

FOSFATO TRICÁLCICO SUBSTITUÍDO POR MAGNÉSIO E COMPÓSITO
MAGNÉSIO – CARBONATO APATITA - COLÁGENO ANIÔNICO COMO POTENCIAL
SUBSTITUTO ÓSSEO

Márcia Soares Sader

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientador: Gloria Dulce de Almeida Soares

Rio de Janeiro
Novembro de 2010

FOSFATO TRICÁLCICO SUBSTITUÍDO POR MAGNÉSIO E COMPÓSITO
MAGNÉSIO – CARBONATO APATITA - COLÁGENO ANIÔNICO COMO POTENCIAL
SUBSTITUTO ÓSSEO

Márcia Soares Sader

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) 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.

Examinada por:

Prof^a. Gloria Dulce de Almeida Soares, D.Sc.

Prof^a. Racquel Zapanta LeGeros, Ph.D.

Prof. Celso Aparecido Bertran, D.Sc.

Dr. Alexandre Malta Rossi, D.Sc.

Prof. José Mauro Granjeiro, D.Sc.

Prof^a. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
NOVEMBRO DE 2010

Sader, Márcia Soares

Fosfato Tricálcico Substituído por Magnésio e Compósito
Magnésio-Carbonato Apatita – Colágeno Aniônico como Potencial
Substituto Ósseo / Marcia Soares Sader – Rio de Janeiro:
UFRJ/COPPE, 2010

XI, 117 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Glória Dulce de Almeida Soares

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de
Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2010.

Referências Bibliográficas: p. 91-102.

1. Colágeno. 2. Magnésio carbonato apatita. 3.
Compósito. 4. Enxertos ósseos. I. Soares, Glória Dulce
de Almeida. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro,
COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de
Materiais. III. Título.

Aos meus filhos Vitor e Luisa, minha eterna
fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Glória de Almeida Soares pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos na realização deste trabalho;

A Dra. Racquel Zapanta Legeros pela contribuição e oportunidade de fazer parte dos experimentos no Department of Biomimetics and Biomaterials, New York University College of Dentistry

À minha mãe pelo amor e incansável ajuda.

Á meu pai que não me viu conquistar esse título.

Aos meus amigos da pós (Tais, Evelise, Vânia, Helena, Cristiane, Nando, Marília) que me ajudaram a superar momentos difíceis e estavam sempre ao meu lado me mostrando um lindo lado da vida.

Aos amigos do laboratório de Biomateriais do PEMM pela união, carinho, amizade e paciência.

À amiga Kanthi Lewis , do Department of Biomimetics and Biomaterials da NYU, pelo carinho e estímulo incansável nos momentos difíceis enfrentados em Nova York.

Ao Dr. Dindo Mijares, do Department of Biomimetics and Biomaterials da NYU pela incansável ajuda e pelas análises realizadas.

Aos amigos e Jenni Hjerppe, David Holmes, Mary Pula e Lenadro Martins pelo carinho e amizade nos meses vividos em Nova York.

Ao Dr. Santiago Gomez pelas belíssimas imagens de microscopia óptica.

À professora e amiga Vicky Adler por todo o carinho e amizade.

Ao Dr. Jorge Araújo e Elizabeth Moreira pelas análises pelo método de Rietveld.

À amiga Mair Machado Medeiros pelo preparo das amostras e imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À Dra. Marta Cristina Nunes Amorim de Carvalho pelas imagens do FEG/MEV.

Ao Dr. Gutemberg Alves do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal Fluminense pela análise de citotoxicidade.

Aos amigos do CETEM, Reiner e Otávio pelas análises de DRX, TGA e pelo “empréstimo” do MEV.

Aos funcionários do PEMM que de forma direta ou indireta auxiliaram na realização desse trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta Tese.

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

FOSFATO TRICÁLCICO SUBSTITUÍDO POR MAGNÉSIO E COMPÓSITO MAGNÉSIO – CARBONATO APATITA - COLÁGENO ANIÔNICO COMO POTENCIAL SUBSTITUTO ÓSSEO

Márcia Soares Sader

Novembro/2010

Orientadora: Glória Dulce de Almeida Soares

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A busca por novos materiais para a regeneração óssea tem possibilitado o desenvolvimento de dispositivos com o mesmo padrão de cristalinidade do osso e com substituições iônicas, podendo estes serem promissores na substituição, restauração ou mesmo na regeneração das funções teciduais perdidas. Magnésio e carbonato são íons importantes associados a apatitas biológicas e foram escolhidos por serem incorporados de forma isolada ou conjunta às amostras. O objetivo da presente tese foi o desenvolvimento de apatitas substituídas por magnésio e de um compósito 3D de apatita substituída por magnésio e carbonato com colágeno aniônico (MCA/col) para aplicação em engenharia óssea tecidual. Foram realizadas caracterizações físico-químicas (DRX, FTIR, TGA, ICP, BET), morfológicas (micro-CT, MO, MEV, MET) e ensaios *in vitro* (degradação, citotoxicidade e cultura de osteoblastos) nos materiais. A incorporação do magnésio na rede da apatita foi confirmada pelo refinamento de Rietveld. A substituição de Mg na estrutura do β -TCP resultou na diminuição dos parâmetros de rede e do tamanho de cristalito. As pastilhas de β -TCMP calcinadas apresentaram uma estrutura mais densa quando comparadas às pastilhas de β -TCP comercial processadas sob idêntica metodologia. A proliferação de células de osteoblastos humanos, SaOs2, parece ter sido estimulada pelas pastilhas de β -TCMP. Os compósitos MCA/col reticulados com glutaraldeído 0,25% são citocompatíveis, tem uma estrutura de poros abertos e interconectados, com fases similares ao conteúdo mineral e orgânico do osso, apresentando, assim, potencial para aplicação na regeneração óssea.

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

MAGNESIUM SUBSTITUTED TRICALCIUM PHOSPHATE AND MAGNESIUM –
CARBONATE APATITE - ANIONIC COLLAGEN COMPOSITES AS POTENTIAL
BONE SUBSTITUTE

Márcia Soares Sader

November/2010

Advisor: Glória Dulce de Almeida Soares

Department: Metallurgy and Materials Engineering

The search for new materials for bone regeneration has enabled the development of devices with the same pattern of bone crystallinity and with ionic substitutions. These materials may be promising for the substitution, restoration or regeneration of lost tissue functions. Magnesium and carbonate are important ions associated to biological apatites and were chosen because they are incorporated separately or jointly to the samples. The objective of this thesis was the development of apatite substituted by magnesium and a composite 3D apatite substituted by magnesium and carbonate with anionic collagen (MCA/col) for application in bone tissue engineering. Physico-chemical (XRD, FTIR, TGA, ICP, BET), morphological (micro-CT, OM, SEM, TEM) and in vitro characterizations (degradation, cytotoxicity and culture of osteoblasts) were performed in the materials. The incorporation of magnesium in the apatite network was confirmed by Rietveld refinement. The substitution of Mg in the structure of β -TCP resulted in the decrease of lattice parameters and crystallite size. The calcined β -TCMP tablets showed a denser structure compared to commercial β -TCP tablets processed under identical methodology. Cell proliferation of human osteoblasts, SaOs2 seems to have been stimulated by β -TCMP tablets. The composites crosslinked with glutaraldehyde 0.25% are compatibles, has an open and interconnected pore structure with similar phases to the bone mineral and organic contents, thus presenting a potential for application in bone regeneration.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	4
REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 <i>MEDICINA REGENERATIVA E ENGENHARIA TECIDUAL</i>	<i>4</i>
2.1.1 <i>BIOENGENHARIA DO TECIDO ÓSSEO</i>	<i>5</i>
2.2 <i>ESTRUTURA DO OSSO</i>	<i>7</i>
2.3 <i>COMPOSIÇÃO DO OSSO</i>	<i>8</i>
2.3.1 <i>Fase Mineral (Apatita)</i>	<i>9</i>
2.3.1.1 <i>Apatitas biológicas</i>	<i>9</i>
2.3.1.2 <i>Apatitas sintéticas</i>	<i>11</i>
2.3.2 <i>Matriz orgânica (Colágeno)</i>	<i>15</i>
2.4 <i>BIOMINERALIZAÇÃO</i>	<i>19</i>
CAPÍTULO 3	23
<i>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</i>	<i>23</i>
CAPÍTULO 4	24
<i>MATERIAIS E MÉTODOS.....</i>	<i>24</i>
4.1 <i>Síntese dos pós.....</i>	<i>24</i>
4.2 <i>Produção de pastilhas densas.....</i>	<i>25</i>
4.3 <i>Extração de colágeno</i>	<i>25</i>
4.4 <i>Mineralização do colágeno aniônico com uma solução similar ao fluido corpóreo 1,5 (Simulated Body Fluid - SBF)</i>	<i>26</i>
4.5 <i>Sínteses dos compósitos (MCA/colágeno aniônico)</i>	<i>27</i>
4.6 <i>Caracterização físico-química dos pós verdes e das pastilhas calcinadas....</i>	<i>29</i>
4.6.1 <i>Difração de raios-X (DRX).....</i>	<i>29</i>

4.6.2	BET	30
4.6.3	Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES)	30
4.6.4	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	31
4.6.5	Teste para a detecção de óxido de cálcio como fase secundária	31
4.6.6	Análise termogravimétrica (TGA)	31
4.7	<i>Caracterização morfológica dos pós verdes e das pastilhas calcinadas</i>	32
4.7.1	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	32
4.7.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
4.8	<i>Testes In Vitro</i>	33
4.8.1	Cultura de células	33
4.9	<i>Caracterização do colágeno aniônico mineralizado com uma solução similar ao fluído corpóreo</i>	33
4.10	<i>Caracterização físico-química dos arcabouços compósitos</i>	33
4.10.1	Propriedades espectrais do colágeno e dos compósitos	33
4.10.2	Composição química da parte mineral dos compósitos	34
4.10.3	Estimativa da razão das fases mineral e orgânica	34
4.10.4	Perfil cristalino	35
4.10.5	Avaliação da temperatura de desnaturação do colágeno	35
4.10.6	Efeito da reticulação com glutaraldeído (GA) na estabilidade dos compósitos em meio de cultura	35
4.11	<i>Caracterização morfológica dos arcabouços compósitos</i>	35
4.11.1	Micrografia dos compósitos	35
4.11.2	Histologia dos compósitos	36
4.11.3	Caracterização estrutural	36
4.11.4	Caracterização ultra-estrutural	37
4.12	<i>Testes in vitro</i>	38
4.12.1	Degradação dos compósitos em meio ácido	38
4.12.2	Citocompatibilidade	39
4.12.3	Adesão e proliferação celular	40
CAPÍTULO 5		41
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>		41
5.1	<i>Caracterização da apatita substituída por magnésio sob forma de pó ou pastilhas</i>	41

5.1.1	Caracterização físico-química dos pós de apatita substituída por magnésio	41
5.1.2	Caracterização morfológica dos pós de apatita substituída por magnésio.	49
5.1.3	Pastilhas densas de β – TCMP	50
5.2	<i>Caracterização do colágeno aniônico mineralizado por uma solução similar ao fluido corpóreo (Simulayted Body Fluid – SBF)</i>	<i>54</i>
5.3	<i>Caracterização dos compósitos de magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico (MCA/col)</i>	<i>60</i>
5.3.1	Propriedades físico-químicas dos compósitos.....	62
5.3.1.1	Propriedades espectrais (FTIR)	62
5.3.1.2	Composição química da fase mineral do compósito.....	63
5.3.1.3	Estimativa das fases mineral e orgânica dos compósitos.....	66
5.3.1.4	Perfil cristalino.....	67
5.3.1.5	Efeito da reticulação na temperatura de desnaturação do colágeno ..	68
5.3.1.6	Estabilidade dos compósitos em meio de cultura.....	69
5.3.2	Caracterização morfológica dos compósitos	72
5.3.2.1	Micrografia dos compósitos.....	72
5.3.2.2	Histologia dos compósitos.....	72
5.3.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	76
5.3.2.4	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	78
5.3.3	Testes in vitro.....	82
5.3.3.1	Teste de dissolução	82
5.3.3.2	Citocompatibilidade	83
5.3.3.3	Cultura de células	85
5.4	<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</i>	<i>86</i>
CAPÍTULO 6		88
<i>CONCLUSÃO</i>	<i>.....</i>	<i>88</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1: Composição dos fosfatos de cálcio de acordo com as razões molares Ca/P	12
Figura 2. 2: Sequência de resíduos aminoácidos de cadeias α do colágeno tipo I.....	17
Figura 2. 3: Hidrólise alcalina dos grupos carboxamida do colágeno tipo I.....	22
Figura 4.1: Fluxograma empregado para a produção de pós das amostras cálcio-deficientes substituídas por magnésio (MgCaD).....	24
Figura 4.2: Fluxograma empregado para a produção de pastilhas calcinadas a partir do pó das amostras cálcio-deficiente substituídas por magnésio (MgCaD), e do pó comercial e macrografia das pastilhas calcinadas.	25
Figura 4.3: Fluxograma empregado para a produção do compósito magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico (MCA/col), indicando de forma resumida as técnicas de caracterização empregadas.....	27
Figura 4.4: Imagem do vaso reacional do compósito 3C1P0,1Mg ao final da síntese.	28
Figura 4.5: Compósito 3C1P0,1Mg desmoldado após a liofilização.	28
Figura 4.6: Fluxograma empregado para observação das matrizes de colágeno aniônico e dos compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA por microscopia de luz polarizada e microscopia de luz de campo claro.....	37
Figura 4.7: Sistema utilizado no teste de dissolução dos arcabouços 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg reticulados com 0.25% GA.....	38
Figura 5.1: Perfis de DRX do β -TCP comercial e dos pós verdes com razão Mg/Ca 0,1; 0,15 e 0,2 (a) e calcinados a 1000 °C (b) obtidos a partir dos precursores $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, e H_3PO_4	42
Figura 5.2: Refinamento pelo método de Rietveld do β -TCMP com razões molares teóricas Mg/Ca 0,1; 0,15 e 0,2.	44
Figura 5. 3: Parâmetros de rede e volume de célula das amostras de β -TCP comercial e de. β -TCMP com razões molares teóricas Mg/Ca 0,1; 0,15 e 0,2.	44
Figura 5. 4: Espectros de FTIR dos pós verdes (a) e calcinados a 1000 °C (b) com razões molares Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2.	46
Figura 5.5: Micrografia de campo claro da amostra MgCaD0,2.	49
Figura 5.6: Micrografia da amostra MgCaD0,2 (a) e o respectivo EDS confirmando a presença de Mg, Ca e P (b).....	50
Figura 5.7: Macrografia das pastilhas β -TCP (a) e β -TCMP (b) após calcinação.	51

Figura 5.8: Micrografias das pastilhas de β -TCP comercial (a) e de β -TCMP com razão molar Mg/Ca = 0,15 (b) calcinadas a 1000 °C.....	51
Figura 5.9: Micrografias da cultura de osteoblastos humanos (SaOs2) sobre as pastilhas de β -TCP comercial (a, c, e) e sobre β -TCMP com razão molar Mg/Ca = 0,2 (b, d, f) após 4h, 24h, e sete dias de incubação respectivamente.	53
Figura 5.10: Micrografia da cultura de osteoblastos humanos (SaOs2) sobre pastilhas β -TCMP com razão molar Mg/Ca = 0,2 após sete dias de incubação.	54
Figura 5.11: Perfil de DRX do colágeno aniônico após a imersão em solução SBF 1,5 por 15 dias.	55
Figura 5.12: Espectros de FTIR do colágeno aniônico antes e após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias.	56
Figura 5.13: DSC do colágeno aniônico antes e após a imersão em solução SBF 1,5 por 15 dias.	57
Figura 5.14: Micrografias do colágeno aniônico após a imersão em solução SBF 1.5 por 15 dias, superfície (a) e fratura (b).	59
Figura 5.15: EDS do colágeno aniônico após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias.	59
Figura 5.16: Microtomografia computacional 3D do colágeno mineralizado após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias.	60
Figura 5.17: Macrografia dos compósitos de MCA / colágeno aniônico.	61
Figura 5.18: Espectros de FTIR do colágeno aniônico (A) e do arcabouço compósito (3C1P0,1Mg) antes (B) e após a reticulação com 0.25% GA (C).	63
Figura 5.19: Espectros de FTIR da parte mineral do compósito com razão molar C/P = 5 antes (A) e após (B) o tratamento de digestão da fase orgânica.	65
Figura 5.20: Perfis de DRX dos compósitos não reticulados com diferentes razões molares de C/P.	68
Figura 5.21: DSC do colágeno aniônico (A) e do compósito 3C1P0,1Mg antes (B) e após a reticulação com 0,25% GA (C).	69
Figura 5.22: Micrografias dos compósitos 3C1P0,1Mg imersos em meio de cultura DMEM por 14 dias não reticulados (a - b), reticulados com 0.125% GA (c - d) e com 0,25% GA (e - f).	70
Figura 5.23: Micrografias do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0.125% GA imerso em meio de cultura DMEM por 14 dias.	71
Figura 5.24: Análise em 3D do compósito 3C1P0,1Mg com 6 mm de diâmetro por meio de microtomografia computadorizada.	73
Figura 5.25: Microscopia óptica de amostras de colágeno tipo I coradas com azul de anilina (a, b) ou impregnadas com prata metenamina (c), rede do colágeno vista por microscopia de luz polarizada (d), compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com	

0,25% GA corados com azul de anilina com partes azuis para o colágeno e cinza claro para a fase mineral (e – h) e corados com von Kossa para a fase mineral fosfato (i - k).....	75
Figura 5.26: Imagens digitais e distribuição do tamanho de poros dos compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA.....	76
Figura 5.27: Micrografias do colágeno aniônico (a- superfície e b- fratura) e dos compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA, superfície (c - d) e fratura (e – f.)	77
Figura 5.28: Micrografias de fibrilas de colágeno do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA (a) mostrando um padrão característico de bandejamento (b).....	79
Figura 5.29: Micrografia de corte fino corado do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA mostrando fibrilas de colágeno (linhas claras) e cristais de MCA nanométricos (linhas escuras).	80
Figura 5.30: Micrografia da parte mineral do compósito 3C1P0,1Mg após digestão do colágeno.....	81
Figura 5.31: Análise elementar (EDS) dos componentes da fase mineral do compósito 3C1P0,1Mg após digestão do colágeno.....	81
Figura 5.32: Concentração (ppm) dos íons Ca, Mg e P liberados na solução tampão a partir dos compósitos 3C1P0,1Mg (a) e 5C1P0,1Mg (b), reticulados com 0.25% GA.	82
Figura 5. 33: Efeito citotóxico de extratos do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA sobre fibroblastos de camundongo, medido por: (A) redução de XTT, (B) absorção de vermelho neutro (C) eluição do corante cristal violeta. Fenol a 4% e extrato de pérolas densas de poliestireno foram usados como controles positivo e placa de poliestireno sem material controle e negativo para toxicidade, respectivamente.	84
Figura 5.34: Micrografias de osteoblastos humanos (SaOs2) semeados sobre o compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA após 48h de cultura (a - b), 7 dias (c - d) e 14 dias (e - f).....	86

INDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição comparativa e parâmetros estruturais das fases inorgânicas de tecidos humanos adultos calcificados (DOROZHKIN, 2007).....	10
Tabela 4.1: Composição da solução SBF e do plasma sanguíneo humano.....	26
Tabela 4.2: Testes físico-químicos empregados nas caracterizações dos pós verdes e das pastilhas calcinadas.	29
Tabela 5.1: Fatores de concordância finais.....	45
Tabela 5.2: Parâmetros de rede, volume da célula unitária e tamanho de cristalito obtidos pelo refinamento do método de Rietveld para os pós calcinados a 1000 °C.	45
Tabela 5.3: Tamanho de área específica e razão molar dos pós verdes.....	45
Tabela 5.4: Perda de peso da amostra de colágeno aniônico após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias, obtida por TGA.	58
Tabela 5.5: Frequências vibracionais atribuídas ao colágeno aniônico e aos compósitos 3C1P0,1Mg antes e após a reticulação com 0,25% GA.	64
Tabela 5.6: Composição química (%p/p) da fase mineral dos compósitos após o tratamento de digestão do colágeno com NaOCl.....	65
Tabela 5.7: Composição das fases mineral e orgânica presentes nos compósitos (%p/p) obtidas por TGA	67
Tabela 5.8: Quantidade de Ca, Mg e P (ppm) liberados dos compósitos com diferentes razões molares de C/P e reticulados com 0,25% GA após 180 minutos de contato com solução tampão ácida	83

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os avanços da medicina têm possibilitado o desenvolvimento de novos materiais para a engenharia de tecidos, os quais possam ser utilizados como dispositivos temporários ou permanentes no organismo humano, uma vez que a expectativa e a qualidade de vida têm aumentado nos últimos tempos.

O desafio da engenharia tecidual é desenvolver novos biomateriais que, associados a células e a fatores de crescimento, drogas ou genes, possam restaurar, manter ou melhorar as funções teciduais perdidas resultantes de acidentes automobilísticos, trauma ou doenças degenerativas.

A escassez de órgãos ou tecidos para transplante tem motivado o estudo de matrizes tridimensionais biocompatíveis e biodegradáveis como suporte celular temporário, as quais possam induzir a regeneração de tecidos danificados.

Todos os tecidos do corpo são extremamente complexos e combinam suporte estrutural com funções biológicas. É necessário que os materiais desenvolvidos tenham propriedades físico-químicas similares ao tecido que eles vão substituir (GELINSKY *et al.*, 2008). O osso é constituído principalmente por uma fase mineral inorgânica, apatita (~65%), por uma fase orgânica não mineralizada, colágeno tipo I (~23%), água (~10%) e proteínas não colagênicas (~2%) tais como fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Arcabouços feitos de apatitas sintéticas modificadas com o mesmo padrão de cristalinidade e estequiometria similar ao osso e colágeno tipo I têm sido desenvolvidos para aplicações na regeneração óssea. Tais materiais devem ter requisitos essenciais como permitir o crescimento interno do tecido, porosidade, interconexão de poros para a vascularização e a difusão de nutrientes e gases, bem como estabilidade mecânica para suportar e transferir cargas até que o tecido se regenere (KARGEORGIOUS e KAPLAN, 2005).

O arcabouço deve também servir de suporte para as interações celulares promovendo a adesão, fixação, proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular, fornecendo um suporte estrutural 3D para o tecido neoformado (SHIN *et al.*, 2003). Fatores de crescimento podem também ser incorporados dentro da matriz

para promover a osteoindução do biomaterial já que o arcabouço não possui essa propriedade.

A taxa de degradação do implante deve propiciar às células a secreção de sua matriz extracelular para garantir o suporte da sua própria estrutura. Simultaneamente à formação da nova matriz, o implante deve ser degradado, reabsorvido e seus subprodutos metabolizados.

Os fosfatos de cálcio têm sido amplamente utilizados nas áreas médica e odontológica devido a sua grande similaridade com a parte inorgânica da maioria dos tecidos calcificados do corpo humano (LEGEROS, 1991). A habilidade da apatita em aceitar substituintes e vacâncias muda suas características minerais, modificando o tamanho do cristalito e a taxa de dissolução. A apatita possui vários sítios cristalográficos diferentes onde várias trocas iônicas podem ocorrer (WOPENKA e PASTERIS, 2005). Magnésio é um dos elementos-traços mais abundante presente no tecido duro. Sua concentração é em torno de 0,6% (p/p) no osso e facilmente substitui o cálcio na rede da apatita (LEGEROS *et al.*, 1989, LEGEROS, 1991). Essa incorporação na apatita sintética depende do pH, da temperatura, da razão molar Mg/Ca e da presença de carbonato no meio reacional (LEGEROS, 1991, 1993, LEGEROS *et al.*, 1996). O conteúdo do carbonato no osso mineral é de 4–8% (p/p), variando com a idade. Substituições de carbonato na rede da apatita ocorrem principalmente nos sítios fosfatos dentro da estrutura do cristal (substituição do tipo B), as quais podem aumentar a solubilidade sem mudanças nas propriedades polares da superfície do material o que influencia a adesão celular inicial e afeta a deposição da matriz de colágeno (ELLIES *et al.*, 1988). A influência da incorporação do carbonato na estabilidade química das apatitas substituídas está relacionada com a redução do tamanho do cristalito e conseqüentemente com o aumento da área de superfície devido a formação de uma apatita com baixa cristalinidade.

O colágeno tipo I é o maior componente da matriz óssea e está intimamente associado à cicatrização e regeneração. Este tem sido muito usado como dispositivo na engenharia tecidual uma vez que é um material natural, com baixa resposta imunológica, permite uma boa fixação celular, biocompatível e facilmente degradado e reabsorvido pelo corpo (FRIESS, 1998). Entretanto, suas baixas propriedades mecânicas limitam sua utilização sendo necessária a sua reticulação visando à melhoria das propriedades biomecânicas e a estabilidade molecular ou ser suportado por um material sintético como compósito para remodelação óssea (WAHL e CZERNUSZKA, 2006).

A hidrólise do colágeno tipo I objetiva o aumento da densidade de cargas negativas facilitando a nucleação e ancoragem dos cristais de apatita objetivando mimetizar o processo de formação óssea.

Este trabalho se propõe a produzir apatitas substituídas por magnésio e estudar seu efeito nas propriedades físico-químicas e adesão celular, caracterizar o colágeno aniônico mineralizado a partir de solução rica em cálcio e fosfato, bem como desenvolver compósitos de magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico tipo I para aplicações na regeneração óssea.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo é dividido em alguns tópicos visando inserir o conceito da medicina regenerativa e mais propriamente da bioengenharia do tecido ósseo e dos materiais que vem sendo desenvolvidos como substitutos ósseos temporários, de composição similar ao osso natural, que é o foco central do trabalho. Primeiramente será dada uma visão abrangente do tecido ósseo em relação a sua composição, passando por substitutos sintéticos, que possam reparar o tecido danificado, abordando suas propriedades características e aplicações. Posteriormente será dado um enfoque de como ocorre a biomineralização da matriz orgânica e as alternativas que tem se buscado para mimetizar esse processo, avaliando como a comunidade científica tem contribuído para o desenvolvimento desses materiais e suas técnicas de obtenção.

2.1 MEDICINA REGENERATIVA E ENGENHARIA TECIDUAL

A expectativa de vida do brasileiro tem crescido muito, projetando-se para os dias atuais uma média de 73 anos. Estima-se que haverão 30 milhões de brasileiros com mais de 60 anos no ano de 2020 (IBGE, 2010).

O aumento do tempo de vida bem como os problemas da vida moderna decorrentes de violências, traumas devido a acidentes automobilísticos além das doenças degenerativas tem demandado a busca de novos conceitos de pesquisa, desenvolvimento e inovação na área da saúde. A discrepância entre a disponibilidade de órgãos ou tecidos provenientes de doadores saudáveis e o número de pacientes que necessitam de um transplante tem sido cada vez maior.

Os avanços da medicina juntamente com os princípios da engenharia e das ciências da vida têm proporcionado o desenvolvimento de substitutos naturais ou sintéticos, obtidos por diversas rotas, que possam vir a manter, reparar, regenerar ou mesmo substituir funções de órgãos ou tecidos do corpo humano. Essa interdisciplinaridade permitiu o desenvolvimento de novas tecnologias, tais como as

terapias celulares e os conceitos de medicina regenerativa e de bioengenharia tecidual.

A medicina regenerativa tem sido uma grande alternativa para um grande número de doenças crônicas ou degenerativas tais como Parkinson, Alzheimer, osteoporose, lesão da coluna vertebral ou mesmo câncer. Esta visa a regeneração das partes do corpo perdidas ou lesionadas através do desenvolvimento e/ou combinação de moléculas; de células vivas, as quais fornecerão a funcionalidade biológica e de materiais naturais, sintéticos ou híbridos nanoestruturados obtidos por rotas de biotecnologia, que atuem como arcabouços mimetizando o ambiente propício para suportar a adesão, mobilidade e diferenciação celular (ENGEL *et al.*, 2007).

O uso de células tronco, as quais possuem a habilidade de gerar todos os tipos de tecido e uma capacidade ilimitada de auto-renovação, e de diferentes biomoléculas, dependendo das células alvo, na funcionalização dos arcabouços porosos ou no aprisionamento de fatores de crescimento, drogas ou genes fazem parte do desafio na produção de materiais que atinjam suas metas (ENGEL *et al.*, 2007).

2.1.1 BIOENGENHARIA DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto humano. É um tecido vivo mineralizado, altamente organizado, servindo como suporte estrutural do organismo na proteção de órgãos vitais, no alojamento da medula óssea formadora de células sanguíneas e na sustentação dos músculos para a locomoção. Além disso, constitui o maior reservatório de íons cálcio e fosfatos (CUI, *et al.*, 2007).

O osso é uma estrutura hierárquica cujas propriedades mudam de acordo com a mudança de escala. Este deve ser estudado a cada nível, nano, micro e macro-estrutural para poder entender seu comportamento intrínseco bem como determinar as considerações apropriadas para a utilização de materiais compósitos na substituição óssea (KATZ *et al.*, 2007).

A bioengenharia do tecido ósseo faz uso da associação de materiais naturais, sintéticos ou híbridos (arcabouços), com células e moléculas sinalizadoras apropriadas, (proteínas morfogenéticas do osso, fatores de crescimento e moléculas de adesão), que sirvam como suporte físico temporário e como substrato para adesão celular durante a cultura *in vitro* e subsequente implantação. As células são

dependentes de ancoragem e, portanto requerem estruturas 3D para direcionar seu crescimento (LANGER e VACANTI, 1993).

A seleção, isolamento e a cultura primária de células induzindo sua diferenciação em fenótipos específicos; o cultivo dessas células em condições estáticas ou em bioreatores; a escolha do material adequado e suas rotas de obtenção e o uso de modelos animais adequados que permitam avaliar a eficácia do material a ser implantado são etapas importantes no desenvolvimento de substitutos ósseos (GOMES e REIS, 2004).

Células primárias vindas do próprio paciente (autógenas) seriam a melhor alternativa. Entretanto a disponibilidade de quantidades suficientes para uso imediato é inviável levando-se semanas para obtê-las. Uma alternativa seria o uso de células primárias vindas de outros doadores (alólogas) ou de diferentes espécies (xenólogas) cujas quantidades seriam suficientes devido a um grande número de doadores e a criopreservação. Problemas morais, religiosos e de etnia, bem como o risco de infecção, rejeição e a possibilidade de transmissão de doenças resultaram no uso de linhagens celulares pré-estabelecidas como alternativa para essas limitações. Entretanto essas células imortalizadas podem ser capazes de desenvolver tumores (FUCHS *et al.*, 2001; GOMES e REIS, 2004). O uso de células tronco embrionárias seria uma excelente alternativa como fonte celular, porém vai de encontro a problemas éticos e de legislação. O isolamento de células progenitoras do tecido do próprio paciente abre um leque de opções na obtenção de um número maior de células necessárias para popular o material a ser implantado, as quais poderiam dar origem a vários tipos celulares diferentes, tais como as células da medula óssea ou adiposas que poderiam se diferenciar em osteoblastos para formar osso.

Os materiais utilizados como suporte temporário na bioengenharia de tecido ósseo devem ser biocompatíveis, bioreabsorvíveis, com baixa citotoxicidade e alta porosidade interconectada que permita a neovascularização e a difusão de nutrientes e gases, permitindo a remoção de resíduos metabólicos, o que aumenta a viabilidade das células no centro da estrutura (CHEN *et al.*, 2001). A função da matriz porosa é guiar o desenvolvimento de um novo tecido e fornecer estabilidade mecânica e uma organização tridimensional para as células aderirem, proliferarem, diferenciarem e secretarem a matriz extracelular (MEC), viabilizando a reconstrução do tecido. Boa resistência mecânica, osteocondutividade para permitir a integração rápida com o osso hospedeiro e a possibilidade de serem produzidos na forma do defeito a ser substituído também são fatores decisivos na escolha do material. Além disso, devem exibir características osteoindutoras para estimular a rápida formação óssea embora para materiais sintéticos a incorporação de fatores biológicos é requerida (BARRERE

et al., 2008; PILLIAR *et al.*, 2001). Osteogenese, osteocondução e osteoindução são três características fundamentais para a regeneração óssea.

Portanto, um biomaterial ideal para a neoformação óssea deve ser constituído de matrizes ou arcabouços osteocondutivos com uma população de células osteogênicas e fatores de crescimento osteoindutores para que possa estimular o reparo e ser substituído progressivamente pelo novo tecido ao longo do tempo.

A degradação e a cinética de reabsorção do arcabouço devem permitir que as células semeadas proliferem e secretem sua própria matriz extracelular (1 a 12 semanas). O suporte físico de estrutura tridimensional (3D) deve ser mantido até que o tecido "engenheirado" tenha suficiente integridade mecânica para suportar a si mesmo (TABATA, 2001). O material deve degradar dentro do defeito ósseo simultaneamente com a neoformação óssea. O uso de materiais temporários evita uma segunda intervenção cirúrgica para a retirada do implante evitando-se riscos de infecção para o paciente e a redução de gastos na rede de saúde.

A avaliação do material em um modelo animal é determinante para reduzir possibilidades de resposta inflamatória ou mesmo rejeição antes das aplicações clínicas.

O desenvolvimento de materiais bioativos com composição, nanoestrutura e resposta biológica similares ao osso tem sido o alvo de muitos pesquisadores na busca de um biomaterial para a regeneração óssea nas áreas de ortopedia e odontologia.

Diversos grupos de pesquisa têm desenvolvido compósitos que possam mimetizar a nanoestrutura da matriz óssea, viabilizando assim seu uso como material promissor na bioengenharia óssea (AL-MUNAJJED *et al.*, 2009; BATISTA *et al.*, 2009; FICAI *et al.*, 2010; GELINSKY *et al.*, 2008; KIKUCHI *et al.*, 2004b; LIU, 2008; PILLIAR, 2001; SANTOS *et al.*, 2008; TAMPIERI *et al.*, 2005 e ZOU *et al.*, 2005).

2.2 ESTRUTURA DO OSSO

O osso existe sob duas formas: osso imaturo (*woven bone*) e osso lamelar. O osso imaturo é um osso primitivo formado durante o desenvolvimento ósseo, no reparo de fraturas e em certas patologias com uma organização irregular das fibras de colágeno. As células se arranjam desordenadamente e a calcificação se dá de forma irregular sendo gradualmente substituído pelo osso lamelar organizado.

O osso lamelar é a forma que constitui a maior parte do esqueleto maduro. É composto por sucessivas camadas de fibras de colágeno orientadas numa direção

preferencial que alternadas dão uma estrutura típica lamelar. A calcificação se dá de forma ordenada. O osso lamelar pode ser formado como osso cortical (ou compacto) ou trabecular (ou esponjoso).

O osso cortical tem 80-90% do seu volume calcificado. O espaço interno dos ossos é preenchido por uma rede de trabéculas finas no qual 15-25% do volume é calcificado. Ele constitui 85% da massa óssea e um terço do volume do esqueleto. Localiza-se na região externa de ossos longos, apresentando espessura variada. Ele é revestido externamente por um tecido conectivo, periósteo, cuja camada mais externa é rica em fibras colagênicas, fibras de Sharpey, que penetram na matriz mineralizada e a camada mais interna rica em células osteoprogenitoras e colágeno. O osso cortical apresenta fibras de colágeno densamente compactadas (osteons), formando lamelas concêntricas em torno dos canais de Havers. Estes canais interconectam-se entre si com a cavidade medular e com a superfície externa do osso através dos canais de Volkmann (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

O osso trabecular constitui cerca de 15% da massa óssea e dois terços do volume total do esqueleto. É revestido por uma camada unicelular, o endósteo, que é um tecido conjuntivo frouxo com células ósseas revestindo cavidades (canal medular e canais de Volkmann e de Havers). O osso trabecular possui uma matriz colagênica pouco organizada e porosa, que delimita as cavidades interconectadas as quais são preenchidas pela medula óssea, que possui muitos precursores de células ósseas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

O osso cortical desempenha as funções mecânicas e protetoras enquanto que o osso trabecular desempenha as funções metabólicas. Este último possui uma grande área de superfície possuindo baixa resistência mecânica (SIMÕES *et al.*, 1995).

2.3 COMPOSIÇÃO DO OSSO

O osso tem como principais componentes uma fase mineral inorgânica (apatita) e uma fase orgânica (colágeno). Muitas das funções fisiológicas e mecânicas do osso dependem do tamanho do cristal de apatita e da sua relação espacial com as moléculas de colágeno na matriz extracelular. Esses cristais são depositados dentro das fibrilas de colágeno e essa relação estrutural vai depender da quantidade e distribuição dessa fase mineral o que afeta a conformação das moléculas de colágeno. Essa interação entre a fase mineral e orgânica é determinante nas suas propriedades biomecânicas e biológicas o que dará suporte às funções atribuídas aos vários tipos de ossos (KATZ *et al.*, 2007).

2.3.1 Fase Mineral (Apatita)

As apatitas pertencem à classe dos fosfatos de cálcio com um amplo espectro de composições químicas. A razão Ca/P pode variar de 0,5 a 2,0 e essas diversidades conduzem seu emprego a aplicações biomédicas principalmente em tecidos mineralizados devido a sua similaridade química com o tecido duro dos vertebrados (ossos, dentina e esmalte).

A apatita é considerada cálcio deficiente quando a razão Ca/P é menor que 1,67, sendo este o valor estequiométrico para a hidroxiapatita pura $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA. Em geral as apatitas precipitadas obtidas por síntese aquosa consistem inicialmente de uma camada estrutural hidratada contendo espécies iônicas facilmente substituídas, com baixa cristalinidade e não estequiometria (KANNAN *et al.*, 2008).

As apatitas têm vários sítios cristalográficos diferentes onde trocas atômicas podem ocorrer e muitos elementos com cargas iônicas diferentes podem ser acomodados nessas posições (WOPENKA e PASTERIS, 2005).

Os fosfatos de cálcio apresentam excelente biocompatibilidade e são bem aceitos e bem integrados pelo corpo humano quando implantados. Podem ser usados nas formas de grânulos, blocos densos e porosos, cimentos, revestindo metais e como compósitos.

A taxa de solubilidade dos fosfatos de cálcio é um parâmetro importante para seu comportamento *in vivo*. A composição, tamanho do cristal e cristalinidade afetam a taxa de dissolução do material. Mudanças nos parâmetros de rede estão diretamente relacionadas ao tamanho e quantidade do substituinte na rede da apatita. A diminuição desses parâmetros leva a uma taxa de dissolução maior uma vez que com a diminuição do tamanho do cristalito a área superficial do material aumenta e com isso um maior contato com os fluidos corpóreos. A cristalinidade está diretamente relacionada ao tamanho do cristalito, morfologia e a distorção do cristal. Uma baixa cristalinidade aumenta a solubilidade do material devido à redução do tamanho dos cristalitos e/ou aumento na distorção do cristal (LEGEROS, 1981).

2.3.1.1 Apatitas biológicas

As apatitas biológicas correspondem à parte inorgânica do tecido ósseo. Elas são caracterizadas por tamanho de cristais nanométricos, baixa cristalinidade, não-estequiometria e várias substituições iônicas (LEGEROS, 1991; REY *et al.*, 2006). Essas substituições causam mudanças nas suas propriedades físico-químicas.

Ocorrem distorções na rede da apatita levando à mudanças na sua morfologia, cristalinidade e conseqüentemente na sua taxa de dissolução.

A composição típica e os parâmetros estruturais das fases inorgânicas de tecidos humanos adultos calcificados são apresentados na Tabela 2.1. Os valores dessas variáveis dependem da idade, do estado nutricional e metabólico e da localização anatômica (osso cortical ou trabecular) (DOROZHKIN, 2007).

Tabela 2.1: Composição comparativa e parâmetros estruturais das fases inorgânicas de tecidos humanos adultos calcificados (DOROZHKIN, 2007).

Composição (% p/p)	Esmalte	Dentina	Osso
Cálcio (Ca)	36,5	35,1	34,8
Fósforo (P)	17,7	16,9	15,2
Ca/P (razão molar)	1,63	1,61	1,71
Sódio (Na)	0,5	0,6	0,9
Magnésio (Mg)	0,44	1,23	0,72
Potássio (K)	0,08	0,05	0,03
Carbonato (CO_3^{2-})	3,5	5,6	7,4
Fluoreto (F^-)	0,01	0,06	0,03
Cloreto (Cl^-)	0,3	0,01	0,13
Pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)	0,022	0,10	0,07
Inorgânicos totais	97	70	65
Orgânicos totais	1,5	20	25
Água	1,5	10	10
Parâmetro rede a [Å]	9,441	9,421	9,41
Parâmetro rede c [Å]	6,880	6,887	6,89
Índice Cristalinidade (HA=100)	70 – 75	33 – 37	33 – 37
Tamanho típico de cristal (nm)	100 μm X 50 X 50	35 X 25 X 4	50 X 25 X 4
Produtos de ignição (800 °C)	B-TCP + HA	B-TCP + HA	HA + CaO
Módulo de elasticidade (GPa)	80	15	0,34 – 13,8
Resistência à compressão (MPa)	10	100	150

As calcificações normais e patológicas nos mamíferos consistem em um fosfato de cálcio íon – substituído. As impurezas presentes nos ossos e dentes introduzem estresse na estrutura do cristal, tornando-o menos estável e mais reativo (LEGEROS, 1991).

2.3.1.2 Apatitas sintéticas

O desenvolvimento de apatitas sintéticas modificadas similares ao osso natural no que diz respeito ao grau de cristalinidade, estequiometria e arquitetura tem sido objeto de grande interesse na obtenção de materiais para reparo e substituição óssea, devido a sua similaridade com a parte inorgânica da maioria dos tecidos calcificados normais (ossos e dentes) presentes no corpo humano (LEGEROS, 1991).

Propriedades como biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade e osteocondutividade tornam-nas certamente uma das cerâmicas mais empregadas na área ortopédica e odontológica.

Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA] e o beta fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP] são reconhecidos como biocerâmicas em potencial para substituição óssea.

A reconstituição óssea é favorecida por esses dois materiais devido à propriedade de resorbabilidade do β -TCP e à excelente osteocondutividade da HA além da grande similaridade com a fase inorgânica do osso. A hidroxiapatita é mais estável que o β -TCP sob condições fisiológicas devido à menor solubilidade e a cinética de reabsorção mais lenta. A hidroxiapatita é conhecida pela sua baixa taxa de dissolução quando utilizada como dispositivo para remodelação óssea ($1\mu\text{m}/\text{ano}$ para HA sinterizada) e o beta- fosfato tricálcico (β -TCP) leva mais de um ano para ser degradado completamente (KIKUCHI *et al.*, 2001).

A mistura de cerâmicas bifásicas tem sido muito utilizada em enxertos ósseos, pois a presença das duas fases permite o balanço entre a fase mais estável (HA) e a mais solúvel (β -TCP).

Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por precipitação, hidrólise a partir de outros fosfatos de cálcio, síntese hidrotérmica ou reação de fase sólida.

A síntese dos fosfatos de cálcio depara-se na dificuldade da obtenção de um produto final estequiométrico sem resíduos de segunda fase. Reações no estado sólido a altas temperaturas ou métodos de precipitação aquosa a baixas temperaturas são alternativas para obtenção dos fosfatos de cálcio. O β -TCP não pode ser obtido por precipitação em meio aquoso, necessitando-se da calcinação da apatita cálcio deficiente obtida [$\text{Ca}_9(\text{HPO})_4(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$] na reação com razão $\text{Ca}/\text{P} = 1,5$. Obtem-se três estruturas polimórficas: β -TCP quando a calcinação ocorre acima de $800\text{ }^\circ\text{C}$, α -TCP entre 1180 e $1430\text{ }^\circ\text{C}$ e α' -TCP acima de $1430\text{ }^\circ\text{C}$ (KANNAN *et al.*, 2008). Os parâmetros mais importantes a serem controlados nessas sínteses são o pH, a temperatura de reação, o tempo de envelhecimento, a estequiometria dos precursores

pois qualquer variação de composição leva à formação de mais de uma fase como a formação de pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, CPP) para $\text{Ca/P} < 1,5$, de hidroxiapatita [$(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA)] e beta-fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ β -TCP] para $1,5 < \text{Ca/P} < 1,67$ e de hidroxiapatita [$(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA)] e óxido de cálcio (CaO) para $\text{Ca/P} > 1,67$ (DESTANVILLE *et al.*, 2003). A Figura 2.1 mostra a composição dos fosfatos de cálcio de acordo com as razões molares Ca/P.

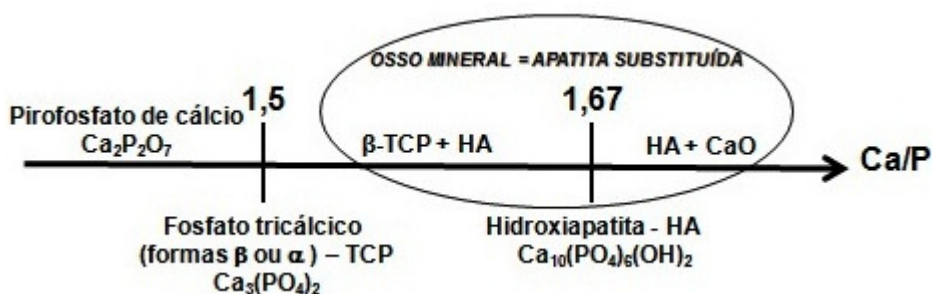


Figura 2. 1- Composição dos fosfatos de cálcio de acordo com as razões molares Ca/P

SUBSTITUIÇÕES IÔNICAS NA ESTRUTURA DAS APATITAS

A habilidade da rede da apatita em aceitar substituintes é enorme. Dentre os substituintes reportados em ossos e dentes estão: F^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , citratos e carbonatos (DOROZHKIN, 2007; WOPENKA e PASTERIS, 2005).

A estrutura da apatita permite substituições catiônicas (para o Ca) e aniônicas (para os grupos PO_4^{3-} e/ou OH^-). Essas substituições afetam a cristalografia (tamanho do cristal e os parâmetros de rede), as propriedades físico-químicas (solubilidade) e a resposta celular e do tecido ao material (INOUE *et al.*, 2004; LEGEROS, 1991; SAKAE *et al.*, 2003; WOPENKA e PASTERIS, 2005; YAO *et al.*, 2009; ZYMAN *et al.*, 2009).

A) Substituição de Magnésio na rede da apatita

Magnésio, Mg^{2+} , é um dos íons-traço mais importante presente nos tecidos duros. O osso contém diferentes concentrações desse íon, adsorvido ou substituído na rede da apatita. Sua concentração é de aproximadamente 0,1 a 0,4% (p/p) no esmalte do dente, maior na dentina [acima de 1,1% (p/p)] e em torno de 0,6% (p/p) no osso (LEGEROS, 1991). O conteúdo de Mg^{2+} nos ossos representa 50–60% do seu valor total no corpo humano. O Mg é um importante íon no controle do metabolismo do osso *in vivo*, uma vez que atua na sua formação e reabsorção.

O magnésio substitui facilmente o cálcio (Ca^{2+}) na rede da apatita, uma vez que seu raio iônico (0,66Å) é bem menor que o do Ca (0,99Å) e a níveis fisiológicos pode promover a mineralização do osso ou controlar a taxa de nucleação dos cristais de apatita, inibindo sua cristalização quando usadas em concentrações maiores que a razão $\text{Mg}/\text{Ca} = 0,05$ através de reações enzimáticas específicas (CUI *et al.*, 2007; DRIESSENS e VERBEECK, 1990; LEGEROS, 1981, 1991). Ele causa redução nos parâmetros de célula dando origem a uma apatita com baixa cristalinidade e maior solubilidade devido à redução do tamanho dos cristalitos e/ou aumento na distorção do cristal aumentando consequentemente a taxa de dissolução (LEGEROS *et al.*, 1989; LEGEROS *et al.*, 1995).

O fosfato tricálcico substituído por magnésio, também conhecido como whitlockita magnesiana, (β -TCMP), pode ser obtido pelo método de precipitação aquosa através da síntese de uma apatita cálcio deficiente, a partir de vários precursores, pH, temperatura e diferentes razões molares Mg/Ca e subsequente sinterização na faixa 700-800°C resultando na β -TCMP com perda de água (LANDI *et al.*, 2005; LEGEROS, 1991; SADER *et al.*, 2009). Outra rota de obtenção é por hidrólise do hidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD), $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ou do hidrogeno fosfato de cálcio anidro, DCPA, CaHPO_4 , em soluções com variações molares da razão Mg/Ca (LEGEROS, 1991). Um produto final com tamanho de partículas uniforme e sem segundas fases residuais é obtido quando o método de precipitação a úmido é empregado, tornando esse processo eficiente para a fabricação de pós, grânulos, corpos densos e porosos e para revestimento de implantes metálicos ou compósitos (KANNAN *et al.*, 2007).

ARAÚJO *et al.* (2009) determinaram que a quantidade máxima de Mg que substitui o Ca na rede da apatita cálcio deficiente é 15% mol através de refinamento pelo método de Rietveld, obtendo-se uma estrutura de whitlockita magnesiana após a calcinação do pó verde a 1000 °C.

A incorporação do Mg^{2+} nas apatitas sintéticas tem sido associada ao processo de biomineralização e a terapia de osteoporose em seres humanos e em animais. A osteoporose, um problema de saúde relevante nos idosos, é caracterizada pelo afinamento do osso cortical e por uma arquitetura trabecular desorganizada causando a deterioração da qualidade do osso e com isso a fragilidade óssea levando à fratura. Isso ocorre quando a rápida taxa de reabsorção óssea excede a taxa de formação óssea (LEGEROS, *et al.*, 2008).

A deficiência do magnésio afeta todos os estágios do metabolismo do esqueleto. Ele é essencial para muitas reações enzimáticas causando arritmias cardíacas, hipocalemia e hipocalcemia, interrupção no crescimento ósseo, diminuição

das atividades osteoblásticas e osteoclásticas, osteopenia e fragilidade óssea, levando a fratura (LANDI *et al.*, 2005; RUDE e GRUBER, 2004).

B) Substituição de Carbonato na rede da apatita

O carbonato é o terceiro íon mais abundante no osso e no esmalte. O conteúdo do carbonato no osso mineral é em torno de 4–8% (p/p) dependendo da idade do indivíduo, já no esmalte do dente o teor é em torno de 3,5%(p/p) e na dentina de 5,8% (p/p) (LEGEROS, 1991).

A presença do grupo carbonato na rede da apatita causa distorção na rede, tensão residual e defeito no cristal tendo um grande efeito na cristalinidade, no aumento da área superficial e consequentemente um aumento da taxa de dissolução (LEGEROS, 1991). O conteúdo de carbonato e a cristalinidade são pontos críticos no comportamento *in vivo*. Fosfatos amorfos são rapidamente reabsorvidos e a presença de carbonato na rede da apatita mostrou causar um aumento da solubilidade em testes *in vitro* e *in vivo* (LEGEROS, 1991).

O tipo e as propriedades das carbonato apatitas sintéticas dependem da rota utilizada para a sua obtenção, como a fonte de íons carbonato, a razão molar dos precursores iniciais, o pH e a temperatura de síntese. A substituição do grupo carbonato na estrutura da apatita pode ocorrer sob duas formas distintas: nos sítios trivalentes fosfatos (PO_4^{3-}) formando uma carbonato apatita do tipo B e nos sítios monovalentes da hidroxila (OH^-), formando uma carbonato apatita do tipo A. Podem ocorrer substituições na estrutura do cristal em ambos os sítios, formando-se a carbonato apatita do tipo AB.

As sínteses de carbonato apatita tipo A são realizadas a altas temperaturas (~1000 °C), dando origem a apatitas homogêneas, com alto grau de pureza. Já as carbonato apatitas do tipo B são obtidas por precipitação aquosa ou por hidrólise a baixas temperaturas (37–100 °C) sendo de baixa cristalinidade e com propriedades semelhantes à parte mineral de ossos e dentes (LEGEROS, 1991).

Na substituição do tipo B é requerida uma substituição de um cátion monovalente pelo Ca para manter o balanço de cargas. A substituição de íons fosfatos trivalentes por íons carbonatos bivalentes é compensada pela criação de uma vacância catiônica (REY *et al.*, 2006). Ocorre uma co-substituição simultânea de um íon sódio ou amônio monovalente por um íon cálcio divalente. O sódio aparece como uma impureza de segunda fase não influenciando o mecanismo de substituição do carbonato. Já a incorporação do íon amônio parece diminuir a estabilidade da apatita

devido à diferença do tamanho do raio iônico, 0,99Å para o Na^+ e 1,63 Å para o NH_4^+ (BARINOV *et al.*, 2006).

A substituição no sítio **A** causa expansão do parâmetro de rede **a** e contração do parâmetro **c** devido ao tamanho do íon carbonato ser maior que a hidroxila. Já a substituição no sítio **B** causa uma contração do parâmetro **a** e uma expansão do parâmetro **c**, diminuição do tamanho do cristal causando o alargamento dos picos de difração e um aumento na tensão do cristal mostrado pela perda de resolução das bandas de absorção do grupo fosfato no espectro de infravermelho (LEGEROS, 1991).

Os níveis de carbonato no osso têm demonstrado que esse íon desempenha um papel importante na bioquímica dos tecidos duros (LEGEROS, 1993). O efeito da substituição do CO_3^{2-} nos parâmetros de rede da apatita esta diretamente relacionada ao constante mecanismo de dissolução com os ciclos de cristalização (LIAO *et al.*, 2005).

Segundo LANDI *et al.* (2005), as apatitas substituídas por magnésio e por magnésio e carbonato beneficiaram o comportamento de células tipo osteoblasto e de células precursoras de osteoblastos em termos de adesão, proliferação e atividade metabólica quando comparadas com hidroxiapatita estequiométrica.

2.3.2 Matriz orgânica (Colágeno)

Os colágenos são proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares. São secretados por diferentes tipos celulares e representam a principal proteína estrutural encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos sendo responsável pela sua integridade e propriedades mecânicas, constituindo 25% da massa protéica total do corpo de vertebrados. Existem mais de 28 tipos de colágeno, sendo os mais abundantes do tecido conjuntivo os tipos I, II, III, V e XI (CUI *et al.*, 2007). O colágeno está presente em quase todos os tecidos como ossos, cartilagem, tendões, ligamentos e em todos os tecidos moles (pele, músculos e outros órgãos) (ALBERTS *et al.*, 2006).

A fase orgânica do tecido ósseo não mineralizada é constituída por 95% de colágeno e 5% de proteínas não colagênicas, componentes celulares, lipídeos e proteoglicanas (ROSSERT e CROMBRUGGHE, 1996).

O tecido ósseo é formado basicamente por colágeno tipo I, a proteína mais abundante no ser humano, responsável pela função mecânica, por manter a integridade de muitos tecidos através da interação com a superfície das células, com as moléculas da matriz extracelular e com fatores de crescimento e diferenciação

(GOISSIS *et al.*, 2008). É o principal produto de secreção de osteoblastos, célula responsável pela síntese da matriz óssea orgânica. Cerca de 90% da matriz extracelular óssea (MEC) é formada por colágeno tipo I e os 10% restantes por proteínas não colagênicas, tais como as proteoglicanas (decorina e biglicana), osteopontina (proteína mais importante depois do colágeno), osteocalcina, (proteína mais abundante do tecido ósseo), osteonectina, sialoproteínas e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (VARGAS *et al.*, 1997). Essas proteínas são ácidas na sua grande maioria e estão diretamente relacionadas aos processos de mineralização e remodelagem do tecido ósseo.

O colágeno tipo I é sintetizado sob a forma de pró-colágeno e após ser secretado para o meio extracelular perde parte de sua estrutura protéica dando origem a estruturas fibrilares. A unidade básica do colágeno fibrilar possui uma configuração formada pelo entrelaçamento de três cadeias peptídicas, duas cadeias alfas 1, ($\alpha 1$) e uma cadeia alfa 2 ($\alpha 2$), [$\alpha 1(I)_2$ - $\alpha 2(I)$], cada uma contendo 1056 e 1029 resíduos de aminoácidos respectivamente, na conformação de tripla hélice, constituindo a unidade macromolecular denominada tropocolágeno (ALBERTS *et al.*, 2006). Ocorre uma periodicidade na auto-organização das moléculas da tripla hélice, as quais estão separadas por 40 nm e possuem distanciamento de 67 nm entre as moléculas de colágeno sucessoras (FRATZ e WEINKAMER, 2008).

A sequência de resíduos aminoácidos das cadeias alfa do colágeno tipo I é regular e caracterizada por unidades repetitivas, os tripletes, com um conteúdo de 33% de glicina (Gly), 12% de prolina (Pro) e 11% de hidroxiprolina (Hyp). Nessas unidades de repetição, (**glicina – X – Y**), a posição X é ocupada pela prolina e a Y pela hidroxiprolina, Figura 2.2. A prolina, devido a sua estrutura em anel, estabiliza a conformação da hélice em cada cadeia α , enquanto que a glicina é espaçada regularmente a cada dois resíduos por toda a região central da cadeia α . Os resíduos de glicina estão localizados no centro da tripla hélice conferindo estabilidade e os resíduos X e Y na superfície da tripla hélice. A repetição da glicina a cada terceira posição na sequência é um fator determinante na estrutura da tripla hélice, pois permite um empacotamento das cadeias. Ligações inter e intramoleculares de ligações de hidrogênio limitam a rotação das cadeias α conferindo a estabilidade da tripla hélice (ALBERTS *et al.*, 2006; FRIESS, 1998; VARGAS *et al.*, 1997).

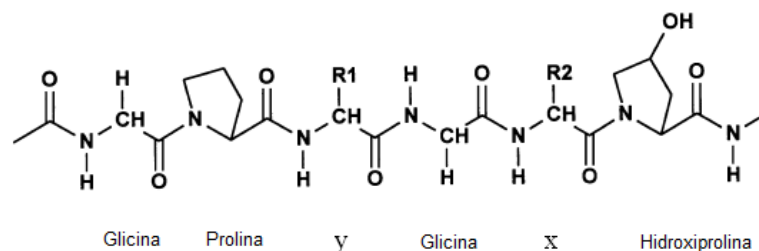


Figura 2. 2: Sequência de resíduos aminoácidos de cadeias α do colágeno tipo I.

O empacotamento ordenado de várias macromoléculas de tropocolágenos dá origem a microfibrilas, as quais agregam-se longitudinalmente e lateralmente por um processo denominado de fibrilogênese. As microfibrilas se auto-arranjam em fibrilas por meio de interações de grupos hidrofóbicos de moléculas adjacentes e de ligações cruzadas covalentes intra e intermoleculares. Essas estão deslocadas um quarto em relação à molécula adjacente, dando origem a uma região de vazio entre as duas moléculas alinhadas longitudinalmente, chamada de *gap*, seguida de uma região de sobreposição dessas moléculas denominada de *overlap*, as quais estão unidas por ligações cruzadas intermoleculares e intramoleculares e por interações eletrostáticas (ALVES, 2006). As fibrilas se organizam em fibras.

As cadeias alfa possuem em suas extremidades uma região não helicoidal com terminações amina ($-\text{NH}_2$) e carboxila ($-\text{COOH}$), denominadas telopeptídeos N-terminal e C-terminal respectivamente, que possuem 16 e 25 resíduos de aminoácidos, respectivamente, os quais não estão incorporados dentro da estrutura da tripla hélice (FRIESS, 1998; ROSSERT e CROMBRUGGHE, 1996). A remoção dos telopeptídeos N e C-terminais pode reduzir as reações adversas como antigenicidade.

O empacotamento sistemático das triplas hélices proporciona resiliência e resistência às fibras de colágeno. A grande resistência das fibras de colágeno vem dessas ligações covalentes intermoleculares estáveis entre as moléculas de tropocolágeno adjacentes, as quais também contribuem para a diminuição da taxa de degradação da molécula de colágeno *in vivo* (ALBERTS *et al.*, 2006; FRIESS, 1998; ROSSERT e CROMBRUGGHE, 1996). As estabilidades química e mecânica adicionais provém de reticulações inter e intra-moleculares. A extensão e o tipo da ligação cruzada variam com a idade e função do tecido (FRIESS, 1998).

2.3.2.1. Reticulação do colágeno

O colágeno pode ser estabilizado através da sua reticulação visando reduzir sua imunogenicidade bem como controlar sua biodegradação. KIKUCHI *et al.* (2004a),

mostraram que compósitos de colágeno sem reticulação degradam rapidamente *in vivo*, resultando em um decréscimo de resistência mecânica. FRIESS, (1998), também observou o mesmo comportamento para filmes de colágeno que não sofreram ligações cruzadas e degradaram entre 2–7 semanas. A reticulação do colágeno visa aumentar suas propriedades mecânicas bem como a sua estabilidade molecular através de ligações intermoleculares covalentes e estáveis entre suas fibrilas. Reticulações físicas e químicas influenciam as propriedades mecânicas, a taxa de degradação bem como a biocompatibilidade dos biomateriais.

Alguns pesquisadores sugerem que o tempo ideal de degradação do implante seria de seis meses permitindo, assim, a simultânea neoformação óssea.

As reticulações físicas têm sido propostas, pois oferecem um menor risco de citotoxicidade apesar da desvantagem de causar uma parcial degradação do colágeno (WAHL e CZERNUSZKA, 2006).

As reticulações químicas apresentam o risco de citotoxicidade em potencial devido a moléculas ou composto residuais liberados no organismo após a implantação. Dentre os compostos químicos, o glutaraldeído (GA) tem sido o reagente mais empregado desde a década de 60, para formar ligações cruzadas via base de Schiff entre os grupos ϵ -amino das cadeias laterais dos resíduos aminoácidos lisina e hidroxiprolina presentes na estrutura primária das fibras de colágeno. Os mecanismos da formação de ligações covalentes com os grupos funcionais disponíveis na proteína são dependentes do pH, solvente, concentração e pureza do reagente.

A fixação inicial do GA nas fibras de colágeno ocorre primeiramente na superfície da fibra principalmente quando grandes concentrações são usadas. É um processo muito rápido onde ocorre a polimerização do monômero do GA. Este reage rápida e irreversivelmente principalmente com os grupos amina, sendo difícil a acessibilidade do reagente nas regiões centrais das fibras de colágeno empacotadas densamente, muitas vezes apresentando problemas quanto a uma reticulação uniforme (RUIJGROK *et al.*, 1994).

A penetração do GA a temperatura ambiente é mais rápida que a baixas temperaturas. GA (4%) penetra no tecido mole 0,7mm em 3h a temperatura ambiente. Após 24h a profundidade de penetração é de 1,5mm. A máxima penetração ocorrida em tecido de fígado humano com GA (4%) em 24h a temperatura ambiente e a frio foi de 4,5mm e 2,5mm respectivamente (CHEUNG *et al.*, 1985).

Apesar de largamente empregado, sua citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* é muito questionada, devido à presença de grupos funcionais não reagidos ou pela liberação desses grupos durante a degradação enzimática do biomaterial reticulado.

Vários estudos reportaram resultados adversos em resposta a implantação do colágeno reticulado com GA em modelos animais e cultura de células, devido a diferentes concentrações aplicadas. Porém alguns trabalhos mostraram a redução da imunogenicidade do colágeno implantado bem como o aumento da resistência à degradação enzimática, (FRIES, 1998).

KIKUCHI *et al.* (2004a), demonstraram uma diminuição do grau de intumescimento com o aumento da concentração de GA quando compósitos de HA / colágeno foram imersos em solução tampão fosfato (PBS) por 21 dias. Já CHARULATHA e RAJARAM (2003), testaram as propriedades de intumescimento de membranas de colágeno reticuladas com diferentes reagentes químicos e constataram uma máxima redução do grau de intumescimento quando GA foi empregado. Na degradação por meio de collagenase *in vitro* as membranas não reticuladas foram solubilizadas após 5h.

Na tentativa de diminuir a toxicidade alguns autores propõem o uso de reagentes tais como carbodiimida, genipina entre outros. Esses reagentes agem somente como catalisadores e são removidos do tecido, não permanecendo resíduos tóxicos (CHANG e TANAKA, 2002; FRIESS, 1998; HABERMEHL, 2005).

2.4 BIOMINERALIZAÇÃO

O uso do colágeno como biomaterial tem como vantagem a sua biocompatibilidade baixa resposta imunológica além da biodegradação e bioreabsorção. Suas propriedades não alergênicas e a baixa antigenicidade, ou seja, estimula a produção de anticorpos para disparar o sistema imune, fazem com que seu uso seja potencializado. Sua biodegradabilidade pode ser regulada por ligações cruzadas por meio de reticulante.

Uma das razões de seu grande uso em aplicações biomédicas é a sua capacidade de formar fibras com alta resistência e estabilidade através da auto-agregação e reticulação (LEE *et al.*, 2001).

Suas principais aplicações na área de biomateriais são como membranas para revestimento de queimaduras ou ferimentos, membranas para regeneração tecidual guiada no caso de doenças periodontais, nanopartículas para liberação de genes, mini-*pelets* ou pastilhas para liberação de drogas, sutura cirúrgica, agente homeostático, promovendo a coagulação sanguínea e suporte para crescimento de nervos periféricos. Ele pode também ser usado como matrizes básicas 3D com poros adequados para crescimento de células e vascularização como implantes ou material

de preenchimento ou serem pré-semeados com células autólogas e retornarem para o paciente em aplicações na engenharia tecidual (LEE *et al.*, 2001). O colágeno pode ser obtido das mais diversas formas além de modular a adesão celular, a cascata de coagulação e a deposição mineral durante a formação óssea (GOISSIS *et al.*, 2008; LEE, *et al.*, 2001).

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no desenvolvimento de cerâmicas sintéticas que mimetizem o sítio a ser implantado, no caso de biopróteses para a engenharia tecidual óssea, no que diz respeito à composição e nanoestrutura, de uma variedade de cerâmicas biológicas tais como as encontradas em dentes, ossos e conchas. O resultado dessas pesquisas é a formação de um compósito nanoestruturado com uma complexa microestrutura. A questão mais relevante nesse processo de biomineralização é a nucleação e crescimento da fase mineral regulada por um complexo espectro da matriz orgânica. Nesse processo, diversos fatores envolvendo a matriz orgânica, onde ocorrerá a deposição de uma fase mineral orientada, devem ser levados em consideração tais como topografia, geometria da rede, efeitos polares, potenciais eletrostáticos, estereoquímica dentre outros (MARTINS e GOISSIS, 1996). A biomineralização ocorre dentro de microambientes específicos os quais devem inibir que o processo ocorra em outros sítios. Um mineral com características específicas tais como tamanho de cristal, geralmente a níveis nanométricos, formato e orientação é produzido.

O colágeno tipo I secretado por células ósseas, osteoblastos, se auto-organiza em microfibrilas com uma estrutura terciária específica, com zonas de periodicidade (período D) com 67nm de largura as quais compreendem zonas distintas chamadas gap (40nm) e overlap (28nm). A nucleação de cristais de apatita tipo placa ocorre dentro desses espaços que por sua vez estão dentro das fibrilas do colágeno. Esses cristais crescem numa orientação específica, ou seja, o eixo c dos cristais cresce paralelo ao eixo longitudinal das fibrilas de colágeno dentro dos quais estes são depositados. Outros componentes orgânicos adicionais estariam envolvidos nesse processo tais como as fosfoproteínas e as proteoglicanas. Essas últimas se ligam ao cálcio via grupos de cadeia lateral carbonila e sulfonato, podendo iniciar a formação dos cristais minerais e ao mesmo tempo inibir a cristalização impedindo que a concentração de íons cálcio dentro do fluido extracelular alcance níveis suficientes para a nucleação (KUHN, *et al.*, 1996).

CUI *et al.* (2007) sugeriram que o estágio inicial da precipitação dos cristais de apatita nas fibras de colágeno ocorrem através da ligação dos íons Ca com as cargas negativas do grupamento carboxila do colágeno. Outros grupos funcionais carregados negativamente também devem ser levados em consideração. Entretanto o grupo

carboxila ($-\text{COOH}$) seria realmente o principal sítio de nucleação os quais estão presentes em 11% nos resíduos de aminoácidos das moléculas de colágeno. Numa solução a pH neutro, mais de 99% desses grupos carboxila de aspartil e glutamil ionizam a COO^- , o que favorece a quelatação dos íons cálcio.

KIKUSHI *et al.* (2001) e RHEE *et al.* (2000) sugeriram que a ligação do íon Ca ao grupo carboxílico carregado negativamente presente na molécula de colágeno é o principal fator para dar início ao processo de nucleação. Segundo GOISSIS *et al.* (2003), as cargas negativas resultantes da hidrólise do colágeno controlariam a mineralização das moléculas de colágeno.

A fabricação de novos materiais biomiméticos engenheirados aplicáveis à engenharia tecidual óssea tem sido objeto de inúmeras publicações. Diversos estudos tem sido reportados no que diz respeito à mineralização do colágeno tais como o uso de soluções simuladoras de fluido corpóreo, SBF, desenvolvida por KOKUBO E TANAKA, (2006), na mineralização de matrizes de colágeno, (AL-MUNAJJED *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; RHEE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2004), a simultânea mineralização e auto-organização do colágeno tipo I, (BRADT *et al.*, 1999; FICAI, *et al.*, 2010; KIKUCHI *et al.*, 2004b; TAMPIERI *et al.*, 2003), métodos de imersão alternada de matrizes de colágeno em soluções individuais de cálcio e fosfato, (BATISTA *et al.*, 2009; GOES *et al.*, 2007; YAMAGUSHI, *et al.*, 2003), compósitos de blendas ou misturas heterogêneas de nano-HA com colágeno, (CUI *et al.*, 2007) dentre outros.

KIKUCHI *et al.* (2001) constataram um processo de remodelação óssea quando compósitos de nanoHA/colágeno (80:20) não reticulados foram implantados em defeitos críticos na tíbia de *beagles* por 12 semanas. Quando KIKUCHI *et al.* (2004a) implantaram compósitos HA/colágeno (80:20) reticulados com GA em tíbia de ratos verificaram uma diminuição da taxa de reabsorção/degradação *in vivo* a qual foi reduzida com o aumento da concentração de GA, não ocorrendo qualquer resposta citotóxica, incluindo inflamação.

LIAO *et al.* (2005) produziram um compósito de nano hidroxiapatita carbonatada/colágeno com razão molar carbonato/fosfato variando de 1 a 10, a temperatura ambiente pelo método biomimético de auto-organização, obtendo um material que mimetizou exatamente os componentes e a microestrutura encontrados no osso natural.

YAMASAKI *et al.* (2003) sugeriram que a presença de magnésio em um compósito magnésio carbonato apatita/colágeno contribuiu para promover a formação óssea através do reconhecimento da família de integrinas presentes na membrana

celular com a superfície do biomaterial, uma vez que a integrina pode ligar-se ao magnésio presente. A degradação do material também foi acelerada em 8 semanas devido a presença de ambas as substituições iônicas na rede da apatita.

MARTINS e GOISSIS (1996) submeteram o colágeno nativo proveniente de pericárdio bovino a um processo de hidrólise seletiva dos grupos carboxiamida das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos de aspargina e glutamina, localizados dentro do período D presentes na cadeia alfa do tropocolágeno. Produziu-se uma matriz carregada negativamente a pH 7,4, com um aumento da densidade de cargas negativas (+ 120 cargas negativas), obtendo-se uma matriz de colágeno polianiônico, onde ocorreriam os primeiros depósitos dos sais de fosfato de cálcio nas zonas gap e overlap.

O processo de hidrólise alcalina seletiva, desenvolvido por MARTINS e GOISSIS (1996) em tendão bovino, teve como resultado a formação de matrizes com um aumento de 46 ± 12 cargas negativas de grupos carboxila (COO^-) dos aminoácidos, superpostas em regiões de carga negativa pré-existent na molécula nativa (Lacerda *et al.* 1998) (Figura 2.2). O processo de hidrólise remove as células intericiais da matriz de colágeno, introduzindo cargas negativas que irão promover uma mineralização controlada e o aumento das propriedades piezoelétricas (BET *et al.*, 1997; LACERDA *et al.*, 1998).

O uso de colágeno tipo I extraído de tendão bovino é vantajoso, pois elimina o processo de descalcificação da parte mineral do osso (WAHL e CZERNUSZKA, 2006). Ao mesmo tempo tem como vantagem uma melhor dispersão fibrilar o que facilita a sua biomineralização quando usado como arcabouço para engenharia de tecido ósseo (HABERMEHL *et al.*, 2005). O colágeno tem se mostrado uma excelente opção para a fabricação de arcabouços devido a sua alta porosidade e permeabilidade (AL-MUNAJJED *et al.*, 2009).

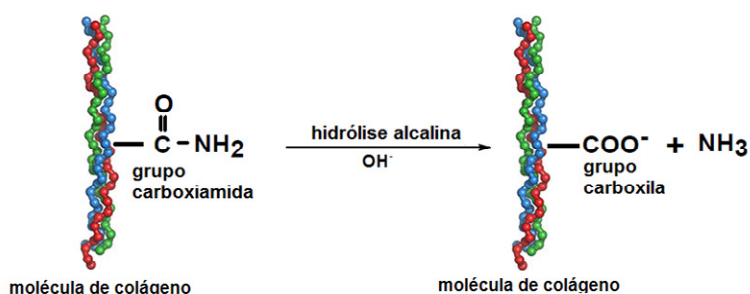


Figura 2. 3: Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamida do colágeno tipo I.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Compósitos 3D obtidos a partir de colágeno aniônico tipo I e apatitas modificadas com o mesmo padrão de cristalinidade do osso e com substituições iônicas mimetizando alguns íons encontrados nas apatitas biológicas podem ser promissores para restaurar a função de tecidos conectivos traumatizados ou degenerados.

Magnésio (Mg^{2+}) e carbonato (CO_3^{2-}) são íons importantes associados a apatitas biológicas e foram escolhidas por serem incorporadas de forma isolada ou conjunta a pós e à fase mineral de compósito com colágeno.

Dessa forma, o objetivo da presente tese foi o **desenvolvimento de apatitas substituídas por magnésio e de um compósito bioativo magnésio carbonato apatita/colágeno aniônico para aplicação em engenharia tecidual.**

Objetivos específicos:

- ◆ Obtenção de apatitas substituídas por magnésio na forma de pós ou pastilhas;
- ◆ Caracterização físico-química e morfológica das apatitas substituídas por magnésio verdes e calcinadas a 1000 °C;
- ◆ Avaliação do comportamento inicial de adesão e a proliferação de células ósseas (osteoblastos) sobre as superfícies das pastilhas calcinadas;
- ◆ Obtenção de arcabouços 3D com composição similar ao osso, constituídos de apatita substituída por magnésio e carbonato como fase mineral e colágeno aniônico como fase orgânica;
- ◆ Caracterização físico-química e morfológica dos arcabouços 3D constituídos por magnésio-carbonato apatita e colágeno aniônico tipo I;
- ◆ Seleção da concentração de reticulante capaz de manter a estabilidade dos compósitos em meio de cultura;
- ◆ Avaliação da citotoxicidade dos compósitos;
- ◆ Avaliação do comportamento inicial de adesão e a proliferação de células ósseas (osteoblastos) sobre os arcabouços.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese dos pós

Os pós verdes das amostras cálcio-deficientes substituídas por magnésio (MgCaD) foram obtidos pelo método de precipitação a partir do gotejamento de uma suspensão de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$, Merck, Brasil] e cloreto de magnésio [$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, Brasil] e de uma solução de ácido fosfórico, [H_3PO_4 , Merck, Brasil], por meio de bomba peristáltica em um becher contendo previamente 50mL de água deionizada a pH 9 constante ajustado com uma solução de hidróxido de amônio (1:1) (NH_4OH , Merck). As amostras cálcio deficientes obtidas, denominadas de MgCaD0,1; MgCaD0,15 e MgCaD0,2 para razões teóricas de $\text{Mg}/\text{Ca} = 0,1$; 0,15 e 0,2 respectivamente nas soluções dos precursores das sínteses, foram envelhecidas por 24h a temperatura ambiente, lavadas até pH neutro, secas e peneiradas ($< 125 \mu\text{m}$).

A Figura 4.1 mostra o fluxograma das etapas empregadas na produção dos pós de MgCaD.

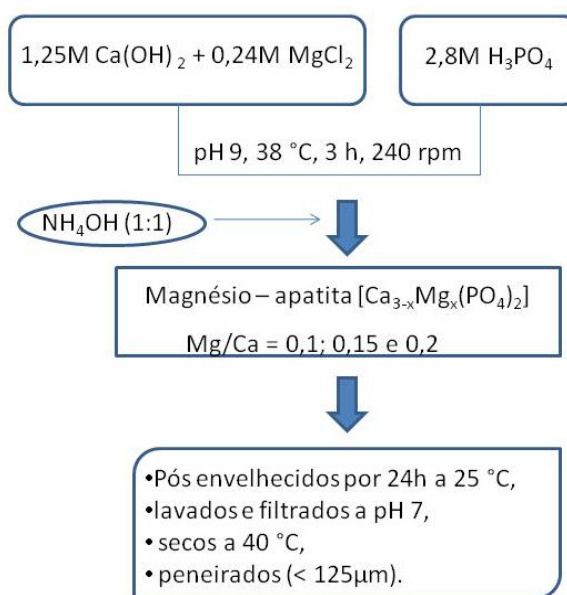


Figura 4.1: Fluxograma empregado para a produção de pós das amostras cálcio-deficientes substituídas por magnésio (MgCaD).

4.2 Produção de pastilhas densas

Pastilhas cilíndricas com 6 mm de diâmetro e 4 mm de altura foram obtidas a partir do pó verde com razões molares teóricas $Mg/Ca = 0,1$; $0,15$ e $0,2$ e de um pó comercial de β -TCP [Merck, Brasil]. A Figura 4.2 mostra o fluxograma das etapas empregadas na produção das pastilhas prensadas uniaxialmente a 216MPa e calcinadas a 1000 °C por 4 h ao ar, com taxa de aquecimento de 2,8 °C/min.

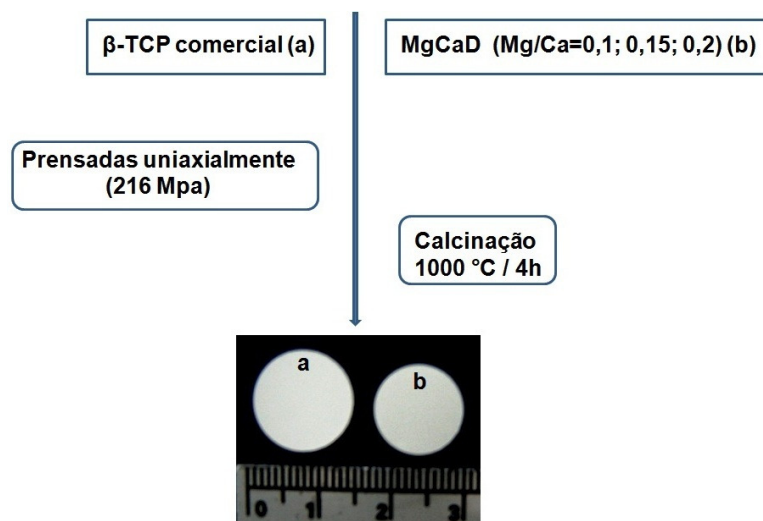


Figura 4.2: Fluxograma empregado para a produção de pastilhas calcinadas a partir do pó das amostras cálcio-deficiente substituídas por magnésio (MgCaD), e do pó comercial e macrografia das pastilhas calcinadas.

As técnicas empregadas na caracterização dos pós e pastilhas de apatita substituída por magnésio são apresentadas no item 4.6 a 4.8.

4.3 Extração de colágeno

O colágeno utilizado nessa dissertação foi doado pelo Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos, USP, SP

A hidrólise alcalina de tendão bovino foi preparada como descrito por GOISSIS *et al.* (2003) para pericárdio bovino. Brevemente, o tendão bovino é imerso em uma solução alcalina (3mL g⁻¹ de tecido) contendo dimetilsulfoxido (6% v/v) e cloretos e sulfatos de sódio, potássio e cálcio a pH ~ 13, 20 °C por 24 h . O excesso de sais foi removido por sucessivas lavagens com solução de ácido bórico (3% p/p) e EDTA

(0,3% p/p) e água deionizada. O colágeno foi extraído com solução de ácido acético (0,5M) a pH 3,5. (BET *et al.*, 2001).

4.4 Mineralização do colágeno aniônico com uma solução similar ao fluido corpóreo 1,5 (Simulated Body Fluid - SBF)

Com o intuito de obter a mineralização de amostras de colágeno aniônico para avaliar a biocompatibilidade das mesmas, matrizes de colágeno liofilizadas com dimensões de aproximadamente 0,55 cm³, foram imersas em 10 mL de solução simuladora de fluido corpóreo 1,5X mais concentrada (SBF 1,5) em pH 7,4 durante 15 dias a 37 °C, com troca de solução a cada três dias. O aumento da concentração da solução similar ao fluido corpóreo em 1,5X foi com o objetivo de acelerar o processo de mineralização devido ao período curto de tempo do ensaio. Após este período, as amostras foram lavadas com água deionizada, novamente liofilizadas e analisadas por diversas técnicas.

A solução utilizada foi similar à simuladora de fluido corpóreo estabelecida por KOKUBO e TAKADAMA (2006), (Tabela 4.1), numa concentração de 1,5.

Tabela 4.1: Composição da solução SBF e do plasma sanguíneo humano.
(KOKUBO e TAKADAMA, 2006)

Íons	Concentração (mmol dm ⁻³)		
	Plasma sanguíneo humano	SBF	1,5 SBF
Na ⁺	142,0	142,0	213,0
K ⁺	5,0	5,0	7,5
Mg ²⁺	1,5	1,5	2,3
Ca ²⁺	2,5	2,5	3,8
Cl ⁻	103,0	147,8	223,2
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2	6,3
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0	1,5
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	0,8
pH	7,38	7,4	7,25

As técnicas empregadas na caracterização do colágeno mineralizado são apresentadas no item 4.9.

4.5 Sínteses dos compósitos (MCA/colágeno aniônico)

Para determinar a concentração da solução de colágeno utilizada na síntese um volume conhecido do gel de colágeno foi diluído em uma solução de ácido acético 0,5M. foi seco em estufa a 100 °C e a diferença de peso determinou a concentração da solução de colágeno (mg/mL).

Os compósitos de magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico na proporção 65:35 e com razões molares teóricas $Mg/Ca = 0,1$ e $C/P = 3$ e 5 foram preparados através do método de precipitação aquosa usando como reagentes precursores uma solução de acetato de cálcio ($C_4H_6CaO_4$), acetato de magnésio ($C_4H_6MgO_4$), bicarbonato de sódio [$NaHCO_3$], uma solução de fosfato de sódio [Na_2HPO_4/NaH_2PO_4] e uma solução de colágeno tipo I em ácido acético.

As soluções de acetato de cálcio e magnésio juntamente com o gel de colágeno foram gradualmente adicionadas através de bombas peristálticas a um vaso reacional contendo as soluções de fosfato de cálcio e bicarbonato de sódio. A síntese foi feita sob agitação em um banho térmico a 37 °C por 3 horas e o precipitado foi envelhecido *overnight* a 40 °C. A Figura 4.3 mostra o fluxograma das etapas empregadas na produção dos compósitos magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico (MCA/col).

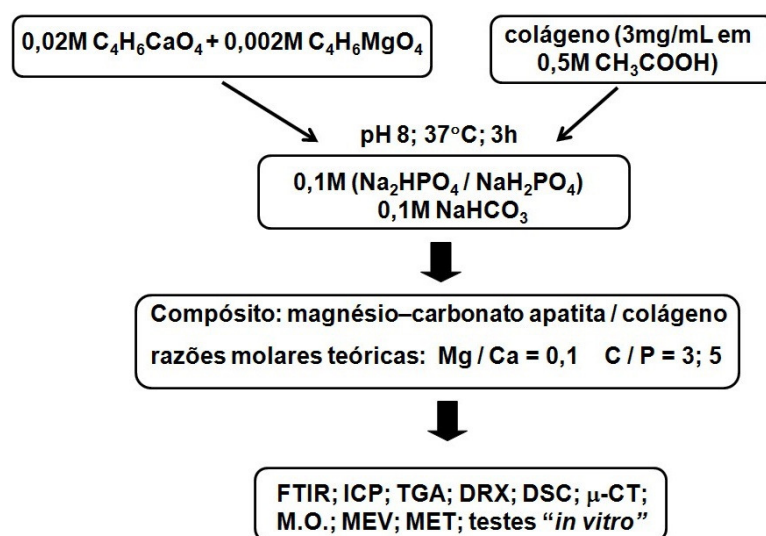


Figura 4.3: Fluxograma empregado para a produção do compósito magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico (MCA/col), indicando de forma resumida as técnicas de caracterização empregadas.

Ao final da síntese, antes da reticulação, a solução apresentou-se límpida, como se pode observar na Figura 4.4, não sendo observada nenhuma precipitação no fundo do vaso reacional. O compósito foi lavado três vezes com solução tampão PBS para ajustar o pH próximo ao fisiológico ($\text{pH}=7,4$) e três vezes com água deionizada.

Os compósitos magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico foram denominados 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg com a mesma razão molar teórica $\text{Mg}/\text{Ca}=0,1$ e diferentes razões molares teóricas $\text{C}/\text{P}=3$ e 5 respectivamente.

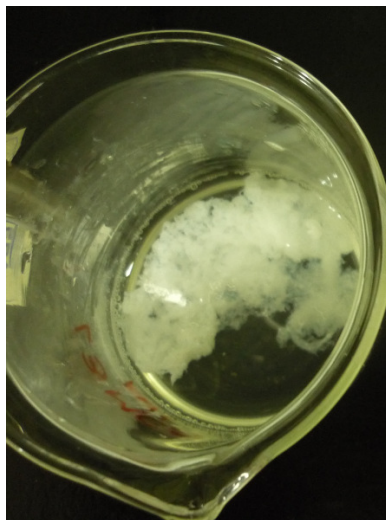


Figura 4.4: Imagem do vaso reacional do compósito 3C1P0,1Mg ao final da síntese.

Os compósitos foram reticulados com solução de glutaraldeído, tendo sido empregadas duas diferentes concentrações: 0,125 e 0,25% (v/v). As soluções de GA foram borbulhadas dentro da solução após a síntese a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ uma vez que CHEUNG *et al.* 1985A relataram que a penetração do GA a temperatura ambiente é mais rápida que a baixas temperaturas.

As amostras foram colocadas em moldes de teflon, congeladas por 24 horas e liofilizadas em um equipamento Liotop L101, apresentando o aspecto mostrado na Figura 4.5. A caracterização dos arcabouços está descrita nos itens 4.10 a 4.12.

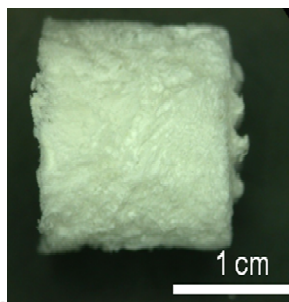


Figura 4.5: Compósito 3C1P0,1Mg desmoldado após a liofilização.

4.6 Caracterização físico-química dos pós verdes e das pastilhas calcinadas

A Tabela 4.2 sumariza os testes físico-químicos empregados nas caracterizações dos pós verdes e das pastilhas calcinadas a 1000 °C.

Tabela 4.2: Testes físico-químicos empregados nas caracterizações dos pós verdes e das pastilhas calcinadas.

TESTES	Pós verdes	Pastilhas calcinadas a 1000 °C
DRX	X	X
REFINAMENTO POR RIETVELD		X
BET	X	
ICP	X	
FTIR	X	X
DETECÇÃO ÓXIDO DE CÁLCIO	X	
TGA	X	
MET	X	
MEV	X	X
CULTURA DE CÉLULAS		X

4.6.1 Difração de raios-X (DRX)

As fases cristalinas presentes nos pós secos foram identificadas por difração de raios-X (**DRX**, Philips modelo X'Pert). Por meio de espalhamento e da consequente difração de raios-X, que ocorre devido às nuvens eletrônicas dos átomos presentes nas amostras, pode-se identificar as linhas de difração correspondentes aos espaçamentos interplanares dos materiais cristalinos. Se os átomos estiverem arranjados regularmente no espaço de rede, o ângulo de espalhamento 2θ está diretamente relacionado à distância interplanar através da equação de Bragg (equação 2).

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2)$$

Esta técnica permite determinar a cristalinidade da amostra bem como estimar as mudanças dos parâmetros de rede causadas pela incorporação de Mg na estrutura da apatita. Através de refinamentos dos espectros pelo método de Rietveld utilizando-

se o programa FULLPROF (DRX - XPERT PRO - Panalytical) Bragg-Brentano geometry, CuK α (40 kV, 40 mA); 2 θ : 5 - 65°, pode-se determinar o tamanho do cristalito dos pós calcinados.

Este refinamento consiste em um processo de ajuste por estágios sucessivos da melhoria dos parâmetros estruturais. O perfil de difração é calculado usando-se as dimensões da célula unitária para determinar as posições do pico, as posições atômicas e parâmetros de deslocamento térmico como um modelo para as intensidades dos picos. Este método permite, através do refinamento, calcular os parâmetros da célula unitária, a análise quantitativa das fases presentes, a determinação de orientação preferencial e a estrutura cristalina.

Foram obtidos perfis de DRX para os pós verdes e para os pós calcinados a 1000 °C com razão teórica de Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2.

4.6.2 BET

As áreas específicas dos pós verdes foram calculadas a partir da quantidade de nitrogênio necessária para adsorver fisicamente à superfície da amostra em diferentes pressões, BET (Micrometrics modelo ASAP 2010). A adsorção física é causada por forças de van der Waals entre as moléculas do gás e os átomos ou íons presentes na amostra. O método consiste em obter o volume da monocamada de nitrogênio adsorvida na superfície completamente seca da amostra degaseificada, através das isotermas de adsorção física determinadas experimentalmente. A isoterma representa a relação entre a quantidade molar de gás adsorvida ou dessorvida por um sólido à temperatura constante em função da pressão do gás.

4.6.3 Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES)

As concentrações de cálcio, magnésio e fósforo dos pós verdes secos foram determinadas através da espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP-OES, Perkin-Elmer modelo OPTIMA 3000). Foram pesadas 10 mg das amostras, dissolvidos em 17,5% (v/v) de ácido clorídrico (HCl) e avolumado a 100mL com água deionizada. As soluções foram bombeadas através de gás argônio e o plasma excitado por uma radiofrequência de 2 kW / 27,12MHz. As concentrações de cada elemento foram determinadas utilizando-se seus comprimentos de onda

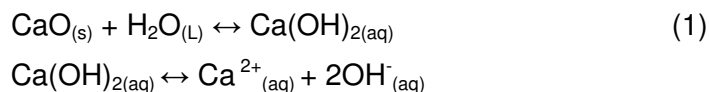
característicos (Ca, 317,9 Å; P, 213,6 Å e Mg, 279,6 Å), permitindo o cálculo das razões molares de Mg/Ca e (Ca+Mg)/P. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, Perkin Elmer modelo Spectrum 100) permitiram a identificação dos grupamentos característicos da apatita. A radiação quando absorvida pela molécula converte-se em energia de vibração molecular dando origem a bandas de vibração – rotação geralmente na mesma frequência. A frequência ou comprimento de onda dessa absorção vai depender da geometria dos átomos, das suas massas relativas bem como das constantes da força de ligação. As amostras foram analisadas numa faixa de espectro de 4000 – 550 cm⁻¹, com reflectância total atenuada (RTA), número de varreduras 16 e resolução 4 cm⁻¹ para obter-se os espectros dos pós verdes e calcinados a 1000 °C com razões teóricas de Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2.

4.6.5 Teste para a detecção de óxido de cálcio como fase secundária

A presença de óxido de cálcio (CaO) nos pós verdes foi verificada de acordo com a norma francesa NF-S 94-066 (1998). Esse teste é importante pois detecta a presença de óxido de cálcio que é citotóxico para as células. O pó sintetizado foi submetido a um tratamento térmico a 1000 °C por 15 horas. O pó, ainda quente (400 °C), foi vertido em água contendo uma pequena quantidade de fenoftaleína. Como o óxido de cálcio é solúvel em água, este se dissocia (equação 1) dando origem a íons hidroxila (OH⁻) que são detectados pela coloração rosa da solução devido a presença da fenoftaleína como indicador ácido-base.



4.6.6 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA/DTA, TA Instruments modelo SDT 2960) avalia as variações de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo

sob atmosfera controlada. Com o aumento da temperatura, o material sofre degradação, perdendo massa sob a forma de produtos voláteis. O início e o fim do processo de perda de massa são obtidos através da derivada da curva fornecida.

É uma técnica muito utilizada para determinar o teor de umidade, a pureza do material e a estabilidade térmica dos componentes de fosfato de cálcio tais como CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} e H_2O .

As análises de TGA dos pós verdes foram feitas nas seguintes condições operacionais: massa da amostra: 10mg; taxa de aquecimento: 10 °C/min e amplitude: 30 a 1200 °C;

4.7 Caracterização morfológica dos pós verdes e das pastilhas calcinadas

4.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (**MET** – JEOL modelo 2000FX), mostrou as características ultra-estruturais dos cristais de apatita substituídos por magnésio. Uma pequena quantidade de pó verde $\text{MgCaD}_{0,2}$ foi dispersa em álcool iso-propílico em cuba ultrasom por 10 minutos e pingou-se duas gotas dessa dispersão em uma grade de cobre com 3 mm de diâmetro coberta por um filme de carbono e de formvar. O equipamento foi operado em 200 KV.

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (**MEV** – JEOL modelo JSM6460LV) acoplada à espectroscopia de energia dispersiva (**EDS** – Thermo/System Six modelo 200) avaliou a morfologia dos cristais (forma e tamanho) da amostra verde $\text{MgCaD}_{0,2}$ e sua composição elementar, respectivamente. As amostras foram montadas sobre fita condutora de carbono em um suporte de alumínio, recobertas com uma fina camada de ouro para evitar carregamento elétrico e as micrografias foram obtidas a uma voltagem de 15KV.

A microscopia eletrônica de varredura também foi empregada para a caracterização da superfície das pastilhas densas. Assim, a microporosidade de uma pastilha produzida com $\text{MgCaD}_{0,2}$ foi comparada a de uma amostra de β -TCP comercial (Merck, Brasil).

4.8 Testes *In Vitro*

4.8.1 Cultura de células

Para avaliar a adesão e a proliferação de osteoblastos humanos (SaOs2) sobre as superfícies das pastilhas de MgCaD0,2 calcinadas a 1000 °C, 4×10^4 células/poço foram plaqueadas sobre suas superfícies nos períodos de 4h, 24h e 7 dias. Foram utilizadas quatro amostras para cada tempo. Após o período de incubação as amostras foram fixadas para manter a integridade das células até serem examinadas por MEV. Após fixação as pastilhas recobertas pelos osteoblastos foram desidratadas numa sequência de alcoóis seguido de secagem em aparelho de ponto crítico. Esses testes foram comparados com amostras de β -TCP comercial puro extra seco (Merck, Brasil) calcinadas a 1000 °C

4.9 Caracterização do colágeno aniônico mineralizado com uma solução similar ao fluido corpóreo

As matrizes de colágeno mineralizadas através da solução 1,5 SBF foram caracterizadas por DRX para verificar as fases cristalinas presentes após a mineralização, por FTIR para identificar os grupamentos específicos do colágeno puro e mineralizado, por DSC para determinar a estabilidade térmica verificando-se a temperatura de desnaturação do colágeno antes e após o processo de mineralização, por TGA para determinar a quantidade de fase orgânica e de fase inorgânica presente nos compósitos, por MEV para analisar a morfologia do precipitado sobre as fibrilas de colágeno e por micro-CT para avaliar a homogeneidade da mineralização sobre o colágeno.

4.10 Caracterização físico-química dos arcabouços compósitos

4.10.1 Propriedades espectrais do colágeno e dos compósitos

As bandas de absorção características do colágeno aniônico e dos compósitos (MCA/col) com razão molares teóricas de Mg/Ca 0,1 e C/P 3 e 5, antes e após reticulação com GA 0,25% (v/v) foram avaliadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (**FTIR**, Perkin Elmer, modelo Spectrum 100). Uma

pastilha do compósito foi preparada misturando-se 1 mg da amostra com 250 mg de brometo de potássio (KBr, Merck, Brasil) e prensando-se com 10.000 psi numa prensa hidráulica (Carver laboratory press, modelo C, Fred S. Carver Inc.). A varredura foi obtida com 4 cm^{-1} de resolução e com 32 tempos de interação na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . O ruído de fundo do aparelho foi corrigido com uma pastilha pura de KBr.

4.10.2 Composição química da parte mineral dos compósitos

As concentrações de cálcio, magnésio, fósforo e sódio dos compósitos 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg foram determinadas por espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (**ICP-OES**, Perkin Elmer modelo OPTIMA 3000) e as razões molares Mg/Ca e (Ca+Mg)/P calculadas.

Para determinação da composição da parte mineral, a parte orgânica dos compósitos foi previamente digerida por uma solução de hipoclorito de sódio a 3% (v/v), NaOCl por 48 horas. Depois o pó foi lavado com água destilada, seco e 10 mg das amostras foram dissolvidas em 17,5% (v/v) de ácido clorídrico (HCl) e avolumado a 100mL com água destilada. As soluções foram bombeadas através de gás argônio e o plasma excitado por uma radiofrequência de 2 kW / 27,12. As concentrações de cada elemento foram determinadas utilizando-se seus comprimentos de onda característicos (Ca, 317,9 Å; P, 213,6 Å; Mg, 279,6 Å e Na, 588,9 Å). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.10.3 Estimativa da razão das fases mineral e orgânica

A análise termogravimétrica (**TGA**, TA Instruments SDT modelo Q600) permitiu estimar a relação entre a fase inorgânica e a orgânica presentes nos compósitos bem como a quantidade de água adsorvida e o carbonato (CO_3^{2-}) liberado como CO_2 no tratamento térmico. As análises foram realizadas utilizando-se 10mg de amostra aquecida de 20 a $950\text{ }^\circ\text{C}$ com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e vazão de nitrogênio de 100 mL min^{-1} permitindo a estimativa da parte mineral como o resíduo obtido a $950\text{ }^\circ\text{C}$.

O resíduo das análises termogravimétricas são um indicativo das fases obtidas. O tecido mineralizado, o osso, calcinado a $400\text{ }^\circ\text{C}$ tem uma coloração preta, calcinado a $600\text{ }^\circ\text{C}$ apresenta coloração cinza indicando algum carbono residual não queimado e calcinado a $800\text{ }^\circ\text{C}$ a cor é branca, indicando a total remoção da parte orgânica.

4.10.3.1 Perfil cristalino

As fases cristalinas presentes nos compósitos 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg foram identificadas por difração de raios-X (**DRX**, Philips modelo X'Pert) com um monocromador com cristal curvo e radiação Cu K α , operando a 45 kV e 45 mA, numa faixa de 20–60°.

4.10.4 Avaliação da temperatura de desnaturação do colágeno

A calorimetria diferencial de varredura (**DSC**, Shimadzu, modelo DSC-50) permitiu determinar a estabilidade térmica das estruturas helicoidais das moléculas de colágeno aniônico e dos compósitos antes e após a reticulação com 0,125 e 0,25% GA, através da quantidade de energia (calor) absorvida ou liberada pelas amostras antes e após o processo de desnaturação. As matrizes cilíndricas de colágeno e de colágeno mineralizado foram imersas em solução tampão fosfato 0.13mol L⁻¹, pH 7,4 por 24 horas para manter as fibras de colágeno numa condição hidratada. O excesso de líquido foi removido com papel de filtro. A temperatura de desnaturação foi determinada com cerca de 10 mg da amostra em cadinho de alumina e a rampa de aquecimento foi de 10 °C min⁻¹ numa faixa de temperatura de 20-150 °C em atmosfera de nitrogênio.

4.10.5 Efeito da reticulação com glutaraldeído (GA) na estabilidade dos compósitos em meio de cultura

O efeito do grau de reticulação com GA na estabilidade dos compósitos foi determinado em um experimento *in vitro* estático onde os compósitos antes e após reticulação com 0,125% e 0,25% GA permaneceram em contato direto com o meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB por um período de 15 dias. Após o teste, a morfologia das amostras foi observada por MEV.

4.11 Caracterização morfológica dos arcabouços compósitos

4.11.1 Micrografia dos compósitos

A micro-tomografia computadorizada (**micro-CT**) é uma técnica não-destrutiva que permite reconstruir e modelar o interior das amostras em escala micrométrica.

A estrutura 3D dos compósitos foi observada por micro-tomografia computadorizada de alta resolução (**μCT** - Scanco Medical 40, Switzerland) operando com uma voltagem de 55 kV, uma corrente de 145 mA e uma resolução de 6 μm.

4.11.2 Histologia dos compósitos

Matrizes de colágeno aniônico liofilizado e compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA e liofilizados foram embutidos com poli (metacrilato de metila) (PMMA, Aldrich) e seções de 80 μm foram cortadas (Isomet 1000, Buehler), lixadas e polidas (Economet3, Buehler). As seções não coradas foram observadas por microscopia de luz polarizada com microscópio universal (Leica DMRX/E) acoplado com sistema digital Syncroscopy Montage Explorer (Frederick, MD). As seções coradas com azul de anilina ou impregnadas com prata metenamina para o colágeno tipo I ou com Von Kossa para fase mineral de fosfato foram analisadas por microscopia de luz de campo claro (Nikon Optiphot2) equipado com uma câmera digital (Nikon, DMX 1200F). O fluxograma empregado para a observação das amostras por microscopia óptica pode ser visto na Figura 4.6.

As imagens coradas com Von Kossa foram convertidas em níveis de escala de cinza, sendo a parte preta considerada os poros e a parte branca o compósito mineral-colágeno, e analisadas para o cálculo da porosidade usando o programa Image J (NIH, USA).

4.11.3 Caracterização estrutural

A microscopia eletrônica de varredura (**MEV**, JEOL modelo JSM6460LV) permitiu observar a estrutura do colágeno aniônico bem como a precipitação da apatita substituída por magnésio e carbonato na parte externa das fibras de colágeno e na parte interna fraturada com nitrogênio líquido. Imagens do compósito também foram obtidas com o microscópio da FEI (FIB/Nova-600 D134) que combina ultra-alta-resolução de emissão de campo e precisão. As amostras foram montadas nos suportes de alumínio com cola prata e receberam uma fina camada de ouro (Emitech, K550, USA) uma vez que são não-condutoras, evitando assim carregamento.

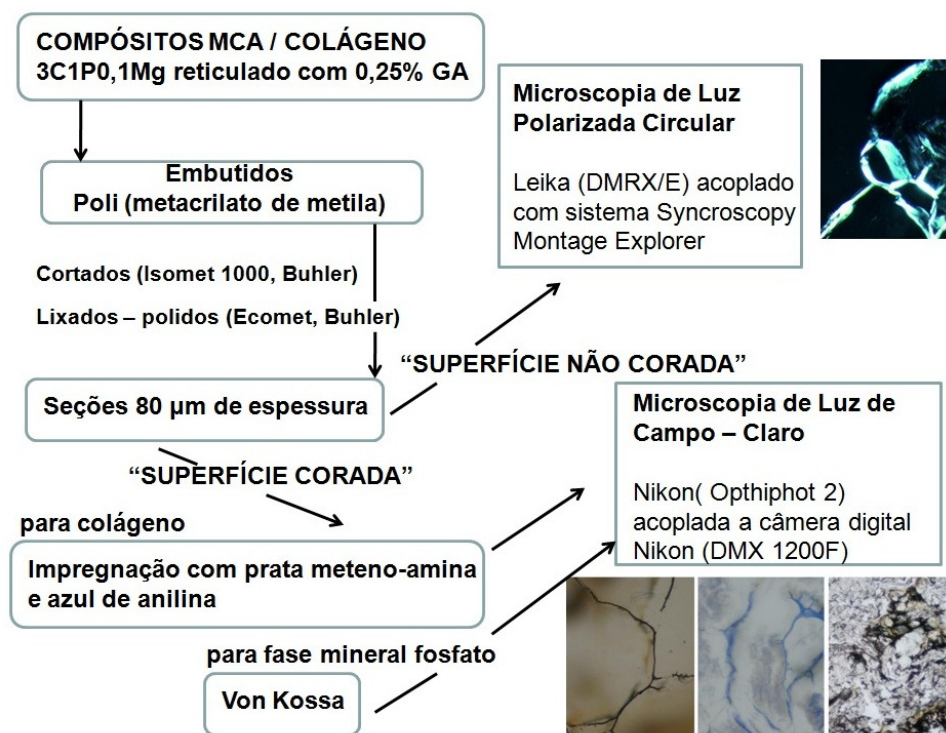


Figura 4.6: Fluxograma empregado para observação das matrizes de colágeno aniônico e dos compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA por microscopia de luz polarizada e microscopia de luz de campo claro.

4.11.4 Caracterização ultra-estrutural

A microscopia eletrônica de transmissão (**MET** - JEOL, 2000FX), com aceleração de voltagem de 120kV, foi empregada para observar a precipitação de apatita (MCA) sobre as fibrilas do colágeno. A preparação das seções finas teve início com a fixação dos compósitos com solução de glutaraldeído 2,5% por 1 hora, seguido de lavagem por três vezes com solução de cacodilato de sódio 0,1 M e corados com tetróxido de ósmio 1% OsO₄ (Ted Pella, USA) por 30 minutos. Após esse procedimento as amostras foram embebidas em resina Spurr (SPI Supplies Division of Structure Probe, Inc., USA), desidratadas em uma série de soluções de álcool com concentrações ascendentes. Seções ultrafinas, em torno de 60-80nm foram cortadas em ultramicrotomo (RMC, Power TomeX) e transferidas para uma grade de cobre coberta com formvar, coradas com citrato de chumbo por 15 minutos e acetato de uranila por 30 minutos para serem observadas por MET (FEI, Tecnai G20). As amostras foram analisadas em campo claro e pode-se caracterizar a distribuição dos precipitados nas fibrilas do colágeno.

O pó da parte mineral obtido através da digestão do colágeno já descrito anteriormente na sessão 4.10.2 foi analisado no MET com uma aceleração de voltagem de 200KV. O pó seco foi disperso em álcool isopropílico e duas gotas dessa suspensão foram adicionadas sobre uma grade de cobre recoberta com filme de formvar. A análise elementar do pó foi adquirida através de espectroscopia por energia dispersiva (**EDS** –Oxford, INCA X-sight)

4.12 Testes *in vitro*

4.12.1 Degradação dos compósitos em meio ácido

A degradação dos compósitos 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA quando imersos em uma solução tampão de acetato de potássio 0.1 M ($\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, Merck, Brasil) foi avaliada por ICP. Uma amostra de 25 mg foi imersa na solução a 37 °C, pH 5, sob atmosfera de ar em um sistema aberto sob constante agitação a 500 rpm. O sistema utilizado no teste de degradação pode ser visto na Figura 4.7. A liberação de Ca, P e Mg foi continuamente monitorada por 180 minutos. As análises foram feitas em triplicata. Os teores foram expressos mg L^{-1} em função do tempo.

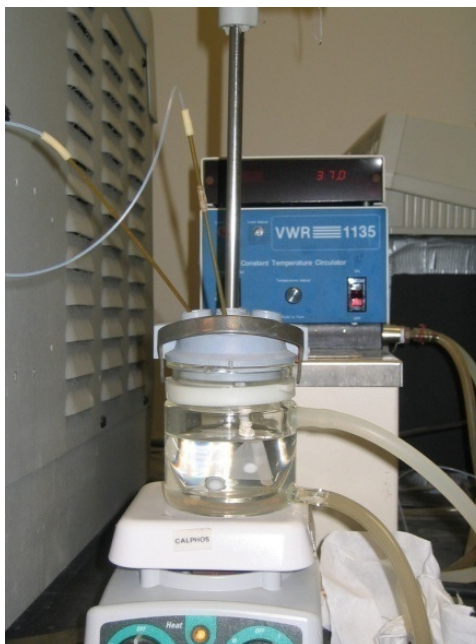


Figura 4.7: Sistema utilizado no teste de degradação dos arcabouços 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg reticulados com 0.25% GA.

4.12.2 Citocompatibilidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados na Unidade de Pesquisas Clínicas do Hospital Universitário Antônio Pedro, da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Um possível efeito citotóxico dos arcabouços 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA e expostos a 25 KGy de irradiação gama por Cobalto-60 [MPS Nordion, model GC 220E, serie 98R ASSY, Type B(U), com 434,83 TBq (11.750 Ci)] foram avaliados por um método multiparamétrico em uma mesma amostra para testar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial (XTT), integridade membrana (vermelho neutro) e a densidade celular (cristal violeta). O experimento, realizado em quintuplicata, seguiu a norma ISO 2010993, partes 5 e 12, referentes à avaliação de materiais médicos e foram empregados kits comerciais (In Cytotox – KXRCV 96.300, Xenometrix, Allschwil, Suíça).

Extratos totais dos arcabouços foram obtidos segundo a norma ISO 2010993-12, na qual o material permaneceu incubado por 24h a 37 °C, em uma proporção de 1mL de meio de cultura (DMEM) não suplementado com soro fetal bovino para cada 100 mg de material sob a forma de pó. Placas de poliestireno sem material foram usadas como controle negativo de citotoxicidade e como controle positivo, soluções de fenol a 4% (v/v).

A cultura de fibroblastos de camundongo de linhagem Balbc / c-3T3 clone A31 foi realizada em presença de DMEM contendo bicarbonato de sódio, NaHCO_3 , (1.2 g L^{-1}), ampicilina (0.025 g L^{-1}), estreptomicina (0.1 g L^{-1}), a 37 °C em estufa com 5 % CO_2 em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células por poço.

Após 24 horas as células foram lavadas com solução tampão salina (PBS) e o meio de cultura foi trocado pelos extratos e os testes de viabilidade foram realizados.

O teste de atividade mitocondrial (XTT) baseia-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais converterem o sal de tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em compostos de formazan (cor laranja). Após incubação com esse reagente por 2 horas, a absorvância a 480 nm foi lida em um leitor de microplacas PowerWave MS2 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA).

O teste de integridade lisossomal (Vermelho Neutro) é conhecido como um teste de sobrevivência/viabilidade baseado na habilidade de células viáveis incorporarem o corante vermelho neutro pelos lisossomos, o qual se acumula na sua membrana íntegra. A quantidade de corante incorporada pode ser medida através da absorvância a 540 nm. As células expostas ao XTT foram lavadas com solução NRI

(Xenometrix Allschwil, Suíça) e expostas por 2 horas ao corante vermelho neutro. Após esse período as células foram fixadas por 1 minuto com solução NRII e o vermelho neutro diluído em uma solução NRIII. A absorvância foi lida no leitor de microplacas.

O teste de densidade celular (Cristal Violeta) avalia a densidade celular por coloração do DNA das células após a eliminação do excesso do corante. As células fixadas no teste de vermelho neutro foram lavadas e tratadas com o corante cristal violeta por 10 minutos, lavadas exaustivamente com água destilada e em seguida expostas a uma solução de metanol e ácido acético, provenientes do kit Citotox. Esta solução alcoólica ácida solubiliza o corante e após agitação permite medir a densidade celular através da absorvância 540 nm em leitor de microplacas.

4.12.3 Adesão e proliferação celular

Os compósitos foram imersos em meio de cultura Dulbecco's (DMEM – Sigma) suplementado com 10% SFB por 24 horas. Após esse tempo o meio de cultura foi removido e 5×10^5 células/poço de osteoblastos humanos SaOs2 foram plaqueadas sobre os compósitos nos períodos de 48h, 7 e 14 dias. Foram utilizadas 3 amostras para cada tempo. As células aderidas ao material foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS), fixadas usando solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 1h e pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio 1,0% em tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 15 min. Após fixação, os materiais foram desidratados por imersão em soluções aquosas de etanol com concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 80%, 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 celular. As amostras foram secas usando aparelho de ponto crítico de CO_2 (Baltec, CPD 030, Sweden) e recobertas com uma fina camada de ouro (EMITECH, K550) para observação por MEV a 15 KV.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse capítulo está subdividido em três partes: caracterização dos pós e pastilhas de apatita substituída por magnésio; mineralização do colágeno aniônico a partir de uma solução de SBF e caracterização do compósito magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico.

5.1 Caracterização da apatita substituída por magnésio sob forma de pó ou pastilhas

5.1.1 Caracterização físico-química dos pós de apatita substituída por magnésio

Parte dos pós foi calcinada a 1000 °C com o objetivo de caracterizar a substituição do magnésio pelo cálcio e seus efeitos na estrutura da apatita cálcio deficiente.

Os perfis de DRX das amostras com razão teórica de Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2 denominadas MgCaD0,1; MgCaD0,15 e MgCaD0,2 respectivamente tanto para o pó verde como para os pós sinterizados a 1000 °C, encontram-se na Figura 5.1.

Os perfis de DRX das amostras verdes (Figura 5.1a) apresentaram uma apatita (JCPDS: 09-0432) com baixa cristalinidade. A apatita é considerada não – estequiométrica ou cálcio deficiente quando a razão Ca/P esta abaixo de 1,67 sendo esta razão o valor estequiométrico para a hidroxiapatita pura, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Geralmente as apatitas precipitadas obtidas por sínteses aquosas inicialmente consistem de uma camada hidratada estrutural contendo espécies iônicas facilmente substituídas, com baixa cristalinidade. A apatita Ca deficiente pode ser representada pela fórmula $\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_2$, onde M representa os íons substitutos do cálcio, no caso o magnésio. O tratamento térmico a 1000 °C resultou em um aumento de cristalinidade e na transformação em β -TCMP $[(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2]$ (JCPDS: 13-0404) para as amostras cálcio deficientes substituídas por magnésio. Foi encontrada hidroxiapatita (HA) como fase secundária.

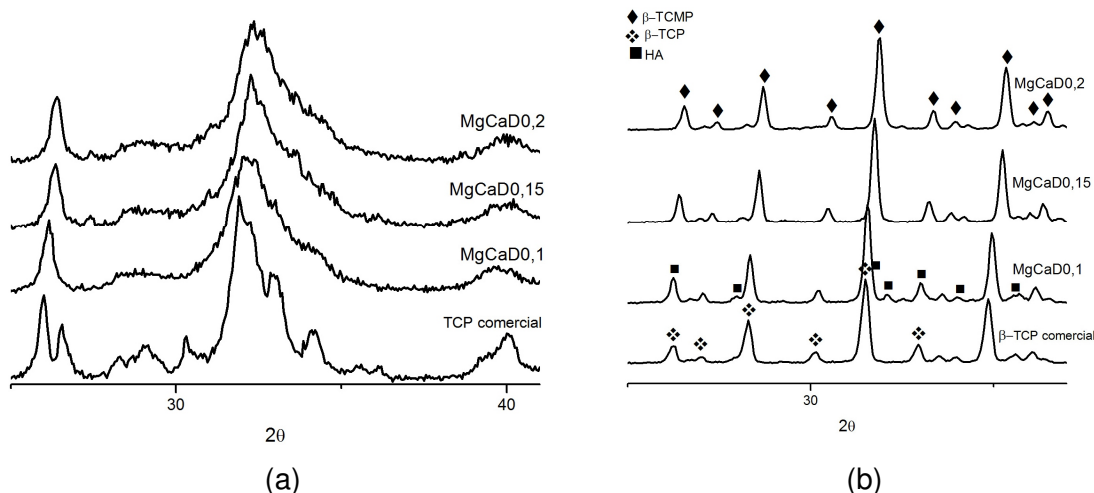


Figura 5.1: Perfis de DRX do TCP comercial e dos pós verdes com razão Mg/Ca 0,1; 0,15 e 0,2 (a) e calcinados a 1000 °C (b) obtidos a partir dos precursores $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, e H_3PO_4 .

O alargamento dos picos de difração das amostras verdes sugere uma redução de cristalinidade refletindo na diminuição do tamanho de cristalito devido à contração nas dimensões da célula unitária causada pela parcial substituição do Mg na rede da apatita, gerando uma desordem do cristal uma vez que o magnésio tem um raio iônico (0,66 Å) menor que o cálcio (0,99 Å) (KLUG e ALEXANDER, 1974; MAYER *et al.*, 1997; LEGEROS, 1991; LEGEROS *et al.*, 1995).

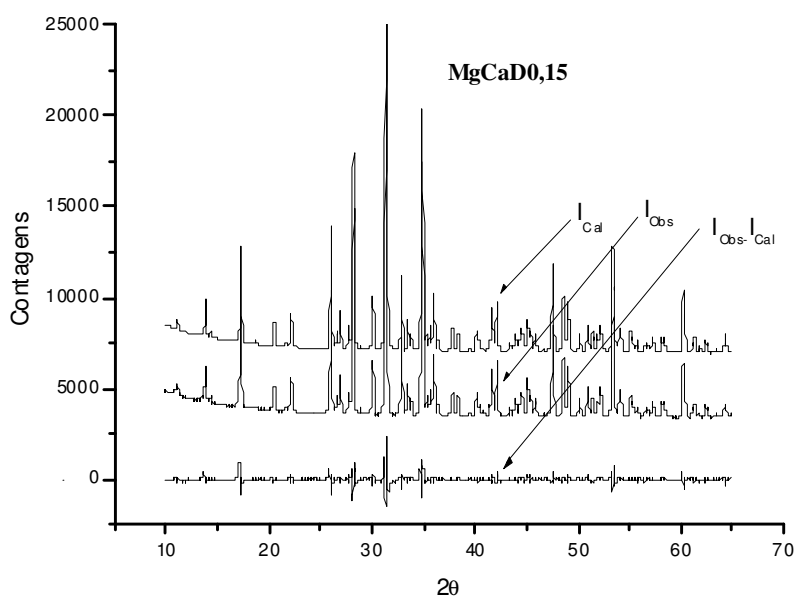
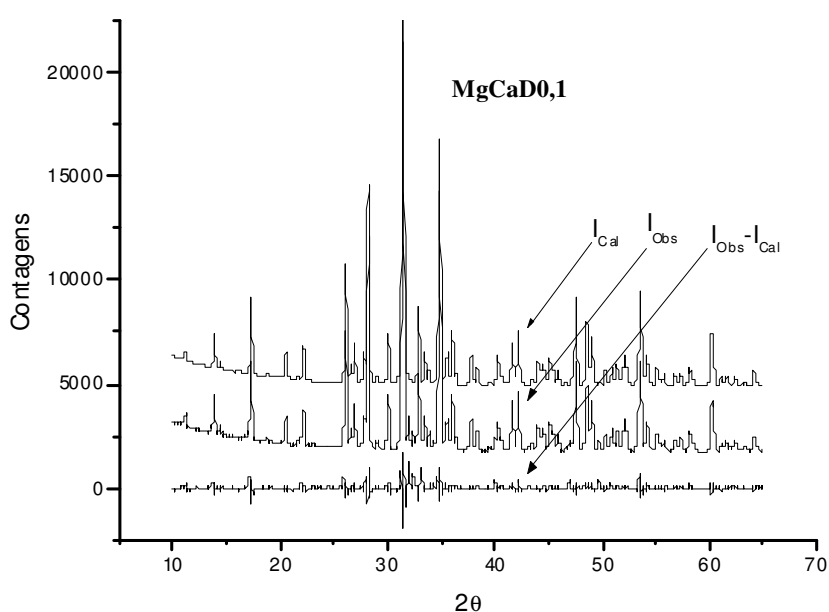
A Figura 5.2 apresenta o resultado do refinamento pelo método de Rietveld das amostras de fosfato tricálcico substituídas por magnésio com razões molares Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2, comparadas com uma amostra de β-TCP comercial pura extra seca (Merck, Brasil), sendo que na Tabela 5.1 os baixos valores obtidos para todos os fatores de concordância finais, **R**, denotam que o modelo estrutural empregado foi adequado para descrever os cristais das amostras de apatita.

A Figura 5.3 mostra a variação dos parâmetros de rede e do volume da célula das amostras de β-TCP comercial e de β-TCMP com razões molares teóricas Mg/Ca 0,1; 0,15 e 0,2.

A inserção do Mg^{2+} no sítio Ca (5) foi de 90% para a amostra MgCaD0,1 com conteúdo molar de 9,0% e fórmula molecular igual a $\text{Ca}_{2,73}(\text{Mg}_{0,27})(\text{PO}_4)_2$. A fórmula estrutural obtida pelo refinamento para a amostra MgCaD0,15 foi $\text{Ca}_{2,71}(\text{Mg}_{0,29})(\text{PO}_4)_2$, com 96% de inserção do Mg^{2+} no sítio Ca (5) e conteúdo molar

de 9,7%. A inserção do Mg^{2+} no β -TCMP ocupou 24% das posições do sítio Ca (4) e 87% no sítio Ca (5) com um conteúdo molar de 10,0% para a amostra MgCaD0,2 com uma provável composição estequiométrica igual a $Ca_{2,70}(Mg_{0,23}^V Mg_{0,07}^{IV})(PO_4)_2$.

ARAÚJO *et al.* 2009, relataram uma substituição máxima de 15% mol de magnésio na rede do beta-fosfato tricálcico (β -TCP) através do método de Rietveld. A incorporação do Mg na rede da apatita é muito limitada e é diretamente dependente da razão molar Mg/Ca na solução, da temperatura, do pH e da presença de carbonato (LEGEROS, 1981; 1991; 1993; LEGEROS *et al.*, 1995; LEGEROS *et al.*, 1996).



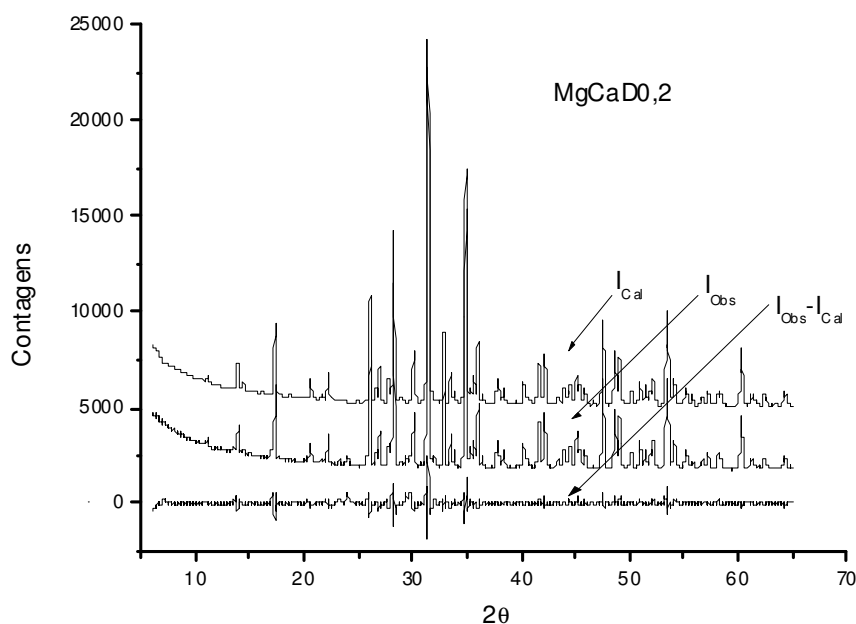


Figura 5.2: Refinamento pelo método de Rietveld do β -TCMP com razões molares teóricas Mg/Ca 0,1; 0,15 e 0,2.

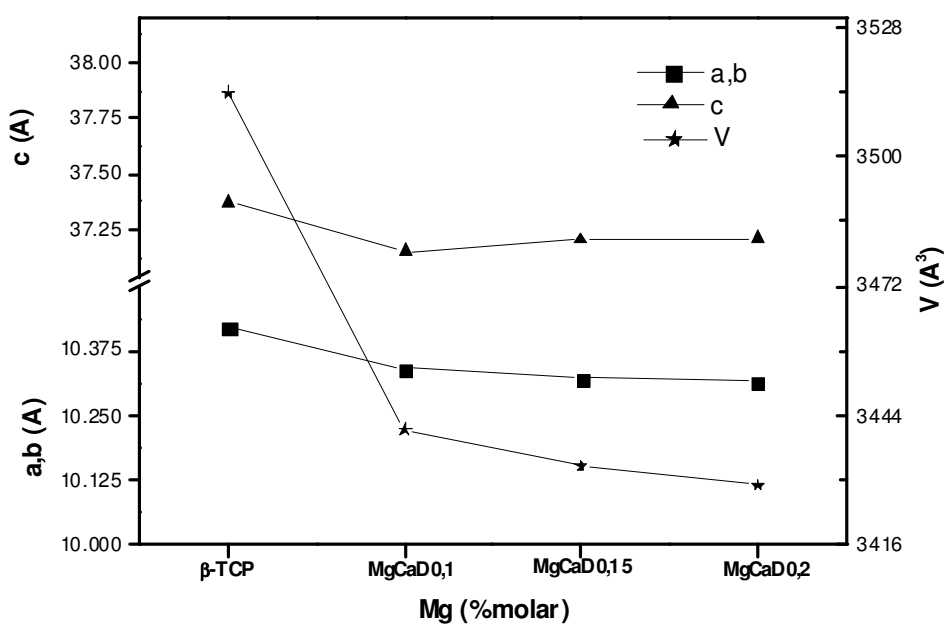


Figura 5. 3: Parâmetros de rede e volume de célula das amostras de β -TCP comercial e de β -TCMP com razões molares teóricas Mg/Ca 0,1; 0,15 e 0,2.

Os valores dos parâmetros de rede, o volume da célula unitária e o tamanho dos cristalitos, parâmetros obtidos pelo refinamento do método de Rietveld para os pós calcinados a 1000 °C estão apresentados na Tabela 5.2. Como esperado, com o aumento da quantidade de Mg incorporado ocorre a diminuição do tamanho de cristalito e do volume da célula unitária.

Tabela 5.1: Fatores de concordância finais.

(%)	<i>MgCaD0,1</i>	<i>MgCaD0,15</i>	<i>MgCaD0,2</i>	<i>B-TCP (Merck)</i>
R_{wp}	18,7	15,9	16,4	11.1
R_{Bragg}	4,43	2.90	3,52	3.84
R_F	2,88	2.35	2,31	3.11

Tabela 5.2: Parâmetros de rede, volume da célula unitária e tamanho de cristalito obtidos pelo refinamento do método de Rietveld para os pós calcinados a 1000 °C.

Amostras	<i>a</i> = <i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	Volume célula unitária (Å³)	Tamanho cristalito
MgCaD0,1	10,3415(1)	37,1543(2)	3441	256
MgCaD0,15	10,3153(7)	37,2117(2)	3429	183
MgCaD0,2	10,3229(0)	37,2066(0)	3433	152
β-TCP*	10,43520	37,40290	3527	---
β-TCP**	10,4208(2)	37,3711(7)	3514	---

*MERCK, Brasil

**YASHIMA *et al.* (2003)

Os resultados das análises de BET e ICP para as amostras com razão teórica de Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2 encontram-se na Tabela 5.3. Com a incorporação do Mg observou-se uma grande diferença na área superficial específica (BET) das amostras verdes, quando comparadas ao β-TCP comercial, 57 m²/g. . As razões Mg/Ca e (Ca+Mg)/P encontradas para os pós verdes, obtidas por ICP, estão muito próximas dos cálculos teóricos (0,1<Mg/Ca<0,2).

A grande área de superfície específica encontrada para a apatitas cálcio deficientes substituídas por magnésio com razão molar Mg/Ca=0,2, MgCaD0,2, é compatível com o tamanho de partícula encontrada pelo MET (item 5.1.2).

Tabela 5.3: Tamanho de área específica e razão molar dos pós verdes.

AMOSTRAS	BET (m²/g)	Razão Mg/Ca	Razão (Ca +Mg)/P
MgCaD0,1	193	0,11±0,002	1,54±0,02
MgCaD0,15	199	0,16±0,008	1,51±0,02
MgCaD0,2	181	0,20±0,001	1,58±0,03

A diferença dos modos de vibração e rotação dos grupos funcionais dos pós verdes e calcinados a 1000 °C podem ser observados nos espectros de infravermelho (Figura 5.4).

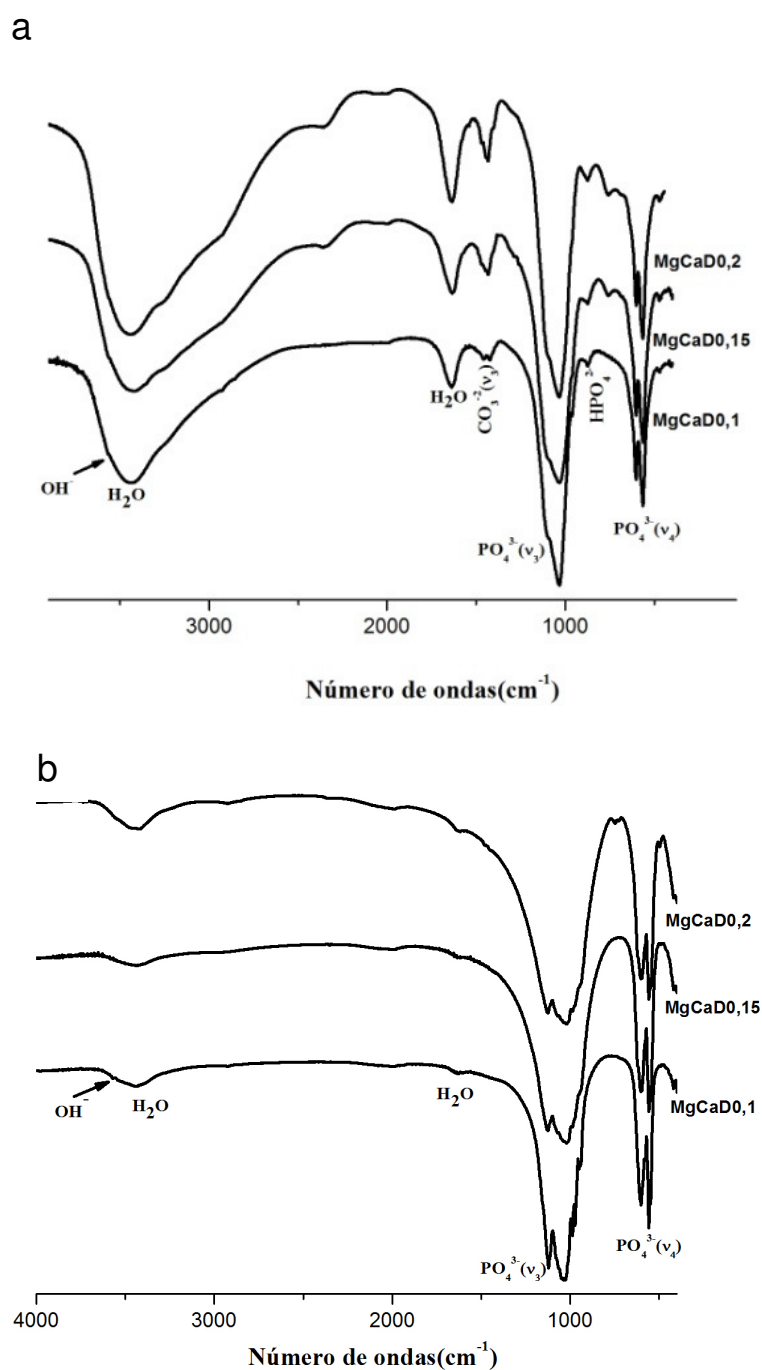


Figura 5. 4: Espectros de FTIR dos pós verdes (a) e calcinados a 1000 °C (b) com razões molares Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2.

Os espectros das amostras verdes mostraram bandas alargadas características da água a 3440 e 1639 cm⁻¹ atribuídas ao processo de precipitação aquosa. A fraca banda de absorção a 874 cm⁻¹ é atribuída à vibração P-O-H do

grupamento HPO_4^{2-} , confirmando a obtenção de uma apatita cálcio deficiente. A vibração C-O do grupo CO_3^{2-} pode contribuir para essa banda de absorção. Com o processo de calcinação esta banda desapareceu e houve a diminuição da intensidade da banda de água.

Apatitas cálcio deficiente, $[\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}]$ com $0 \leq x \leq 1$, podem ser obtidas através de uma precipitação aquosa clássica onde o valor de x vai depender de parâmetros tais como pH e temperatura principalmente. O primeiro deve ser mantido perto da neutralidade, levemente ácido e geralmente utilizam-se baixas temperaturas de síntese. A cinética de formação dos precipitados esta diretamente vinculada ao tempo de envelhecimento da síntese. Essa síntese geralmente apresenta duas ou mais fases devido à dificuldade em manter esses parâmetros bem controlados (DESTANVILLE *et al.*, 2003).

As bandas de fosfato ($\text{PO}_4^{3-} \nu_3$) a 1033 cm^{-1} e 1092 cm^{-1} foram observadas para os pós verdes. Após o tratamento térmico pode-se observar o desdobramento destes dois picos em três picos alargados de PO_4^{3-} a 1125 , 1020 e 986 cm^{-1} . As bandas do modo de estiramento P-(OH) nas whitlockitas magnesianas ficam mais alargadas à medida que a razão Mg/Ca aumenta. A diminuição da resolução dessas bandas indica uma diminuição de cristalinidade (LEGEROS, 1991).

As bandas de fosfato ($\text{PO}_4^{3-} \nu_4$) a 603 e 564 cm^{-1} estão presentes em todos os espectros. A banda característica do grupamento OH^- a 3570 cm^{-1} diminuiu de intensidade após a calcinação dos pós. Isso pode ser atribuído à diminuição do tamanho de cristalito e a grande desordem atômica da célula unitária do cristal com a incorporação do Mg^{2+} na rede da apatita, o que favorece um baixo grau de hidroxilação, ou seja, dificulta a apatita a incorporar OH^- dentro dos seus sítios (PASTERIS *et al.*, 2004).

A presença da banda de carbonato ($\text{CO}_3^{2-} \nu_3$) a 1626 cm^{-1} , característica da substituição do tipo B na apatita cálcio deficiente ($\text{CO}_3\text{-for-PO}_4$) é notada somente para os pós verdes. Isto pode ser atribuído ao processo de síntese, o qual não foi realizado sob atmosfera inerte. À medida que o teor de Mg aumenta a incorporação de carbonato também aumenta verificado pelo aumento da banda. Após a sinterização a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ essa banda desaparece uma vez que todo o CO_3^{2-} é liberado sob forma de CO_2 .

Podem-se observar mudanças nos grupamentos OH^- , HPO_4^{2-} e PO_4^{2-} nos espectros das amostras calcinadas, o que indica uma transformação de fase da apatita Ca deficiente em β -TCMP.

A presença de uma segunda fase no produto das sínteses pode ser avaliada por várias técnicas. Se o pó apresenta uma razão Ca/P menor 1,5, provavelmente estará presente uma fase de pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) que pode ser confirmada tanto por DRX quanto pela banda de $\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$ que fica a 726 cm^{-1} não identificada nos espectros da Figura 5.3. O resíduo após o tratamento térmico também apresentará a presença de pirofosfato. Quando o produto da síntese apresenta relação Ca/P entre 1,5 e 1,67, é considerada uma apatita deficiente em cálcio e apresenta como segunda fase a hidroxiapatita (Ca/P 1,67) cuja presença pode ser confirmada através do pico da hidroxila a 3570 e 650 cm^{-1} no FTIR e seu perfil na DRX (DESTANVILLE *et al.*, 2003). Na Figura 5.3a foram observadas bandas muito pequenas do estiramento OH^- , atribuída à presença de uma segunda fase, hidroxiapatita, confirmada pela DRX somente para as amostras MgCaD0,1 e MgCaD0,2.

No caso de sínteses com produtos com razão Ca/P maior que 1,67, o produto de decomposição térmica é a fase de óxido de cálcio (CaO), que pode ser detectado durante um tratamento térmico por 15h a $1000\text{ }^\circ\text{C}$.

Após o tratamento dos pós verdes de apatitas substituídas por Mg não se verificou a presença de CaO (NF-S 94-066), o que confirma que o valor das razões de Ca/P das amostras obtidas nesse estudo estão abaixo de 1,67 e acima de 1,5 uma vez que as bandas de pirofosfato tanto pelo DRX quanto pelo FTIR também não foram encontradas.

HING *et al.* (2003) testaram dois implantes cilíndricos de HA *in vivo* com razões molares Ca/P diferentes. A HA não estequiométrica com razão Ca/P = 1.70 quando implantada apresentou um osso menos denso ao seu redor sem uma aposição direta do osso sobre o implante. A fase CaO em presença de fluídos fisiológicos pode resultar em um aumento de pH devido a formação e subsequente dissolução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

A influência da substituição do Mg^{2+} na transformação de fase da apatita cálcio deficiente foi determinada pelas análises térmicas diferenciais, TGA – DTA. Foram observados picos exotérmicos a $716.85\text{ }^\circ\text{C}$, $712.78\text{ }^\circ\text{C}$ e $711.19\text{ }^\circ\text{C}$ para as amostras verdes MgCaD0,1, MgCaD0,15 e MgCaD0,2 respectivamente, os quais correspondem à transformação da apatita cálcio deficiente em β -TCMP a temperaturas mais baixas. Este processo foi acompanhado por perda de massa. A adição crescente de Mg abaixou a temperatura de transformação apatita cálcio deficiente $\rightarrow$ β -TCMP, geralmente segundo DOROZHKIN, (2007), acima de $800\text{ }^\circ\text{C}$, similarmente aos

resultados encontrados por MARCHI *et al.* (2007). Isso possibilitaria a obtenção de β -TCMP em temperaturas mais baixas de sinterização que resultariam em menores tamanhos de grão. Entretanto a alta reatividade de superfície pode explicar o rápido aumento do crescimento do grão encontrado a baixas temperaturas de sinterização (LANDI *et al.*, 2000), o que foi observado em nosso estudo quando se produziu pastilhas calcinadas a partir do pó $\text{MgCaD}_{0,15}$ (item 5.1.3).

5.1.2 Caracterização morfológica dos pós de apatita substituída por magnésio

A Figura 5.5 apresenta a micrografia de campo claro da amostra verde $\text{MgCaD}_{0,2}$ obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde se podem observar cristais tipo agulhas com comprimento entre 50 e 200nm.



Figura 5.5: Micrografia de campo claro da amostra $\text{MgCaD}_{0,2}$.

A avaliação morfológica dos pós verdes foi feita também através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pode-se notar a presença de muitos aglomerados devido ao tamanho nanométrico das partículas, verificado por MET, as quais têm uma superfície mais ativa o que facilita a aglomeração (Figura 5.6a). A análise elementar obtida por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) identificou a presença dos picos característicos de magnésio, cálcio, fósforo, oxigênio e carbono (Figura 5.6b). Este último elemento é proveniente da incorporação de carbonato na apatita devido às condições não inertes da síntese.

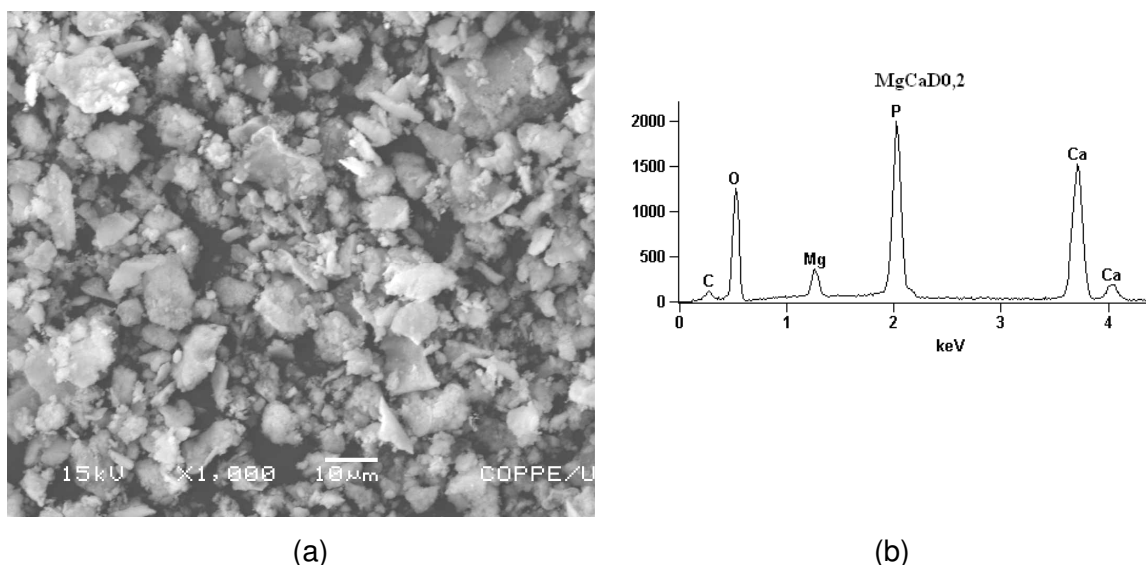


Figura 5.6: Micrografia da amostra MgCaD0,2 (a) e o respectivo EDS confirmando a presença de Mg, Ca e P (b).

5.1.3 Pastilhas densas de β – TCMP

Pastilhas cilíndricas, obtidas do pó verde a partir dos precursores $(\text{CaOH})_2$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e H_3PO_4 com razão $\text{Mg}/\text{Ca} = 0,15$ foram prensadas, calcinadas a 1000°C e comparadas com pastilhas obtidas a partir de um pó comercial de β -TCP.

A resposta à compactação das pastilhas obtidas com os pós da amostra comercial e da amostra MgCaD0,15 foi muito diferente. De acordo com LANDI *et al.* 2000, a sinterabilidade e as propriedades mecânicas de pastilhas densas de HA estão estritamente ligadas às características do pó de partida tais como tamanho de partícula, cristalinidade e substituições químicas. A pastilha de β -TCMP exibiu uma maior contração volumétrica após a calcinação e uma maior densificação quando comparada com a pastilha de β -TCP comercial (Figura 5.7). A incorporação de

magnésio na rede da apatita diminui os parâmetros de rede e consequentemente o tamanho do cristalito o que pode explicar o efeito de contração das pastilhas de β -TCMP.

De acordo com LIN *et al.* (2007), uma baixa temperatura de calcinação é um modo efetivo de se obter corpos com alta densidade e com tamanho de grão mais fino. A amostra com pó mais fino é mais reativa e após a calcinação torna-se mais densificada (LANDI *et al.*, 2000), implicando na contração das pastilhas de β -TCMP.

As densidades geométricas das pastilhas após a calcinação foram $1.83 \pm 0.04 \text{ g/cm}^3$ e $2.45 \pm 0.04 \text{ g/cm}^3$ para as amostras β -TCP comercial e β -TCMP, respectivamente.

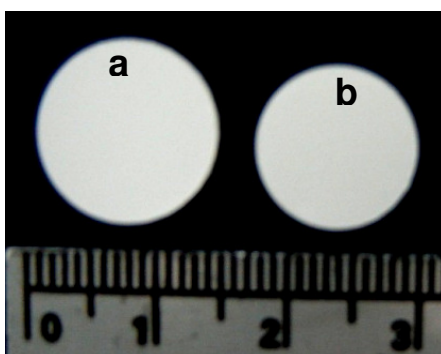


Figura 5.7: Macrografia das pastilhas β -TCP (a) e β -TCMP (b) após calcinação.

Devido à diferença do nível de densificação observou-se, através do MEV, uma variação da microporosidade na superfície das pastilhas calcinadas. Pode-se observar uma maior porosidade para a pastilha de β -TCP quando comparada com a pastilha de β -TCMP com razão molar Mg/Ca=0,15 (Figura 5.8).

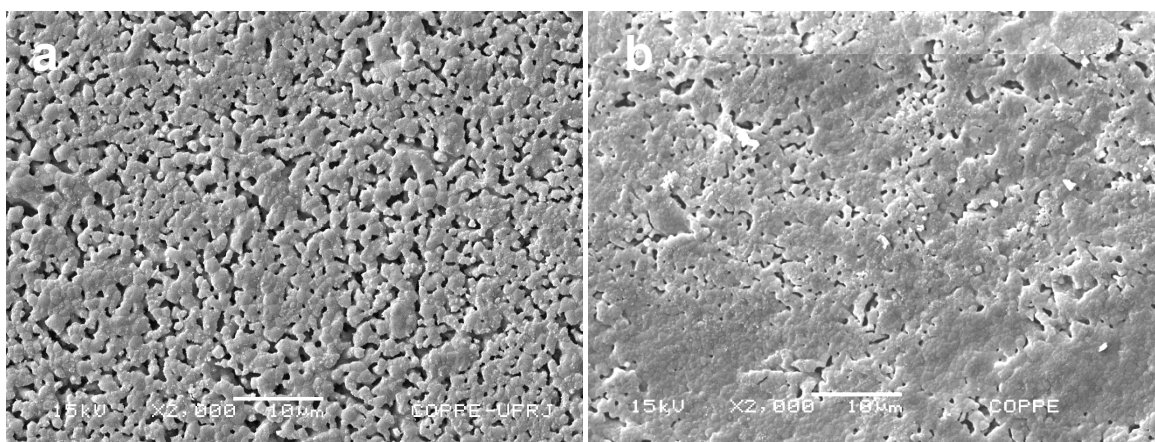


Figura 5.8: Micrografias das pastilhas de β -TCP comercial (a) e de β -TCMP com razão molar Mg/Ca = 0,15 (b) calcinadas a 1000 °C.

DESCAMPS *et al.* (2007) constataram que para temperaturas de calcinação de 850 °C e de sinterização de 1100 °C a presença de pequena quantidade de HA permite alcançar densidades maiores que 99%, uma vez que inibe o aumento da partícula permitindo a densificação do material, sendo uma fase não inibitória para aplicação como biomaterial. Além disso, o mínimo dessa fase, HA, estabelecido pela ASTM F 1088-87, é de 5% na composição do beta fosfato tricálcico.

Testes *in vitro*:

Foram realizadas caracterizações *in vitro* de uma linhagem de osteoblastos humanos, SaOs2, cultivada sobre as de pastilhas de β -TCP e β -TCMP prensadas e calcinadas a 1000 °C com razão Mg/Ca = 0,2. O estágio inicial de adesão e a proliferação foram avaliados por MEV (Figura 5.9).

Após 4 horas de incubação um pequeno número de células esféricas não espalhadas foi observado em ambas as pastilhas, com um número menor de células observado para a amostra β -TCMP. Após 24 horas de cultura, a densidade celular foi maior para a amostra β -TCMP. As células aderiram e espalharam amplamente no substrato β -TCMP exibindo longos filopódios estendidos em todas as direções. A proliferação celular foi mais estimulada pelas amostras de β -TCMP, quando comparada com uma amostra de β -TCP comercial, observando-se uma monocamada sobre a superfície das pastilhas após sete dias de incubação (Figura 5.10).

Uma hipótese para um menor número de células observadas nas pastilhas de β -TCMP com razão Mg/Ca=0,2 nos primeiros tempos de cultura, 4 horas, seria a liberação de magnésio adsorvido na superfície da pastilha para o meio de cultura uma vez que o teor molar de magnésio encontrado na amostra MgCaD0,2 foi de 10%. RYAN *et al.* (1999) reportou que a whitlockita magnésiana estimula a proliferação celular e a síntese de colágeno.

Esses dados preliminares demonstraram que a amostra β -TCMP com razão molar Mg/Ca = 0,2 pode suportar a adesão e proliferação de osteoblastos humanos indicando sua biocompatibilidade e a não citotoxicidade.

A superfície do material em termos de topografia e / ou química vai afetar diretamente a adesão celular, podendo modificar o fenótipo de células osteogênicas nos testes *in vitro* e *in vivo*. Isso pode influenciar o processo de adesão de proteínas afetando, assim, a adesão e proliferação celular. A interação celular com o material é mediada por receptores de membrana que integram a superfamília das integrinas pelas quais as células irão se ligar a superfície do implante. A expressão das integrinas pode ser modulada pela modificação química da superfície. No caso do

magnésio, este pode sinalizar para os receptores de integrina intracelular aumentando a adesão celular (Rude e Gruber, 2004). Zreiqat *et al.* (2002) sugeriram que a presença de Mg resultou em um aumento da adesão de osteoblastos à superfície da biocerâmica via altos níveis de expressão de receptores de integrina.

Apesar da diferença de porosidade entre as pastilhas de β -TCP e β -TCMP a melhor resposta celular pode ter sido estimulada pelo magnésio.

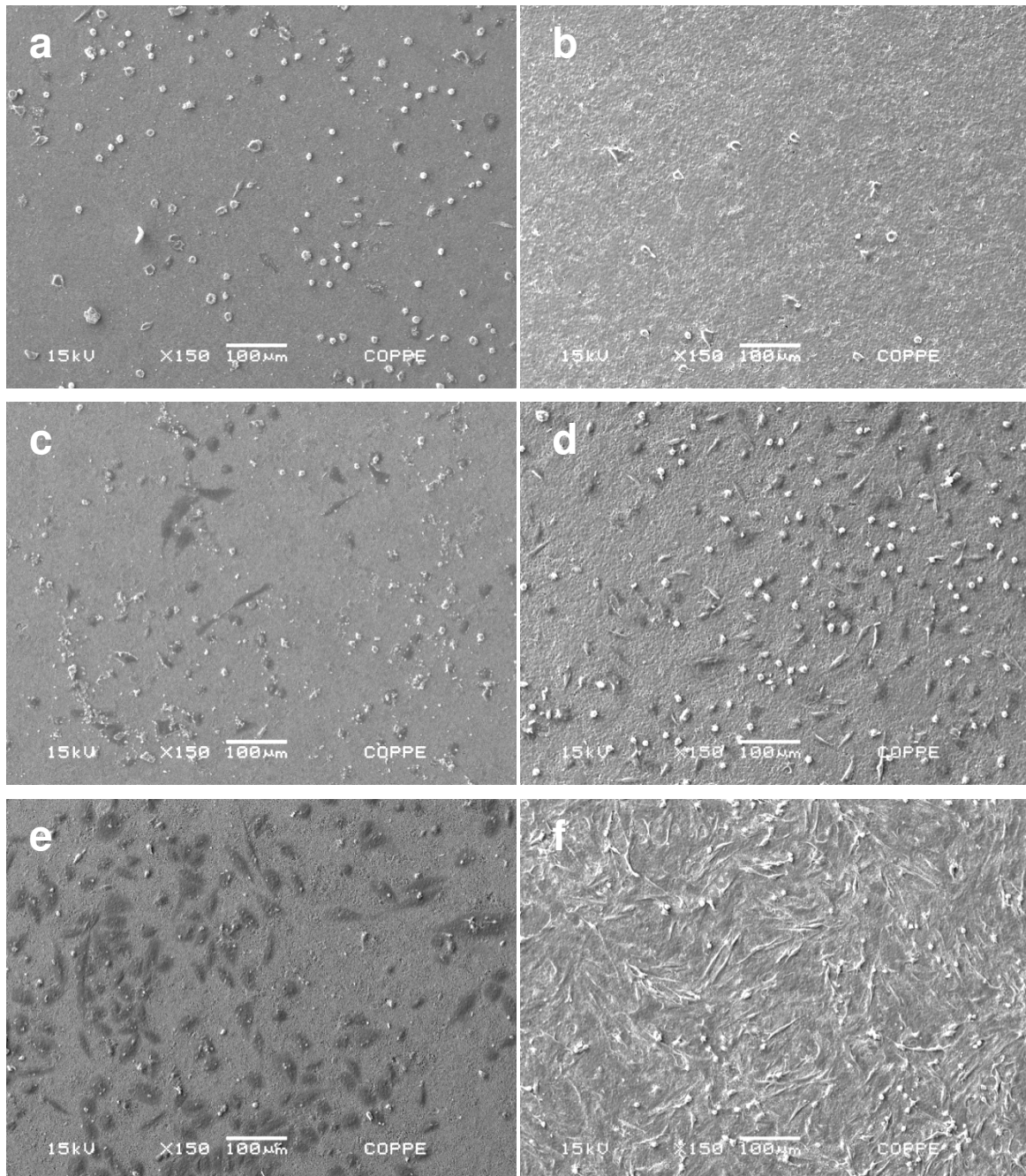


Figura 5.9: Micrografias da cultura de osteoblastos humanos (SaOs2) sobre as pastilhas de β -TCP comercial (a, c, e) e sobre β -TCMP com razão molar Mg/Ca = 0,2 (b, d, f) após 4h, 24h, e sete dias de incubação respectivamente.

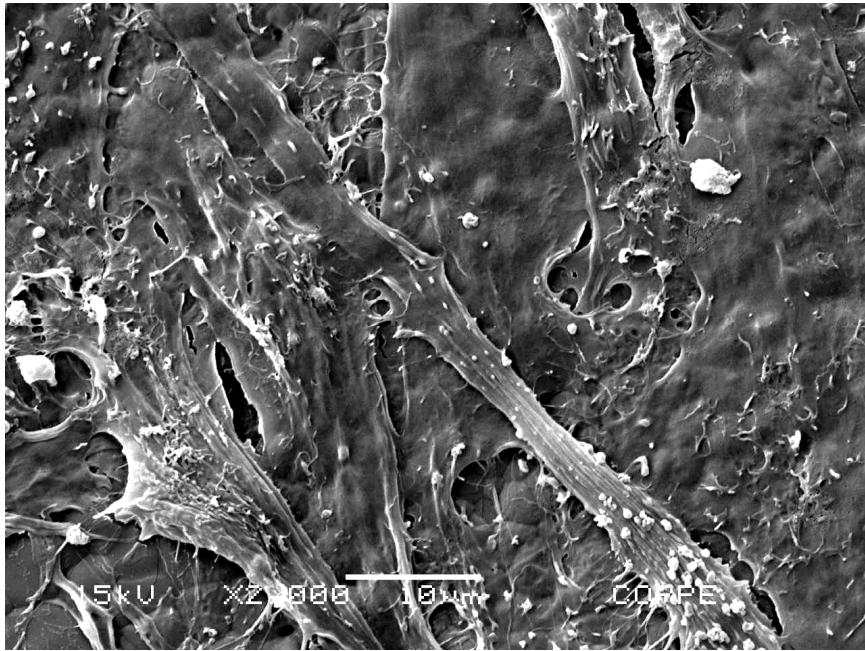


Figura 5.10: Micrografia da cultura de osteoblastos humanos (SaOs2) sobre pastilhas β -TCMP com razão molar Mg/Ca = 0,2 após sete dias de incubação.

5.2 Caracterização do colágeno aniônico mineralizado por uma solução similar ao fluido corpóreo (Simulayted Body Fluid – SBF)

As caracterizações físico-químicas do colágeno mineralizado após imersão em SBF por 15 dias foram realizadas através das técnicas de DRX, FTIR, DSC, TGA, MEV/EDS e micro-CT. A mineralização *in vitro* do colágeno é uma opção para o desenvolvimento de biomateriais para preenchimento e restauração de tecidos danificados (BATISTA *et al.*, 2009).

O perfil de DRX do colágeno aniônico mineralizado por 15 dias apresentou picos característicos de uma apatita pouco cristalina e provavelmente cálcio-deficiente (Figura 5.11). O perfil encontrado no revestimento biomimético é compatível com as apatitas biológicas que também apresentam picos com baixa resolução os quais podem ser atribuídos a uma baixa cristalinidade ou a uma apatita nanométrica.

Os espectros de FTIR das amostras de colágeno aniônico antes e após o processo de mineralização podem ser visualizados na Figura 5.12.

Foram identificadas bandas típicas de estiramento N-H características do grupamento amida A (3309 cm^{-1}) e bandas de estiramento C-H do grupamento amida B (3076 e 2930 cm^{-1}) do colágeno.

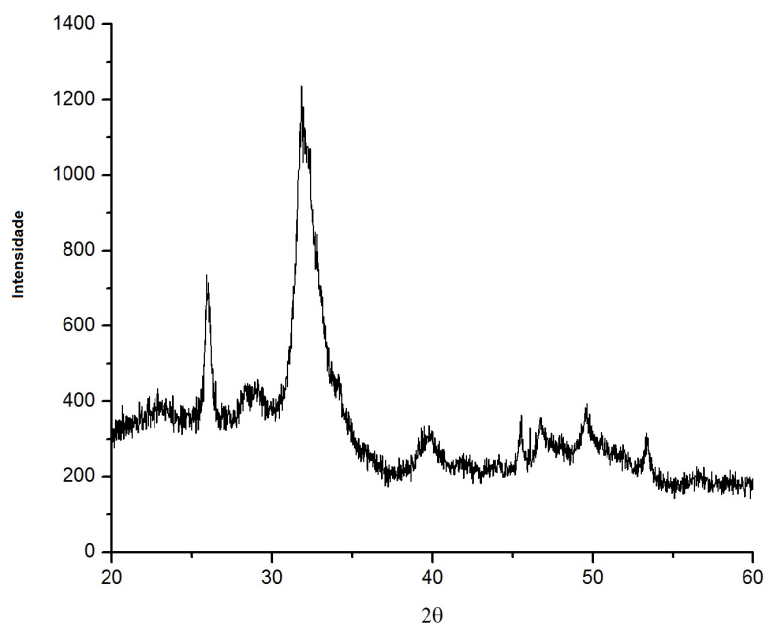


Figura 5.11: Perfil de DRX do colágeno aniônico após a imersão em solução SBF 1,5 por 15 dias.

As bandas principais do colágeno tipo I, as quais estão relacionadas com a deformação da ligação C=O do grupamento amida I (1631 cm^{-1}), com a deformação angular da ligação N-H, amida II (1545 cm^{-1}) e com a banda de absorção relatada para a vibração da ligação C-N, amida III (1232 cm^{-1}) também foram identificadas. O colágeno tipo I tem uma conformação de tripla-hélice e uma estrutura helicoidal secundária composta por cadeias 2 α 1 e α 2 as quais são formadas por uma forte ligação de hidrogênio e um alto conteúdo de amida A da matriz de colágeno. As ligações de hidrogênio nas proteínas de colágeno ocorrem entre os grupos hidroxila e carboxila presentes nas três cadeias peptídicas e são responsáveis pela manutenção da estabilidade da tripla-hélice. Os grupos amida (I, II e III) das cadeias peptídicas têm alguns modos de vibração característicos, os quais estão diretamente correlacionados a conformação polipeptídica (CHANG e TANAKA, 2002). A banda relacionada com a vibração do estiramento do grupo carbonila (C=O) (amida I) corresponde a um sensível marcador da estrutura secundária peptídica. As bandas correspondentes aos grupamentos amida II e amida III também são sensíveis a alterações na estrutura

secundária da proteína. Geralmente a banda da amida I é mais intensa que a da amida II e III (CHANG e TANAKA, 2002). Verificou-se também as bandas correspondentes à vibração de estiramento C-N dos anéis pirrolídicos da prolina e hidroxiprolina, a qual tem intensidade independente de variações estruturais das moléculas do colágeno (BET *et al.*, 2001; LACERDA *et al.*, 1998).

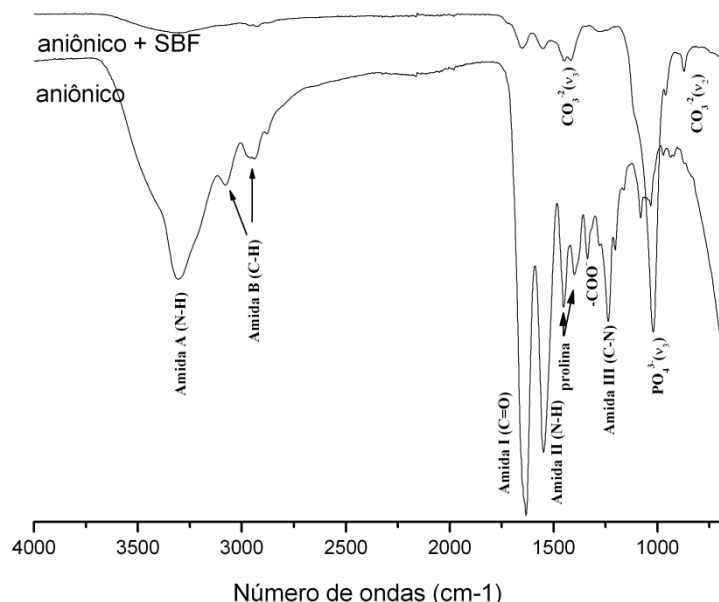


Figura 5.12: Espectros de FTIR do colágeno aniônico antes e após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias.

Após a mineralização pode-se observar a diminuição de intensidade das bandas de colágeno e o surgimento da banda principal de fosfato ($\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$), 1019cm^{-1} , proveniente da apatita depositada sobre as fibras de colágeno, e carbonato (CO_3^{2-}) a 1560cm^{-1} ($\nu_3 \text{C-O}$) e 873cm^{-1} ($\nu_2 \text{C-O}$). A presença dessas bandas indica a incorporação de carbonato na rede da apatita substituindo o grupamento fosfato, sendo o carbonato proveniente da atmosfera uma vez que a síntese não foi realizada sob condições inertes.

Para verificar se a integridade da tripla hélice do colágeno foi preservada após o processo de extração e hidrólise, a razão entre as bandas de amida III e a ligação C-H dos anéis pirrolídicos da prolina e hidroxiprolina ($A_{1235}/A_{1450\text{cm}^{-1}}$) devem variar de 1,0 a 1,1. Quando a estrutura do colágeno é desnaturada esse valor é próximo a 0,6 (BET *et al.*, 1997). O valor encontrado para o colágeno foi de 1,02 indicando a preservação da estrutura da tripla hélice do tropocolágeno após o processo de hidrólise alcalina.

Através da análise por DSC do colágeno aniônico imerso em solução SBF 1,5 por 15 dias, Figura 5.13, pode-se avaliar o efeito da mineralização do colágeno na sua temperatura de desnaturação (T_d).

Altas temperaturas podem levar à quebra da reticulação intramolecular e as proteínas vão de uma estrutura cristalina altamente organizada, a tripla hélice, para uma forma espiral aleatória (BATISTA *et al.*, 2009). O primeiro estágio da transição envolve o rompimento das ligações de ligações de hidrogênio entre as três cadeias polipeptídicas das moléculas do tropocolágeno. O segundo estágio é atribuído ao rompimento das ligações de hidrogênio entre as cadeias alfa (GELINSKY *et al.*, 2008). Um aumento da T_d significa um aumento da estabilidade das moléculas do colágeno ou da resistência da molécula da proteína em se desdobrar devido ao tratamento térmico. Um pico de forma alargada e/ou a presença de “ombros” na curva representa um aumento da dispersão da estabilidade das fibras (GELINSKY *et al.*, 2008; USKOKOVIC *et al.*, 2003).

Ocorreu um aumento da T_d do colágeno aniônico de 61,4 °C para 67,8 °C após o processo de mineralização. Este resultado confirma a efetiva mineralização das matrizes, onde a deposição da apatita nas fibras de colágeno aumentou a temperatura de desnaturação em 6 °C.

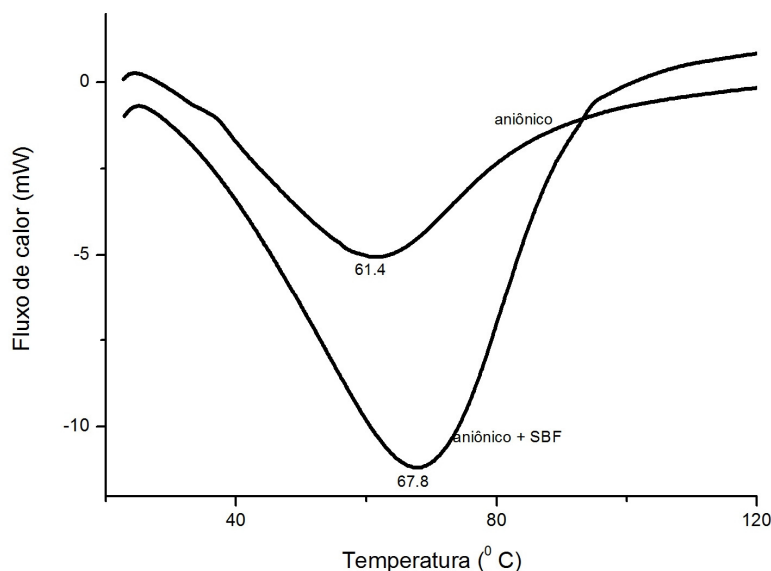


Figura 5.13: DSC do colágeno aniônico antes e após a imersão em solução SBF 1,5 por 15 dias.

A análise termogravimétrica (TGA) determinou a relação entre a fase inorgânica e a fase orgânica presentes na matriz de colágeno após imersão em

solução SBF 1,5 durante 15 dias. O comportamento térmico do colágeno aniônico mineralizado foi caracterizado por três estágios de perda de peso sendo o primeiro referente a perda de água adsorvida, o segundo correspondente à degradação do colágeno e o terceiro relacionado à decomposição do íon carbonato. A parte mineral inorgânica corresponde ao resíduo encontrado a 950 °C (BATISTA *et al.*, 2009). Dessa forma, os resultados mostrados na Tabela 5.4 sugerem que o processo de mineralização foi efetivo na matriz de colágeno aniônico. Os grupos negativamente carregados, provenientes dos resíduos de aminoácidos que formam as cadeias polipeptídicas da molécula de colágeno, interagem com os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} desempenhando um papel importante na regulação desse processo (ZHANG *et al.*, 2004).

Tabela 5.4: Perda de peso da amostra de colágeno aniônico após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias, obtida por TGA.

Faixa de temperatura (°C)	Perda de peso (%)
25-160	15,1
160-400	24,9
400-950	15,7
resíduo a 950	44,3

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu observar a morfologia da apatita depositada ao longo das fibras da matriz de colágeno (Figura 5.14). A interação entre o colágeno e a apatita parece ter sido efetiva. O número de cargas negativas aumentou em 46 ± 12 os grupos carboxila (COO^-) dos aminoácidos asparagina e glutamina (BET *et al.*, 1997; LACERDA *et al.*, 1998), favorecendo a precipitação do fosfato de cálcio formado a partir da solução biomimética corpórea após o tratamento alcalino de hidrolise seletiva.

A análise elementar por EDS mostrada na Figura 5.15 confirmou a presença de carbono, oxigênio, cálcio e fósforo. Os picos de sódio (Na) e cloreto (Cl) são provenientes da solução de SBF. Para eliminar esse sal, o material deveria ter sido lavado mais vezes após sua retirada da solução.

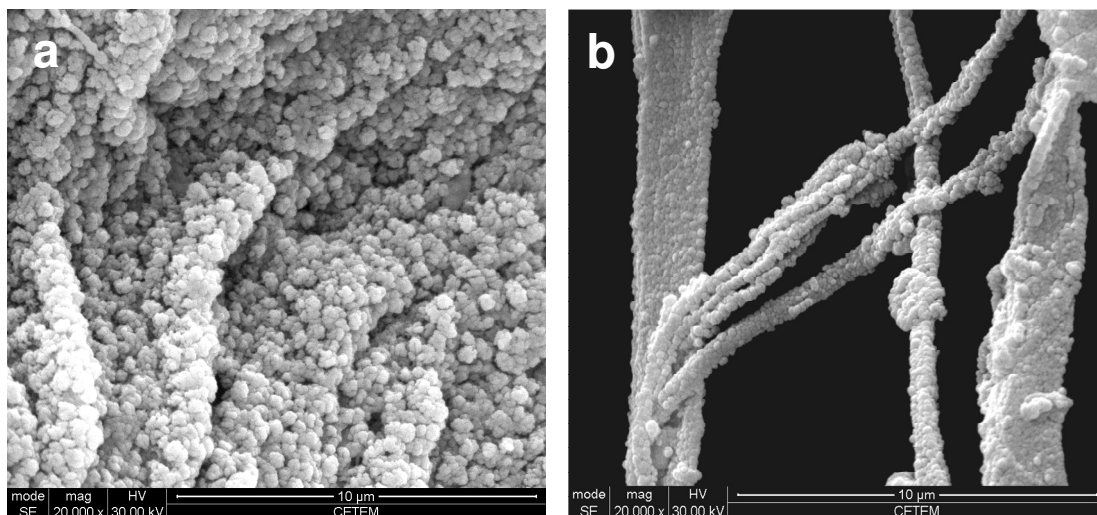


Figura 5.14: Micrografias do colágeno aniônico após a imersão em solução SBF 1.5 por 15 dias, superfície (a) e fratura (b).

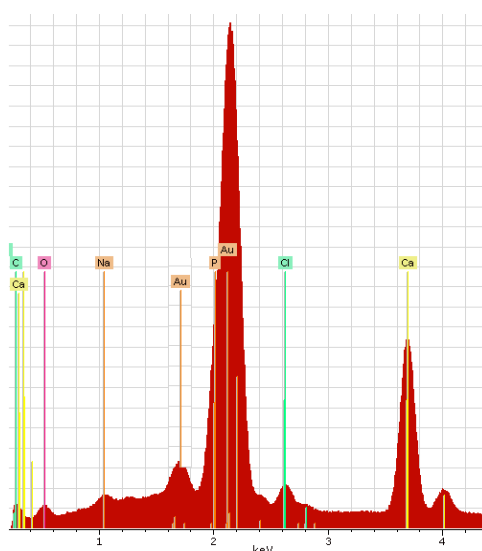


Figura 5.15: EDS do colágeno aniônico após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias.

A microtomografia computadorizada (micro-CT) permitiu a visualização da matriz de colágeno mineralizada em 3D, Figura 5.16, com uma resolução de 6µm.

A amostra apresentou uma precipitação heterogênea sobre as fibras de colágeno aniônico com algumas partes mais densas vistas na recomposição de toda a amostra (3D de cortes finos) e principalmente nas bordas (corte fino de 8 µm).

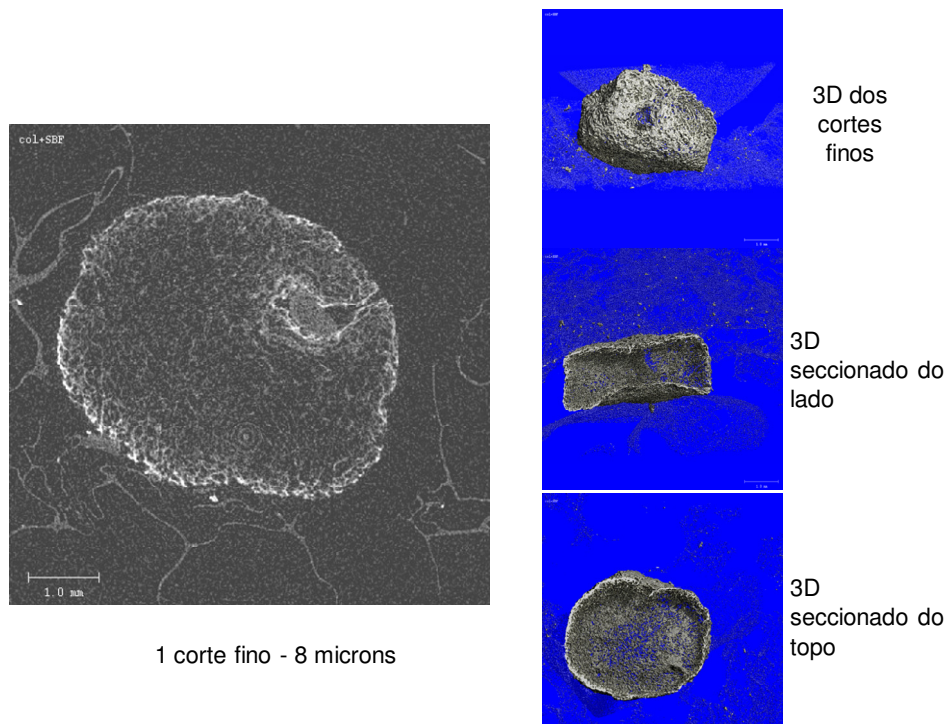


Figura 5.16: Microtomografia computacional 3D do colágeno mineralizado após a imersão em SBF 1,5 por 15 dias.

5.3 Caracterização dos compósitos de magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico (MCA/col)

As sínteses empregadas nesse trabalho tiveram como objetivo mimetizar o processo fisiológico de biomineralização que ocorre *in vivo através da* simultânea mineralização e auto-organização do colágeno tipo I, proveniente de tendão bovino. Ao mesmo tempo propôs incorporar íons Mg^{2+} e CO_3^{2-} presentes na apatita biológica, com teores próximos aos encontrados no osso.

O processo de nucleação da MCA na matriz de colágeno é dependente dos grupos de resíduo carregados negativamente (grupos carboxila de aspartato e glutamato) e dos carregados positivamente (grupos amino da lisina) onde íons com cargas opostas tais como Ca^{2+} e PO_4^{3-} podem se ligar (ZHANG *et al.*, 2004). A incorporação de ambos, individualmente ou em combinação, na estrutura da apatita contribui para uma maior taxa de reabsorção do compósito quando implantado devido à diminuição da cristalinidade como consequência do grande número de defeitos estruturais acarretado pelas substituições. O uso de soluções de cálcio, fosfato e colágeno pode levar a uma direta mineralização *in vitro*.

As fibrilas de colágeno atuam como um arcabouço para a deposição mineral, evitando a presença de magnésio carbonato apatita (MCA) livre na solução. A estrutura hierárquica do colágeno mineralizado é um complexo sistema onde a auto-organização inclui uma ordenada deposição de apatita dentro da matriz de colágeno tipo I. A ancoragem entre as nanopartículas da apatita substituída e as moléculas de colágeno é essencial para esse processo. As matrizes colagênicas podem ser obtidas sem nenhuma indução de modificação estrutural após o processo de hidrólise para produzir um compósito mineralizado usado como suporte para crescimento celular no preenchimento de tecidos danificados ou perdidos.

Compósitos 3D podem ser obtidos sob qualquer forma ou tamanho a partir do preenchimento de moldes apropriados com uma suspensão de colágeno mineralizado. No presente trabalho optou-se por amostras cilíndricas com 6 mm de diâmetro e 4 mm de altura como mostrado na Figura 5.17.

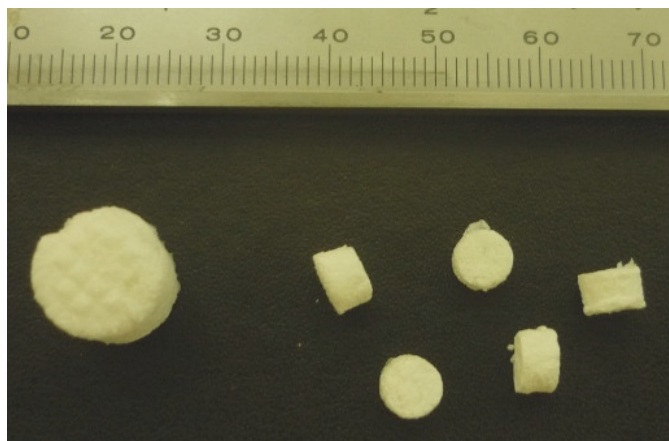


Figura 5.17: Macrografia dos compósitos de MCA / colágeno aniônico.

Os compósitos com razão molar teórica $Mg/Ca=0,1$ e com razões molares teóricas C/P 3 e 5, denominados 3C1P0,1Mg e 5C1P0,1Mg respectivamente, foram obtidos a partir da precipitação de uma apatita cálcio deficiente substituída por magnésio e carbonato sobre as fibrilas de colágeno bovino. A escolha da razão molar Mg/Ca foi devido a máxima incorporação de Mg na rede da apatita em 15% molar, estudada pelo método de Rietveld por Araújo *et al.* (2009). Após a síntese os compósitos foram liofilizados para manter sua estrutura tridimensional e caracterizados.

A reticulação dos compósitos com soluções de GA foi necessária para estabilizar os compósitos quando submetidos às condições úmidas.

5.3.1 Propriedades físico-químicas dos compósitos

5.3.1.1 Propriedades espectrais (FTIR)

A Figura 5.18 mostra os espectros de FTIR com as bandas características do colágeno aniônico e do arcabouço compósito 3C1P0,1Mg antes e após a reticulação.

O espectro do colágeno aniônico foi apresentado na Figura 5.12 e já discutido.

As frequências vibracionais características do colágeno aniônico e do compósito 3C1P0,1Mg antes e após a reticulação são apresentadas na Tabela 5.5 e estão de acordo com LIU, (2008).

Bandas características de uma apatita carbonatada foram observadas nos espectros dos compósitos. A incorporação de CO_3^{2-} na rede da apatita foi evidenciada pelo aumento da intensidade das bandas de absorção desse grupamento, detectado pelo FTIR. Os espectros dos arcabouços exibiram bandas de carbonato (CO_3^{2-}) (ν_3 C-O) e (ν_2 C-O). A incorporação do íon carbonato no sítio do fosfato aumenta a razão molar (Ca+Mg)/P confirmando a substituição do tipo B. Bandas referentes ao grupamento fosfato (PO_4^{3-}) (ν_3 P-O) e (ν_4 P-O) também foram detectadas.

O espectro de FTIR do colágeno aniônico mostrou que a estrutura de unidade básica do colágeno permaneceu conservada após a precipitação das partículas de magnésio carbonato apatita (MCA) sobre as fibrilas do colágeno sugerindo a preservação do colágeno após a síntese.

Os espectros do compósito MCA–colágeno antes e após reticulação mostraram um pequeno deslocamento da banda de estiramento (COO^- a 1339 cm^{-1}) quando comparados à mesma banda do espectro do colágeno aniônico, (1335 cm^{-1}), sugerindo uma interação química entre o grupo carboxilato (COO^-) e os cristais de MCA nucleados. Outro indicativo dessa ligação química entre o colágeno e a parte mineral é que, após o processo de mineralização, o espectro do compósito antes e após reticulação apresentou todas as bandas características do colágeno embora com menor intensidade. O deslocamento das bandas do colágeno sugere uma interação química entre os íons Ca^{2+} e o grupo C=O da cadeia peptídica (KIKUCHI *et al.*, 2004b).

Nenhuma diferença entre os espectros das amostras com diferentes razões molares de C/P foi encontrada (dados não mostrados).

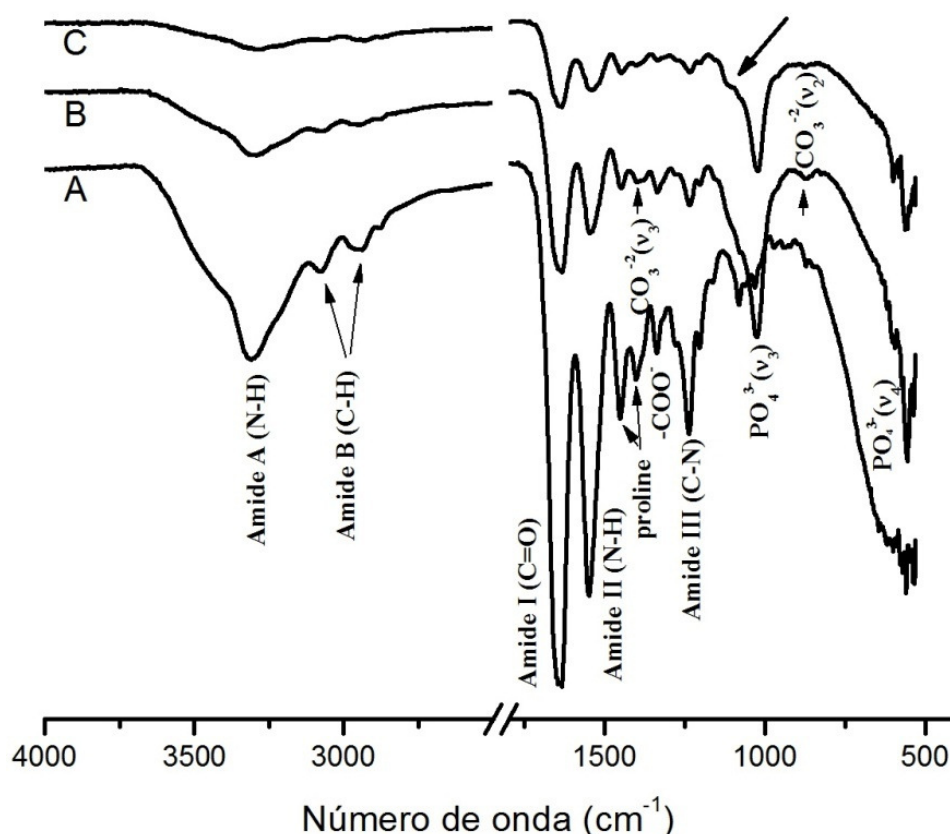


Figura 5.18: Espectros de FTIR do colágeno aniônico (A) e do arcabouço compósito (3C1P0,1Mg) antes (B) e após a reticulação com 0.25% GA (C).

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores que detectaram esse deslocamento dessa banda para compósitos apatita-colágeno (ALLEGRETTI e BERTRAN, 2009; CHANG e TANAKA, 2002; KIKUCHI *et al.*, 2001; RHEE *et al.*, 2000; ROVERI *et al.*, 2003; TAMPIERI *et al.*, 2003, ZHANG, *et al.*, 2004).

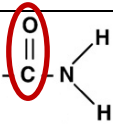
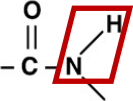
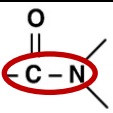
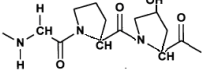
A Tabela 5.5 mostra as frequências vibracionais encontradas para o colágeno aniônico e para os compósitos 3C1P0,1Mg antes e após a reticulação com 0,25% GA.

O aparecimento de uma banda a 1100 cm^{-1} (seta – Figura 5.19) para a amostra 3C1P0,1Mg reticulada uma solução 0,25% GA pode ser atribuída ao modo de vibração C-O devido à glicação do colágeno e a carboidratos os quais são essenciais no processo de reticulação (CHANG *et al.*, 2002).

5.3.1.1 Composição química da fase mineral do compósito

A análise química dos pós MCA obtidos a partir da digestão do colágeno com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) foi determinada por ICP-OES e pode ser vista na Tabela 5.6.

Tabela 5.5: Frequências vibracionais atribuídas ao colágeno aniônico e aos compósitos 3C1P0,1Mg antes e após a reticulação com 0,25% GA.

FREQUÊNCIAS VIBRACIONAIS (número de onda – cm ⁻¹)				
Grupamento	Grupamento vibracional	Colágeno aniônico	Compósito (3C1P0,1Mg) não reticulado	Compósito (3C1P0,1Mg) reticulado
Amida A	N - H	3310	3301	3280
Amida B	C - H	3077 / 2950	3074 / 2949	3078 / 2949
Amida I		1644	1637	1638
Amida II		1552	1543	1541
Amida III		1237	1236	1236
anéis pirrolidínicos da prolina e hidroxiprolina		1452 / 1400	1450 / 1402	1449 / 1398
-COO ⁻		1339	1335	1335
Carbonato	(v ₃ C-O)	----	1400	1401
Carbonato	(v ₂ C-O)	----	872	873
Fosfato	(v ₃ P-O)	----	1026	1023
Fosfato	(v ₄ P-O)	----	555	559

A partir das concentrações de Ca, P, Na e Mg as razões molares Mg/Ca e (Ca+Mg)/P da parte mineral dos compósitos foram estimadas. Aumentando a incorporação de carbonato no sítio do grupo fosfato aumenta-se a razão molar (Ca+Mg)/P, levando-se a uma apatita com uma razão maior que a estequiométrica (>1.67), sugerindo a substituição de carbonato do tipo B (CO₃ por PO₄) conforme já evidenciado pelas análises de FTIR.

Era esperado que o conteúdo de P e Mg diminuíssem para o compósito com maior razão molar C/P devido à incorporação do carbonato no sítio do fosfato, sugerindo a substituição de carbonato do tipo B (CO₃ –for –PO₄) e consequentemente aumentando a razão molar (Ca+Mg)/P. A substituição de um íon trivalente, PO₄³⁻, por um bivalente, CO₃²⁻, leva a uma substituição simultânea de um cátion monovalente,

Na^+ , por um divalente, Ca^{2+} , para manter o balanço de cargas. Porém esses resultados não foram encontrados. O conteúdo de Mg e de Na diminuem para a amostra com maior teor de carbonato quando comparada com a amostra com menor incorporação de carbonato. Ao mesmo tempo a quantidade de P detectada foi maior para a amostra com maior incorporação de carbonato.

Tabela 5.6: Composição química (%p/p) da fase mineral dos compósitos após o tratamento de digestão do colágeno com NaOCl

Amostras	Ca	Mg	P	Na	Mg/Ca	(Ca+Mg)/P
3C1P0,1Mg	32,03±0.13	0,857±0.005	15,32±0.03	0,292±0.002	0,044±0.005	1,69±0,013
5C1P0,1Mg	33,20±0.06	0,705±0.009	16,05±0.11	0,279±0.019	0,035±0.0004	1,66±0.009

A incompatibilidade entre os resultados teóricos e experimentais pode ser consequência da parcial digestão do colágeno com NaOCl. A Figura 5.19 mostra o espectro de FTIR da mesma amostra (5C1P0,1Mg) antes e após o tratamento de digestão do colágeno.

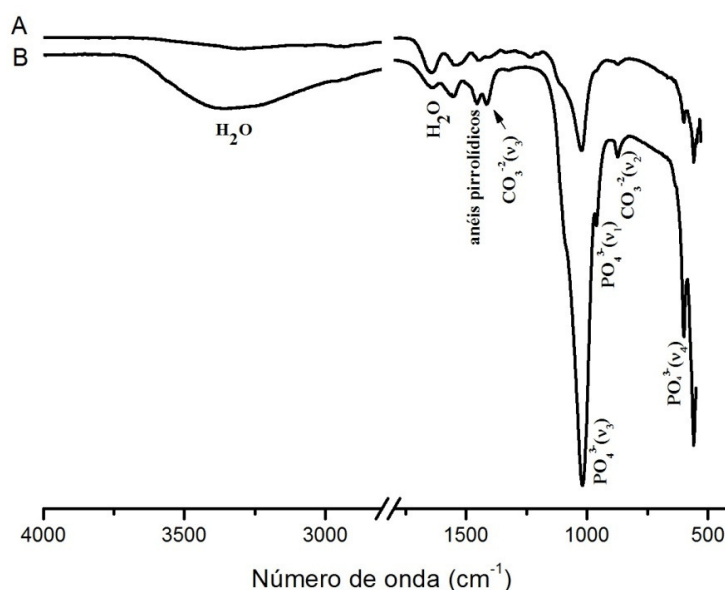


Figura 5.19: Espectros de FTIR da parte mineral do compósito com razão molar C/P = 5 antes (A) e após (B) o tratamento de digestão da fase orgânica.

Pode-se notar que a amostra digerida com NaOCl ainda apresenta bandas associadas às fibrilas de colágeno embora com bem menor intensidade. Isso indica que não ocorreu a completa eliminação da fase orgânica e consequentemente a parte mineral não foi completamente extraída das fibrilas do colágeno, afetando os resultados obtidos.

5.3.1.2 Estimativa das fases mineral e orgânica dos compósitos

As análises termogravimétricas dos compósitos liofilizados permitiram estimar a relação entre a fase mineral (MCA) e orgânica (colágeno aniônico) presentes nas amostras, bem como a água adsorvida e o conteúdo de carbonato dos compósitos em diferentes faixas de temperatura (Tabela 5.7).

O comportamento térmico dos compósitos foi avaliado em três estágios de perda de massa. O primeiro estágio, na faixa de 25-160 °C, corresponde à liberação da água adsorvida na superfície das amostras. Essa água, a qual é termicamente instável abaixo de 200 °C é reversível e não afeta a dimensão da célula unitária da apatita (LEGEROS *et al.*, 1978). Quanto menor o tamanho do cristal maior a área de superfície da apatita e consequentemente maior a quantidade de água adsorvida em sua superfície. O segundo estágio (160-400 °C) é atribuído à degradação da estrutura da molécula do colágeno (fase orgânica) e consequentemente à combustão do componente orgânico que começa em torno de 200 °C (BATISTA *et al.*, 2009; GELINSKY *et al.*, 2008). O último intervalo de temperatura, 400-950°C pode ser relacionado com a decomposição do carbonato em CO₂ (YAO *et al.*, 2009) e o resíduo inorgânico da combustão corresponderia à parte mineral (MCA) do compósito (BATISTA *et al.*, 2009; LIAO *et al.*, 2005).

Há uma diferença entre os conteúdos minerais e orgânicos dos arcabouços com diferentes razões molares de C/P. O compósito com maior conteúdo de carbonato apresentou uma maior fase orgânica e uma menor parte mineral, quando independente da quantidade de carbonato encontrado nas amostras, o conteúdo da fase orgânica deveria ser o mesmo. Esse resultado evidencia a dificuldade de se obter arcabouços homogêneos e reprodutíveis, mesmo considerando-se o rigoroso procedimento experimental empregado.

A amostra reticulada com 0,125% GA apresentou valores da mesma ordem de grandeza para o conteúdo de carbonato e pequenas diferenças nos valores encontrados para a fase mineral e orgânica mostrando que o processo de reticulação não muda a composição dos compósitos.

Magnésio e carbonato estão associados a apatitas biológicas, os quais têm uma concentração aproximada de 0,8% e 7,5% (p/p) respectivamente no osso (LEGEROS *et al.*, 1995; LEGEROS *et al.*, 1996). As concentrações de magnésio e carbonato encontradas para ambos os compósitos é similar aos valores presentes no osso (Tabelas 5.6 e 5.7).

Ao mesmo tempo os conteúdos da parte mineral e orgânica encontrados para os arcabouços com diferentes concentrações de carbonato, em torno de 59-68% de fase mineral e 18-27% de fase orgânica, aproximam-se das proporções biológicas apresentando valores muito próximos aos teores encontrados no osso, da ordem de 65% de parte mineral e 25% de fase orgânica, dependendo da idade do indivíduo.

Tabela 5.7: Composição das fases mineral e orgânica presentes nos compósitos (%p/p) obtidas por TGA

AMOSTRAS	Perda de H ₂ O	Fase orgânica	%CO ₃	Fase mineral
3C1P0,1Mg	13,80 ± 1.88	18,46 ± 2.00	6,45 ± 0.45	67,73 ± 3.39
3C1P0,1Mg-0.125% GA	13,86 ± 0.26	20,02 ± 2.47	6,43 ± 0.41	66,12 ± 2.49
5C1P0,1Mg	14,07 ± 1.06	26,85 ± 1.98	7,63 ± 0.15	59,08 ± 1.60

5.3.1.3 Perfil cristalino

A Figura 5.20 mostra os perfis de DRX dos compósitos MCA/colágeno não reticulados com diferentes razões molares de C/P.

A fase mineral encontrada é similar ao perfil da apatita biológica cujo perfil apresenta uma baixa resolução que pode ser atribuída à baixa cristalinidade e aos tamanhos de cristalitos pequenos (PANG e BAO, 2003; ZHAI *et al.*, 2005).

Os difratogramas dos compósitos apresentaram dois picos alargados com 2 θ em 26,34 e 32,30 característico de uma baixa cristalinidade atribuídos à fase amorfa do colágeno bem como às nanopartículas de MCA. A ligação entre os cristais da nano-apatita e as moléculas de colágeno pode resultar numa diminuição do número de ligações de hidrogênio dentro das fibras de colágeno acarretando uma diminuição da cristalinidade do compósito (LIN *et al.*, 2005). Além disso, as fibras de colágeno devem ter atuado como sítios para nucleação da MCA gerando um maior número de cristais de dimensões nanométricas.

De acordo com LEGEROS (1981); LEGEROS e TUNG (1983); LEGEROS *et al.* (1996) e OKAZAKI e LEGEROS (1992) a incorporação de Mg²⁺ e CO₃²⁻ causa redução do tamanho do cristalito e mudanças na morfologia do cristal, contração do eixo **a** e expansão do eixo **c**, bem como aumenta a solubilidade do composto uma vez que diminuindo o tamanho do cristal a área superficial específica aumenta.

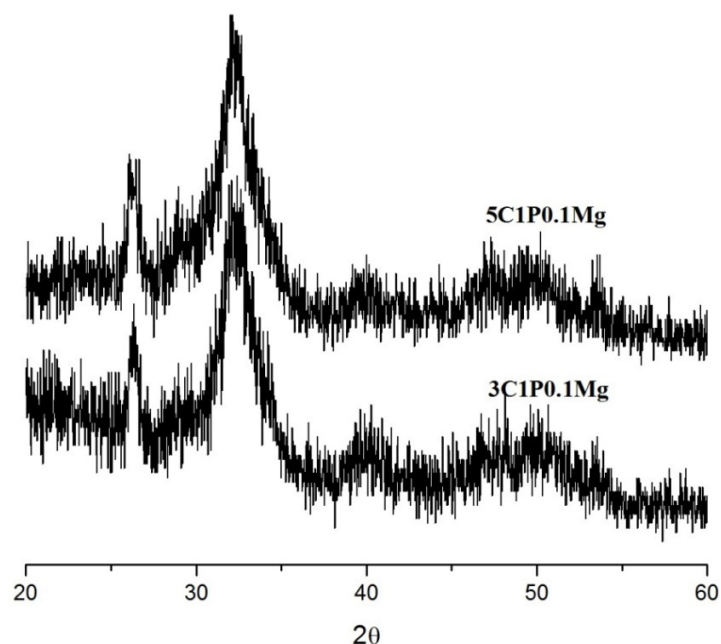


Figura 5.20: Perfis de DRX dos compósitos não reticulados com diferentes razões molares de C/P

5.3.1.4 Efeito da reticulação na temperatura de desnaturação do colágeno

A estabilidade térmica do colágeno e do compósito pode ser detectada através de mudanças na estrutura da proteína antes e após a reticulação com GA. O compósito reticulado com solução de 0,25% GA apresentou a maior temperatura de desnaturação (66,7 °C) quando comparado com a amostra não reticulada (64,5 °C) e com o colágeno aniônico (61,5 °C), Figura 5.21.

Ambos os compósitos antes e após a reticulação apresentaram um deslocamento da temperatura de desnaturação quando comparadas com a amostra de colágeno. Isso demonstra que a estabilidade da tripla hélice do colágeno aumentou devido à interação química entre as partículas de MCA e o colágeno aniônico. O compósito reticulado com a solução de GA mais concentrada, 0,25%, mostrou a maior T_d , indicando que o processo de reticulação aumentou a estabilidade das moléculas de colágeno ao mesmo tratamento térmico empregado.

Esses resultados confirmam a efetiva mineralização da matriz de colágeno, onde a deposição das partículas de MCA nas fibrilas do colágeno e o processo de reticulação aumentaram a temperatura de desnaturação do colágeno de 3°C para a amostra não reticulada e de 5 °C para a amostra reticulada com 0,25% GA.

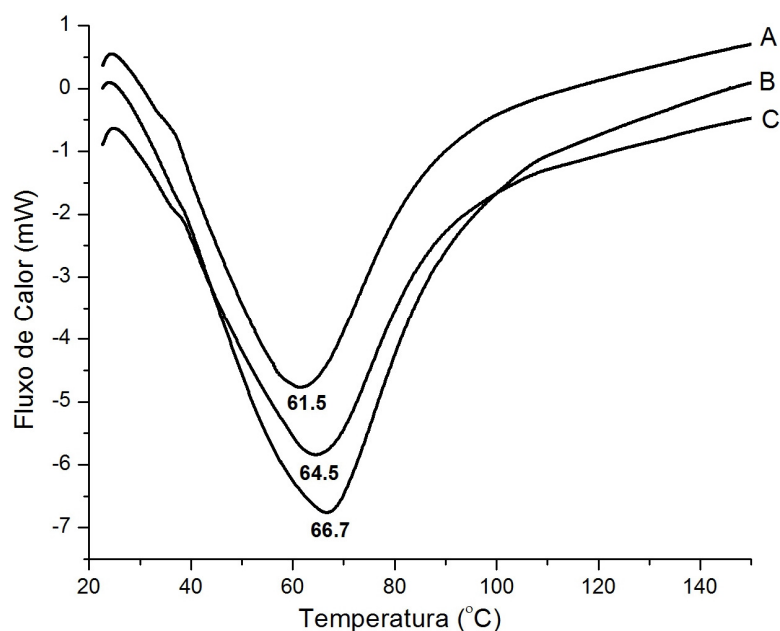


Figura 5.21: DSC do colágeno aniônico (A) e do compósito 3C1P0,1Mg antes (B) e após a reticulação com 0,25% GA (C).

5.3.1.5 Estabilidade dos compósitos em meio de cultura

A estabilidade dos compósitos 3C1P0,1Mg antes e após a reticulação com 0,125 e 0,25% GA foi testada sob condições úmidas, e as micrografias dos materiais após a exposição por 14 dias em meio de cultura DMEM mostradas na Figura 5.22. Os compósitos não reticulados mostraram muitas fibras de colágeno expostas quando imerso em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 14 dias.

O compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,125% GA também apresentou fibras de colágeno embora em menor quantidade. Já a amostra reticulada com 0,25% GA manteve sua estabilidade sob condições úmidas por 14 dias mostrando uma estrutura integrada sem mudanças morfológicas. Isto indica a necessidade do processo de reticulação para a estabilização da estrutura de poros abertos.

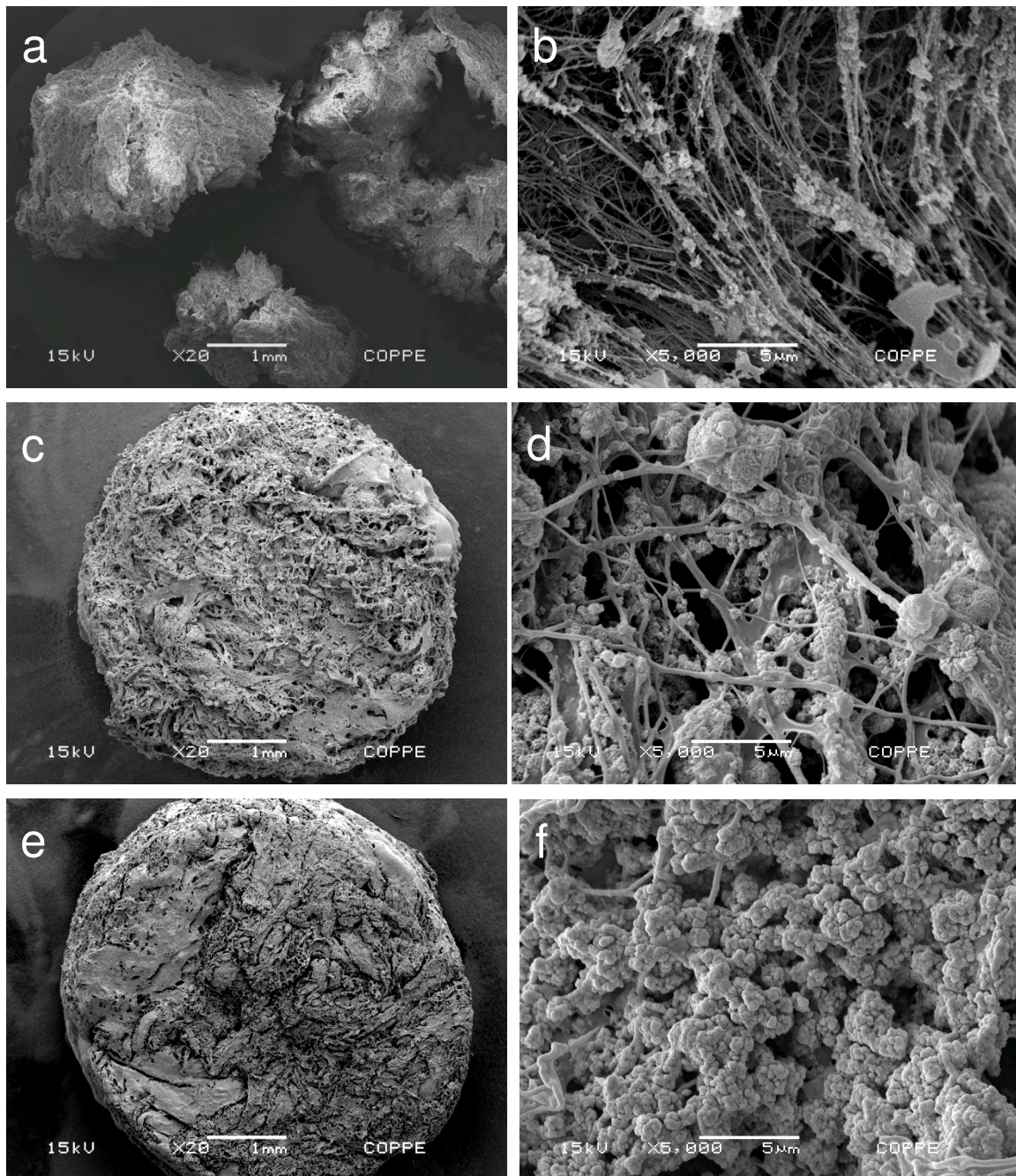


Figura 5.22: Micrografias dos compósitos 3C1P0,1Mg imersos em meio de cultura DMEM por 14 dias não reticulados (a - b), reticulados com 0.125% GA (c - d) e com 0,25% GA (e - f).

As fibras de colágeno têm uma grande resistência principalmente devido às suas ligações covalentes entre as moléculas de tropocolágeno adjacentes. A reticulação com GA forma pontes intra e/ou intermoleculares entre as fibrilas do colágeno resultando numa estrutura rígida diminuindo a distância entre as fibras no compósito. GA tem dois grupos funcionais os quais podem se ligar aos grupos amina livres presentes nos resíduos de aminoácidos (lisina e hidroxiprolina) das cadeias

polipeptídicas do colágeno levando a um compósito mais estável em condições úmidas (CHANG e TANAKA, 2002). GA promove a estabilização das moléculas funcionais da proteína, diminui o processo de degradação e aumenta as cargas negativas sem mudanças nas positivas (MIGUEL *et al.*, 2006) e é um dos reticuladores mais usados para manter a estabilidade do material durante o tempo de implantação.

A estabilidade dos compósitos testados sob condições úmidas aumentou com o aumento da concentração da solução de GA. O mesmo comportamento foi observado por KIKUCHI *et al.* (2004a). A taxa de reabsorção/degradação dos compósitos é mais bem controlada através da reticulação inter e intramolecular entre as fibrilas do colágeno.

A Figura 5.23 mostra a morfologia de precipitados encontrada após o compósito com 0.125% GA ter permanecido imerso em meio de cultura por 14 dias. A Figura 5.23b mostra em detalhe a microestrutura do precipitado. Eles estão agregados e distribuídos por toda a rede do colágeno.

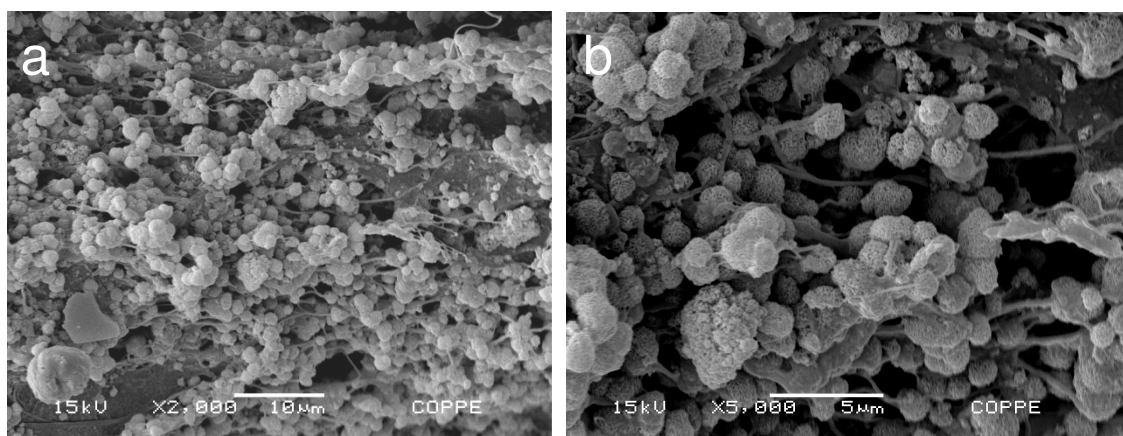


Figura 5.23: Micrografias do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0.125% GA imerso em meio de cultura DMEM por 14 dias.

Os íons Ca^{2+} livres aumentam sua concentração em torno do implante ocorrendo uma supersaturação que propicia a uma rápida precipitação de partículas com diferentes morfologias. A morfologia dos cristais encontrada nos compósitos reticulados com 0,125% GA após 14 dias em contato com DMEM foi a mesma que RHEE *et al.* (2000) observaram quando uma membrana de colágeno foi colocada em contato com uma solução similar ao fluído corpóreo concentrado por quatro semanas (SBF 1,5). Essa microestrutura sugere um processo de dissolução – precipitação da fase apatita.

Nos compósitos reticulados com 0,25% GA, mantidos sob as mesmas condições, não se observou essa precipitação.

5.3.2 Caracterização morfológica dos compósitos

A caracterização morfológica dos compósitos reticulados foi realizada utilizando-se diferentes técnicas como mostrado a seguir.

5.3.2.1 Micrografia dos compósitos

As análises dos compósitos por microtomografia computadorizada permitiu a visualização dos arcabouços em *3D*. As imagens dos dados reconstruídos podem ser vistas na Figura 5.24.

Essas imagens foram obtidas com uma resolução de 6 μ m. Uma rede de poros interconectada foi revelada.

A amostra avaliada pelo micro-CT mostrou heterogeneidade com partes densas e porosas reforçando os resultados obtidos para a razão mineral/orgânica dos compósitos. Pode-se notar uma obstrução dos poros nas bordas e no centro da amostra. No entanto, essa análise foi realizada em uma amostra seca após ser liofilizada, cujo processo tende a contrair a amostra devido à retirada da água. Os compósitos podem ser expandidos numa faixa de 50 - 100% quando sob condições úmidas, aumentando o tamanho dos poros (LIU, 2008).

5.3.2.2 Histologia dos compósitos

O tamanho, a morfologia e a interconectividade dos poros bem como a porosidade da matriz de colágeno e dos arcabouços compósitos foi avaliada por microscopia óptica. Esses parâmetros são muito importantes para compósitos usados em engenharia tecidual principalmente para o crescimento e a migração de células bem como para a difusão de nutrientes e gases (SONG *et al.*, 2006). Estes devem apresentar uma distribuição homogênea de poros com alta porosidade e interconectividade.

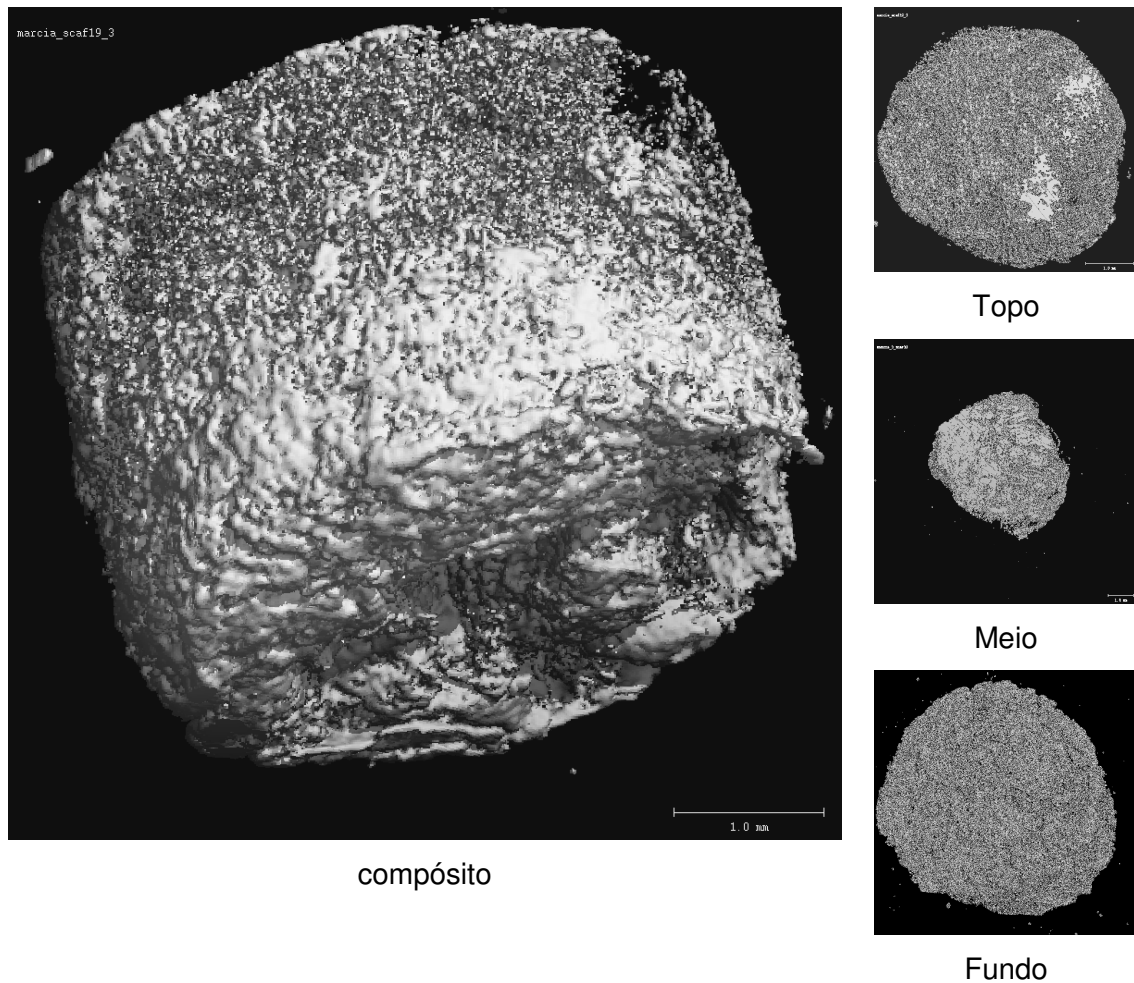


Figura 5.24: Análise em 3D do compósito 3C1P0,1Mg com 6 mm de diâmetro por meio de microtomografia computadorizada.

Na Figura 5.25a - c pode-se observar, com diferentes magnificações, a matriz de colágeno liofilizada com poros grandes ($\sim 200\mu\text{m}$) e fibras separadas por ângulos de 120° . A Figura 5.25d mostra uma seção polida da matriz de colágeno com $80\mu\text{m}$ de espessura, onde somente a rede de colágeno pode ser vista por microscopia de luz. A Figura 5.25e – h são imagens com diferentes aumentos, coradas com azul de anilina. A rede de colágeno aparece na cor azul e a parte mineral na cor cinza claro, a qual pode ser vista preenchendo os poros. A Figura 5.25i - k mostra distintas magnitudes das seções dos compósitos corados com von Kossa (5% nitrato de prata sob luz ultravioleta). Esta técnica é amplamente empregada para visualizar depósitos mineralizados nos quais ocorrem precipitados de prata metálica (em preto). A quantidade de prata depositada apresenta diferentes tonalidades, de preto a marron, dependendo da quantidade de prata.

A imagem 5.25i mostra a rede de colágeno corada (parte preta) e poucos depósitos minerais, possivelmente devido a diferentes quantidades da fase inorgânica

depositada nas fibras de colágeno. Nas imagens j e k os depósitos minerais e seus tamanhos podem ser visualizados, sendo que na ultima (k) nota-se depósitos muito pequenos e alinhados. Os compósitos apresentaram morfologia de poros irregular, compatível com as imagens obtidas por micro-CT.

A histologia dos compósitos mostrou a deposição da parte mineral nas fibrilas de colágeno ocorrendo o preenchimento parcial dos poros. As partículas de MCA parecem estar conectadas às fibrilas de colágeno as quais atuam como suporte para a mineralização. Esse evento foi confirmado pela solução límpida obtida após o final do processo de precipitação do compósito, não se observando precipitados no fundo do frasco de reação. Em paralelo, quando os compósitos mineralizados foram colocados no ultrassom com água para a verificação da ligação entre os cristais de MCA e as fibrilas do colágeno, nenhum pó no fundo do frasco também foi observado confirmando-se uma ligação química entre ambos.

A Figura 5.26 mostra imagens digitais do compósito 3C1P0,1Mg cuja porosidade foi subdividida em duas faixas de tamanho: pequenos poros (menores que 200 μm) e grandes poros (maiores que 200 μm).

Uma porosidade irregular, com alta variabilidade de formas e tamanhos pode ser observada através da M.O. A porosidade total foi estimada na faixa de 33 – 46% com desvio padrão de 5%.

Os compósitos apresentaram uma maior quantidade de poros pequenos. Sabe-se que materiais usados para regeneração óssea devem ter tamanhos de poros numa faixa de 100 - 400 μm (LIU, 2008). A baixa porosidade observada nos compósitos foi calculada em amostras secas que colapsam nos processos de secagem. Sob condições úmidas os compósitos expandem e o tamanho de poros torna-se maior.

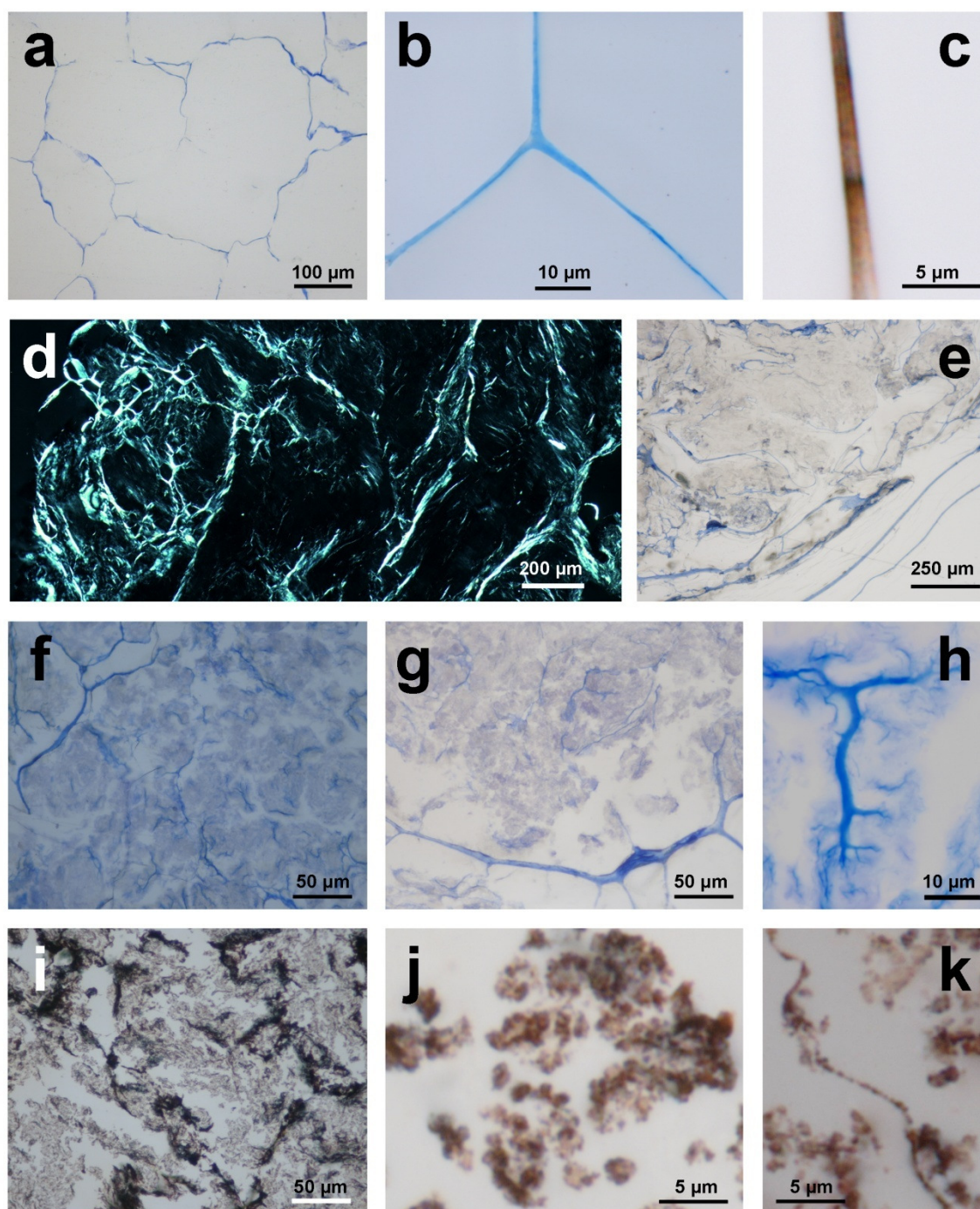


Figura 5.25: Microscopia óptica de amostras de colágeno tipo I coradas com azul de anilina (a, b) ou impregnadas com prata metenamina (c), rede do colágeno vista por microscopia de luz polarizada (d), compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA corados com azul de anilina com partes azuis para o colágeno e cinza claro para a fase mineral (e – h) e corados com von Kossa para a fase mineral fosfato (i - k).

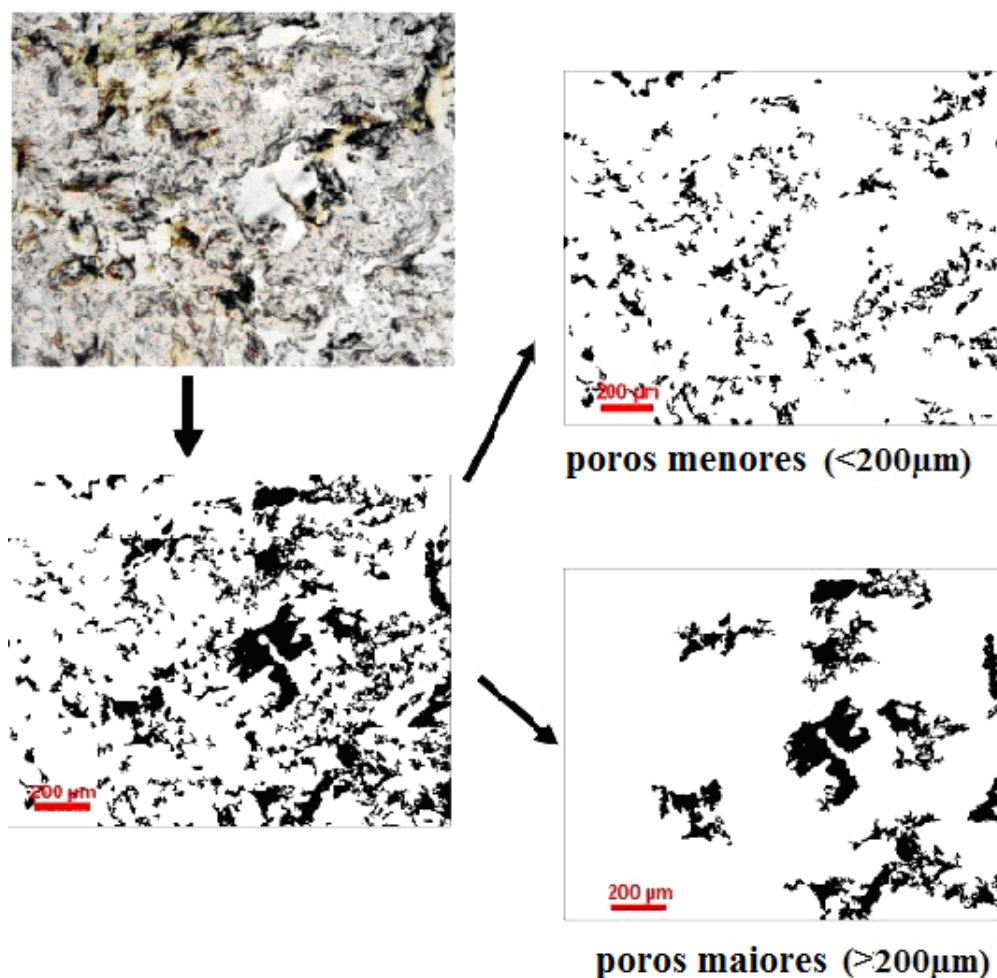


Figura 5.26: Imagens digitais e distribuição do tamanho de poros dos compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA.

5.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura revelou a porosidade das amostras de colágeno aniônico (Figura 5.27a – superfície e 5.27b – fratura). As micrografias do colágeno como recebido mostraram uma estrutura de poros abertos com interconectividade.

As Figuras 5.27c e 5.27d mostram as características da superfície dos compósitos 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA. Pode-se observar nas imagens da superfície de fratura (Figuras 5.27e e 5.27f), em um maior aumento, o recobrimento das fibras de colágeno por aglomerados de cristais de MCA sugerindo uma efetiva interação entre a fase mineral e o colágeno.

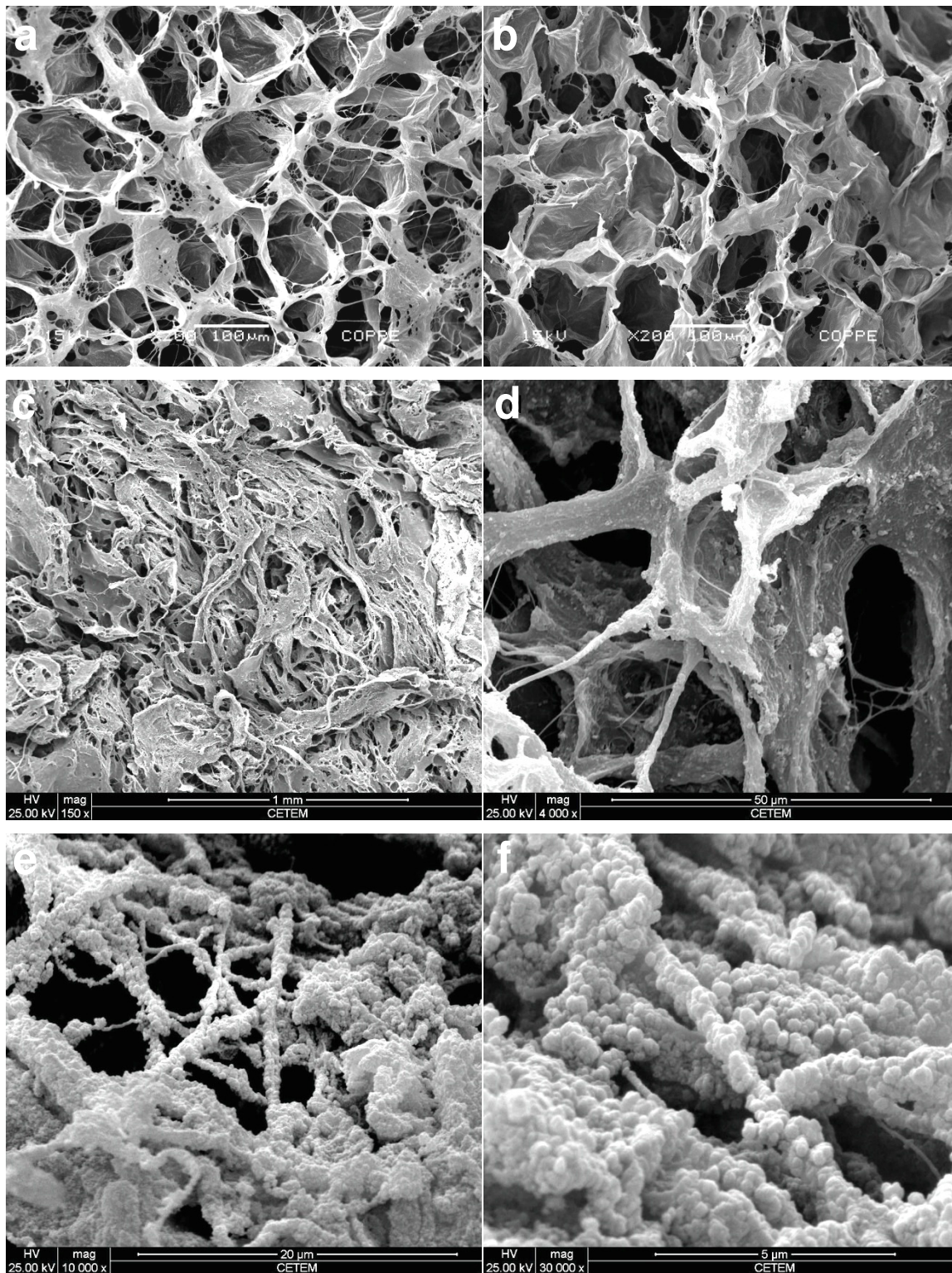


Figura 5.27: Micrografias do colágeno aniônico (a- superfície e b- fratura) e dos compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA, superfície (c - d) e fratura (e – f.)

As imagens confirmaram poros abertos e interconectados também nos compósitos. A imagem da fratura revelou muitas partículas de MCA agregadas e alinhadas em torno das fibrilas, tipo feixes. Podem-se visualizar também os cristais de

MCA depositados sobre as fibrilas e preenchendo parcialmente os espaços vazios da matriz de colágeno. Isso contribui para uma diminuição da porosidade do compósito levando a uma estrutura mais densa.

O colágeno atuou como sítio para a precipitação dos íons presentes em solução, provavelmente através das cargas negativas (COO^-) presentes no colágeno hidrolisado, resultando na formação de aglomerados de partículas nanométricas de MCA ligados às fibras de colágeno.

O microscópio de emissão de campo (FEI Nova 600) com uma ultra-alta resolução foi empregado para confirmar a periodicidade das fibrilas de colágeno (Figura 5.28a–b). A fibrila de colágeno apresenta-se recoberta por estruturas globulares apresentando uma estriação transversal em torno de 50nm (periodicidade – D). Em tecidos animais, esse padrão de bandeamento do colágeno tem uma periodicidade entre 50 e 60 nm de largura (WU *et al.*, 2004).

5.3.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na micrografia eletrônica de transmissão do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% a baixa densidade eletrônica das imagens corresponde às fibrilas do colágeno, enquanto que a maior densidade eletrônica é atribuída aos cristais de MCA, onde o contraste por difração está presente.

As imagens revelam a distribuição das partículas de MCA na matriz de colágeno. Cortes finos dos compósitos 3D corados mostraram partículas nanométricas de aproximadamente 50nm depositadas nas fibrilas finas. Os compósitos não apresentaram uma distribuição homogênea das partículas de MCA na matriz de colágeno, como observado também em menores aumentos.

Bandeamento similar ao observado na Figura 5.28b foi identificado por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 5.29). No entanto, grande parte das fibrilas estava aglomerada e o bandeamento não pode ser observado. A precipitação sobre as fibrilas parece predominar.

ZHANG *et al.* (2003) mostraram que o processo de mineralização do colágeno *in vivo* inicia-se nas zonas vazias entre as moléculas do colágeno, passando a zona de sobreposição das fibrilas e ocorrendo ao longo da periferia dessas com o eixo c orientado paralelamente a direção longitudinal das fibras e o eixo a alinhado perpendicularmente às mesmas.

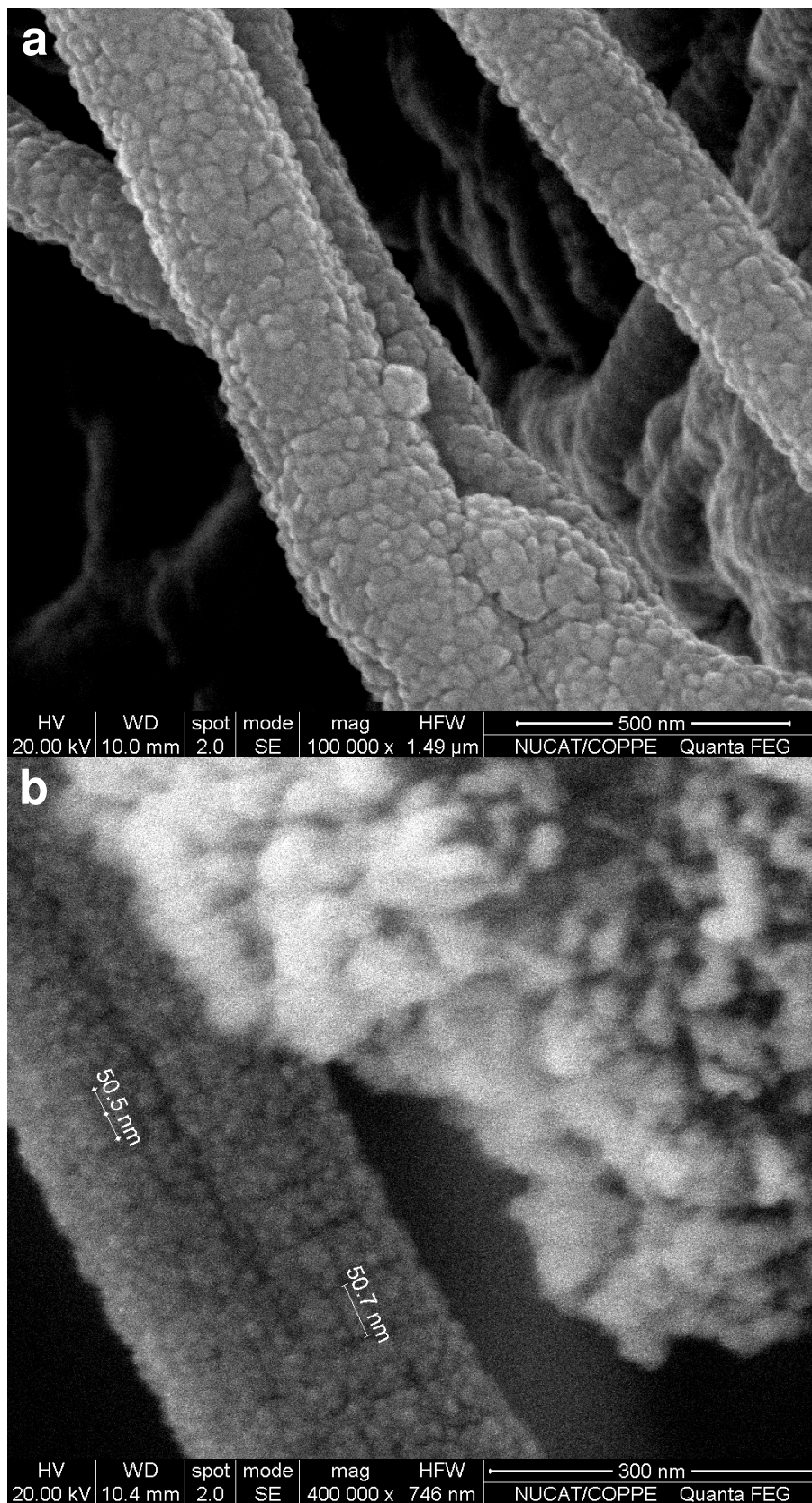


Figura 5.28: Micrografias de fibrilas de colágeno do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA (a) mostrando um padrão característico de bandeamento (b).

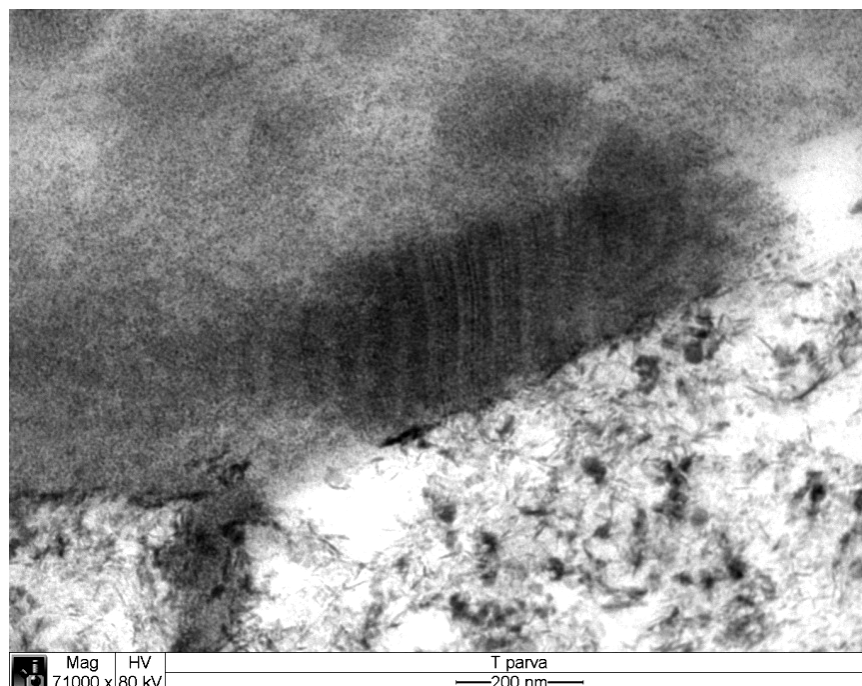


Figura 5.29: Micrografia de corte fino corado do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA mostrando fibrilas de colágeno (linhas claras) e cristais de MCA nanométricos (linhas escuras).

BRADT *et al.* (1999) reportaram que a formação das fibrilas deveria acontecer antes do processo de mineralização uma vez que as fibrilas do colágeno atuam como suporte para esse processo sendo necessária uma larga extensão de fibrilas presentes no meio reacional antes que a precipitação de fosfatos de cálcio ocorra. A formação de fibrilas a partir do colágeno depende das mudanças do valor de pH, da temperatura da solução e da concentração dos íons.

Era esperado que a maioria das partículas de MCA precipitasse nas regiões de *gap* do colágeno. Uma boa distribuição dos cristais de MCA na matriz de colágeno depende do pH da síntese. Sabe-se que as fibras de colágeno são bem dispersas em pH baixo (<4) podendo ocorrer a refibrilação por neutralização o que pode ser notado pelo aumento da viscosidade da solução (MILLES *et al.*, 2005). Aumentando o pH, as fibras tendem a se aglomerar formando feixes que dificultam a dispersão dos precipitados. Apatitas são solúveis em baixo pH. Portanto para se obter a fase apatítica é necessário um pH alcalino.

Em nosso estudo, apesar da solução de colágeno estar em meio acético, pH 3,5, ela é adicionada ao meio reacional que tem o pH aferido para 8. Com isso as fibrilas tendem a se rearranjar em feixes induzindo a um processo de nucleação heterogênea.

Após o procedimento de digestão do colágeno, a imagem de campo claro mostrou a morfologia dos nanocristais da parte mineral dos compósitos (Figura 5.30). Partículas menores que 50 nm foram observadas, similares às apatitas biológicas.

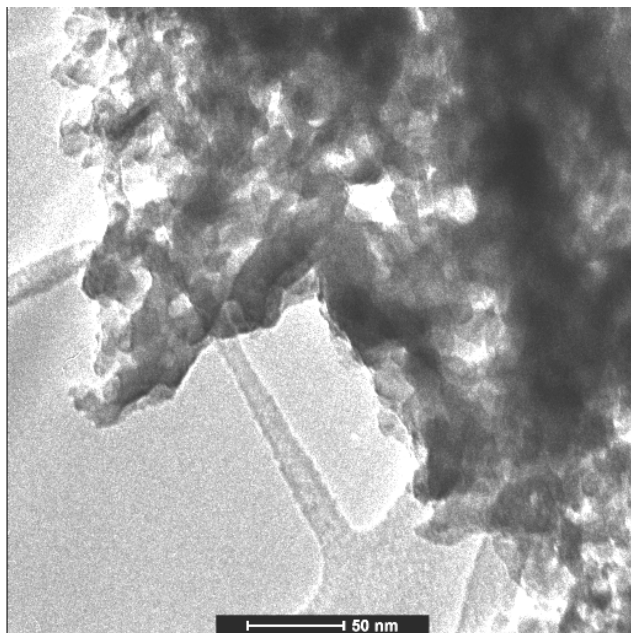


Figura 5.30: Micrografia da parte mineral do compósito 3C1P0,1Mg após digestão do colágeno.

A imagem de MET do compósito tratado com NaOCl, sem a fase orgânica, apresentou a mesma morfologia encontrada por LIAO *et al.* (2005), a qual consiste de subgrãos ultrafinos. Vários autores (KIKUCHI *et al.*, 2001; RHEE *et al.*, 2000; TAMPIERE *et al.*, 2003) encontraram diferentes morfologias para compósitos de HA/colágeno obtidos pelo processo de auto-organização.

A Figura 5.31 apresenta a análise elemental (EDS) confirmando a presença de carbono, oxigênio, magnésio, cálcio e fósforo. O pico de cobre corresponde à grade utilizada como suporte para a amostra.

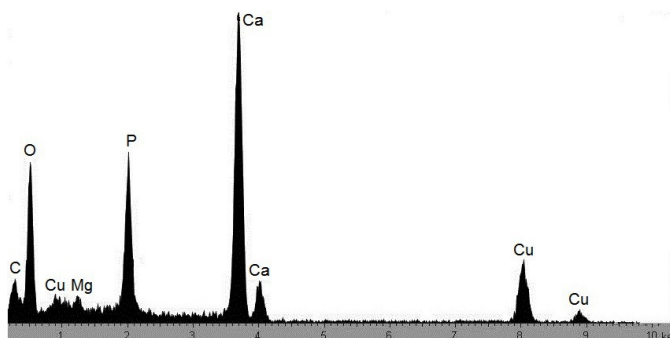


Figura 5.31: Análise elemental (EDS) dos componentes da fase mineral do compósito 3C1P0,1Mg após digestão do colágeno.

5.3.3 Testes in vitro

5.3.3.1 Teste de dissolução

A solubilidade *in vitro* de um material com alto potencial como substituto ósseo é um parâmetro muito importante na avaliação do seu desempenho *in vivo* (LEGEROS, 1993). Substituições na rede da apatita afetam sua cristalografia (tamanho de cristal, parâmetros de rede), bem como suas propriedades físico-químicas (solubilidade) e sua resposta às células e aos tecidos (INOUE *et al.*, 2004; LEGEROS, 1991; SAKAE *et al.*, 2003; WOPENKA e PASTERIS, 2005; YAO *et al.*, 2009; ZYMAN *et al.*, 2009).

O experimento de dissolução foi conduzido a pH=5 simulando as condições ácidas durante a reabsorção osteoclástica. Osteoclastos ativos, quando em contato com a superfície óssea calcificada, secretam H^+ dentro do espaço extracelular da lacuna de Howship's e as bordas pregueadas dos osteoclastos podem regular o pH ao seu redor em torno de 4 a 5 (YAO *et al.*, 2009).

As concentrações dos íons Ca, Mg e P liberados quando os compósitos de MCA/colágeno, reticulados com 0,25% GA com razões molares de C/P 3 e 5, foram colocados em uma solução tampão ácida pH 5 a 37 °C, por 180 minutos, podem ser vistas na Figura 5.32.

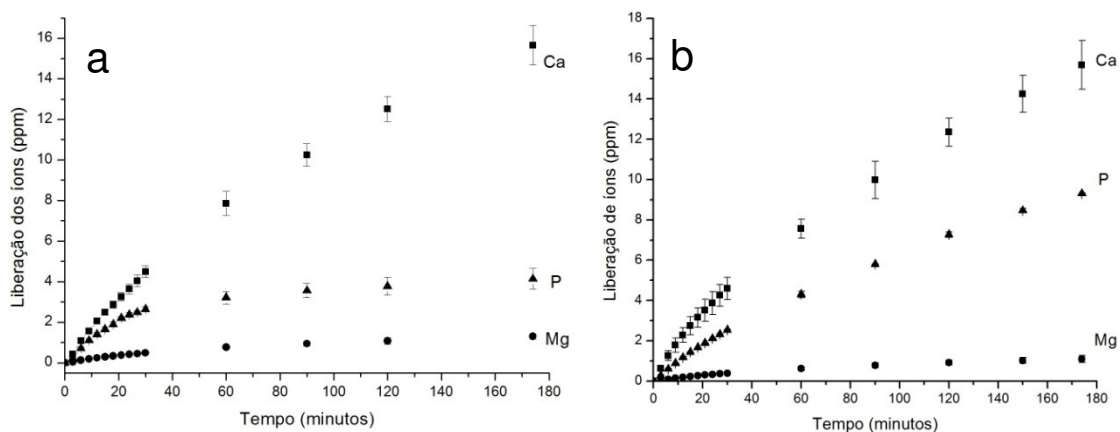


Figura 5.32: Concentração (ppm) dos íons Ca, Mg e P liberados na solução tampão a partir dos compósitos 3C1P0,1Mg (a) e 5C1P0,1Mg (b), reticulados com 0.25% GA.

No início do processo de imersão a dissolução é intensa e os teores de Ca e P aumentam rapidamente. A quantidade de Mg liberada alcança saturação dentro de 120 minutos enquanto que a liberação de Ca e P continua aumentando após esse período.

As nanopartículas de MCA visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 5.30) geram uma grande área de superfície o que aumenta a dissolução em meios ácidos.

A Tabela 5.8 mostra a concentração total de cada íon liberada após os 180 minutos.

A dissolução química aumenta as concentrações locais de Ca e P proporcionando a precipitação de uma fase apatítica na superfície do implante. Esse experimento foi feito de modo dinâmico e, portanto a constante agitação da solução não permitiu a precipitação de outra fase sobre os compósitos, observado por MEV. Não foram observadas diferenças significativas na liberação desses íons a partir das duas composições dos compósitos.

Tabela 5.8: Teor de Ca, Mg e P (ppm) liberados dos compósitos e reticulados com 0,25% GA após 180 minutos de contato com solução tampão ácida

Compósitos	Ca (ppm)	Mg (ppm)	P (ppm)
3C1P0,1Mg	15,66 ± 0.97	1,30 ± 0.13	9,76 ± 2.07
5C1P0,1Mg	15,68 ± 1.21	1,10 ± 0.18	9,30 ± 0.03

5.3.3.2. Citocompatibilidade

Os resultados dos testes de citocompatibilidade *in vitro* para o compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0.25% são apresentados na Figura 5.33. Possíveis efeitos citotóxicos foram avaliados de acordo com as normas ISO-2010993 partes 5 e 12 referentes a materiais médicos. Diferentes parâmetros, (A) metabolismo mitocondrial e toxicidade respiratória, (B) permeabilidade da membrana celular e a integridade dos lisossomas e (C) proliferação celular por meio da presença do DNA, foram investigados nas amostras reticuladas com glutaraldeído uma vez que a toxicidade poderia afetar a função celular (SCUDIÉRO *et al.*, 1988; DE DEUS *et al.*, 2009).

Pouca diferença foi observada entre os extratos da amostra e o controle negativo para a redução do XTT (Figura 5.33A). O controle positivo, fenol 4%, prejudica a atividade do XTT enquanto que o compósito induziu um pouco mais a atividade metabólica em relação ao controle negativo, poliestireno.

No ensaio do vermelho neutro (Figura 5.33B) as células viáveis acumularam esse corante dentro de seus lisossomas permitindo estimar a quantidade de células com suas membranas intactas. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o compósito e a amostra controle.

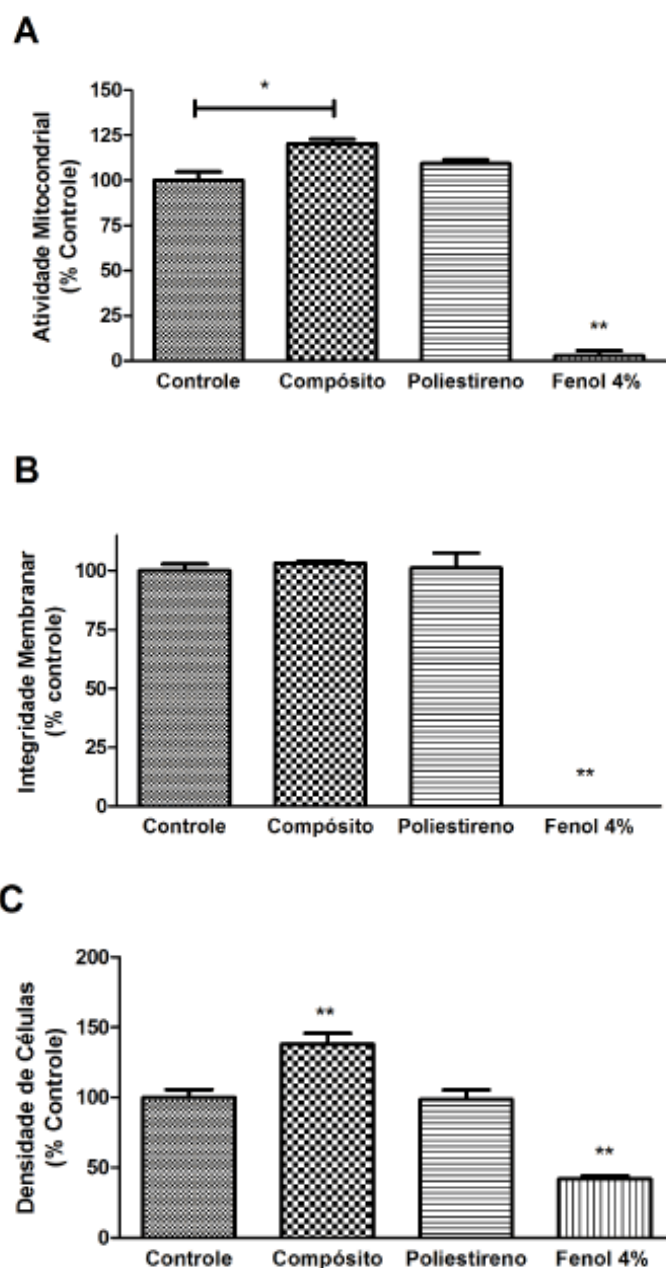


Figura 5. 33: Efeito citotóxico de extratos do compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA sobre fibroblastos de camundongo, medido por: (A) redução de XTT, (B) absorção de vermelho neutro (C) eluição do corante cristal violeta. Fenol a 4% e extrato de pérolas densas de poliestireno foram usados como controles positivo e placa de poliestireno sem material controle e negativo para toxicidade, respectivamente.

(*) diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

(**) estatisticamente diferente de todos os outros grupos ($p < 0,05$).

Cristal violeta é um corante que tinge o DNA das células ligando-se eletrostaticamente com as proteínas do núcleo. A quantidade de corante é diretamente

proporcional a densidade celular. O extrato dos compósitos reticulados induziu um aumento no total de números de células, significativamente maior que o controle negativo (Figura 5.33C).

Em resumo, as amostras não liberaram substâncias tóxicas que pudessem comprometer a viabilidade celular.

5.3.3.3 Cultura de células

A citocompatibilidade e a morfologia de osteoblastos humanos plaqueados sobre os compósitos reticulados foram avaliadas em tempos determinados. A Figura 5.34 mostra células osteoblásticas humanas SaOs2 semeadas sobre os compósitos 3C1P0,1Mg reticulados com 0,25% GA no período de 48h, 7 e 14 dias. A morfologia e adesão celular (fixação e espraio) foram observadas por MEV. As células aderiram e proliferaram sobre as amostras já no primeiro intervalo de incubação (48 horas) (Figura 5.34 a-b) Após 7 e 14 dias (Figura 5.34 c-d e e-f respectivamente) elas apresentaram numerosos filopódios em todas as direções. Após 14 dias as células se espraíram sobre as amostras com uma morfologia achatada formando uma camada contínua. Nenhum efeito adverso foi notado com a incorporação de magnésio e carbonato na rede da apatita bem como a reticulação com glutaraldeído. Os compósitos mostraram uma boa bioresposta aos osteoblastos confirmando sua citocompatibilidade, indicando que o material tem um grande potencial para aplicações em engenharia de tecido óssea.

SERRE *et al.* (1998) estudaram a influência da substituição do magnésio em um biomaterial colágeno-apatita. Foram avaliadas duas esponjas modificadas com diferentes apatitas substituídas. Uma delas continha 20% de Mg e 80% de Ca e a outra era composta basicamente por Mg com traços de Ca. A primeira diminuiu as propriedades osteocondutivas da esponja e a segunda teve um efeito citotóxico sobre células ósseas e impediu a formação da MEC. Esse efeito tóxico pode ser explicado pela liberação de um grande número de íons Mg para o meio de cultura os quais estão presentes em grande concentração no compósito.

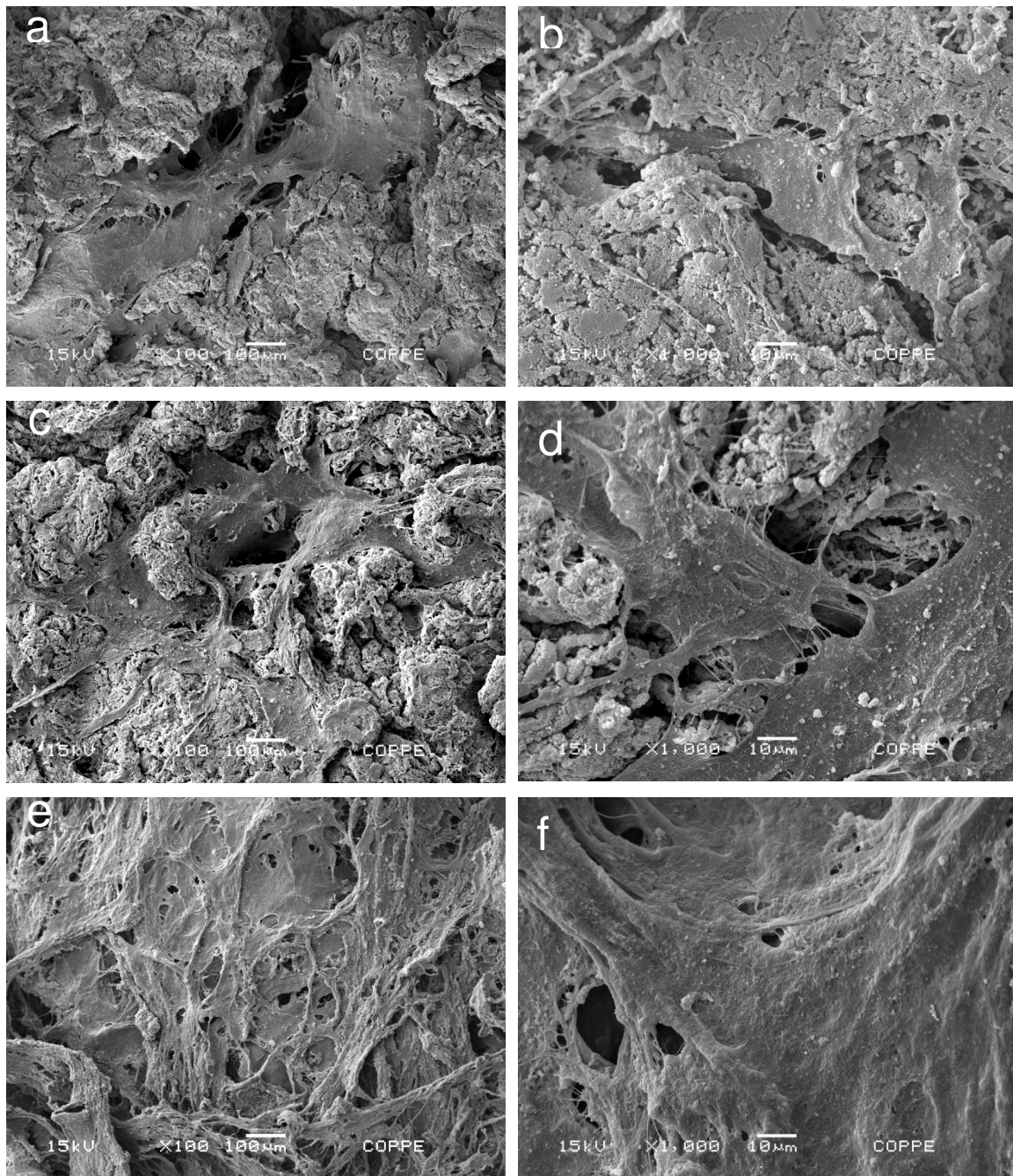


Figura 5.34: Micrografias de osteoblastos humanos (SaOs2) semeados sobre o compósito 3C1P0,1Mg reticulado com 0,25% GA após 48h de cultura (a - b), 7 dias (c - d) e 14 dias (e - f).

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A observação da mineralização do colágeno *in vitro* é uma forma de entender os mecanismos subjacentes da mineralização *in vivo*, através da organização a nível molecular. Compósitos inspirados biologicamente devem reproduzir a complexidade

da estrutura óssea e serem capazes de criar um ambiente similar aos organismos vivos. A estratégia para produzir um material semelhante ao osso pela auto-organização do colágeno na presença de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} é um desafio.

A incorporação de magnésio e carbonato na rede da apatita, individualmente ou em combinação, é uma proposta de aumentar a taxa de dissolução do componente inorgânico do compósito, através da redução de cristalinidade devido ao aumento do número de defeitos estruturais dentro da rede da apatita. Essa desordem causada pela substituição iônica dentro do cristal enfraquece as ligações na apatita aumentando sua reatividade. A incorporação de CO_3^{2-} aumenta a solubilidade da apatita (LEGEROS, 1991; LEGEROS e TUNG, 1983) a qual aumenta ainda mais quando Mg também é incorporado (GIBSON e BONFIELD, 2002; LEGEROS, 1991; LEGEROS *et al.*, 1995; LEGEROS *et al.*, 1996).

As propriedades físicas tais como formato, porosidade, cristalinidade, as propriedades químicas tais como composição e substituição iônica na rede da apatita e os fatores biológicos tipo infecção e queda de pH mediado por células afetam a taxa de biodegradação do material.

A cinética de degradação e reabsorção do arcabouço devem permitir que as células proliferem e secretem sua própria matriz extracelular sendo mantida a integridade do arcabouço durante esse período. A degradação do material dentro do sítio implantado deve ser simultânea à neoformação óssea, viabilizando assim a reconstrução do novo tecido.

Embora haja uma controvérsia a respeito do uso do glutaraldeído na reticulação de dispositivos médicos devido ao seu efeito carcinogênico, ele continua sendo usado por vários grupos de pesquisa e é aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA). Fica difícil prever como seria o comportamento dessas amostras *in vivo* uma vez que o teste de citocompatibilidade ocorre em um período de incubação de 24h.

Portanto são inúmeros parâmetros que devem ser destacados quando se busca o desenvolvimento de materiais promissores para a regeneração óssea com composição similar, nanoestrutura e resposta biológica a esse sítio.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

O objetivo desse trabalho foi a produção e caracterização de uma apatita substituída por magnésio e de um compósito 3D de magnésio-carbonato apatita/colágeno aniônico (MCA/col). Os resultados das caracterizações físico-químicas e morfológicas, bem como dos testes *in vitro* das amostras obtidas foram subdivididos em três grupos e permitiram se chegar às seguintes conclusões:

APATITA SUBSTITUÍDA POR MAGNÉSIO SOB FORMA DE PÓ OU PASTILHAS

- 1) O método de precipitação aquosa que empregou como reagentes as soluções de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, MgCl_2 e H_3PO_4 , pH igual a 9 sob 38 °C foi eficiente na produção de uma apatita cálcio-deficiente substituída por magnésio (MgCaD).
- 2) A incorporação do magnésio na rede da apatita foi confirmada pelo refinamento do método de Rietveld. A calcinação a 1000 °C por 4 horas, ocasionou a conversão da MgCaD em β -TCMP. No entanto, foi detectada hidroxiapatita (HA) como fase residual.
- 3) A substituição de Mg por Ca na estrutura do β -TCP resultou na diminuição dos parâmetros de rede e do tamanho de cristalito e uma leve diminuição na temperatura de transformação de fase da apatita cálcio deficiente em Mg-TCP.
- 4) As fórmulas estruturais aproximadas obtidas utilizando-se o refinamento de Rietveld foram $\text{Ca}_{2,73}(\text{Mg}_{0,27})(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_{2,71}(\text{Mg}_{0,29})(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_{2,70}(\text{Mg}_{0,23}\text{Mg}_{0,07})(\text{PO}_4)_2$ para as amostras MgCaD com razões molares Mg/Ca = 0,1; 0,15 e 0,2 respectivamente.
- 5) As pastilhas de β -TCMP calcinadas a 1000 °C apresentaram uma estrutura mais densa e menos porosa quando comparadas às pastilhas de β -TCP comercial processadas sob idêntica metodologia.

6) A proliferação de osteoblastos humanos, SaOs2, parece ter sido estimulada pelas pastilhas de β -TCMP quando comparadas com as pastilhas de β -TCP.

7) A incorporação de magnésio em apatitas cálcio deficientes seguida de compactação uniaxial sob pressão de 216 MPa e calcinação a 1000 °C por 4 horas parece ser uma alternativa na obtenção de pastilhas densas biocompatíveis e não citotóxicas com potencial emprego como materiais de enxerto ósseo.

MINERALIZAÇÃO DO COLÁGENO ANIÔNICO COM UMA SOLUÇÃO SIMILAR AO FLUÍDO CORPÓREO (SBF)

1) Os resultados confirmaram a possibilidade de mineralizar amostras de colágeno aniônico empregando-se soluções supersaturadas de íons cálcio e fosfato. O processo de mineralização nas fibras de colágeno pode ter sido facilitado pela presença de cargas negativas após o processo de hidrólise.

2) A fase mineral formada é compatível com as apatitas biológicas apresentando baixa cristalinidade. A mineralização mostrou-se heterogênea apresentando partes densas em algumas regiões e porosas em outras.

COMPÓSITOS DE MAGNÉSIO-CARBONATO APATITA/COLÁGENO ANIÔNICO (MCA/col)

1) A síntese que empregou como reagentes as soluções $[\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2]$, $[\text{MgC}_4\text{H}_6\text{O}_4]$, $[\text{NaHCO}_3]$ e $[\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4]$ em presença de colágeno aniônico tipo I parece ter sido eficiente na produção de um arcabouço composto de magnésio-carbonato apatita/colágeno (MCA/col).

2) A obtenção de compósitos 3D a partir de uma suspensão de colágeno mineralizado e liofilizado é viável sob qualquer forma ou tamanho.

3) As fibrilas de colágeno atuaram como suporte para a nucleação da fase mineral evitando a precipitação da apatita substituída por magnésio e carbonato (MCA) na

fase líquida. Os compósitos formados contêm aproximadamente, 59-68% de fase mineral e 18-27% de fase orgânica, composição essa similar à do osso.

4) Os espectros de FTIR apresentaram bandas características de colágeno e da fase apatita sugerindo que não houve alterações nos modos vibracionais dos grupamentos das moléculas de colágeno após a obtenção do compósito.

5) A fase mineral formada é compatível com as apatitas biológicas apresentando baixa cristalinidade. A substituição tipo B do carbonato na rede da apatita foi confirmada pela análise de FTIR. Além disso, essa técnica indicou uma interação química entre os cristais de MCA nucleados nos grupos (COO^-) devido ao pequeno deslocamento da banda de estiramento em 1339 cm^{-1} , característica desse grupo.

6) A análise microestrutural mostrou uma estrutura heterogênea, com poros abertos e interconectados, com a fase mineral depositada preferencialmente sobre as fibrilas de colágeno.

7) O processo de reticulação com glutaraldeído a 0,25% (p/p) foi efetivo para estabilizar os compósitos sob condições úmidas e aumentou a temperatura de desnaturação do colágeno.

8) Nenhum efeito citotóxico, baseado nos três parâmetros do teste de citotoxicidade (XTT, vermelho neutro e cristal violeta) foi verificado pelo uso do glutaraldeído como reticulante, na concentração anteriormente mencionada.

9) Compósitos sintéticos que mimetizam a estrutura do osso podem ser desenvolvidos por esse processo e apresentar potencial uso como substitutos para a regeneração óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J. *et al.*, , “Biologia Molecular da Célula”, In, Albert Bruce (ed), 4ed, cap. 19, São Paulo, Brasil, ArtMed, 2006
- ALLEGRETTI, L.J.M. e BERTRAN, C.A., 2009, “The effect of collagen matrix on calcium phosphate mineralization”, *Key Engineering Materials*, v. 396–398, pp. 195 – 198.
- AL-MUNAJJED A.A., PLUNKETT A.N., GLEESON P. J., *et al.*, 2009, “Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique”, *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterilas* v. 90B, pp. 584-591.
- ASTM, Designation F 1088-87. Standard Specification for Beta-Tricalcium Phosphate for Surgical Implantation, 1987.
- ALVES, M.G.B., 2006, “Ageing e alteração da região overlap: gap do colágeno tipo I – repercussão sobre a mineralização e seu papel na osteoporose”, DSc. Tese, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.
- ARAÚJO, J.C., SADER, M.S., MOREIRA, E.L., MORAES, V.C.A., LEGEROS, R.Z. E SOARES, G.A., 2009, “Maximum substitution of magnesium for calcium sites in Mg- β -TCP structure determined by X-ray powder diffraction with Rietveld refinement”, *Materials Chemistry and Physics*, v. 118, pp. 337–340.
- BARINOV, S.M., RAU, J.V., FADEEVA, I.V., *et al.*, 2006, “Carbonate loss from two magnesium-substituted carbonated apatites prepared by different synthesis techniques”, *Materials Research Bulletin*, v. 41, pp. 485-494.
- BARRERE, F., MAHMOOD, T.A., de GROOT, K. e VAN BLITTERSWIJK, C. A., 2008, “Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions”, *Materials Science and Engineering R*, v. 59, pp. 38-71.

- BATISTA, T.M., MARTINS, V.C.A. e PLEPIS, A.M.G., 2009, "Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 95, pp. 45–949
- BET, M. R., GOISSIS, G. e PLEBIS, A.M.G., 1997, "Compósitos Colágeno Aniônico: Fosfatos de Cálcio. Preparação e Caracterização", *Química Nova*, v. 20, pp. 475–477.
- BET, M. R., GOISSIS, G. e LACERDA, C.A., 2001, "Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagines e glutamine carboxamide side chains", *Biomacromolecules*, v. 2, pp. 1074-1079.
- BRADT, J-H., MERTIG, M., TERESIAK, A. e POMPE, W., 1999, "Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation", *Chemical. Materials.*, v. 11, pp. 2694–2701.
- CHANG, M.C. e TANAKA, J., 2002, "FT-IR study for hydroxyapatite / collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde", *Biomaterials*, v. 23, pp. 4811–4818.
- CHANG, Y., TSAI, C.-C., LIANG, H.-C. e SUNG, H.-W., 2002, "In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin)", *Biomaterials*, v. 23, pp. 2447–2457.
- CHARULATHA, V. e RAJARAM, A., 2003, "Influence of Different Crosslinking Treatments on the Physical Properties of Collagen Membranes", *Biomaterials*, v. 24, pp. 759–767.
- CHEN, USHIDA, T. e TATEISHI, T., 2001, "Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering", *Materials Science and Engineering C*, v. 17, pp. 63–69.
- CHEUNG, D.T., PERELMAN, N. KO, E.C. e NIMNI, E., 1985, "Mechanism of Crosslinking of Proteins by Glutaraldehyde III. Reaction with Collagen in Tissues", *Connective Tissue Research*, v. 13, pp. 109–115.

- COSTA, M.O., SADER, M.S., MARTINS V.C.A., LEGEROS, R.Z. e SOARES, G.A., "Comparação do Grau de Mineralização entre Colágeno Nativo e Aniônico usando Solução SBF", In: *Proceedings of 6° COLAOB*, Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.
- CUI, F.-Z., LI, Y. e GE, J., 2007, "Self-assembly of mineralized collagen composites", *Materials Science and Engineering R*, v. 57 pp. 1–27.
- DE DEUS, G., GANABARRO, A., ALAVES, G. *et al.*, 2009, "Optimal Cytocompatibility of a Bioceramic Nanoparticulate Cement in Primary Human Mesenchymal Cells", *J. Endodontics.*, v. 35, pp. 1387-1390.
- DESCAMPS, M., HORNEZ, J.C. e LERICHE, A., 2007, "Effects of powder stoichiometry on the sintering of β -tricalcium phosphate", *Journal of the European Ceramic Society*, v. 27, pp. 2401–2406.
- DESTAIVILLE, A., CHAMPION, E., BERNACHE-ASSOLLANT, D. Elaborde, E., 2003, "Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate", *Materials Chemistry and Physics*, v. 80, pp. 269–277.
- DRIESSENS, F.C.M. e VERBEECK, R.M.H., In: *Biominerals*, CRC Press Inc., Boston, USA, 1990.
- DOROZHKIN, S.V., 2007, "Calcium Phosphates", *Journal of Materials Science*, v. 42, pp. 1061–1095.
- ELLIES, L.G., NELSON, D.G. e FEATHESTONE, J.D., 1988, "Crystallographic structure and surface morphology of sintered carbonated apatites", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 22, pp. 541–553.
- ENGEL, E., MICHIARDI, A., Navarro, M. *et al.*, 2007, "Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side", *Trends in Biotechnology*, v. 26, pp. 39–47.
- FICAI, A., ANDRONESCUA, E., VOICUA, G. *et al.*, 2010, "Self-Assembled Collagen / Hydroxyapatite Composite Materials", *Chemical Engineering Journal*, v. 160, pp. 794–800

- FRIESS, W., 1998, "Collagen – Biomaterial for drug delivery", *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 45, pp. 113-136.
- FRATZL, P. e WEINKAMER, R., 2007, "Nature's Hierarchical Materials", *Progress in Materials Science*, v. 52, pp. 1263–1334.
- FUCHS, J.R., NASSERI, B.A. e VACANTI, J.P., 2001, "Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction", *Annals of Thoracic Surgery*, v. 72, pp. 577–591.
- GELINSKY, M., WELZEL, P.B., SIMON, P. *et al.*, 2008, "Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone", *Chemical Engineering Journal*, v. 137, pp. 84–96
- GIBSON, I.R. e BONFIELD, W., 2002, "Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite", *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 59, pp. 697–708.
- GOES, J.C., FIGUEIRÓ, S.D., OLIVEIRA, A.M. *et al.*, 2009, "Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process", *Acta Biomaterialia*, v.3, pp. 773-778.
- GOISSIS, G., MARGINADOR, S.V.S. e MARTINS, V.C.A., 2003, "Biomimetic Mineralization of Charged Collagen Matrices: *In Vitro* and *In Vivo* Study", *Artificial Organs*, v. 27, pp. 437–443.
- GOISSIS, S.V.S., GOISSIS, A.P.A., GOISSIS, G., "Structural analysis of type I collagen towards the understanding of the structure activities relationships with the extracellular matrix", In: Proceedings of 5° COLAOB, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 2008
- GOMES, M.E e REIS, L.R., 2004, "Tissue Engineering: Key Elements and some Trends", *Macromolecular Bioscience*, v. 4, pp. 737–742.
- HABERMEHL, J., 2005, "Development and validation of a collagen-based scaffold for vascular tissue engineering", M.Sc. Tese, Faculté des Sciences et de Génie, Universidade de Laval, Quebec, Canadá.

HING, K.A., GIBSON, I.R., REVELL, S.M. *et al.*, “Influence of Phase Purity on the *In Vivo* Response to Hydroxyapatite”, In: Proceedings of the 13th International Symposium on Ceramics in Medicine, v. 22-26, pp. 373–376, 2000.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia__visualiza.php?id_noticia=1476&id_pagina=1 (acesso em fevereiro 2010).

INOUE, M., LEGEROS, R.Z., INOUE, M. *et al.*, 2004, “In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites”, *Journal of Biomededical Materials Research A*, v. 70, pp. 585-593.

ISO 2010993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: In vitro methods. International Organization for Standardization. Geneva; 1999.

ISO 2010993-12. Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization. Geneva; 1996.

JUNQUEIRA, L.C.E. e CARNEIRO, J., In: *Histologia Básica*, 8° ed., Editora Guanabara Koogan, 2006.

KANNAN, S., GOETZ-NEUNHOEFFER, F, NEUBAUER, J. e FERREIRA, J.M.F., 2008, “Ionic Substitution in Biphasic Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate Mixtures: Structural Analysis by Rietveld Refinement”, *Journal of the American Ceramic Society*, v. 91, pp. 1-12.

KARGEORGIOUS, V. e KAPLAN, D., 2005, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis”, *Biomaterial*, v. 26, pp 5474-5491.

KATZ, J.L., MISRA, A., SPENCER, P. *et al.*, 2007, “Multiscale mechanics of hierarchical structure/property relationships in calcified tissues and tissue/material interfaces”, *Materials Science & Engineering C*, v. 27, pp. 450-468.

KIKUCHI, M., ITOH, S., ICHINOSE, S., *et al.*, 2001, “Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite / collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 1705–1711.

- KIKUCHI, M., MATSUMOTO, H.N. e YAMADA, T. *et al.*, 2004a “Glutaraldehyde Cross-Linked Hydroxyapatite/Collagen Self-Organized Nanocomposites”, *Biomaterials*, v. 25, pp. 63–69.
- KIKUCHI, M., IKOMA, T., ITOH, S. *et al.*, 2004b, “Biomimetic Synthesis of Bone – like Nanocomposites using the Self – Organization Mechanism of Hydroxyapatite and Collagen”, *Composites Science and Technology*, v. 64, pp. 819–825.
- KLUG, H. P. e ALEXANDER, L. E., 1974, “X-ray diffraction: Procedures for polycrystalline and amorphous materials”, Wiley & Sons, New York.
- KOKUBO T. e TAKADAMA H., 2006, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?” *Biomaterials*, v. 27, pp. 2907-2915.
- KUHN, L.T., FINK D.J. e HEUER, A.H., “Biomimetic Strategies and Materials Processing”. In: Mann, S. (ed), *Biomimetic Materials Chemistry*, 1 ed., chapter 2, New York, USA, Wiley – VCH, 1996
- LACERDA, C., PLEPIS, A.M.G. e GOISSIS, G.; 1998, “Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: Preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais”, *Química Nova*, v. 21, pp. 267-271.
- LANDI, E., TAMPIERI, A., CELOTTI, G. E SPRIO, S., (2000), “Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites”, *Journal of the European Ceramic Society*, v. 20, pp. 2377-2387.
- LANDI, E., TAMPIERI, A., BELMONTE, M.M., CELOTTI G. *et al.*, 2005, “Biomimetic Mg- and Mg, CO₃-substituted hydroxyapatites: Synthesis, characterization and in vitro behavior”, *Journal of the European Ceramic Society*, v. 26, pp. 2593–2601.
- LANGER, R. e VACANTI, J.P., 1993, “Tissue engineering”, *Science*, v. 260, pp. 920–926.
- LEE, C.H., SINGLA, A. e LEE, Y., 2001, “Biomedical Applications of Collagen” *International Journal of Pharmaceutics*, v. 221, pp. 1–22.

- LEGEROS, R.Z., 1981, "Apatites in biological systems", *Progress in Crystal Growth Characterization*, v. 4, pp. 1–45
- LEGEROS, R.Z., "Calcium phosphates in oral biology and medicine", In: Myers Karger H. editor, *Monographs in Oral Science*, vol.15, Basel; AG Publishers, 1991.
- LEGEROS R.Z., 1993, "Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics", *Clinical Materials*, v. 14, pp. 65-88.
- LEGEROS R.Z., BONEL G. e LEGROS R., 1978, "Types of H₂O in human enamel and in precipitated apatites", *Calcified Tissue Research*; v. 26, pp. 111–118.
- LEGEROS, R. e TUNG, M.S.; 1983, "Chemical Stability of Carbonate and Fluoride – Containing Apatites", *Caries Research*., v. 17, pp. 419-429.
- LEGEROS, R.Z., DALCUSI, G., KIJKOWSKA, R. e KEREDEL, B., "The effect of magnesium on the formation of apatites and whitlockites", in Iitokawa, Y. & Durlach, J. (eds), *Magnesium in Health and Disease*, John Libb Co Ltd., pp.11-19, 1989.
- LEGEROS, R.Z., KIJKOWSKA, R., BAUTISTA, C. e LEGEROS J.P., 1995, "Synergistic effects of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites", *Connective Tissue Research*, v. 33, pp. 203–209.
- LEGEROS, R.Z., SAKAE, T., BATISTA, C. *et al.*, 1996, "Magnesium and carbonate in enamel and synthetic apatites", *Advanced in Dental Research*, v. 10, pp. 225-231.
- LEGEROS, R.Z., MIJARES, D., YAO, F. *et al.*, 2008, "Synthetic Bone Mineral (SBM) for Osteoporosis Therapy: Part 1 – Prevention of Bone Loss from Mineral Deficiency, *Key Engineering Materials*, v. 361-363, pp. 43-46.
- LIAO, S., WATARI, F., U.O.M. *et al.*, 2005, "The Preparation and Characteristics of a Carbonated Hydroxyapatite / Collagen Composite at Room Temperature", *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials B*, v. 74, pp. 817–821.

- LIN, X.Y., LI, X.D., FAN, H.S., *et al.*, 2005, "Comparative Investigation of Coprecipitation and In-situ Synthesis of Nanohydroxyapatite/Collagen Composite", *Key Engineering Materials* v. 284-286, pp. 839-842.
- LIN, K., CHANG, J., LU, J., WU, W. and ZENG, Y., 2007, "Properties of β -Ca₃(PO₄)₂ bioceramics prepared using nano-size powders" *Ceramic International*, v. 33, pp. 979-985.
- LIU, C.Z., 2008, "Biomimetic Synthesis of Collagen / Nano-Hydroxypatite Scaffold for Tissue Engineering", *Journal of Bionic Engineering Supply*, v. 5, pp. 1-8.
- MARCHI, J., DANTAS, A.C.S., GREIL, P., BRESSIANI, J.C. *et al.*, 2007, "Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders" *Materials Research Bulletin*, v. 42, pp. 1040–1050.
- MARTINS, V.C.A. e GOISSIS, G., 1996, "Colágeno Aniônico como Matriz para Deposição Orientada de Minerais de Fosfatos de Cálcio", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 6, pp. 30–37.
- MAYER, I., SCHLAM, R. e FEATHERSTONE, D.B., 1997, "Magnesium-containing carbonate apatites", *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 66, pp. 1-6
- MIGUEL, F.B., CARDOSO, A.K.M.V., BARBOSA, A.A. *et al.*, 2006, "Morphological Assessment of the Behavior of Three-Dimensional Anionic Collagen Matrices in Bone Regeneration in Rats", *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials B*, v. 78, pp. 334 – 339.
- MILLES, C.A., AVERY, N.C., RODIN, V.V. e BAILEY, A.J., 2005, "The Increase in Denaturation Temperature Following Cross-linking of Collagen is Caused by Dehydration of the Fibres", *Journal of Molecular Biology*, v. 346, pp. 551–556.
- NF-S 94-066, Matériaux pour implants chirurgicaux – Détermination quantitative du rapport Ca/P de phosphates de calcium, 1998.
- OKAZAKI, M. e LEGEROS, R.Z., 1992. "Crystallographic and chemical properties of Mg-containing apatites before and after suspension in solutions". *Magnesium Research*, v. 5, pp. 103-108.

- PANG, Y.X. e BAO, X., 2003, "Influence of temperature, ripening time and calcification on the morphology and crystallinity of hydroxiapatite nanoparticles", *Journal of the European Ceramic Society*, v. 23, pp. 1697–1704.
- PASTERIS, J.D., WOPENKA, B., FREEMAN, J.J. *et al.*, 2004, "Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials", *Biomaterials*, v. 25, pp. 229–238.
- PILLIAR, R.M., FILIAGGI, M.J., WELLS, J.D., GRYNPAS, M.D. e KANDEL, R.A., 2001, "Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications – in vitro characterization", *Biomaterials*, v. 22, pp. 963-972.
- REY, C., COMBES, C., DROUET, C. e SFIHI, H., 2006, "Chemical Diversity of Apatites", *Advances in Science and Technology*, v. 49, pp. 27-36.
- RHEE S.H., LEE D.J. e TANAKA J., 2000, "Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemical Interaction with Collagen", *Journal of the American Ceramic Society*, v. 83, pp. 2890-2892.
- ROVERI, N., FALINI, G., SIDOTI, M.C. *et al.*, 2003, "Biologically inspired growth of hydroxyapatite nanocrystals inside self-assembled collagen fibers", *Materials Science and Engineering C* v. 23, pp. 441–446.
- ROSSERT, J. e CROMBRUGGHE, B.D., 1996, " Type I Collagen: Structure, Synthesis and Regulation", In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G. and Rodan, G.A. (Ed). *Principles of Bone Biology*, London: Academic Press, pp. 127-139.
- RUDE, R.K. e GRUBER, H.E., 2004, "Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations", *Journal of Nutricional Biochemistry*, v. 15, pp. 710-716.
- RUIJGROK, J.M., DE WIJN, J.R. e BOON, M.E., 1994, "Optimizing glutaldehyde crosslink of collagen: effects of time, temperature and concentration as measured by shrinkage temperatute", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, pp. 80-87.
- RYAN, L.M., CHEUNG, H.S., LEGEROS, R.Z., KURUP, I.V. *et al.*, 1999, "Cellular response to whitlockite", *Calcified Tissue International*, v. 65, pp. 374–377.

- SADER, M.S., LEGEROS, R.Z. e SOARES, G.A., 2009, “ Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium – substituted tricalcium phosphate dense tablets”, *Journal of Materials Science: materials in Medicine*, v. 15, pp. 710–716.
- SAKAE, T., OOKUBO, A., LEGEROS, R. Z. *et al.*, 2003, “Bone formation induced by several carbonate- and fluoride-containing apatite implanted in dog mandible”, *Key Engineer Materials*, v. 240-242, pp. 395-398.
- SANTOS, M.H., HENEINE, L.G.D. e MANSUR, H.S., 2008, “Synthesis and Characterization of Calcium Phosphate / Collagen Biocomposites doped with Zn^{2+} ”, *Materials Science and Engineering C*, v. 28, pp. 563 – 571.
- SCUDIERO, D.A.; SHOEMAKER, R.H.; PAUL, K.D.; MONKS, A. *et al.*, 1988, “Evaluation of a soluble tetrazolium / formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines”, *Cancer Research*, v. 48, pp. 4827–4833.
- SERRE, C.M., PAPILLARD, M., CHAVASSIEUX, P. *et al.*, 1998, “Influence of Magnesium Substitution on a Collagen – Apatite Biomaterial on the Production of Calcifying Matrix by Human Osteoblasts”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 42, pp. 626–633.
- SHIN, H., JO, S. e MIKOS, A.G., 2003, “Biomimetic materials for tissue engineering”, *Biomaterials*, v. 24, pp. 4353-4364.
- SIMÕES, R.D., SJZENFELD, V.L., ATRA, E, RODRIGUES DE LIMA, G.e BACARAT, E.C., “Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose”. In: *Ginecologia Endócrina*, 1ª ed., São Paulo, Editora Atheneu, pp. 272-282, 1995.
- SONG, E., KIM, S.Y., CHUN, T. *et al.*, 2006, “Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility”, *Biomaterials*, v. 27, pp. 2951–2961
- TABATA, Y., 2001, “Recent progress in tissue engineering”, *Drug Discovery Today*, v. 6, pp. 483–487.

- TAMPIERI, A., CELOTTI, G. LANDI, E. *et al.*, 2003, “Biologically inspired synthesis of bone-like composite: Self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals”, *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 67, pp. 618–625.
- TAMPIERE, A., CELLOTI, G. e LANDI, E., 2005, “From biomimetic apatites to biologically inspired composites”, *Analitical and Bioanalitical Chemistry*, v. 381, pp. 568–576.
- TAMPIERE, A., SANDRI, M., LANDI, E., *et al.*, 2008, “Design of graded biomimetic osteochondral composite scaffolds”, *Biomaterials*, v. 29, pp. 3539–3546.
- USKOKOVIC, V., IGNJATOVIC, N. e PETRANOVIC, N., 2003, “Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite – Collagen Biocomposites”, *Materials Science Forum*, v. 413, pp. 269–274.
- VARGAS, D.M., AUDÍ, L. e CARRASCOSA, A., 1997 “Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo”, *Revista Brasileira de medicina*, v. 43, pp. 367-370.
- WAHL, D.A., e CZERNUSZKA, J.T., 2006, “Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair”, *European Cells and Materials*, v. 11, pp. 43-56.
- WOPENKA, B. e PASTERIS, J.D., 2005, “A mineralogical perspective on the apatite in bone”, *Materials Science and Engineering C*, v. 25, pp. 131-143.
- WU, T-J., HUANG, H-H., LAN, C-W. *et al.*, 2004, “Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite”, *Biomaterials*, v. 25, pp. 651–658.
- YAMASAKI, Y., YOSHIDA, Y., OKAZAKI, M. *et al.*, 2003, “Action of FGMgCO₃Ap-collagen composite in promoting bone formation”, *Biomaterials*, v. 24, pp. 4913–4920.
- YAMAGUSHI, I., KOGURE, T. e SAKANE, M., 2003, “Microstructure analysis of calcium phosphateformed in tendon”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 14, pp. 883–89.

- YAO, F., LEGEROS, J.P. e LEGEROS, R.Z., 2009, "Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties", *Acta Biomaterialia*, v. 5, pp. 2169–2177.
- YASHIMA, M., SAKAI, A., KAMIYAMA, T. *et al.*, 2003, "Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction", *Journal of Solid State Chemistry*, v. 175, pp. 272–277.
- ZHAI, Y., CUI, F.Z. e WANG, Y., 2005, "Formation of nano-hydroxyapatite on recombinant human-like collagen fibrils", *Current Applied Physics*, v. 5, pp. 429–432.
- ZHANG, L.-J., FENG, X.-S., LIU, H.-G. *et al.*, 2004, "Hydroxyapatite / collagen composite materials formation in simulated body fluid environment", *Materials Letters*, v. 58, pp. 719–722.
- ZHANG, W., LIAO, S.S. e CUI, F.Z.; 2003, "Hierarchical Self-Assembly of Nano-Fibrils in Mineralized Collagen", *Chemical Materials*, v. 15, pp. 3221–3226.
- ZOU, C., WENG, W., DENG, X. *et al.*, 2005, "Preparation and characterization of porous β -tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure", *Biomaterials*, v. 26, pp. 5276–5284.
- ZREIQAT, H., HOWLETT, C.R., ZANNETTINO, A. *et al.*, 2002, "Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants" *Journal of Biomedical Materials Research*, 62, 175 – 184.
- ZYMAN, Z.Z., ROKHMISTROV, D.V., GLUSHKO, V.I. e IVANOV, I.G., 2009, "Thermal impurity reactions and structural changes in slightly carbonated hydroxyapatite", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, pp. 1389–1399.