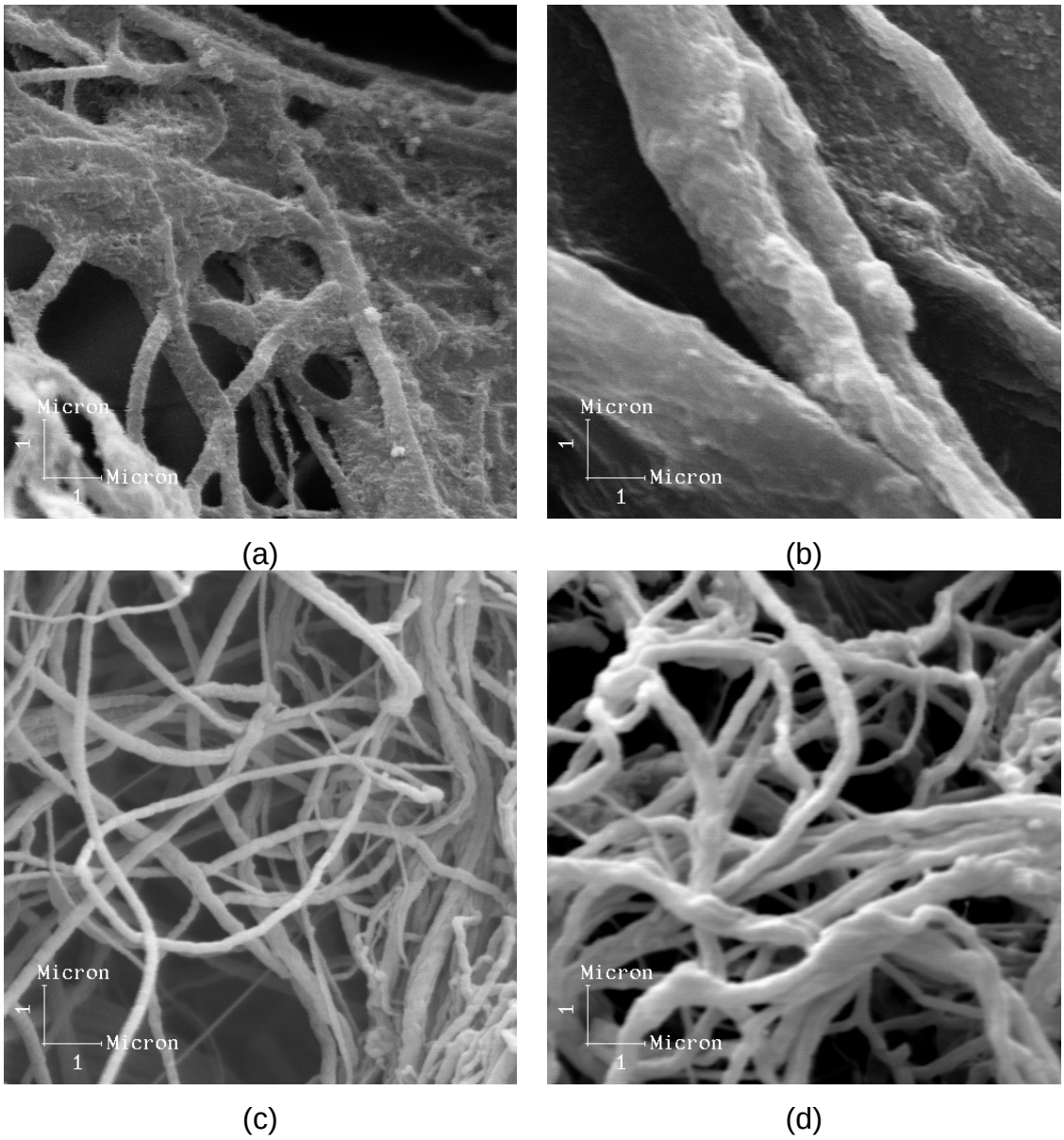


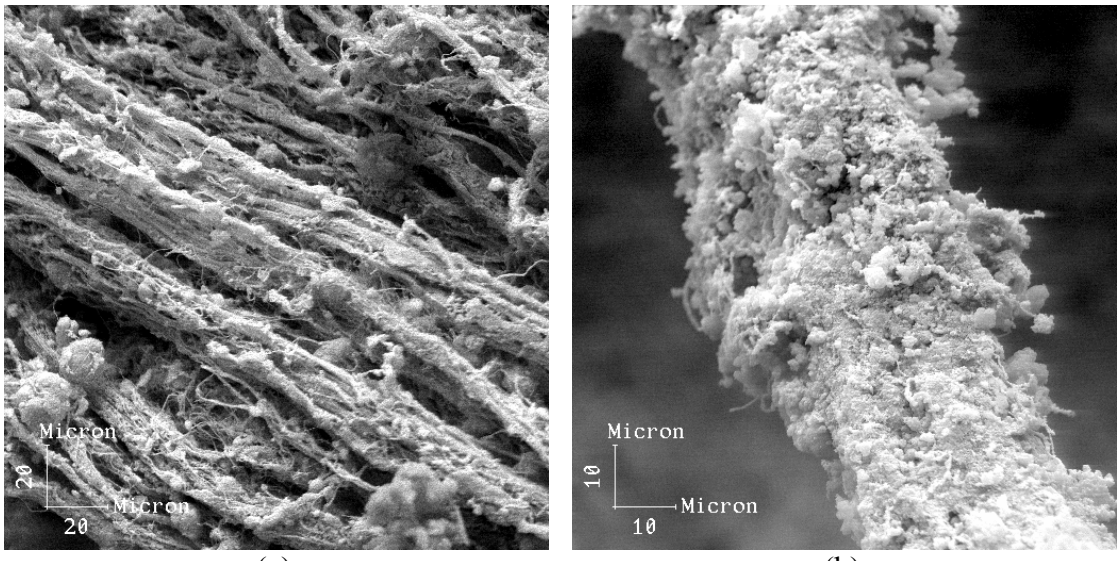
Figura 5.19 – Micrografias dos colágenos submetidos à condição de preparação do compósito, sem formar fase mineral: (a) CN liofilizado; (b) CA liofilizado; (c) CN seco por ponto crítico; (d) CA seco por ponto crítico. Ampliação de x10000.

No caso do colágeno aniônico (CA) liofilizado (Figura 5.19b), o material apresenta uma configuração amorfa e colapsada. A secagem pelo processo de ponto crítico preserva a estrutura de fibra do colágeno, como é mostrado nas Figuras 5.19c e 5.19d. Isso sugere que a morfologia do colágeno é muito sensível ao método de secagem empregado. A secagem por ponto crítico visa proporcionar a mínima alteração da estrutura morfológica do material estudado.

5.2.2 – Compósitos Hidroxiapatita/Colágeno

5.2.2.1 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (80:20) – HA/CN-80/20

As Figuras 5.20a e 5.20b mostram as imagens obtidas por MEV para o compósito HA/CN-80/20. É possível observar uma grande quantidade de fosfato de cálcio precipitado sobre as fibras. Grande parte desse material é fracamente aderida à superfície do colágeno, soltando-se durante a manipulação. A possibilidade de desprendimento de partículas pode causar problemas em relação a apoptose de células quando avaliados *in vitro* e/ou *in vivo*. Do mesmo modo, a literatura também alerta sobre a presença de partículas soltas que podem levar ao deslocamento destas dentro do tecido podendo até ser expulsas pelo organismo ou provocar um processo inflamatório (HSU, 1999).



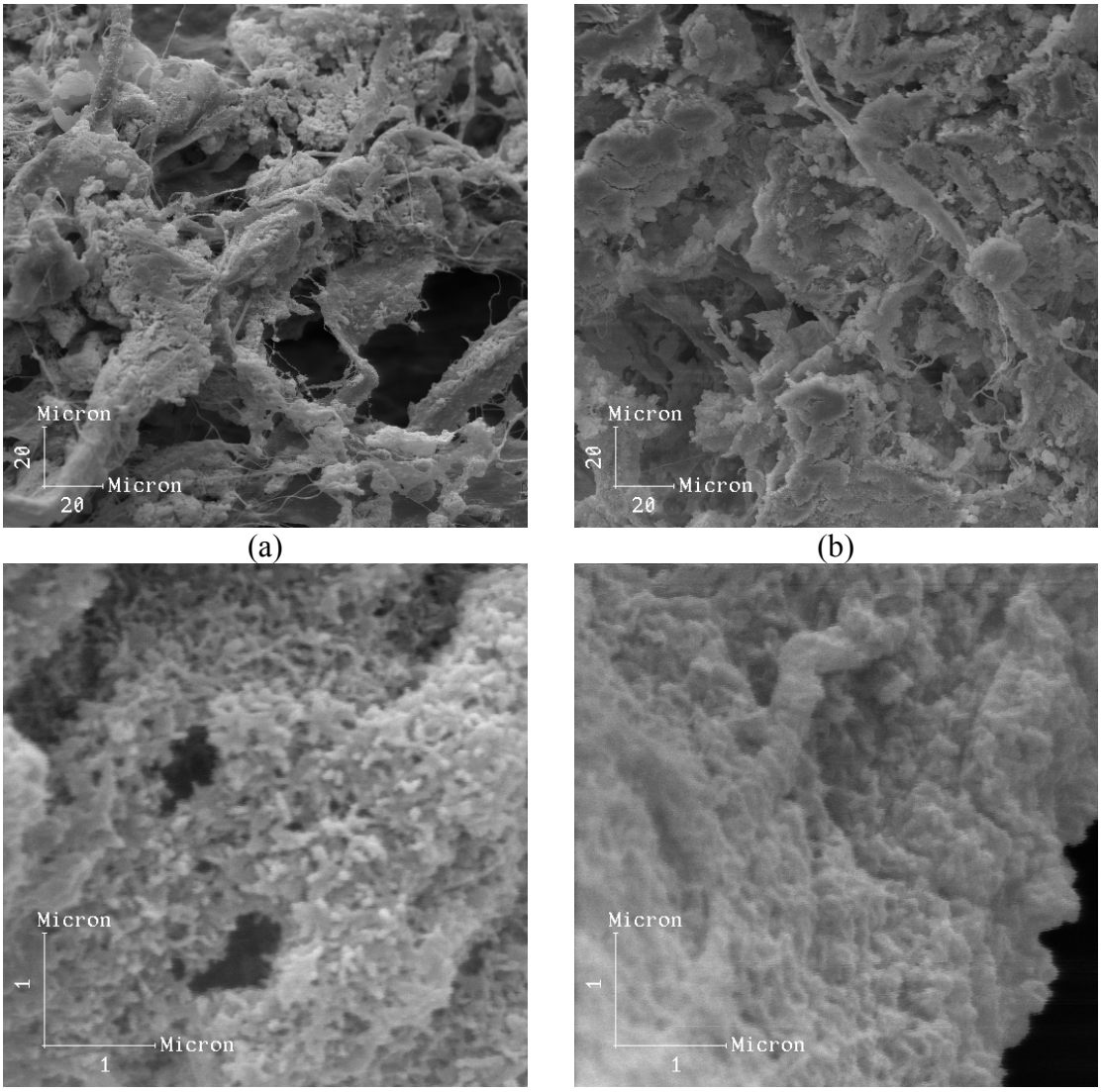
(a) (b)

Figura 5.20 – Micrografias do compósito HA/CN-80/20 seco por liofilização: (a) x500 e (b) x1000 de ampliação.

5.2.2.2 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/Colágeno Aniônico (50:50) – HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50

As Figuras 5.21a e 5.21b mostram as micrografias dos compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50 secos por liofilização, respectivamente. Nestes compósitos é possível detectar pó aparentemente solto entre as fibras do colágeno. No entanto, não foi verificada a presença de pó disperso na solução-mãe durante a preparação, nem durante a manipulação dos materiais após a etapa de secagem. Com maior ampliação (Figuras 5.21c e 5.21d) foi possível verificar a estrutura ultrafina da fase mineral presente nos compósitos e uma maior integração entre os componentes no compósito HA/CA-50/50.

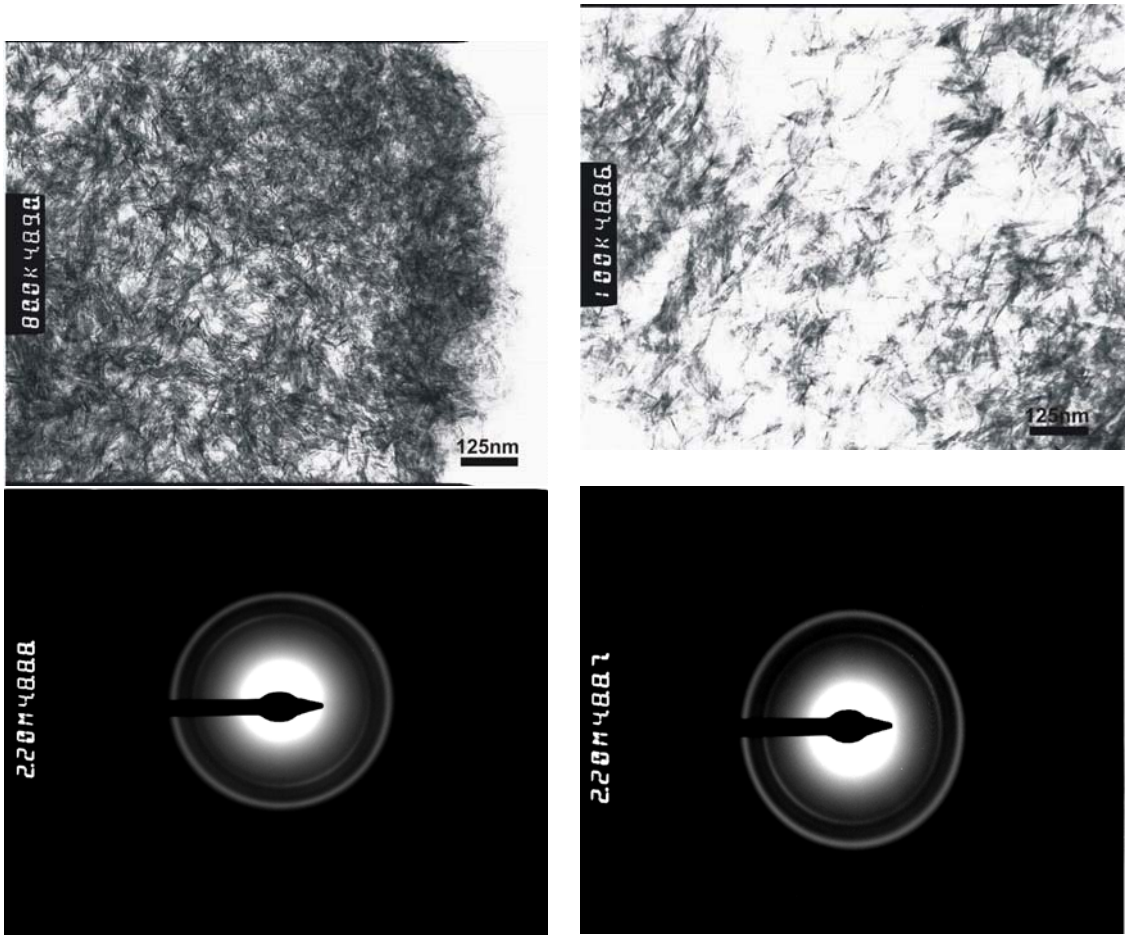
A Figura 5.22 apresenta as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão e os padrões de difração dos compósitos HA/CN-50/50 (Figura 5.22a) e HA/CA-50/50 (Figura 5.22b). Ambos materiais são constituídos por cristais nanométricos. A formação dos anéis de difração advém da impossibilidade de realizar a difração dos raios-X em um único cristal. Não fica clara a precipitação preferencial da HA ao longo do eixo do colágeno como preconizado por RHEE & TANAKA (1998).



(a) (b)

(c) (d)

Figura 5.21 – Micrografias dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50 (x500); (b) HA/CA-50/50 (x500) (c) HA/CN-50/50 (x19000); (d) HA/CA-50/50 (x19000) secos por liofilização.

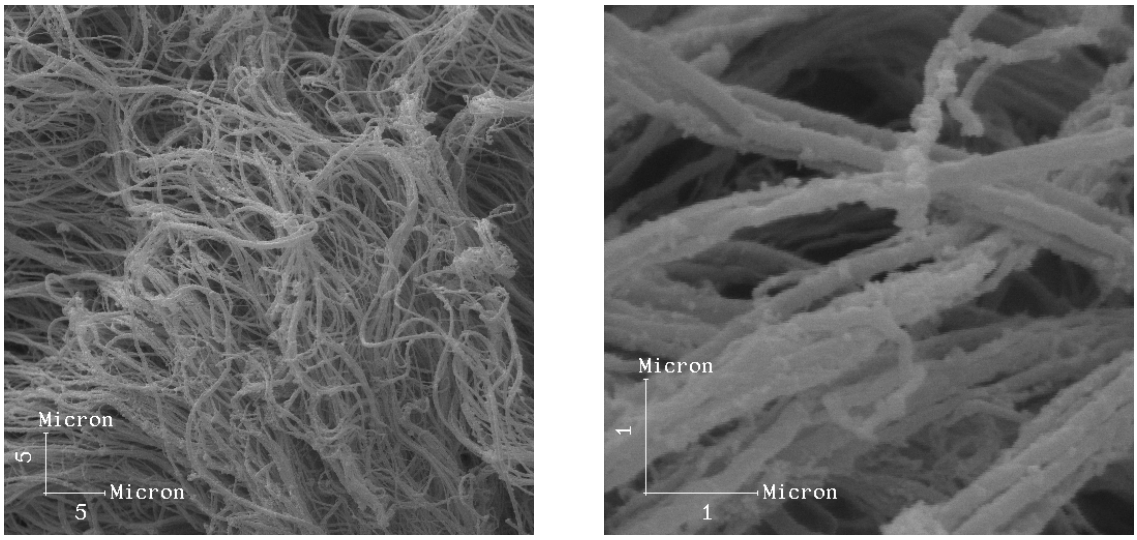


(a) (b)

Figura 5.22 – Micrografias por microscopia eletrônica de transmissão e padrões de difração de elétrons dos compósitos obtidos: (a) HA/CN-50/50; (b) HA/CA-50/50.

5.2.2.3 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo (20:80) – HA/CN-20/80

A Figura 5.23 mostra micrografias do compósito HA/CN-20/80 seco por ponto crítico. Observa-se a secagem por ponto crítico preserva a configuração natural das fibras (Figura 5.23a). Em maior ampliação (Figura 5.23b) é possível observar aglomerados de cristais distribuídos no material.



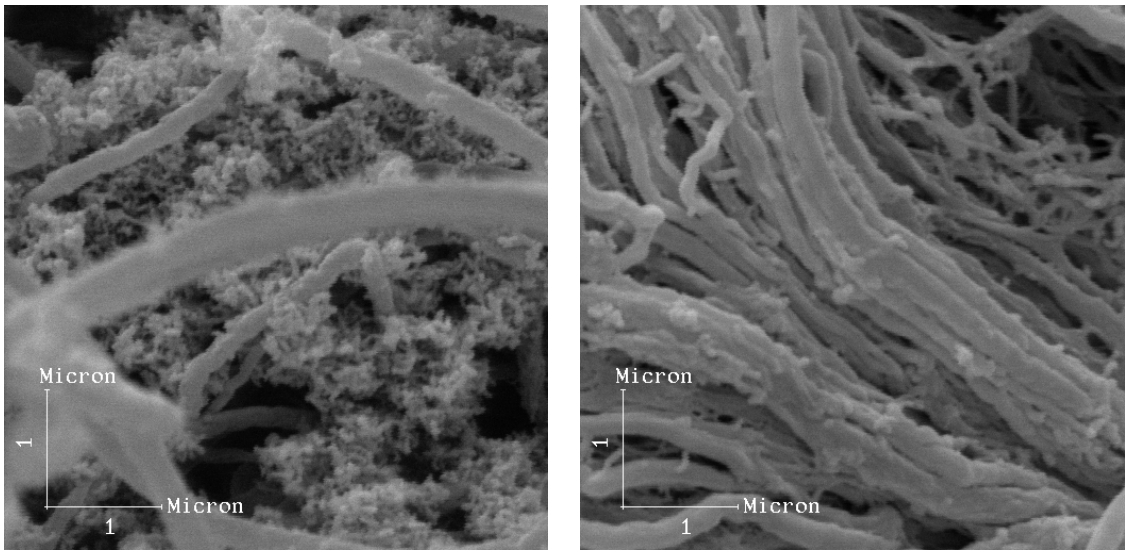
(a) (b)

Figura 5.23 – Micrografias do compósito HA/CN-20/80 seco por ponto crítico: (a) 2000; (b) 19000 vezes de ampliação.

5.2.2.4 - Hidroxiapatita/Colágeno Nativo e Hidroxiapatita/Colágeno Aniônico (10:90) – HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90

As micrografias dos compósitos obtidos sem a etapa de digestão e secos por ponto crítico são apresentadas na Figura 5.24. O compósito HA/CN-10/90 (Figura 5.24a) apresenta uma grande quantidade de pó aglomerado e pouco associado com as fibras de colágeno nativo, enquanto que o compósito HA/CA-10/90 (Figura 5.24b) apresenta uma morfologia mais homogênea. Este resultado pode estar associado com o comportamento dos cristais precipitados durante a preparação do compósito, pois o processo de polimerização do colágeno (fibrilogênese) ocorre concomitantemente ao de nucleação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Durante a preparação do compósito HA/CN-10/90 (Figura 5.24a) o colágeno nativo forma fibras que se aglomeram mais rapidamente e dificultam a interação com a fase mineral formada. Já

no compósito HA/CA-10/90 (Figura 5.24b), a polimerização do colágeno aniônico forma fibras mais "soltas" e o processo de fibrilogênese ocorre mais lentamente. Isto tem como resultado uma interação mais efetiva entre as fibras e a fase mineral formada no meio reacional, possibilitando também uma melhor distribuição das partículas sobre as fibras.



(a) (b)

Figura 5.24 – Micrografias dos compósitos obtidos com 0h de digestão: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 secos por ponto crítico. Ampliação de X19000.

Na Figura 5.25 são apresentadas as micrografias dos compósitos obtidos após 6h de digestão secos por liofilização e ponto crítico. Ambos compósitos secos por liofilização (Figuras 5.25a e 5.25b) apresentam uma morfologia homogênea. Nos materiais secos por ponto crítico, as fibras do compósito HA/CA-10/90 (Figura 5.25d) são revestidas de forma mais densa e homogênea que no compósito HA/CN-10/90 (Figura 5.25c).

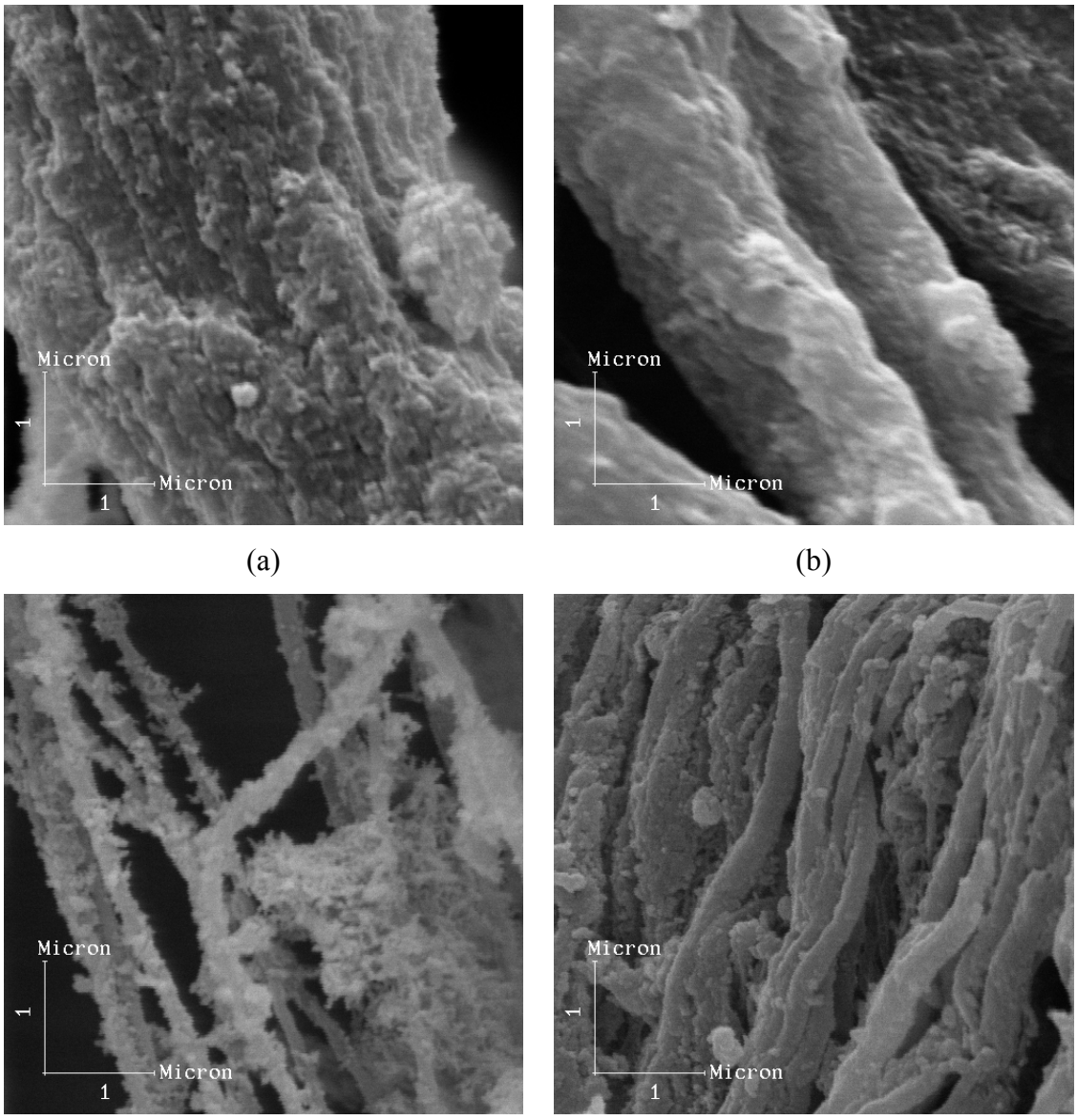
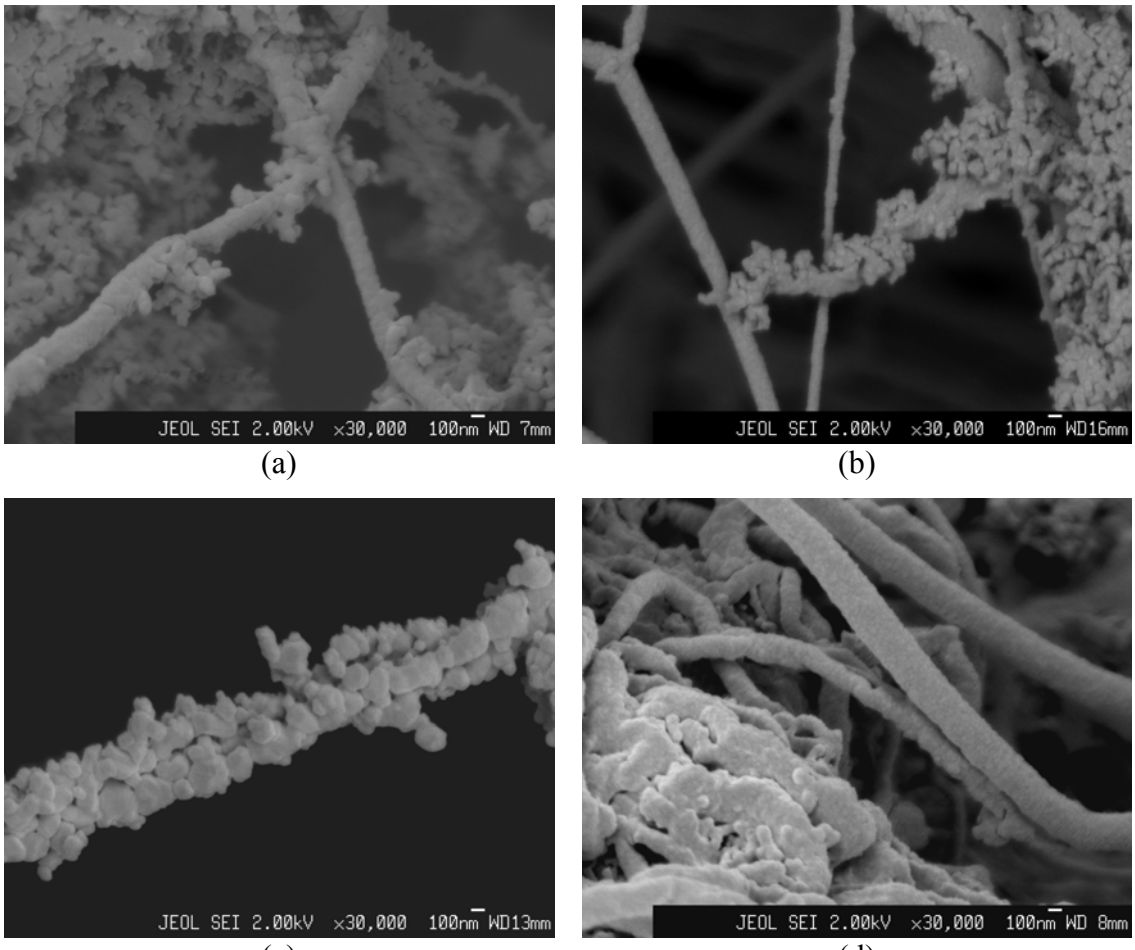


Figura 5.25 – Micrografias dos compósitos obtidos com 6h de digestão: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 secos por liofilização; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 secos por ponto crítico. Ampliação x19000.

A Figura 5.26 apresenta as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG). A formação de aglomerados de cristais no início da digestão pode ser observada em ambos os compósitos (Figuras 5.26a e 5.26b). Após 6 horas de digestão, o compósito HA/CN-10/90 (Figura 5.26c) continua a apresentar cristais aglomerados, mas distribuídos por toda extensão da fibra de colágeno. O compósito HA/CA-10/90 (Figura 5.26d) apresentou uma textura mais homogênea com a presença de uma menor quantidade de aglomerados.



(a) (b)

(c) (d)

Figura 5.26 – Micrografias (MEV-FEG) dos compósitos obtidos por secagem por ponto crítico: (a) HA/CN-10/90; (b) HA/CA-10/90 com 0h de digestão; (c) HA/CN-10/90; (d) HA/CA-10/90 com 6h de digestão.

5.3 - Cultura de Osteoblastos nos Compósitos HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90

As micrografias das superfícies obtidas após a cultura de osteoblastos em lamínulas de vidro (controle) e nos compósitos HA/CN-10/90 e HA/CA-10/90 são mostrados na Figura 5.27. Na superfície controle observa-se após 4horas de cultivo um grande número de células aderidas e apresentando um espraiamento radial; após 7dias as células apresentam forma alongada e em 14 dias a superfície da lamínula está completamente recoberta por células. Por se tratar de uma estrutura tridimensional e irregular, a observação das células nos compósitos é bem mais difícil. No tempo de 4 horas não foi possível observar células devido à pequena quantidade de células semeadas e a semelhança morfológica entre o compósito e as mesmas. Nos tempos de cultivo de 7 e 14 dias a quantidade de células é bem maior o que facilitou sua identificação. Estas apresentaram, uma forma alongada (5.27e; 5.27f e 5.27i), além de sua forma poligonal típica (5.27f; 5.27h e 5.27i). Segundo DELIGIANNI *et al*. (2001) osteoblastos quando espraiados atingem comprimentos de até 80μm, sendo esse valor compatível com os encontrados neste trabalho. Embora não se tenha feito cortes transversais para observar o interior dos compósitos, algumas imagens indicam que as células penetraram o material, como mostrado na Figura 5.28.

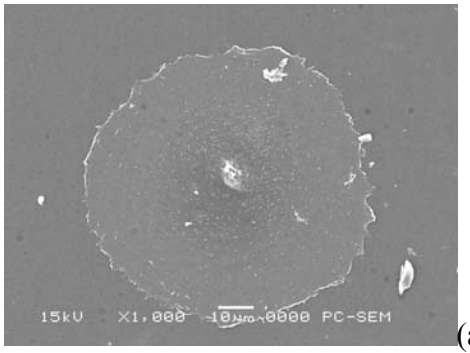
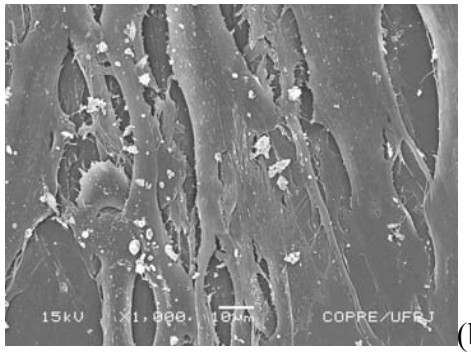
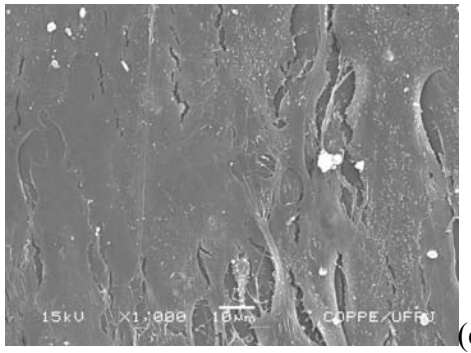
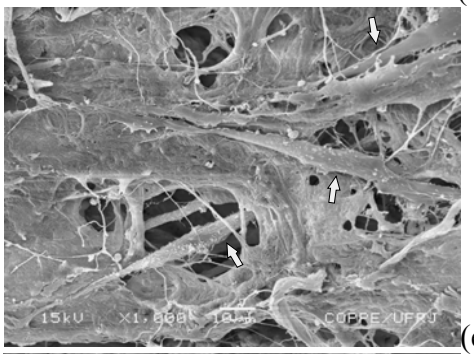
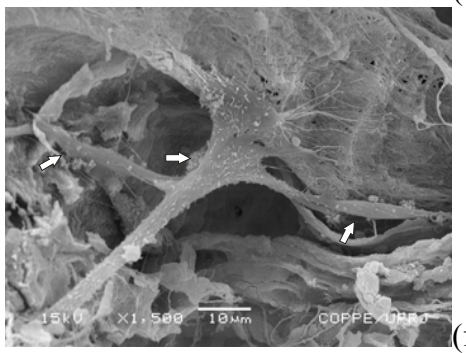
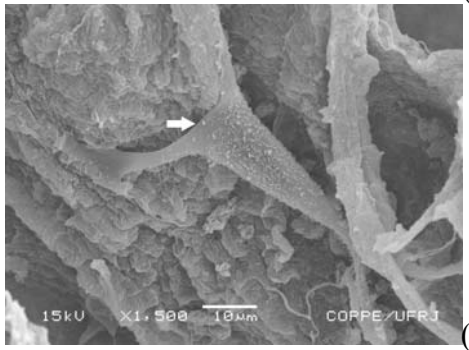
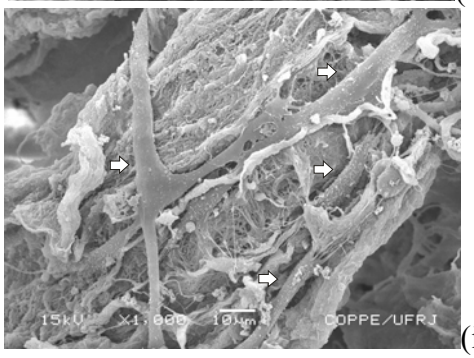
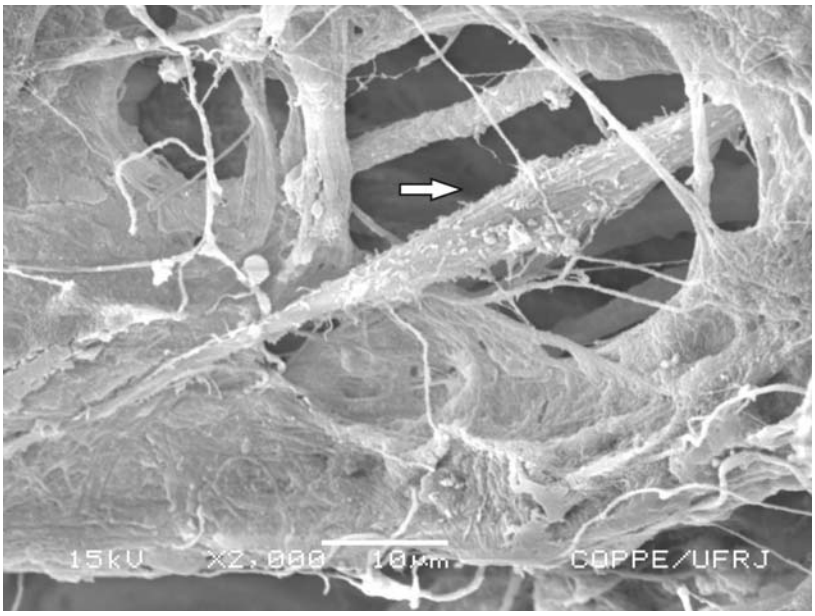
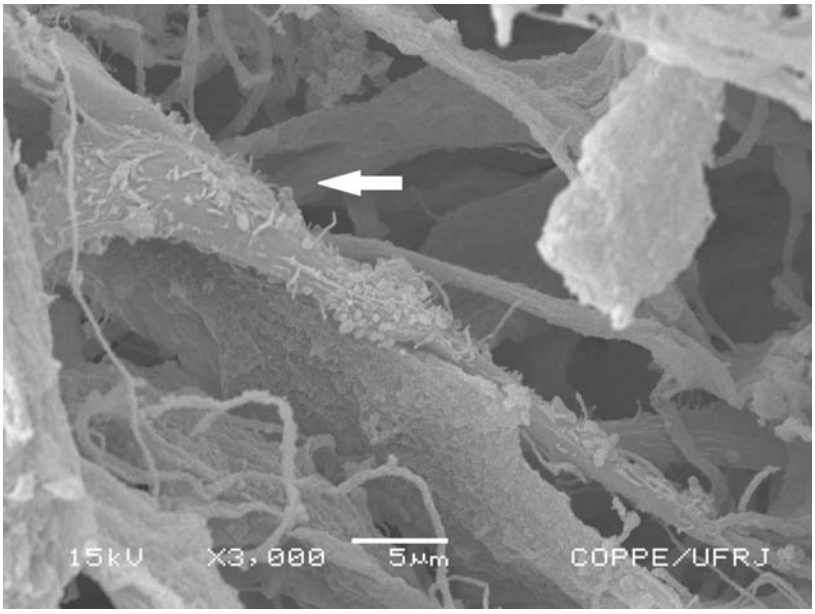
Amostra	4 Horas	7 Dias	14 Dias
Controle	 (a)	 (b)	 (c)
HA/CN-10/90	Células não foram observadas (d)	 (e)	 (f)
HA/CA-10/90	Células não foram observadas (g)	 (h)	 (i)

Figura 5.27 – Micrografias (MEV) dos materiais cultivados com osteoblastos (setas) após 4 h (a;d;g), 7 d (b;e;h) e 14 d (c;f;i) .



(a)



(b)

Figura 5.28 – Micrografias mostrando osteoblastos penetrando o material pelos poros presentes: (a) HA/CN-10/90 (b) HA/CN-10/90.

5.4 - Considerações Gerais

O desenvolvimento de materiais para aplicações como enxertos ósseos foi fortemente influenciado pelo surgimento e consolidação da Engenharia de Tecidos. Com a entrada do terceiro milênio, biomateriais de 3ª geração estão sendo desenvolvidos com o foco na regeneração dos tecidos (HENCH & POLAK, 2002). No caso do substituto ósseo, o tecido passa a ser gerado em laboratório por meio da associação de arcabouços sintéticos ou naturais, células e substâncias ativas como proteínas morfogenéticas e fatores de crescimento, otimizando e acelerando a resposta do tecido circundante. O desenvolvimento de arcabouços apropriados vem sendo objeto de estudo em diversos grupos de pesquisa (ITO, 1998; HUTMACHER, 2000; MCDONOUGH et *al.*, 2000; SACHLOS & CZERNUSZKA, 2003; WANG *et al.*, 2004; XU & SIMON JR., 2004). No desenvolvimento de arcabouços para preenchimento de defeitos ósseos, alguns pesquisadores se baseiam na composição e configuração estrutural do tecido ósseo (MARTINS & GOISSIS, 1996; LAWSON & CZERNUSZKA, 1998; GOISSIS *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al*., 2003). Com isso, tem crescido o interesse no desenvolvimento de suportes contendo hidroxiapatita e colágeno, principais componentes da matriz extracelular. A produção envolve não somente a mimetização da composição, mas fundamentalmente a reprodução de sua configuração estrutural.

O processo de mineralização natural ainda não é bem esclarecido. Alguns autores apontam que a mineralização inicia-se em vesículas presentes entre as fibras de colágeno e posteriormente nas regiões de *gap*, entre as moléculas de tropocolágeno (LOWENSTAM & WEINER, 1989; LANDIS & SILVER, 2002). Outros sugerem que o processo inicial de mineralização ocorre diretamente nas regiões de *gap*, com orientação preferencial ao longo do eixo das fibrilas de colágeno (WEINER & TRAUB, 1989; ZHANG *et al.,* 2003). A orientação preferencial dos cristais ainda é questão de controvérsia. Segundo COOL *et al*. (2002), somente 25% da fase mineral está localizada dentro da fibrila de colágeno e que, portanto, os 75% restantes estariam fora das regiões de *gap* e sobre a molécula de colágeno e sem orientação preferencial aparente. As diferenças observadas devem decorrer do uso de diferentes metodologias experimentais e de caracterização. Além disso, a morfologia do osso é altamente

variável em função do local, idade, etc., o que dificulta sua mimetização (LEGEROS, 1994).

A caracterização química por infravermelho utilizada neste trabalho não permitiu diferenciar o colágeno nativo (CN) do colágeno aniônico (CA). Entretanto, foram observadas diferenças na formação das fibras quando submetidos às condições de síntese do compósito, com ou sem presença dos reagentes inorgânicos. O colágeno nativo (CN) apresentou comportamento de fibrilogênese similar quando na ausência e na presença de HA. Em ambos os casos a formação das fibras ocorreu instantaneamente, com o gel de CN formando um novelo de fibras de colágeno ao redor da haste do agitador mecânico.

Já o colágeno aniônico (CA) apresentou um comportamento diferenciado do colágeno nativo (CN): quando submetido às mesmas condições de preparação, o material não forma uma associação de fibras evidente. Semelhante desempenho de fibrilogênese foi observado por BET *et al.* (2001). Estes autores verificaram que o colágeno aniônico, apesar de preservar a estrutura hélice tripla do colágeno, provoca a diminuição da estabilidade térmica do material e dificulta a capacidade de formação de fibrilas com o aumento do número de grupos carboxílicos. Na síntese dos compósitos contendo CA, o processo de fibrilogênese do CA e a precipitação simultânea da HA permitiram uma associação mais efetiva dos fosfatos de cálcio formados com as fibras, sendo possível a visualização de novelos distribuídos por todo meio reacional. Ao contrário dos compósitos contendo CN, os compósitos contendo CA começam a formar um novelo ao redor da haste do agitador somente na etapa de digestão do material.

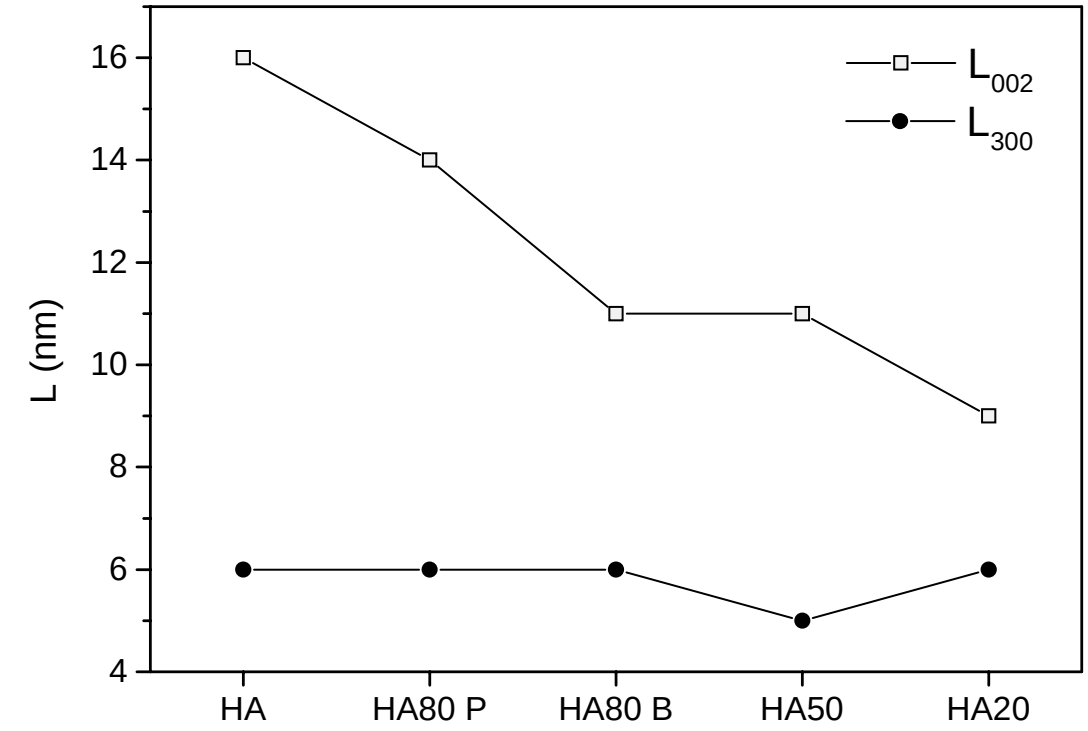
A caracterização da fase mineral feita por DRX mostrou que em todas as amostras preparadas houve a precipitação de uma hidroxiapatita carbonatada, não sendo detectada a presença de outros fosfatos de cálcio. Conforme mostrado na Tabela 5.11, os parâmetros de rede da HA formada na presença ou ausência de colágenos são mais próximos dos valores encontrados nos primeiros estágios de formação do osso natural, cuja fase mineral é caracterizada como hidroxiapatita carbonatada (ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1994; AOKI, 1994). A dispersão dos valores de parâmetro de rede pode estar relacionada com uma variação no teor de carbonato presente no material.

Tabela 5.11 – Parâmetros da HA sintetizada com e sem presença de colágeno.

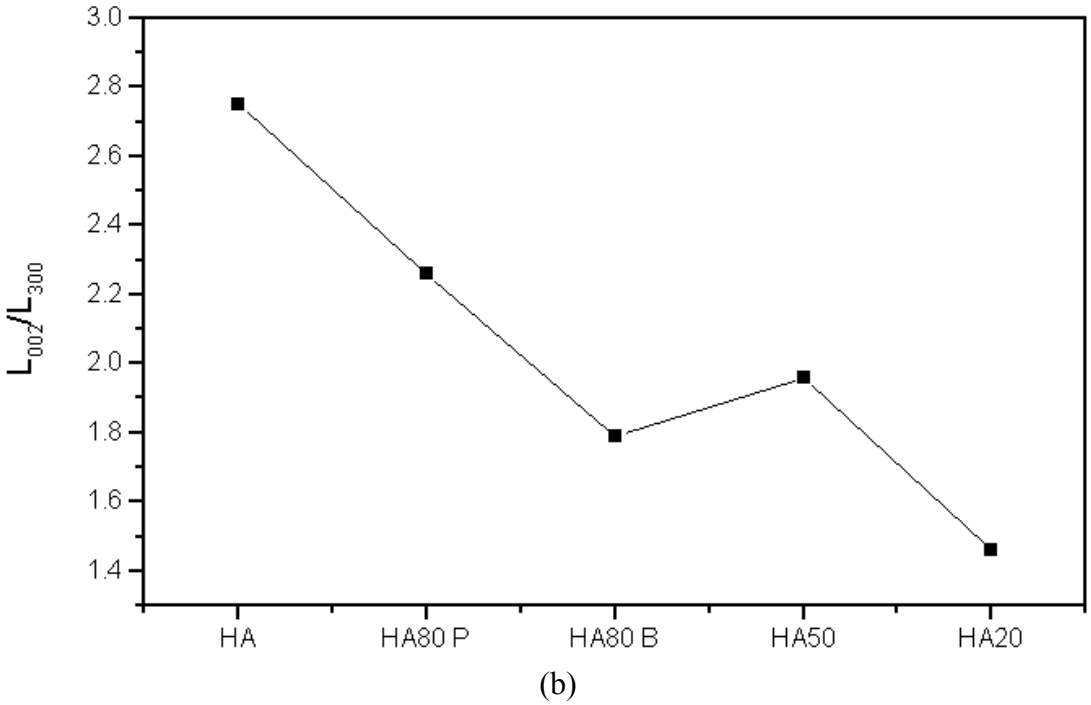
Amostra	*a = b (Å)*	*c (Å)*
HA	9,4362	6,8759
HA/CN-80/20 B	9,4375	6,8761
HA/CN-80/20 P	9,4449	6,8755
HA/CA-50/50	9,4433	6,8762
HA/CN-50/50	9,4436	6,8764
HA/CN 20/80	9,4414	6,8708
HA[a]	9,4220	6,8833
Osso de fetos[b]	9,4411	6,8845
Osso de adulto[b]	9,3836	6,8745

[a] MENEGHINI et al. (2003) e LEGEROS (2002) – hidroxiapatita sintética.
[b] MENEGHINI et al. (2003) - ossos humanos refinados pelo método de Rietveld.

Os cristais formados apresentam dimensões nanométricas e uma morfologia acicular similar à da apatita biológica (LEGEROS, 1994). A presença de colágeno, tanto nativo quanto aniônico, provoca a diminuição do tamanho dos cristais formados, principalmente ao longo da direção (002). A formação de hidroxiapatita é um processo que envolve nucleação e crescimento de cristais. Dessa forma, a presença de colágeno no meio reacional influi na velocidade de nucleação favorecendo a formação de cristais menores. Nas amostras contendo colágeno nativo verificou-se que o teor de colágeno no compósito afeta o crescimento do cristal (Figura 5.29a) verificando-se uma tendência a esferoidização dos cristais (Figura 5.29b) com a diminuição do teor de HA. Os resultados sugerem que o colágeno exerce uma grande influência na formação dos cristais de HA, sendo esse efeito menor à medida que o cristal tem menor contato com a molécula de colágeno. O crescimento dos cristais ocorre preferencialmente ao longo da direção (002), eixo de maior simetria da HA. Esse crescimento é retardado pela presença da proteína que atua como um catalisador desse processo.



(a)



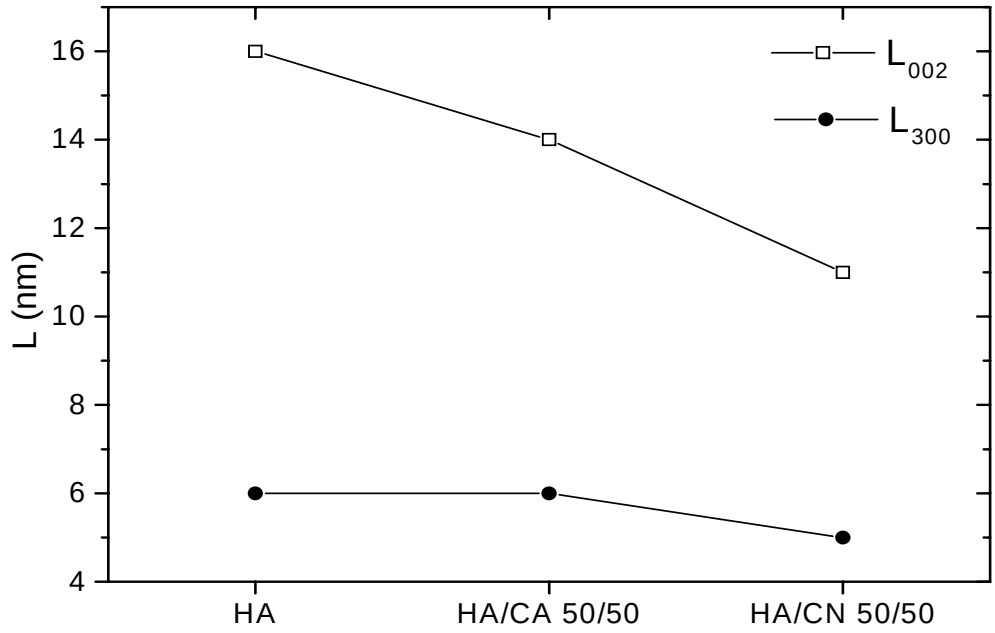
(b)

Figura 5.29 – Tamanho médio dos cristais nas direções (002) e (300) (a) e fator de forma dos cristais (b) na HA pura e nos compósitos contendo colágeno nativo. (HA – HA pura; HA80 P – fase pó do compósito HA/CN 80/20 P; HA80 B – bloco do compósito HA/CN 80/20 B; HA50 – compósito HA/CN 50/50 e HA20 - HA/CN 20/80).

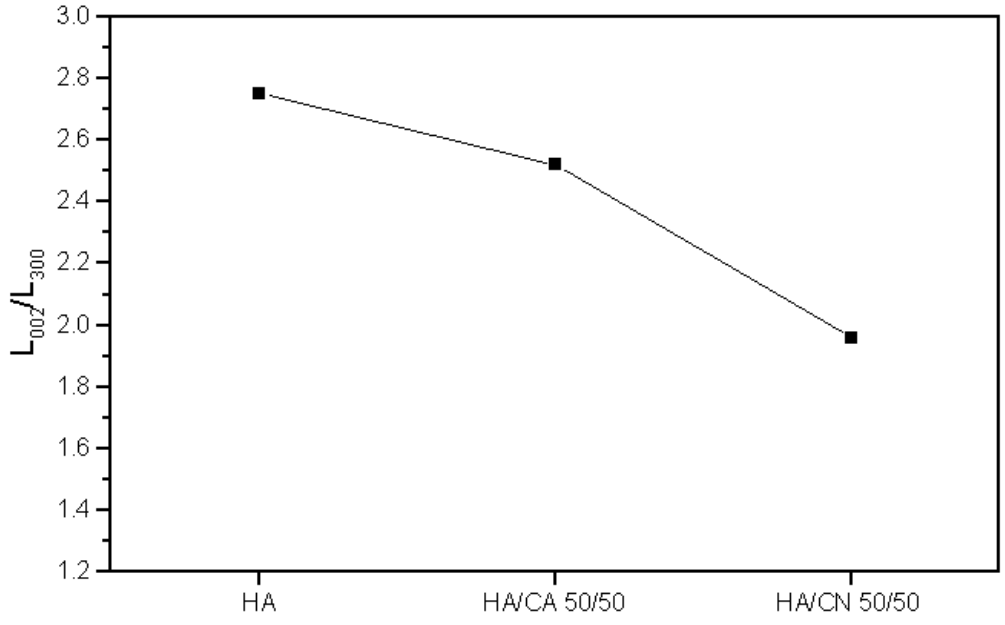
Segundo AOKI (1994) e LEGEROS (1994), a baixa cristalinidade e tamanho reduzido dos cristais estão relacionados com a presença de defeitos na rede das apatitas biológicas. A solubilidade do fosfato também é associada à baixa cristalinidade. Segundo LEGEROS (1994) e ELLIOT (1994) a extensão da dissolução será função da composição, tamanho da partícula, porosidade (micro e macroporosidade), área superficial específica e cristalinidade (tamanho e perfeição do cristal). Entretanto, LEGEROS (2002) também sugere que a presença de uma matriz orgânica pode promover um efeito protetor diminuindo a extensão de dissolução de cristais de HA com baixa cristalinidade.

Portanto, comparando-se os resultados de refinamento obtidos para os compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50 (Figura 5.30), confirma-se a tendência de diminuição dos cristais quando a síntese da HA é realizada em presença do colágeno. No entanto, esse efeito é maior quando o colágeno nativo está presente no meio reacional do que o colágeno aniônico. O comportamento diferenciado dos colágenos no meio reacional parece ser o fator preponderante na taxa de nucleação e na morfologia dos cristais formados. A formação de fibras no colágeno aniônico (CA) é lenta e os cristais são formados em toda a extensão do meio reacional.

A existência de fibras mais soltas de colágeno aniônico (CA) permite ainda um maior contato e distribuição dos cristais formados na superfície das fibras de colágeno, conforme observado nas imagens de MEV dos compósitos HA/CA-10/90 (Figuras 5.24b e 5.25d). Além disso, a formação de cristais mais alongados nos compósitos contendo colágeno aniônico, possibilita uma distribuição dos cristais mais homogênea sobre as fibras no final da etapa de digestão (Figura 5.26b). A formação e aglomeração das fibras de colágeno nativo no meio reacional forma um ambiente confinado gerando cristais menores e mais regulares, como observado nas amostras coletadas no início da fase de digestão (Figura 5.24a), e mesmo após 6 horas de digestão (Figura 5.25c).



(a)



(b)

Figura 5.30 – Tamanho médio dos cristais nas direções (002) e (300) (a) e fator de forma dos cristais (b) na HA pura e nos compósitos HA/CN-50/50 e HA/CA-50/50.

Pelas análises realizadas por IV-RD, verifica-se a formação de fosfato de cálcio em todos compósitos (PEÑA & VALLET-REGI, 2003). Entretanto a identificação da natureza do composto ficou prejudicada em função da baixa qualidade dos espectros obtidos. Mesmo a identificação de bandas de grupos CO_3^{2-} sempre presentes na HA

carbonatada foi dificultada pela existência desses grupos na estrutura do colágeno. Conforme identificado na HA pura, os grupos CO_3^{2-} estão também presentes na fase mineral dos compósitos. Esse resultado era esperado uma vez o CO_2 do ar é facilmente absorvido na estrutura da hidroxiapatita durante a preparação (ROSSI, *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a hidroxiapatita não forma uma ligação química forte com as moléculas de colágeno (KIKUCHI *et al.*, 2001; CHANG & TANAKA, 2002a). Isso porque não foram identificadas alterações nos modos vibracionais como do grupamento C=O da amida I por volta de 1685 cm^{-1} e do grupamento COO^- em 1340 cm^{-1}. A interação do colágeno e a hidroxiapatita deve envolver forças de ligação fracas, tais como forças de van der Waals e ligações de hidrogênio, e interação mecânica.

6 - CONCLUSÕES

Este trabalho objetivou a produção e caracterização de compósitos de hidroxiapatita e colágeno do tipo I, nativo e aniônico. A análise dos resultados de caracterização microestrutural, química e morfológica dos compósitos obtidos permitiu se chegar às seguintes conclusões:

1) O método de precipitação por titulação, utilizando como reagentes soluções de $Ca(OH)_2$ e H_3PO_4, mostrou-se eficiente para a produção compósitos HA/Colágeno. Verificou-se que a utilização do colágeno na forma de gel proporciona uma interação mais efetiva entre a molécula de colágeno e a fase mineral formada.

2) Os revestimentos das fibras de colágeno com HA foram obtidos utilizando-se uma relação mássica de 10 a 50 % de HA. Teores de HA superior a 50% resultaram na formação de pó dissociado do compósito.

3) Análises por FTIR sugerem que a presença dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} no meio reacional não modificam de superfície do colágeno, uma vez que não foram identificadas alterações nos modos vibracionais de grupamentos pertencentes à molécula de colágeno.

4) Os refinamentos dos difratogramas de XRD utilizando o método de Rietveld indicam que a fase mineral formada é uma hidroxiapatita carbonatada, não tendo sido identificado nenhum outro fosfato de cálcio. O refinamento dos difratogramas pelo tratamento anisotrópico confirma a preferência de crescimento dos cristais segundo a direção 002, gerando estruturas aciculares.

5) A morfologia dos cristais de hidroxiapatita e a textura do revestimento são determinadas pelo comportamento dos colágenos, nativo e o aniônico, no meio reacional. A dispersão das fibras do colágeno aniônico resulta em cristais maiores e um revestimento mais homogêneo.

6) Osteoblastos apresentaram atividade proteolítica sobre os materiais, indicando a citocompatibilidade do compósito.

7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1) Estudo de dissolução do compósito em meio aquoso e em solução de fluido corpóreo (SFC).

2) Estudo da formação do compósito variando outros parâmetros de síntese, tais como concentração do colágeno e taxa de agitação.

3) Avaliação quantitativa do comportamento de osteoblastos sobre compósitos de HA/Colágeno do tipo I.

4) Avaliação “In Vivo” de compósitos de HA/Colágeno do tipo I.

5) Incorporação de fármacos para produção de sistemas de liberação controlada.

8 - REFERÊNCIAS

AOKI, H., 1994, In: *Medical Application of Hydroxyapatite*. 1º edição, Tokyo, Ishiyaku, EuroAmericana,.

BADYLAK, S.F., 2002, "The Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction", *Cell & Developmental Biology*, Vol. 13, p. 377-383.

BAIG, A.A.; FOX, J.L.; YOUNG, R.A.; HSU, J.; HIGUCHI, W.I.; CHETTRY, A.; *et al*., 1999, "Relationships Among Carbonated Apatite Solubility, Crystallite Size, and Microstrain Parameters", *Calcified Tissue International*, Vol. 64, p. 437-449.

BAKOS, D.; SOLDÁN, M.; HERNÁNDEZ-FUENTES, I., 1999, "Hydroxyapatite-Collagen-Hyaluronic Acid Composite", Vol. 20, p. 191-195.

BENTHAN – Collagen Molecule: *http://www.benthan.org/cgt1-1/ochiya/Ochiya-fig/f2-p35.gif*; acesso em 10 de dezembro de 2002.

BET, M.R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C.A., 2001, "Characterization of Polyanionic Collagen Prepared by Selective Hydrolysis of Asparagine and Glutamine Carboxyamine Side Chains", *Biomacromolecules*, Vol. 2, p. 1074-1079.

BETT, J.A.S.; CHRISTNER, L.G.; KEITH HALL, W., 1967, "Studies of the Hydrogen Held by Solids". XII. Hydroxyapatite Catalysts", *Journal of the American Chemical Society*, 89:22, p. 5535-5541.

THE BIOMET ADVANTAGE– BIOMET Annual Report; www.biomet.com/ corporate/investors/annuals/2004.pdf; acesso em 9 de outubro de 2004.

BMME – BMME 112/APPL 161 – Biomaterials (Fall 2001); Lecture 11: Natural Materials; http:://www.bme.unc.Edu/academics/syllabi/; acesso em 23 de julho de 2002.

BOHNER, M., 2000, "Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements", *Injury International Journal of the Care of the Injury*, Vol. 31, S-D37-47.

BONASSAR, L.J.; VACANTI, C.A., 1998, "Tissue Engineering: The First Decade and Beyond", *Journal of Cellular Biochemistry Supplements*, 30/31, p. 297-303.

BOSKEY A.L., 2001, "Musculoskeletal Disorders and Orthopedic Conditions", *Journal of American Medical Association (JAMA)*, February 7, Vol. 285, no. 5, p. 619-623.

BRADT, J.-H; MERTIG, M.; TERESIAK, A.; POMPE, W., 1999, "Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation", *Chemical Materials*, Vol. 11, p. 2694-2701.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F., 2000, "Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 21, p. 2347-2359.

CHAI, C.S.; BEN-NISSAN, B., 1999, "Bioactive Nanocrystalline Sol-Gel Hydroxyapatite Coatings", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 10, p. 456-469.

CHANG, M.C.; TANAKA, J., 2002, "FT-IR Study for Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Cross-Linked by Glutaraldehyde", *Biomaterials*, Vol. 23, p. 4811-4818.

CHANG, M.C.; TANAKA, J., 2002, "XPS Study for the Microstructure Development of Hydroxyapatite-Collagen Nanocomposites Cross-Linked Using Glutaraldehyde", *Biomaterials*, Vol. 23, p. 3879-3885.

CHESMEL, K.D., CLARK, C.C. *et al.*, 1995, "Cellular Responses to Chemical and Morphologic Aspects of Biomaterial Surfaces. II. The Biosynthetic and Migratory Response of Bone Cell Populations", *Journal of Biomedical Material Research*, v. 29, p. 1101-1110.

CHEVALLAY, B.; HERBAGE, D., 2000, "Collagen-Based Biomaterials as 3D Scaffold for Cell Cultures: Applications for Tissue Engineering and Gene Therapy", *Medical & Biological Engineering & Computing*, Vol. 38, p. 211-218.

CIENFUERGOS, F.; VAITSMAN, D., 2000, *Análise Instrumental.* Rio de Janeiro: Editora Interciência.

COOL, S.M.; FORWOOD, M.R.; CAMPBELL, P.; BENNETT, M.B., 2002, "Comparisons Between Bone and Cementum Compositions and the Possible Basis for Their Layered Appearances", *Bone*, Vol. 30, N. 2, p. 386-392.

CUERONET – ESTRUTURA DEL COLÁGENO; *http://www.cueronet.com/técnica/Colágeno.htm*; acesso em 15 de outubro de 2002.

DELIGIANNI, D.D., KATSALA, N.D., KOUTSOUKOS, P.G., MISSIRLIS, Y.F., 2001, "Effect of Surface Roughness of Hydroxyapatite on Human Bone Marrow Cell Adhesion, Proliferation, Differentiation and Detachment Strength", *Biomaterials*, v. 22, p. 87-96.

DOROZHKIN, S.V.; EPPLE, M., 2002, "Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate", *Chemical International Education*, Vol. 41, p. 3130-3146.

DU, C.; CUI, F.Z.; ZANG, W.; FENG, Q.I.; ZHU, X.D; de GROOT, K., 2000, "Formation of Calcium Phosphate/Collagen Composites Through Mineralization of Collagen Matrix, *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 50, p. 518-527.

ELLIOT, J.C., 1994, "Structure and Chemistry of the Apatite and Other Calcium Orthophosphates", 1 edition, Amsterdam, Elsevier.

FIBROGEN; *http://www.fibrogen.com/collagen/*; acesso em 15 de julho de 2002.

FRIESS, W., 1998, "Collagen – Biomaterial for Drug Delivery", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics"*, Vol. 45, p. 113-136.

GOISSIS, G.; MAGINADOR, S.V.S.; MARTINS, V.C.A., 2003, "Biomimetic Mineralization of Charged Collagen Matrices: In Vitro and In Vivo Study", *Artificial Organs*, Vol.27, n. 5, p. 437-443.

GREENWALD, A.S.; BODEN, S.D.; GOLDBERG, V.M.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C.T.; ROSIER, R.N., 2002, "Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions & Applications", *American Academy of Orthopaedic Surgeons - 69th Annual Meeting,* February 13-17, Dallas, Texas.

HENCH, L.L.; ETHRIDGE, E.C., 1982, "Characterization of Ceramic Surfaces", *Biomaterials, an Interface Approach*, Academic Press, p. 76-82.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M., 2002, "Third-Generation Biomedical Materials", *Science*, Vol. 295, p. 1014-1017.

HSU, F.Y.; CHUEH, S.-C.; WANG, Y.J., 1999, "Microspheres of Hydroxyapatite/ Reconstituted Collagen as Supports for Osteoblast Cell Growth", *Biomaterials*, Vol. 20, p. 1931-1936.

HUTMACHER, D. W., 2000, "Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage", *Biomaterials*, Vol. 21, p. 2529-2543.

ITO, Y., 1998, "Tissue Engineering by Immobilized Growth Factors", *Materials Science and Engineering*, C 6, p. 267-274.

IVANOVA, T.I.; FRANK-KAMENETSKAYA, O.V.; KOL'TSOV, A.B.; UGOLKOV, V.L., 2001, "Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition", *Journal of Solid State Chemistry*, Vol. 160, p. 340-349.

JHS – JHS LABORATÓRIOS; http://www.biominas,org.br/empresas/jhs.htm; acesso em 10 de agosto de 2002.

JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995, In: *Histologia Básica*. 8º edição, Editora Guanabara Koogan.

KANNAN, S.; BALAMURUGAN, A.; RAJESWARI, S., 2001, "Bio-Composites: A Review of Literature", *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, Vol. 14, N. 2, p. 30-36.

KASEMO, B., 2002, "Biological Surface Science", *Surface Science*, Vol. 500, p. 656-677.

KIM, H.M.; MIYAJI, F.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T., 1996, "Preparation of Bioactive Ti and its Alloys Via Simple Chemical Surface Treatment", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 32, p. 409-417.

KIKUCHI, M.; SUETSUGU, Y.; TANAKA, J.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K. *et al.*, 1999, "The Biomimetic Synthesis and Biocompatibility of Self-Organized Hydroxyapatite/Collagen Composites", *Bioceramics*, Vol. 12, p. 393-396.

KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S; SHINOMIYA K.; TANAKA, J., 2001, "Self-organization Mechanism in a Bone-like Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Synthesized in Vitro and its Biological Reaction in Vivo", *Biomaterials*, 22, p. 1705-1711.

KOBAYASHI, N.; ONUMA, K.; OYANE, A.; YAMAZAKI, A., 2003, "The Role of Phosvitin for Nucleation of Calcium Phosphate on Collagen", *Bioceramics 16*, p. 537-540.

KUKUROVA, E.; BAKOS, D.; KOLLER, J., 1999, "Use of Membranes on the Basis of Collagen in Substitutional Medicine", *Bratisl Lek Listy*, Vol. 100, Issue 10, p. 560-566.

LANDIS, J.L.; SILVER, F.H., 2002, "The Structure and Function of Normally Mineralizing Avian Tendons", *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A, Vol. 133, p. 1135-1157.

LANGSTAFF, S.; SAYER, M.; SMITH, T.J.N.; PUGH, S.M.; HESP, S.A.M.; THOMPSON, W.T., 1999, *Biomaterials*, Vol. 20, p. 1727-1741.

LAWSON, A.C.; CZERNUSZKA, J.T., 1998, "Collagen-Calcium Phosphate Composites", Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, *Journal of Engineering in Medicine,* Vol. 212, Issue 6, p. 413-425.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y., 2001, "Biomedical Applications of Collagen", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 221, p. 1-22.

LEGEROS, R.Z., 1994, "Biological and Synthetic Apatites". In: BROWN, P.W.; CONSTANTZ, B., *Hydroxyapatite and Related Materials*, CRC Press, Boca Raton, p. 3-28.

LEGEROS, R.Z., 2002, "Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphate", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, N. 395, p. 81-98.

LENNINGER, J., 1998, *Princípios de Bioquímica*, Cap. 7, ed. Savier, p.118-142.

LIFE – BONE; http://www.life.uiuc.edu/csb/213/pdf/14.pdf; acesso em 10 de dezembro de 2002.

LOWENSTAM, H.A.; WEINER, S., 1989, *On Biomineralization*, Cap. 9, ed. Oxford University Press, p. 144-167.

MARTINS, V.C.A.; GOISSIS, G., 1996, "Colágeno Aniônico como Matriz para Deposição Orientada de Minerais de Fosfato de Cálcio", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Out/Dez, p. 30-36.

MCDONOUGH W.G.; AMIS, E.J.; KOHN, J., 2000, "Critical Issues in the Characterization of Polymers for Medical Applications", *NISTIR 65*, U.S.A., p. 1-109.

MENEGHINI, C.; DALCONI, M.C.; NUZZO, S.; MOBILIO, S.; WENK, R.H., 2003, "Rietveld Refinement on X-Ray Diffraction Patterns of Bioapatite in Human Fetal Bones", *Biophysical Journal*, Vol. 84, p. 2021-2029.

MYTHILI, J.; SASTRY, T.P.; SUBRAMANIAN, M., 2000, "Preparation and Characterization of a New Bioinorganic Composite: Collagen and Hydroxyapatite", *Biotechnology Applied Biochemistry*, Vol. 32, p. 155-159.

NIEDERAUER, G.G.; SLIVKA, M.A.; LEATHERBURY, N.C.; KORVICK, D.L. *et al.*, 2000, "Evaluation of Multiphase Implants for Repair of Focal Osteocondral Defects in Goats", *Biomaterials*, Vol. 21, p. 2561-2574.

NOAH, E.M.; CHEN, J.; JIAO, X.; HESCHEL, I.; PALLUA, N., 2002, "Impact of Sterilization on the Porous Design and Cell Behavior in Collagen Sponges Prepared for Tissue Engineering", *Biomaterials*, Vol. 23, p. 2855-2861.

PANDA, R.N.; HSIEH, M.F.; CHUNG, R.J.; CHIN, T.S., 2003, "FTIR, XRD, SEM and Solid State NMR Investigations of Carbonate-Containing Hydroxyapatite Nano-Particles Synthesized by Hydroxide-Gel Technique", *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, Vol. 64, Issue 2, p. 193-199.

PARRY, D.A., 1988, "The Molecular and Fibrilar Structure of Collagen and its Relationship to the Mechanical Properties of Connective Tissue", *Biophysical Chemistry*, Vol. 29, p. 195-209.

PEÑA, J., VALLET-REGI, M., 2003, "Hydroxyapatite, Tricalcium Phosphate and Biphasic Materials Prepared by a Liquid Mix Technique", *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 23, p. 1687-1696.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNNACHE-ASSOLLANT, D.; THOMAS, P., 2002, "Calcium Phosphate Apatites with Variable Ca/P Atomic Ratio I. Synthesis, Characterization and Thermal Stability of Powders", *Biomaterials*, Vol. 23, 1065-1072.

REIS, M.L.C.; FERREIRA, J., 1998, "Método de Refinamento Rietveld e Procedimento Quasar na Análise de Misturas de Fases Minerais", *Estudos, Notas e Trabalhos, Tomo 40*. Instituto Geológico e Mineiro. Versão *Online* no *site* do IGM (http://www.igm.pt/edicoes_online/estudos/tomo40/artigo7.htm).

RHEE, S-H.; TANAKA, J., 1998, "Hydroxyapatite Coating on a Collagen membrane by a Biomimetic Method", *Journal of the American Ceramic Society*, Vol. 81, n. 11, p. 3029-3031.

RHO, J-Y; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P., 1998, "Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone", *Medical Engineering & Physics*, Vol. 20, p. 92-102.

ROCHA, L.B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M.A., 2002, "Biocompatibility of Anionic Collagen Matrix as Scaffold for Bone Healing", *Biomaterials*, Vol. 23, p. 449-456.

ROETHER, J.A.; BOCCACCINI, A.R.; HENCH L.L.; MAQUET, V.; GAUTIER, S.; JÉRÔME, R., 2002, "Development and In Vitro Characterisation of Novel Bioresorbable and Bioactive Composite Materials Based on Polylactide Foams and Bioglass® for Tissue Engineering Applications", *Biomaterials*, Vol. 23, Issue 18, p. 3871-3878.

ROSSI, A. M., MOREIRA, J., MAVROPOULOS, E., SOARES, G. A., MOURE, G. T., 2003, "Dissolution of Calcium-Deficient Hydroxyapatite Synthesized at Different Conditions", *Materials Characterization*, Vol.50, n.2-3, p.203 - 207.

ROVERI, N.; FALINI, G.; SIDOTI, M.C.; TAMPIERI, A.; LANDI, E.; SANDRI, M.; PARMA, B., 2003, "Biologically Inspired Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals Inside Self-Assembled Collagens Fibers", *Materials Science & Engineering C*, 1065, p. 1-6.

SACHLOS E.; CZERNUSZKA, J.T., 2003, "Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds", *European Cells and Materials*, Vol. 5, p. 29-40.

SAÚDE – Programa Saúde do Idoso: *http://www.saude.gov.br*; acesso em 03 de maio de 2002.

SENA, L.A., 2003, "Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas: Síntese e Caracterização", *Exame de Qualificação*, p. 1-75.

SHEU, M-T.; HUANG, J.-C.; YEH, G.-C.; HO, H.-O, 2001, "Characterization of Collagen Gel Solutions and Collagen Matrices for Cell Culture", *Biomaterials*, Vol. 22, p. 1713-1719.

SIEBERS, M.C.; ter BRUGGE, P.J.; WALBOOMERS, X.F.; JANSEN, J.A., 2005, "Integrins as Linker Proteins Between Osteoblasts and Bone Replacing Materials. A Critical Review", *Biomaterials*, Vol. 26, p. 137-146.

SIKAVITSAS, V.I.; TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G., 2001, "Biomaterials and Bone Mechanotransduction", *Biomaterials*, Vol. 22, p. 2581-2593.

SILVA, C.C.; THOMAZINI, D.; PINHEIRO, A.G.; ARANHA, N.; FIGUEIRÓ, S.D. *et. al.,* 2001, "Collagen-Hydroxyapatite Films: Piezoelectric Properties", *Materials Science and Engineering*, B86, p. 210-218.

SIMÕES, RD; SJZENFELD, VL; ATRA, E.; RODRIGUES DE LIMA, G.; BARACAT, E.C., 1995, "Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose". In: *Ginecologia Endócrina*, 1ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, p. 272-282.

SIVAKUMAR, M.; RAO, K.P., 2002, "Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres", *Biomaterials*, Vol. 23, p. 3175-3181.

SUVOROVA, E.I.; BUFFAT, P.A., 1999, "Electron Diffraction from Micro- and Nanoparticles of Hydroxyapatite", *Journal of Microscopy*, Vol. 196, p. 46-58.

SYLVESTER, M.F.; YANNAS, I.V.; SALZMAN, E.W.; FORBES, M.J., 1989, "Collagen Banded Fibril Structure and the Collagen-Platelet Reaction", *Thrombosis Research*, Vol. 55, p. 135-148.

TABATA, Y., 2000, "The Importance of Drug Delivery Systems in Tissue Engineering", *Pharmaceutical Science & Technology Today*, Vol. 3, Issue 3, p. 80-89.

TADIC, D.; PETERS, F.; EPPLE, M., 2002, "Continuous Synthesis of Amorphous Carbonated Apatites", *Biomaterials*, Vol. 23, p. 2553-2559.

TENHUISEN, K.S.; MARTIN, R.I.; KLIMKIEWICZ, M.; BROWN, P.W., 1995, "Formation and Properties of a Synthetic Bone Composite: Hydroxyapatite-Collagen", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 29, p. 803-810.

TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G., 2002, "Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-quitosana", *Química Nova*, Vol. 25, n. 6, p. 943 - 948.

Van der HOUWEN, J.A.M.; CRESSEY, G.; CRESSEY, B.A.; VALSAMI-JONES, E., 2003, "The Effect of Organic Ligands on the Crystallinity of Calcium Phosphate", *Journal of Crystal Growth*, Vol. 249, p. 527-583.

YONG, R.A., 1995, In*: The Rietveld Method*, Oxford University Press, New York.

WANG, X.; BANK, R.A.; TELOPPELE, J.M.; AGRAWAL, C.M., 2001, "The Role of Collagen in Determining Bone Mechanical Properties", *Journal of Orthopaedics Research*, Vol. 19, p. 1021-1026.

WANG, X.; GROGAN, S.P.; RIESER, F.; WINKELMANN, V; MAQUET, V.; LA BERGE, M.; MAINIL-VARLET, P., 2004, "Tissue Engineering of Biphasic Cartilage Constructs Using Various Biodegradable Scaffolds: an In Vitro Study", *Biomaterials*, Vol. 25, p. 3681-3688.

WEINER, S.; TRAUB, W., 1989, "Crystal Size and Organization in Bone", *Connect Tissue Research*, Vol. 21, p. 259-265.

XU, H.H.K.; SIMON JR., C.G., 2004, "Self-hardening Calcium Phosphate Composite scaffold for Bone Tissue Engineering", *Journal of Orthopaedic Research*, Vol. 22, p. 535-543.

ZANABONI, G.; ROSSI, A.; ONANA, A.M.T.; TENNI, R., 2000, "Stability and Networks of Hydrogen Bonds of the Collagen Triple Helical Structure: Influence of pH and Chaotropic Nature of Three Anions", *Matrix Biology*, Vol. 19, p. 511-520.

ZHANG, W.; LIAO, S.S.; CUI, F.Z., 2003, "Hierarchical Self-Assembly of Nano-Fibrils in Mineralized Collagen", *Chemical Material*, Vol. 15, p. 3221-3226.

Anexo 1

Procedimento de preparação para MEV e MET dos compósitos

O material fixado em solução aquosa de glutaraldeído 2,5% e separado para análise por MEV foi lavado com solução tampão de cacodilato de sódio 0,1mol.L^{-1}, posteriormente lavado com uma série de soluções aquosas de etanol (35%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) e seco por ponto crítico de CO_2 (BAL-TEC CPD 030). O material fixado e separado para análise em MET foi lavado em tampão de cacodilato de sódio 0,1mol.L^{-1} (3 vezes/ 5min). Depois a solução foi substituída por uma solução de tampão de cacodilato de sódio 0,1mol.L^{-1} contendo 1% de tetróxido de ósmio por 1h. Em seguida foram realizadas lavagens com tampão de cacodilato de sódio 0,1mol.L^{-1} (2 vezes/ 5min). Prosseguiu-se com a desidratação em soluções aquosas de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) e iniciada a infiltração em resina Polybed 812. Cortes com cerca de 70nm de espessura foram obtidos utilizando-se ultramicrótomo (RMC XT 6000-XL, Research and Maufacturing Co.). Após coletar os cortes nas grades de Cu contendo filme carbono, os materiais foram contrastados usando-se soluções de acetato de uranila e citrato de chumbo.

Procedimento de preparação para MEV das amostras obtidas após cultivo de células

Células aderidas ao material foram fixadas usando solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1mol L^{-1} por 1h e pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1,0% em tampão cacodilato de sódio 0,1mol L^{-1} por 15min. Após fixação, os materiais foram desidratados por imersão em soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes (15%, 35%, 50%, 70%, 90% e 100%). Cada imersão durou cerca de 10min tomando-se o cuidado de nunca deixar a amostra secar, principalmente para evitar danos à estrutura da membrana das células. As amostras foram secas usando aparelho de ponto crítico de CO_2 (BAL-TEC CPD 030) no Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - CCS/UFRJ e recobertas com um filme de ouro por *sputtering* (Balzers).