

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E DE COMPÓSITOS
HIDROXIAPATITA-COLÁGENO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Doris Moura Campos

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

Aprovada por:

Prof^a. Glória de Almeida Soares, D.Sc.

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

Prof. Fernando Costa e Silva Filho, D.Sc.

Dr^a. Lídia Ágata de Sena, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
FEVEREIRO DE 2008

CAMPOS, DORIS MOURA

Produção e Caracterização de Colágeno Tipo I e de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Regeneração Óssea. [Rio de Janeiro] 2008

XII, 100p. 29,7cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2008)

Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Biomaterial

2. Compósito hidroxiapatita-Colágeno tipo I

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Aos meus avós, Luiza e Ilia, por representarem
tudo o que eu precisava acreditar.

AGRADECIMENTOS

1. A Deus, aos guias e a tudo o que acredito ser importante dentro do Universo infinito, por conceder mais uma vitória na caminhada profissional e pessoal a qual me dedico. Obrigado pela proteção e força interior que me deram.
2. À minha orientadora Glória Soares, por ter me dado oportunidade de ingressar em seu laboratório tão jovem na iniciação científica. Agradeço por sempre estar presente, pelos seus conselhos e pela compreensão de que em alguns momentos eu não poderia me dar mais. Agradeço por ser um exemplo de profissionalismo e me orientar sem “podar” minhas indagações, agindo com entusiasmo diante de uma área diferente.
3. Aos membros da banca pela honra da presença, por avaliarem esse trabalho e o enriquecerem com suas sugestões.
4. Às minhas antigas e primeiras orientadoras, Valderez e Christina, por terem me iniciado no meio científico e por me estimularem a continuar nesse caminho. Aos colegas dos laboratórios antigos que sempre prestaram-me auxílio, mesmo eu não pertencendo mais aos seus núcleos.
5. Ao prof. Marcos Farina, físico e professor do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), que me incentiva a participar de uma área diferente das minhas “origens intelectuais”.
6. Aos pertencentes do incrível Laboratório de Biomateriais do PEMM, Márcia, Euler, Helena, Cristiane, Aline, Lígia, Larissa, Maíra e Neusa que se empenham verdadeiramente a ser um grupo de pesquisa. Obrigada a todas as pessoas amigas que não medem esforços para que nossos momentos juntos sempre fossem de inspiração científica e pessoal. Obrigada em especial à Márcia, Helena e Cristiane, por me ouvirem sempre nos momentos difíceis pelos quais passei.

7. Aos não pertencentes, porém amigos, do Laboratório de Biomateriais do PEMM, Cristiane, Marília, Taís, Emanuel, Silvia e Ingrid, por sempre estarem conosco nos momentos importantes.
8. Aos professores que sempre se mostraram dispostos ao engrandecimento intelectual dos seus alunos. Obrigada aos professores Renata, Lula, Tsuneharu, Sérgio, Rossana e Granjeiro pela total dedicação à carreira profissional escolhida.
9. Aos técnicos: Heleno (AFM), Leonice (FTIR), Márcia (MEV), ao aluno George (Rietveld), à doutora Lídia (DRX), à aluna Ingrid (Citotoxicidade) e ao prof. Edgar (esterilização) pelas análises realizadas e grande ajuda prestadas a esse trabalho.
10. À minha família, por todo incentivo, carinho e amor dedicados a mim. Ao meu pai, que mesmo não estando mais presente, se empenhou para que eu absorvesse e concluísse o que era bom ou não na formação do meu caráter.
11. Ao meu marido Leonardo que completa meus pensamentos e me ajuda ser uma pessoa melhor. Aos meus grandes amigos insulanos, verdadeiros irmãos, que sempre me incentivaram e torceram por mim.
12. Ao CNPQ e FAPERJ pelo apoio financeiro durante a execução desse trabalho.
13. A todos, mesmo não lembrados, por todo apoio e carinho.

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E DE COMPÓSITOS
HIDROXIAPATITA-COLÁGENO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Doris Moura Campos

Fevereiro/2008

Orientadora: Glória de Almeida Soares

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Avanços nos estudos de biomateriais para enxertos ósseos indicam que a similaridade das características dos materiais utilizados e do tecido lesado é de essencial importância para o sucesso da regeneração tecidual. Os compósitos HA-Col I foram produzidos através da fibrilogênese *in vitro* das fibrilas de Col I concomitante à precipitação da hidroxiapatita (HA) a partir do gotejamento de soluções contendo íons cálcio e íons fosfato. A estequiometria da reação foi ajustada para razão cálcio/fósforo igual a 1,67 e o pH e a temperatura foram ajustados e mantidos em 9 e 38°C, respectivamente. O planejamento fatorial teve como variáveis a fonte de cálcio, o tempo de envelhecimento e o meio de extração do colágeno. Os compósitos foram liofilizados e esterilizados por radiação gama, sendo que algumas amostras foram tratadas quimicamente com glutaraldeído (GTA). Por espectroscopia de infravermelho (FTIR) foram identificadas bandas características do colágeno tipo I e da hidroxiapatita e por difração de Raios-X (XRD) os picos característicos de hidroxiapatita.

Todas as condições apresentaram estrutura porosa, quando observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O tratamento com glutaraldeído se mostrou fundamental para a manutenção estrutural de amostras dos compósitos em meio de cultura por até 7 dias e não deixou resíduo tóxico, após teste segundo a norma ISO 10993-3.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

CHARACTERIZATION AND PRODUCTION OF TYPE I COLLAGEN AND
HYDROXYAPATITE-COLLAGEN TYPE I COMPOSITE FOR BONE
REGENERATION

Doris Moura Campos

February 2008

Advisor: Glória de Almeida Soares

Department: Metallurgical and Materials Science Engineering

Recent studies show that similarity between synthetic scaffolds and original tissue is an important characteristic for bone replacement materials. The composites HA-Col I were prepared by the polymerization of collagen fibrils at the same time of hydroxyapatite (HA) precipitation from the calcium and phosphate rich solutions. Stoichiometry was kept equal to 1.67 and pH and temperature adjusted and maintained at 9 e 38°C, respectively. Fatorial planning considered as variable: calcium source, reaction time and medium for collagen extraction..Composites obtained were lyophilized and sterilized by gamma radiation, and some samples were chemically treated with glutaraldehyde (GTA). By infrared spectroscopy (FTIR) characteristics bands of type I collagen and hydroxyapatite were identified while X-ray diffraction (XRD) allowed the identification of HA peaks. All conditions presented porous structure, observed by scanning electron microscopy (SEM). GTA treatment seems to be fundamental in order to maintain composite samples in culture medium for 7 days and no toxic effect were observed by testing according to ISO 10.993-3 standard.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 - TECIDO ÓSSEO.....	4
2.1.1 - <i>PROCESSOS DE OSSIFICAÇÃO</i>	7
2.1.2 - <i>ORGANIZAÇÃO TECIDUAL</i>	8
2.1.3 - <i>TIPOS CELULARES</i>	11
2.2 - REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	16
2.3 - MINERALIZAÇÃO NATURAL NOS OSSOS	19
2.4 - COMPONENTES ORGÂNICOS	22
2.4.1 - <i>COLÁGENO</i>	24
2.4.1.1 - <i>PRODUÇÃO CELULAR</i>	25
2.4.1.2 - <i>COLÁGENO TIPO I EM BIOMATERIAIS</i>	26
2.5 - COMPONENTES INORGÂNICOS	29
2.5.1 - <i>SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO</i>	31
2.6 - BIOMATERIAIS	32
2.6.1 - <i>BIOMATERIAIS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO</i>	33
2.6.2 - <i>COMPÓSITOS HA-COL I</i>	35
2.7 - BIOENGENHARIA TECIDUAL	37
2.8 - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA	40
2.8.1 - <i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA</i>	40
2.8.1.1 - <i>ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA</i>	41
2.8.2 - <i>DIFRATOMETRIA DE RAIOS X</i>	41
2.8.3 - <i>ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO</i>	43
2.8.4 - <i>MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA</i>	44
3- OBJETIVOS	46
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 - COLÁGENO	47
4.2 - PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS HA-COL I	49
4.3 - TRATAMENTOS “PÓS-SÍNTESES”	52
4.3.1 - <i>ENSAIO DE DURABILIDADE EM AMBIENTE DE CULTURA DE CÉLULAS</i>	53
4.3.2 - <i>TESTE DE CITOTOXICIDADE</i>	54
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	56
5.1.1 - <i>COLÁGENO</i>	56
5.1.2 - <i>HIDROXIAPATITA</i>	57
5.1.3 - <i>COMPÓSITOS HA-COL I</i>	58
5.1.4 - <i>EFEITO DA PRECIPITAÇÃO SALINA</i>	68
5.2- CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	70
5.2.1 - <i>COLÁGENO</i>	70
5.2.2 - <i>COMPÓSITOS HA-COL I</i>	73
5.3 - ENSAIO DE DURABILIDADE EM CULTURA.....	77
5.4 - ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	82
6.0 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
7.0 – CONCLUSÕES	89
8.0- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
9.0 - REFERÊNCIAS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema da disposição dos tipos ósseo, vasos sanguíneos e periósteo no osso longo.....	6
Figura 2.2 - Diagrama mostrando a transição dos tipos celulares de pré-osteoblastos a osteócitos durante a diferenciação da linhagem osteoblástica. O diagrama não está em escala. (1) pré-osteoblasto, (2) pré-osteoblasto-osteoblasto, (3) osteoblasto, (4) osteoblasto-pré-osteócito, (5, 6) pré-osteócito, (7) osteócito jovem, (8) osteócito antigo (modificado de FRANZ-ODENDAAL <i>et al.</i> , 2006).	15
Figura 2.3 - Esquema do processo de remodelação óssea. Esse processo é dividido em duas etapas distintas: a reabsorção óssea provocada pelos osteoclastos (setas) (B, C) e a deposição de novo osso pelos osteoblastos (E, F) (modificado de CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).....	17
Figura 2.4 - Diagrama mostrando a estrutura hierarquizada do composto natural HA-Col I.O primeiro nível na hierarquia é a organização de nanocristais de HA com moléculas de Col I inicialmente nas regiões Gap. O segundo nível na hierarquia é o crescimento de cristais de HA na superfície das fibrilas de Col I, orientadas ao longo do eixo destas. O terceiro nível é a formação das fibras de Col I pelas ligações entre cada uma das fibrilas mineralizadas (modificado de CUI <i>et al.</i> , 2007).	22
Figura 2.5 - Diagrama mostrando o arranjo atômico da hidroxiapatita (modificada de MCGREGOR, 1998).....	30
Figura 4.1 – Produção do composto HA-Col I no Laboratório de Biomateriais (PEMM/COPPE).....	51
Figura 5.1 - Espectros de FTIR de Col I extraído em solução de ácido acético 1M: (a) SPS; (b) CPS.....	57
Figura 5.2 – (a) Espectros de FTIR e (b) DRX da amostra controle de HA produzida a partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e envelhecida por 3 horas nas mesmas condições das sínteses.....	58
Figura 5.3 - Espectros de FTIR dos compostos formados por Col I extraído em solução de ácido acético 1M CPS e HA: (a) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0h de envelhecimento; (b) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 0h de envelhecimento; (c) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 3h de envelhecimento; (d) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 3h de envelhecimento.	60
Figura 5.4 - Espectros de FTIR dos compostos formados por Col I extraído em solução de ácido Fosfórico 59,32mM CPS e HA; (a) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0h de envelhecimento; (b) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 0h de envelhecimento; (c) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 3h de envelhecimento; (d) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 3h de envelhecimento.	61
Figura 5.5 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compostos formados por Col I (extraído em solução de ácido acético 1M CPS) e HA: (a; b) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0h de envelhecimento; (c; d) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 0h de envelhecimento. (vermelho – experimental; preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).	63
Figura 5.6 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compostos formados por Col I (extraído em solução de ácido acético 1M CPS) e HA: (a; b) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 3h de envelhecimento; (c; d) composto baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 3h de envelhecimento. (vermelho – experimental;	

preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).	64
Figura 5.7 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compósitos formados por Col I (extraído em solução de ácido fosfórico 59,32mM CPS) e HA: (a; b) compósito baseado em Col I com Ca(OH) ₂ e 0h de envelhecimento; (c; d) compósito baseado em Col I com Ca(NO ₃) ₂ e 0h de envelhecimento. (vermelho – experimental; preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).	65
Figura 5.8 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compósitos formados por Col I (extraído em solução de ácido fosfórico 59,32mM CPS) e HA: (a; b) compósito baseado em Col I com Ca(OH) ₂ e 3h de envelhecimento; (c; d) compósito baseado em Col I com Ca(NO ₃) ₂ e 3h de envelhecimento. (vermelho – experimental; preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).	66
Figura 5.9 – Espectros de FTIR dos compósitos produzidos a partir de Col I extraído em solução ácido acético 1M SPS (a) e CPS (b). Ambos os compósitos foram produzidos com Ca(NO ₃) ₂ e envelhecidos por 3h.	69
Figura 5.10 – DRX e diagramas de Rietveld dos compósitos produzidos a partir de Col I extraído em solução ácido acético 1M SPS (a; b) e CPS (com posterior lavagem) (c; d). Ambos os compósitos foram produzidos com Ca(NO ₃) ₂ e envelhecidos por 3h.	69
Figura 5.11 - Micrografias (MEV) do Col I obtido pela extração em solução de ácido acético 1M: (a) SPS (b) CPS; (c,d) detalhe das fibras de Col I obtidas pela extração em solução ácido acético 1M SPS.	71
Figura 5.12 – Micrografias (AFM) de filme de Col I SPS; (a) micrografia da topografia; (b) micrografia de contraste de fase. Fibras de Col I CPS; (c) micrografia da topografia; (d) micrografia de contraste de fase.	72
Figura 5.13 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução de ácido acético 1M SPS) e por HA: (a; d) detalhes da deposição mineral sobre as fibras; (b; c) detalhes de uma possível organização das fibras de Col I longitudinalmente.	74
Figura 5.14 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução de ácido acético 1M CPS) e por HA: (a) detalhe da interação entre as fibras de Col I; (b) observação da deposição mineral não organizada; (c,d) detalhes da deposição mineral sobre as fibras.	75
Figura 5.15 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M e HA. (a) fibras SPS; (b) fibras CPS.	76
Figura 5.16 - Micrografias (MEV) e espectros de energia dispersiva (EDS) de: (a) fibras de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M SPS sem mineralização; (b) compósito baseado em Col I (extraído em solução ácido acético 1M SPS) e HA.	77
Figura 5.17 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético 1M SPS) e por HA. Os compósitos não foram tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; b) detalhe da deposição mineral; (c; d) detalhe da estrutura lamelar formada.	78
Figura 5.18 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético 1M SPS) e por HA. Os compósitos foram tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; b) detalhe da deposição mineral; (c; d) detalhe da estrutura lamelar formada.	79
Figura 5.19 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético 1M CPS) e por HA. Os compósitos não foram	

tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; b; c) detalhe da deposição mineral; (d) detalhe da estrutura lamelar formada.	80
Figura 5.20 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético CPS) e por HA. Os compósitos foram tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; c) detalhe da deposição mineral sobre as fibras; (b; d) detalhe da estrutura lamelar formada.	81
Figura 5.21 –Avaliação da citotoxicidade dos compósitos HA-Col I com e sem precipitação salina e tratados ou não com GTA. CPCG = com precipitação salina e com tratamento com GTA; CPSG = com precipitação salina e sem tratamento com GTA; SPCG = sem precipitação salina e com tratamento com GTA; SPSG = sem precipitação salina e sem tratamento com GTA.	83
Figura 5.22 – (1; 2) Aspecto do material após o teste; (3; 4; 5) material sendo lavado com solução salina; (6) Aspecto do material após a manipulação mostrando que houve alteração parcial da forma; (7) Aspecto do material após a obtenção do extrato puro (modificação da cor pelo contato com DMEM e manutenção da integridade).	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1- Valores de propriedades físicas do osso humano (modificado de MURUGAN & RAMAKRISHNA, 2005).	9
Tabela 2.2 - Distribuição dos tipos de colágeno nos organismos (modificado de FRIESS, 1998).	23
Tabela 4.1 - Planejamento fatorial 2^k da produção de compósitos HA-Col I.	50
Tabela 4.2 - Legenda das combinações realizadas entre os níveis das variáveis na produção de compósitos HA-Col I.	50
Tabela 5.1 – Índices de concordância finais do refinamento dos compósitos.	62
Tabela 5.2 – Parâmetros da HA presente nos compósitos HA-Col I.	67

1. INTRODUÇÃO

Os avanços na área de biomateriais se devem ao aumento da necessidade de tratar clinicamente um grande número de pacientes. Embora atualmente várias doenças estejam sob controle nas sociedades civilizadas, a incidência de acidentes com o envolvimento de lesão do esqueleto cresceu devido ao uso amplo de veículos automotores. Além disso, o aumento da expectativa de vida da população gera novos casos de osteoporose e fraturas, devido ao comprometimento ósseo de pessoas idosas. Um outro motivo seria o número alarmante de pacientes diagnosticados com patologias ósseas que provocam perda da estrutura ou sítio da lesão.

Quando o reparo natural é insuficiente, o tecido ósseo lesado necessita de materiais que possuam propriedades adequadas às funções estabelecidas pelo órgão no organismo humano. Os materiais sustentáveis para intervenções de reparo ou reestruturações ósseas devem se assemelhar a um “osso artificial” (VALLET-REGÍ, 1997).

Esse cenário atual, unido às técnicas cirúrgicas aprimoradas, leva ao uso de implantes, próteses ou sistemas clínicos que trabalhem na substituição local e que, ao mesmo tempo, trabalhem em contato com os outros tecidos do organismo, sem lhes causar danos posteriores.

Para essa aplicação, um grupo de materiais é utilizado com o propósito de substituir ou acelerar o reparo do tecido e da função desempenhada. Esse grupo é denominado biomateriais e deve possuir, entre outras propriedades, biocompatibilidade e biofuncionabilidade.

Além dessas propriedades, um outro fator importante nos biomateriais utilizados para uso clínico no organismo é a durabilidade. Essa durabilidade ainda vem aliada à manutenção da funcionalidade do biomaterial ao longo de determinado período da vida do paciente (relacionada à própria vida útil do material no sistema orgânico). Ao longo desse período, os biomateriais devem manter contato com os tecidos vivos (adjacentes ou não) sem causar riscos de reações, principalmente na interface tecido-material.

De acordo com os motivos relatados acima, um avanço crescente nas pesquisas que focam o uso de biomateriais para reparo de lesões no tecido ósseo vem aumentando em todo o mundo. Os investimentos na produção de biomateriais para uso clínico em tecidos músculo-esqueléticos giram em torno de 20 bilhões de dólares (BIOMET, 2006).

Outro fator a ser observado é a vasta utilização de materiais metálicos na fabricação dos implantes e próteses. Isso ocorre pelo fato de suas propriedades mecânicas em geral serem compatíveis a dos ossos longos em geral. Em contrapartida, os implantes metálicos, ao longo do tempo, podem sofrer corrosão resultando na liberação e acúmulo de íons metálicos no tecido adjacente ou em órgãos do organismo. Aliados ao uso dos metais, materiais cerâmicos também são vastamente utilizados pois apresentam boa biocompatibilidade, mas sua baixa resistência ao estresse mecânico pode levar à perda de sua função. Outros materiais, como os poliméricos, podem, em sua degradação, gerar resíduos tóxicos ao organismo.

A partir disso, alguns biomateriais utilizados atualmente são produzidos pela união de várias áreas do conhecimento a fim de fornecer ao paciente um material/sistema que provoque um reparo mais rápido e de melhor qualidade. Os conhecimentos das áreas de Engenharia, Farmacologia e Biologia Celular e Tecidual estão sendo empregados na produção de enxertos, próteses e implantes com as características descritas anteriormente. Na Engenharia de Tecidos Ósseos, o desenvolvimento de biomateriais que, ao invés de substituir o sítio ósseo aceleram o reparo da lesão a partir do tecido original do próprio paciente, vem ganhando destaque no mundo científico. Esses materiais são classificados como biomiméticos, uma vez que eles funcionam como a própria matriz extracelular.

Durante a produção do material, características como macro e micro-estruturas, propriedades mecânicas, tratamentos na superfície, entre outros, devem seguir a finalidade de sua aplicação. A adição de biomoléculas como proteínas, fatores de crescimento e citosinas, antibióticos e hormônios promovem uma melhora nas primeiras horas em contato com o tecido adjacente, diminuindo as reações do organismo contra o material externo. O cultivo celular de células do próprio paciente (autólogas) na superfície desses materiais, anterior à intervenção cirúrgica, diminui a rejeição pós-

operatória, além de acelerar a formação de uma interface mais coesa ou a própria regeneração da lesão a partir do tecido original.

Ao observarmos a literatura científica relacionada à engenharia de tecidos ósseos nos últimos anos, o desenvolvimento de arcabouços utilizando proteínas como colágeno, ou compostos por hidroxiapatita (HA) e colágeno do tipo I (Col I) têm se destacado. Os compósitos HA-Col I possuem semelhanças químicas entre seus componentes e os presentes na matriz extracelular do tecido ósseo humano. A HA e Col I são as principais moléculas inorgânica e orgânica, respectivamente, encontradas no esqueleto dos vertebrados. Sua organização estrutural altamente específica leva às propriedades mecânicas do osso que resultam na sustentação do organismo, locomoção e proteção de órgãos nobres como encéfalo, medula espinhal e vísceras.

Muito ainda deve ser observado e pesquisado na área de biomateriais. A dificuldade de agrupar propriedades e moléculas diferentes em um só produto leva a maiores investimentos nessa área de pesquisa. A proposta desse trabalho foi a produção de compósitos HA-Col I sob a forma de cilindros moldáveis para enxerto ósseo. A partir de dados da literatura, foi estabelecido um protocolo para extração de Col I de origem bovina e modificações na produção dos compósitos foram efetuadas a fim de otimizar as propriedades e características do produto. O que se propõe é a produção, caracterização físico-química e otimização das características do material compósito para cultivo celular.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - TECIDO ÓSSEO

Os seres humanos apresentam um endoesqueleto baseado em cálcio que os permitiu a sobrevivência no ambiente terrestre. A sustentação do corpo é devido ao fato dos órgãos que o compõe – os ossos – reunirem, em um só conjunto de estruturas, inúmeras funções vitais ao organismo.

O tecido ósseo é o tecido predominante na composição dos ossos. É importante destacar que o osso é um órgão, pois ele apresenta, além do ósseo, outros tecidos: cartilaginoso, sangüíneo, conjuntivo fibroso, adiposo e até nervos. Além de promover a sustentação do organismo, os ossos fazem hematopoiese (formação das células do sangue), constituem reserva de gordura, promovem a troca contínua de cálcio e fósforo com o plasma sangüíneo, protegem o encéfalo, a medula espinhal, o coração e os pulmões e compõem sistemas de alavancas nas articulações, garantindo ampla movimentação de várias partes do corpo (TORTORA, 2000).

Os ossos são pontos de inserção muscular e transmitem a força das contrações musculares de uma parte à outra do corpo durante o movimento. São capazes de absorver toxinas e metais pesados minimizando seus efeitos adversos nos outros tecidos do corpo e funcionando como uma linha de defesa.

A estrutura macroscópica de ossos longos apresenta uma diáfise (*dia*= através; *physis* = crescimento) e duas epífises (*epi*= acima). A diáfise é localizada na região mediana principal do osso e apresenta em seu interior a medula óssea amarela nos ossos adultos. As epífises são as extremidades do osso que apresentam grande quantidade de osso esponjoso e a medula óssea vermelha em seu interior.

Nos ossos longos existe uma fina faixa transversal de cartilagem hialina, o disco epifisário, a partir do qual ocorre o crescimento do osso, visível em ossos ainda em crescimento. A superfície externa da epífise é lisa e brilhante, revestida por uma camada de cartilagem hialina chamada superfície articular.

O osso é todo revestido externamente por uma resistente bainha branca de tecido fibroso, o perióstio (*peri*= em torno de; *osteon*= osso), cujas fibras colágenas se inserem firmemente no tecido ósseo. Ele consiste de tecido conjuntivo denso irregular, vasos sangüíneos e nervos que passam pelo osso e vários tipos de células ósseas. O perióstio é necessário para a proteção, nutrição, crescimento em diâmetro e reparo dos ossos, e é local de fixação para ligamentos e tendões. Ele reveste toda a superfície externa do osso, exceto em suas superfícies articulares. Sua região externa é comparativamente espessa e é denominada camada fibrosa, enquanto sua região mais interna é menos definida e chamada camada osteogênica, devido à presença de células osteoprogenitoras.

O endóstio (*endo*= dentro) é o revestimento da cavidade medular que consiste em células osteoprogenitoras achatadas sem um componente fibroso. Todavia suas células osteoprogenitoras são capazes de participar, como aquelas do perióstio, no reparo de ossos quebrados. Elas também servem como uma fonte de osteoblastos necessários para formar novos sistemas haversianos quando os velhos são absorvidos.

Assim como todos os tecidos do organismo, o tecido ósseo possui células próprias e substância intercelular bem definida. A matriz óssea é sólida e rígida devido a grande quantidade de compostos minerais, especialmente fosfato e carbonato de cálcio, mas também possui certa ductilidade devido suas fibras de proteínas. Os ossos das crianças têm maior proporção das substâncias orgânicas que os dos adultos e, essa proporção, diminui à medida que a idade avança. Isso explica a maior ocorrência de fraturas em idosos.

A matriz óssea é formada por duas fases: a mineral (ou inorgânica) e a orgânica. Na fase mineral estão presentes grande quantidade do fosfato de cálcio denominado hidroxiapatita (HA), além de carboapatita, traços de íons magnésio, carbonato, hidroxila, cloro, flúor e citrato (CUI *et al.*, 2007); a fase orgânica está representada por fibras de colágeno tipo I (Col I), proteo e glicosaminoglicanas e moléculas sinalizadoras como hormônios, fatores de crescimento e citosinas. As fibras de Col I proporcionam ductilidade ao osso enquanto os cristais de HA, resistência à compressão. Participando das atividades teciduais estão as principais células ósseas: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

As células osteoprogenitoras mantêm a população de osteoblastos através do processo de diferenciação celular. Os osteoblastos localizam-se na superfície óssea sintetizando e secretando diversos componentes da matriz e, principalmente, Col I. Os osteócitos se localizam no interior da matriz óssea e são as células ósseas maduras (ao final do processo de diferenciação) (Figura 2.1). Os osteoclastos são encontrados na superfície óssea reabsorvendo a matriz mineralizada em um processo denominado remodelação óssea. O processo de remodelação óssea é importante para o crescimento, reparo e manutenção dos ossos e será discutido posteriormente.

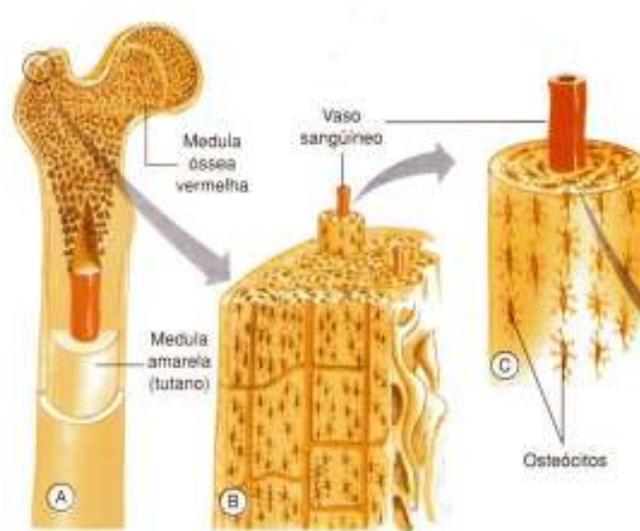


Figura 2.1 – Esquema da disposição dos tipos ósseo, vasos sanguíneos e periosteio no osso longo.

A principal função dos ossos, a de sustentar o corpo, está relacionada com sua matriz óssea mineralizada. Os ossos longos apresentam, em observação macroscópica, um tipo de tecido ósseo com matriz mais densa em suas camadas superficiais. Esse tipo ósseo, denominado tecido ósseo compacto, apresenta propriedades mecânicas com valores altos, dando o caráter rígido ao osso. Em observações microscópicas, a matriz óssea mineralizada apresenta um arranjo determinado das fibras de Col I. Além disso, essas fibras estão impregnadas com HA. A estrutura primária do osso consiste em fibrilas de Col I e cristais de HA alinhado ao eixo c de alongação das fibrilas

(KIKUCHI *et al.*, 2004a). Esse arranjo nanométrico faz com que os ossos resistam às forças de tensão as quais estão submetidos durante a vida do indivíduo.

2.1.1 - PROCESSOS DE OSSIFICAÇÃO

Os ossos se formam através dos processos de ossificação. Os dois processos de ossificação, intramembranosa e endocondral, envolvem a substituição de tecido conjuntivo preexistente por osso, não havendo distinção dos dois processos quando observamos um osso adulto. A ossificação intramembranosa refere-se à formação de osso diretamente dentro ou sobre as membranas de tecido conjuntivo fibroso. Em contrapartida, o processo de ossificação do tipo endocondral apresenta um molde de cartilagem que é substituído gradualmente por tecido ósseo.

a) Ossificação intramembranosa – é o processo que forma, por exemplo, os ossos planos do crânio, a mandíbula e as clavículas. O embrião humano possui um esqueleto composto por cartilagem ou tecido conjuntivo fibroso. Esse esqueleto serve como molde para o evento de ossificação que começará a seguir. A ossificação se inicia por volta da sexta ou sétima semana de vida e continua ao longo da vida adulta.

Células do mesênquima (células que formam a maioria de nossos tecidos) diferenciam-se em células osteoprogenitoras e, posteriormente, em osteoblastos, formando o centro de ossificação. Os osteoblastos iniciam a secreção de matriz até que estejam totalmente circundados por ela. As células, agora denominadas osteócitos, promovem junções de suas membranas plasmáticas através de canalículos enquanto a matriz continua sendo mineralizada.

À medida que a matriz óssea se mineraliza, ela se funde formando as trabéculas do osso esponjoso. Os espaços entre as trabéculas são preenchidos por medula óssea vermelha e, na superfície exterior do osso, o mesênquima se condensa formando o perióstio. As camadas superficiais do osso podem ainda ser substituídas por osso compacto pelo processo de remodelação, o que permitirá o crescimento do novo osso até o tamanho adulto.

b) Ossificação endocondral – A grande maioria dos ossos, inclusive os ossos longos, é formada por esse processo. No início do desenvolvimento embrionário, um molde de cartilagem hialina é formado. À medida que o molde de cartilagem cresce, células da região média do molde iniciam, estimuladas quimicamente, a mineralização, diminuindo a taxa de difusão de nutrientes e oxigênio e causando sua própria morte. As lacunas resultantes das células mortas são preenchidas por células osteoprogenitoras.

Uma nova artéria penetra na matriz calcificada estimulando uma nova colonização celular. As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos que secretam uma matriz óssea formando trabéculas do osso esponjoso. A atividade dos osteoclastos gera a cavidade medular, enquanto os osteoblastos continuam secretando mais tecido ósseo em direção às extremidades. A cavidade medular é então preenchida pela medula óssea vermelha.

A cartilagem hialina continua, mesmo no fim do processo, a recobrir as epífises como cartilagem articular, e aparece entre a diáfise e as epífises como placa epifisária, a qual é responsável pelo crescimento dos ossos em comprimento. A placa epifisária permite a diáfise aumentar em comprimento até o início da vida adulta. As células de cartilagem da placa epifisária cessam a divisão, e a cartilagem eventualmente é substituída pelo osso. A velocidade de crescimento é controlada por hormônios, como o hormônio do crescimento humano (GH).

O crescimento em diâmetro ocorre junto com o crescimento em comprimento. Neste processo, o osso revestindo a cavidade medular é destruído por osteoclastos do endóstio de modo que a cavidade aumenta em diâmetro. Ao mesmo tempo, os osteoblastos do perióstio acrescentam novo tecido ósseo em torno da superfície externa do osso.

2.1.2 - ORGANIZAÇÃO TECIDUAL

Os ossos que compõem o esqueleto são constituídos por dois tipos de tecidos ósseos: compacto ou cortical; e esponjoso ou trabecular (ou ainda medular). Ambos são revestidos externamente pelo perióstio e, internamente, pelo endóstio e apresentam as mesmas moléculas e tipos celulares conhecidos. O que difere esses dois tipos de tecido

ósseo é a organização estrutural dessas moléculas e células, resultando em diferentes arranjos e propriedades mecânicas.

As propriedades mecânicas do osso dependem geralmente da sua idade. Sabe-se que espécies femurais apresentando 3, 5 e 35 anos de idade possuem módulos de elasticidade de 7,0, 12,8 e 16,7GPa, respectivamente. Adicionalmente, após o amadurecimento ósseo, o módulo de elasticidade do osso cortical femural declinar aproximadamente 2% por década (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005). Algumas propriedades importantes do osso estão apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1- Valores de propriedades físicas do osso humano (modificado de MURUGAN & RAMAKRISHNA, 2005).

Propriedades	Osso cortical	Osso trabecular
Módulo de Young (GPa)	14-20	0,05-0,5
Limite de resistência á tração (MPa)	50-150	10-20
Limite de resistência à compressão (MPa)	170-193	7-10
Tenacidade à fratura (MPa.m^{1/2})	2-12	0,1
Massa específica (g/cm³)	18-22	0,1-1,0
Volume total ósseo (mm³)	1,4 x 10 ⁶	0,35 x 10 ⁶
Superfície interna total (mm²)	3,5 x 10 ⁶	7,0 x 10 ⁶
Superfície/volume ósseo (mm²/mm³)	2,5	20

Os ossos do organismo humano podem ser classificados com base em sua forma como: longos, curtos, planos e irregulares. Os ossos longos, representados pelo fêmur e a tibia, apresentam grande quantidade de tecido ósseo compacto e de osso esponjoso em quantidades consideráveis em seu interior. Os ossos curtos (o carpo e o tarso, por exemplo) possuem grande quantidade de tecido ósseo esponjoso e uma fina camada de osso compacto. Os ossos planos, representados pelos ossos do crânio, esterno, escápula e costelas, permitem uma proteção considerável uma vez que fornecem extensa área de inserção muscular e, por fim, os ossos irregulares (incluem-se as vértebras) variam na quantidade de osso compacto e esponjoso.

O processo de preenchimento gradual que converte o osso esponjoso em osso compacto cria vários canais estreitos revestidos por células osteoprogenitoras. Esses canais envolvem os vasos que estavam presentes anteriormente nos espaços trabeculares da rede esponjosa. Cada arranjo com várias camadas consecutivas é denominada ósteon. Os ósteons apresentam um diâmetro médio de 0,3mm.

a-) Tecido ósseo compacto

O tecido ósseo compacto está localizado na periferia dos ossos do organismo e apresenta grande quantidade de matriz óssea mineralizada. Isso permite que eles auxiliem na resistência dos ossos às forças impostas sobre eles.

As artérias nutritivas e nervos do periósteo penetram no osso compacto através de canais perfurantes, denominados canais de Volkmann. Estes vasos sanguíneos conectam-se com outros vasos sanguíneos e nervos da cavidade medular e com aqueles dos canais centrais de Havers. Os canais centrais são paralelos ao eixo de comprimento do osso longo.

Em torno dos canais centrais há lamelas concêntricas de matriz mineralizada. Entre as lamelas estão localizadas lacunas, onde encontramos os osteócitos. Projetando-se para fora em todas as direções a partir das lacunas, há canalículos contendo as projeções citoplasmáticas desses osteócitos.

Os canalículos de um osteócito conecta-se com aqueles das outras lacunas e, eventualmente, com os canais centrais. Assim uma intrincada rede ramificada de canalículos é formada ao longo do osso. Esse amplo sistema de microscópicos canalículos garante ao tecido um ativo metabolismo, uma intensa troca de substâncias com o sangue (nutrientes, oxigênio e excretas em geral) e a boa capacidade de regeneração em casos de fraturas. Devido à presença de fibras nervosas, o osso possui grande sensibilidade.

No tecido ósseo compacto, cada canal central, com suas lamelas, lacunas, osteócitos e canalículos circundantes, é denominado ósteon ou sistema haversiano.

b-) Osso esponjoso

O tecido ósseo esponjoso é encontrado nos ossos do quadril, das costelas, do esterno, das vértebras, do crânio e nas extremidades de ossos longos sendo o único local de armazenamento da medula óssea vermelha, e assim, da hematopoiese em adultos.

A medula óssea é hematopoieticamente ativa. Na vida adulta, a medula óssea pode se apresentar sob duas formas: medula óssea vermelha, com coloração vermelho-vivo e produzindo um grande número de eritrócitos, e medula óssea amarela, com coloração amarelada devido à existência de caroteno proveniente da gordura acumulada nas abundantes células armazenadoras de lipídeos.

Em contraste com o tecido ósseo compacto, o tecido ósseo esponjoso não possui osteons verdadeiros. O osso esponjoso possui lamelas finas longitudinais de tecido mineralizado denominadas trabéculas com seus osteócitos estão preenchendo as lacunas. Os vasos sangüíneos do periósteo penetram até o osso esponjoso, e os osteócitos nas trabéculas são nutridos diretamente pelo sangue que circula através das cavidades medulares.

2.1.3 - TIPOS CELULARES

Os tipos celulares presentes nos ossos variam de acordo com o tecido envolvido, localização na matriz óssea e funções. Nas trabéculas do osso esponjoso existem várias populações celulares envolvidas com o processo de divisão celular para reposição de células de diferentes linhagens e funções encontradas no sangue e nos tecidos. As células sanguíneas são altamente especializadas, capazes de desempenhar suas respectivas funções no momento em que ganham acesso à corrente sanguínea. Em geral, elas não circulam até que sua proliferação tenha terminado, atingindo o nível necessário de maturação.

As populações celulares encontradas nesse microambiente são denominadas células mesenquimais. Estas células são pluripotentes e indiferenciadas, podendo dar origem a diversos tecidos do nosso organismo além de participar da manutenção, reparo e controle da homeostasia. As células indiferenciadas podem iniciar o processo de diferenciação com a ativação e inativação de determinados genes, alterando seu fenótipo celular. Uma vez que a célula tenha iniciado esse processo, sua taxa proliferativa cai e, de acordo com seu nicho celular, ela gera a linhagem a qual se comprometeu inicialmente.

As células osteoprogenitoras estão localizadas na medula óssea e podem originar, de acordo com os estímulos específicos, células ósseas maduras, condroblastos ou até mesmo fibroblastos (KIHARA *et al.*, 2006). As células osteoprogenitoras são pequenas, apresentam coloração pálida, fusiformes e podem ainda ser encontradas nos tecidos conjuntivos perivasculares, nas superfícies do tecido ósseo, endósteo e periósteo (KIHARA *et al.*, 2006; TACHIBANA *et al.*, 2005).

As células osteoprogenitoras, no início de seu processo de diferenciação, geram células denominadas pré-osteoblastos. Os pré-osteoblastos se diferenciam em osteoblastos maduros e, ao final do processo, em osteócitos. Cada tipo celular apresenta características morfológicas e funções diferentes alterando, por exemplo, sua atividade de síntese protéica. Alguns osteoblastos podem permanecer como células de reserva na superfície óssea constituindo as chamadas “bone lining cells” (células de revestimento ósseo) (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

As células de revestimento ósseo protegem o tecido ósseo subjacente contra fluidos extracelulares e contribui na regulação dos fluxos dos íons cálcio e fósforo para dentro e para fora da estrutura óssea. São células possivelmente derivadas de osteoblastos que cessaram sua atividade, mas podem retornar ao estado de célula osteoprogenitora por um processo ainda não bem elucidado (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Portanto as células osteoprogenitoras do tecido ósseo, os osteoblastos e osteócitos são células derivadas da linhagem osteoblástica presente no interior do osso esponjoso. Entretanto, os osteoclastos não compartilham da mesma linhagem de

diferenciação, sendo derivados de células progenitoras mononucleadas da linhagem de monócitos/macrófagos.

a-) Osteoblastos

Os osteoblastos ativos apresentam intensa atividade de síntese dos componentes da matriz óssea. Nesse momento, seu fenótipo celular é cubóide, com citoplasma basófilo, núcleo excêntrico e nucléolo proeminente. É possível a visualização por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de inúmeros retículos endoplasmáticos rugosos (RER) e muitas lamelas do aparelho de Golgi. Essas organelas são conhecidamente abundantes em células com intensa atividade secretora (MACKIE, 2003).

Além de colágeno tipo I (Col I), os osteoblastos sintetizam proteínas não-colagênicas, fatores de crescimento específicos, prostaglandinas, collagenases e fosfatase alcalina. Esta última parece estar envolvida na sinalização transmembranar e tem função na regulação da migração e diferenciação dos osteoblastos (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005). Uma outra função dos osteoblastos é participar na nucleação do mineral ósseo cristalino nas fibras de Col I.

Os pré-osteoblastos são semelhantes aos osteoblastos, porém não sintetizam Col I, nem osteocalcina, sialoproteína e osteopontina. São estimulados por glicocorticóides e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) a iniciar o processo de diferenciação e ativação da atividade de produção da matriz óssea. A palavra morfogenética significa que elas induzem a formação de um osso inteiramente novo. Têm a capacidade de iniciar o que é denominado como “a fase morfogenética do desenvolvimento ósseo”, que inclui a migração, agregação e proliferação das células do tipo mesenquimal e sua subsequente diferenciação em células osteoprogenitoras (TORTORA, 2000).

Também desperta interesse saber que o conteúdo de BMPs na matriz óssea diminui com a idade, e que esse declínio segue um curso de tempo similar ao da perda de densidade óssea. Algumas evidências também sugerem que em certas formas de osteoporose (redução da massa óssea total), a auto-imunidade às BMPs pode ser responsável pela redução da formação óssea (COMARCK, 1991).

b-) Osteócitos

Após a diferenciação em osteoblastos e a produção inicial da matriz óssea não mineralizada (matriz osteóide), começa um processo de mineralização que ocorre ao redor do osteoblasto secretor, levando-o ao final de seu processo de diferenciação, gerando o osteócito (Figura 2.3). Uma zona de tecido osteóide persiste ao redor de cada osteoblasto e osteócito durante a mineralização normal, indicando o local em que está havendo mineralização.

Os osteócitos localizam-se em lacunas presentes tanto no tecido ósseo compacto quanto no esponjoso. Da lacuna, inúmeros canálculos irradiam em direção a vários pontos do tecido. A matriz óssea é atravessada por numerosos canais finos que são preenchidos por um líquido e interconectam as lacunas dos osteócitos que, direta ou indiretamente, as ligam com as superfícies ósseas continuamente banhadas por líquido tecidual. O significado funcional desses canais é que eles servem como canais vitais que permitem a difusão dos nutrientes e oxigênio para todos os osteócitos no tecido ósseo, possibilitando que essas células permaneçam viáveis em um ambiente muito mineralizado.

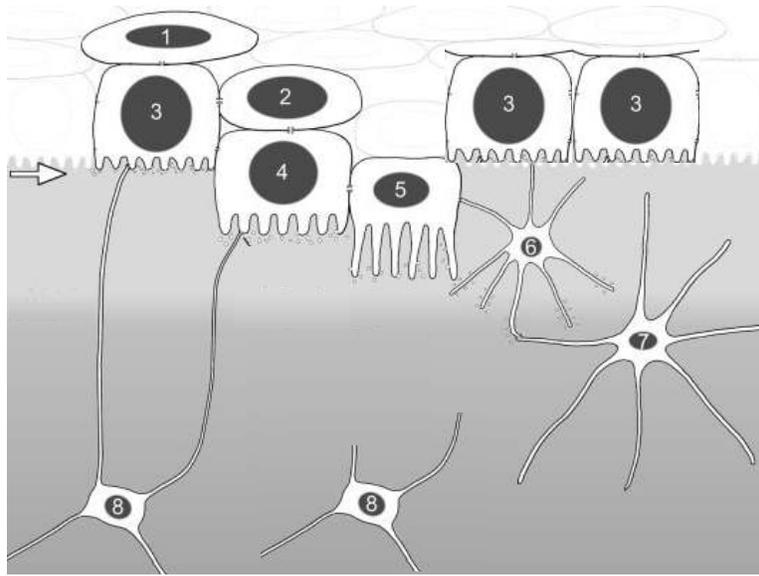


Figura 2.2 - Diagrama mostrando a transição dos tipos celulares de pré-osteoblastos a osteócitos durante a diferenciação da linhagem osteoblástica. O diagrama não está em escala. (1) pré-osteoblasto, (2) pré-osteoblasto-osteoblasto, (3) osteoblasto, (4) osteoblasto-pré-osteócito, (5, 6) pré-osteócito, (7) osteócito jovem, (8) osteócito antigo (modificado de FRANZ-ODENDAAL *et al.*, 2006).

.c-) Osteoclastos

Os osteoclastos são células oriundas da linhagem de diferenciação de monócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas. Os osteoclastos apresentam múltiplos núcleos periféricos circundados por pilhas de sacos de Golgi junto com inúmeras mitocôndrias, algumas vesículas secretoras e lisossomos, além de uma pequena quantidade de RER. A ultraestrutura do osteoclasto sugere que ele é uma célula secretora capaz de transporte iônico ativo. São proporcionalmente muito maiores que os osteoblastos e apenas um osteoclasto pode reabsorver a matriz depositada por 100 osteoblastos.

A porção do osteoclasto diretamente responsável pela reabsorção óssea é uma estrutura transitória e altamente móvel denominada borda pregueada. Esta borda da

célula é constituída por prolongamentos ramificados semelhantes a dedos que sobressaem na superfície óssea onde estão situados.

Os osteoclastos provocam escavações na superfície desnuda da matriz óssea (denominadas lacunas de Howship) resultando no processo incessante de remodelação óssea. Os osteoclastos podem secretar enzimas hidrolíticas capazes de degradar os constituintes orgânicos amorfos da matriz. Além disso, a secreção de ácidos, como carbônico, cítrico e láctico, pode provocar a descalcificação focal da matriz óssea.

2.2 - REMODELAÇÃO ÓSSEA

Aparentemente os ossos são órgãos inertes, estáveis e não sujeitos às alterações estruturais. No entanto, sabemos que durante toda a vida eles têm ativo metabolismo, sendo continuamente remodelados pela reestruturação de suas lâminas ósseas, de acordo com as forças de compressão e tensão que atuam sobre eles. A matriz óssea é gradualmente degradada e reposta por osso novo numa razão de substituição de 1mm/ano (KIKUCHI *et al.*, 1999).

O osso compacto é formado pela transformação do osso esponjoso. O diâmetro de um osso longo é aumentado pela destruição interna do osso (como explicado no processo de ossificação endocondral). Mesmo após terem atingido sua forma e tamanho adulto, o tecido ósseo antigo é continuamente destruído e o tecido ósseo novo é formado em seu lugar. Todos esses eventos são dependentes de: minerais adequados (sendo os mais importantes: cálcio, fósforo e magnésio); vitaminas A, C e D e vários hormônios como estrógenos e testosterona, fatores de crescimento semelhantes à insulina, hormônio tireóideos, calcitonina e hormônio paratormônio (PTH); e exercício, que expõe os ossos ao estresse. Assim, enquanto os osteoblastos produzem e mineralizam uma nova matriz óssea, os osteócitos a mantêm e, por sua vez, os osteoclastos a reabsorvem.

As células precursoras de osteoclastos são normalmente liberadas como monócitos na corrente sanguínea. Em locais onde a superfície da matriz óssea encontra-se isenta da camada de osteoblastos, os monócitos se fundem para formar os

osteoclastos multinucleados para a reabsorção óssea. Esses osteoclastos aderem-se à superfície da matriz óssea “livre” e iniciam sua degradação (ALBERTS *et al.*, 2006).

O processo de remodelação começa em um pequeno espaço na superfície óssea denominado lacuna de Howship. Osteoclastos promovem mudanças nas condições químicas locais, diminuindo o pH para aproximadamente 5. Isso resulta na dissolução dos nanocristais de HA juntamente com a degradação das moléculas orgânicas (inclusive Col I) por ação enzimática dessas células (KIKUCHI *et al.*, 1999).

À medida que o processo de remodelação se desenvolve, os osteoblastos depositam camadas concêntricas de matriz nova (matriz osteóide) que gradualmente preenchem a cavidade, deixando somente um canal estreito em torno de um novo vaso sanguíneo, o canal de Havers (ALBERTS *et al.*, 2006).

Células que estão presentes na cavidade medular, e que possuam a capacidade de se diferenciar em células da linhagem osteogênica, são diferenciadas em células osteoprogenitoras. Após o início da reabsorção óssea pelos osteoclastos, vários hormônios como PTH, vitamina D3 e citocinas, como os IGFs, são capturadas pela matriz regulando o metabolismo, função e regeneração óssea, resultando na diferenciação das osteoprogenitoras em osteoblastos maduros (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005).

Ao final do processo de remodelação, os osteoblastos se tornam aprisionados pela própria matriz orgânica osteóide e, posteriormente mineralizada durante a formação óssea, dando origem aos osteócitos.

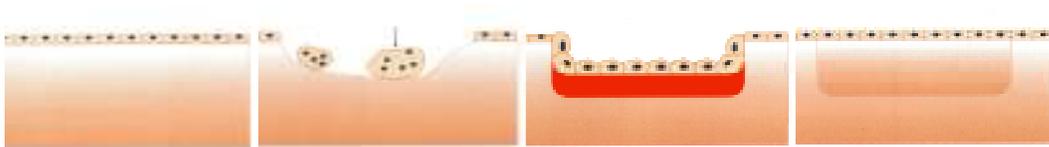


Figura 2.3 - Esquema do processo de remodelação óssea. Esse processo é dividido em duas etapas distintas: a reabsorção óssea provocada pelos osteoclastos (setas) (B, C) e a deposição de novo osso pelos osteoblastos (E, F) (modificado de CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005)

O processo de remodelação óssea é importante para o crescimento, reparo e manutenção da saúde óssea. O armazenamento e liberação de cálcio são dependentes do processo de remodelação, e seus níveis estão intimamente relacionados com o sutil controle das células envolvidas nesse processo. Os ossos também armazenam mais fosfato (fósforo) do que qualquer outro órgão. Níveis apropriados de fosfato são requeridos para a produção de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e ATP (molécula energética das células).

A retirada de cálcio e fósforo dos ossos para o sangue é controlada pelo PTH. Ele interfere no número e no comportamento dos osteoclastos e na função renal de reabsorção de cálcio. Quando seus níveis estão muito elevados no sangue, a glândula tireóide produz calcitonina que inibe a atividade osteoclástica e estimula os osteoblastos a secretarem e mineralizarem mais matriz óssea nova. A liberação da calcitonina pode ser influenciada pelo aumento do estresse mecânico, como a tração dos músculos esqueléticos para sustentação do corpo, exercícios físicos e a força da gravidade (TORTORA, 2000).

Os ossos são dotados de uma capacidade notável para adaptar sua estrutura em resposta a variações de longa duração na carga imposta a eles. Este comportamento de adaptação sugere que a deposição e a erosão da matriz sejam controladas de alguma maneira pela solicitação mecânica local, mas os mecanismos envolvidos não são totalmente compreendidos (ALBERTS *et al.*, 2006). LANDIS & SILVER (2002) sugerem que a formação mineral é mediada por uma combinação de efeitos biológicos, físico-químicos e biomecânicos no tecido.

Os efeitos do envelhecimento sobre o sistema esquelético são os aumentos nas taxas de osteoporose e de fraturas. A osteoporose acomete principalmente mulheres a partir dos 40 anos. Nessa idade elas param de produzir estrógenos em seus ovários. Tanto a osteoporose quanto o risco de fraturas são decorrentes da deficiência na quantidade de cálcio e sua utilização na mineralização da matriz. Alguns motivos podem levar a este estado, como a baixa velocidade de produção de proteínas ou até mesmo a inativação de algumas populações de osteoblastos. A baixa produção de moléculas orgânicas como Col I pode levar ao aumento do risco de fraturas pela

diminuição da ductilidade dos ossos, entre outros motivos. A inativação ou baixo desempenho das populações de osteoblastos leva a um desequilíbrio no processo de reabsorção-deposição da matriz óssea realizada pelos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente. Muitos autores afirmam que as populações de osteoblastos e osteoclastos se auto-regulam através de moléculas sinalizadoras como Rank e Rank-L (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005))

2.3 - MINERALIZAÇÃO NATURAL NOS OSSOS

Os fatores que atuam na deposição mineral e, posterior formação de HA, ainda não são bem definidos. Vários fatores diferentes parecem atuar, sinergicamente ou de forma permutável, para iniciar a deposição mineral. Ainda não está muito claro se a fase sólida primeiramente formada é amorfa ou cristalina. Todavia já está fortemente comprovado que o mineral final do osso é a HA.

A deposição da HA nas fibrilas de Col I ocorre fora das células ósseas e é produzida por ações seqüenciais de osteoblastos *in vivo*. As concentrações de cálcio e fósforo observadas no local de mineralização são consideravelmente altas, e devem estar relacionadas a fatores que atuam localmente, dando condições para o início do processo (KIKUCHI *et al.*, 1999). Nesse local, o pH fisiológico está em torno de 7,4. As concentrações sanguíneas de cálcio e fósforo parecem ser insuficientes para que haja cristalização ou precipitação espontânea além desses sítios focais, protegendo os tecidos moles no resto do corpo.

A partir das concentrações adequadas, ocorre o produto iônico entre íons cálcio e fosfato que posteriormente sofre um processo de transição e interconversão, gerando vários arranjos cristalinos alternativos de graus variáveis de complexidade. Uma vez iniciada a formação dos cristais de HA, eles tenderão a crescer e a catalisar a posterior cristalização de fosfatos de cálcio, mesmo nos locais que as concentrações de íons cálcio e fosfato sejam semelhantes às do nível plasmático. Isto explica por que é tão importante manter a nucleação cristalina sob rígido controle (COMARCK, 1991).

A partir das observações e estudos sobre o processo de mineralização, duas hipóteses foram levantadas. A primeira considera que alguns componentes celulares são diretamente responsáveis pela nucleação, e a segunda hipótese baseia-se na idéia de que a nucleação depende de propriedades físico-químicas específicas de alguns constituintes macromoleculares derivados das células da matriz orgânica madura.

Até muito recentemente, a atenção era concentrada quase que apenas em estruturas derivadas das células denominadas vesículas da matriz. Estas são pequenas estruturas envolvidas por membranas, com diâmetro de 25nm a 250nm, que foram observadas em vários locais e fases de mineralização de diferentes tecidos. Elas parecem originar-se de áreas de crescimento da própria membrana plasmática das células envolvidas nesse processo. Uma observação detalhada do interior dessas vesículas permitiu supor que elas funcionariam como iniciadoras da mineralização. Isto explicaria a interação dessas com os primeiros cristais de HA, que parecem ser formados dentro ou próximo às vesículas. Essa íntima associação sugere que as vesículas da matriz fornecem o microambiente adequado para a nucleação da HA (LANDIS & SILVER, 2002).

De acordo com a segunda hipótese, a reação entre HA e Col I acontece em regiões interfibrilares das fibras de Col I (regiões GAP) (GE *et al.*, 2007). Os grupos carboxila e hidroxila na superfície dos substratos são importantes no processo de nucleação da HA (TACHIBANA *et al.*, 2005). Nesse ambiente, íons cálcio primeiramente interagem com as carboxilas das fibrilas de Col I e íons fosfatos ligam-se aos de cálcio (ZHANG *et al.*, 2003). Quando o valor de pH é apropriado, o efeito dos íons hidroxila, cálcio e fosfatos sintetizam fosfatos de cálcio em condição compósita às fibrilas de Col I e, por último, o fosfato de cálcio se torna HA (ZHAI *et al.*, 2005). Segundo COOL *et al.* (2002), somente 25% da fase mineral estão localizadas dentro da fibrila de colágeno e 75% estariam sobre a molécula de colágeno sem orientação aparente.

É provável que arranjos estereoquímicos presentes nos sítios interfibrilares promovam as ligações para a ocorrência dos eventos de nucleação e alinhamento dos cristais de HA nas fibras de Col I. MAITLAND & ARSENAULT (1991) identificaram sítios hidrofílicos e hidrofóbicos nas fibras colágenas que poderiam mediar a formação

mineral no tecido ósseo. Além disso, íons carbonato podem substituir dois sítios aniônicos da estrutura da apatita: sítios OH⁻ monovalentes e fosfatos PO₄³⁻ trivalente, chamados respectivamente de substituição tipo A e tipo B. A razão de sítio B carbonatado e de fosfato permite estimar a idade dos cristais minerais do osso.

LANDIS & SILVER (2002) afirmam que quando ocorre esforço mecânico no osso, o deslizamento das fibrilas de Col I expõe os sítios aptos às ligações dos íons envolvidos, permitindo a interação com as vesículas de mineralização e pequenas proteoglicanas. Essas proteoglicanas, como a decorina, possuem uma potencial interação com os íons cálcio do local, permitindo o início da mineralização. Porém ânions fosfatos afetam o processo de fibrilogênese, assim como as interações envolvendo outros componentes da MEC (ex. ligação de glicosaminoglicanas com fibrilas de colágeno) (TACHIBANA *et al.*, 2005).

A primeira enzima descoberta que possui envolvimento com o processo de mineralização foi a fosfatase alcalina. Isso se deve ao fato de que ela está presente em praticamente todos os locais em que ocorre mineralização. Essa enzima é capaz de hidrolisar uma grande variedade de substratos contendo fosfato orgânico e, também reside em vesículas da matriz. Ela também atua na liberação de íons cálcio e fosfato, oriundos do β-glicerofosfato em pH 7,4. Essa liberação poderia aumentar os níveis dos íons localmente, permitindo a nucleação dos primeiros cristais de fosfato de cálcio (COMARCK, 1991).

Além disso, essa enzima ainda possui a capacidade de hidrolisar o pirofosfato e outros polifosfatos, conhecidamente inibidores da mineralização da matriz óssea. Portanto, a enzima fosfatase alcalina provavelmente atua na nucleação inicial dos cristais de HA e também funciona como antiinibidor da mineralização. Uma outra proteína importante nesse processo é a osteonectina que ancora o mineral ósseo (HA) ao Col I da matriz óssea. A osteocalcina é uma proteína ligante de cálcio que também está envolvida na mineralização do tecido ósseo.

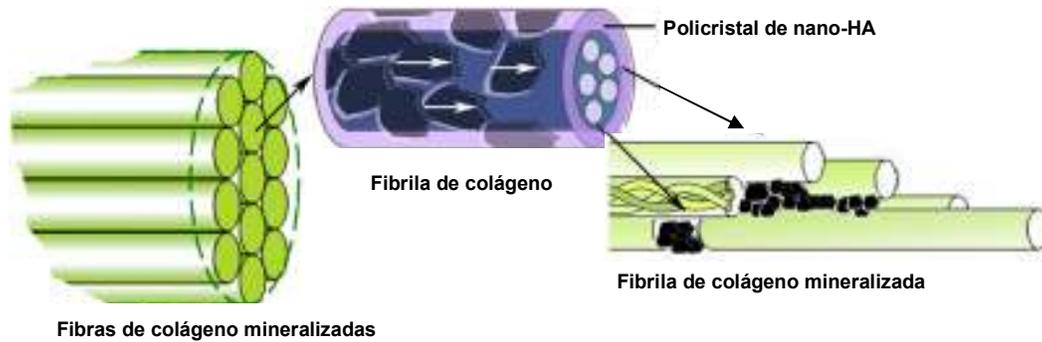


Figura 2.4 - Diagrama mostrando a estrutura hierarquizada do compósito natural HA-Col I. O primeiro nível na hierarquia é a organização de nanocristais de HA com moléculas de Col I inicialmente nas regiões Gap. O segundo nível na hierarquia é o crescimento de cristais de HA na superfície das fibrilas de Col I, orientadas ao longo do eixo destas. O terceiro nível é a formação das fibras de Col I pelas ligações entre cada uma das fibrilas mineralizadas (modificado de CUI *et al.*, 2007).

2.4 - COMPONENTES ORGÂNICOS

Cerca de 90% do conteúdo orgânico da matriz óssea é constituída por colágeno; a maior parte do colágeno encontrado na matriz é do tipo I (Col I), mas também foram observadas pequenas quantidades do tipo V. Aproximadamente os 10% restantes são representados por um componente amorfo contendo sulfato de condroitina e ácido hialurônico (associados às proteínas como agregados de proteoglicanas) juntamente com proteínas não colágenas e glicoproteínas. Como a matriz óssea tem apenas um pequeno conteúdo de proteoglicanas não apresenta muita retenção de água.

Ao contrário das glicosaminoglicanas que resistem às forças compressivas, as fibrilas de colágeno formam estruturas que resistem às forças trativas. No osso, as fibras estão arranjadas em camadas ordenadas, com as fibrilas de cada uma das camadas paralelas entre si e quase em ângulo reto com as fibrilas nas camadas adjacentes. Essa organização estrutural permite ao osso desempenhar as funções no organismo já descritas anteriormente.

Colágeno representa uma das proteínas estruturais e corresponde aproximadamente a 30% das proteínas dos organismos dos vertebrados. Mais de 90%

das proteínas de matriz extracelular (MEC) de tendões e ossos e mais de 50% da MEC da pele consistem em colágeno. Colágeno está presente desde o tendão de Achilles até a córnea. Vários tipos de colágeno formam os diferentes tecidos conjuntivos do corpo. Assim, a união dos tipos de colágeno compreende uma família de moléculas geneticamente distintas na qual a configuração estrutural em tripla-hélice de sub-unidades polipeptídicas é comum. Vinte tipos de colágeno foram isolados variando o comprimento da hélice, a natureza e o tamanho das porções que não formam hélice (Tabela 2.2) (CUI *et al.*, 2007).

Tabela 2.2 - Distribuição dos tipos de colágeno nos organismos (modificado de FRIESS, 1998).

Tipo de colágeno	Distribuição em tecidos do organismo
I	Pele, tendões, ossos, córnea, dentina, fibrocartilagem, vasos sanguíneos, intestino, útero
II	Cartilagem hialina, notocorda
III	Vasos sanguíneos, útero, derme, intestino, válvula cardíaca, gengiva (usualmente co-existe com colágeno tipo I exceto em ossos, tendões e córnea)
IV	Membrana basal
V	Córnea, placenta, osso, vasos sanguíneos, cartilagem hialina, gengiva
VI	Pele, músculo cardíaco
VII	Pele, placenta, cartilagem, córnea
VIII	Produzido por células endoteliais
IX	Cartilagem
X	Cartilagem mineralizada ou hipertrófica
XI	Cartilagem, disco intervertebral
XII	Tendão em embriões de galinhas, ligamento periodontal em bovinos
XIII	Osso, mucosa intestinal

O colágeno tipo I (Col I) é predominante na maioria dos animais e é encontrado especialmente na pele, tendões e ossos, onde extrema força é transmitida. Ele é composto por três cadeias (duas idênticas) denominadas cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (1056 e 1038

resíduos aminoácidos, respectivamente). Apresentam diferentes composições de aminoácidos, podendo raramente representar um trímero de cadeias α 1. Colágenos I, II e III têm grandes seções de seqüência que apresentam homologia, independente da espécie estudada.

2.4.1 - COLÁGENO

A molécula básica de colágeno contém 3 cadeias polipeptídicas α , cada uma constituída em mais de 1000 aminoácidos. Os aminoácidos são organizados em uma seqüência que permite a formação da tripla-hélice. O aminoácido glicina possui o menor grupo radical e sua repetição ocorre a cada três posições na seqüência das cadeias da hélice. Aproximadamente 35% são posições de não-glicinas presentes na repetição de unidades Gly-X-Y. A posição X é exclusivamente ocupada pelo aminoácido prolina, e a posição Y, predominantemente ocupada pela 4-hidroxiprolina. A molécula também contém um aminoácido não-usual chamado hidroxilisina, importante na formação da estrutura. Tanto a hidroxiprolina quanto a hidroxilisina alinham e estabilizam a tripla-hélice (KOIDE *et al.*, 2005). Por sua natureza alicíclica, elas formam ligações de hidrogênio que resulta na limitação da rotação da hélice (FRIESS, 1998).

A estrutura terciária do colágeno se refere à unidade fundamental originalmente conhecida como tropocolágeno: três cadeias polipeptídicas interconectadas formando a tripla hélice. Esta possui peso molecular de aproximadamente 300KDa, um comprimento de 300nm e diâmetro de 1,5nm. Essas dimensões explicam a alta viscosidade nas soluções e alta mobilidade em campos elétricos. O colágeno pode ser considerado um material anisotrópico por que contém regiões com diferentes graus de cristalinidade.

Existem ainda regiões terminais amino e carboxi constituídas de 9-26 aminoácidos nas extremidades da molécula que não formam a estrutura da hélice. Essas regiões são denominadas telopeptídeos. Em um máximo nível de observação estrutural, as moléculas de tripla-hélice se auto-organizam longitudinal e bilateralmente dentro das fibrilas com periodicidade distinta. Os agregados de 4 a 8 moléculas de colágeno são formados durante o processo de fibrilogênese. Essas fibrilas possuem de 10 a 500nm de diâmetro dependendo do tipo de tecido ou estágio do desenvolvimento. As triplas-

hélices estão separadas por 40nm e possuem distanciamento de 67nm entre as moléculas sucessoras. Essas fibrilas de colágeno se auto-organizam podendo formar moléculas ainda maiores, como as fibras.

2.4.1.1 - PRODUÇÃO CELULAR

O processo de síntese do colágeno inicia-se com a transcrição dos genes e posterior tradução dos RNA mensageiros pelos ribossomos (organelas responsáveis pela fabricação das cadeias polipeptídicas) do RER. No lúmen do RER encontramos o pró-colágeno que sofre sucessivos processos de hidroxilação e glicosilação em seus aminoácidos lisina e prolina, formando a tripla hélice. A tripla hélice é enviada para o Golgi (organela responsável pela produção de vesículas secretoras) sendo posteriormente secretada para a MEC. Ao serem secretadas para o espaço extracelular, as moléculas de tropocolágeno reúnem-se em polímeros de ordem maior como as fibrilas de colágeno. Estas fibrilas freqüentemente agregam-se em feixes com vários micrômetros, denominadas fibras de colágeno (ALBERTS *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2007).

PROVENZANO & VANDERBY (2006) sugerem que, durante a fibrilogênese, proteoglicanas guiam e estabilizam a formação e amadurecimento de fibrilas de colágeno. Estudos mostram que decorina, limucan, e fibromodulina atuam regulando a organização na formação das fibrilas de colágeno.

O empacotamento sistemático das triplas-hélices resulta na resistência e na resiliência das fibras de colágeno. Adicionalmente, a estabilidade mecânica e química deriva das ligações cruzadas intra e intermoleculares. *In vivo* dois tipos de ligações cruzadas naturais são realizadas nas fibras de colágeno: intramolecular, entre as unidades do tropocolágeno; e intermoleculares, entre as diferentes unidades do mesmo. A extensão e o tipo da ligação cruzada variam com a idade do tecido e sua função. Durante o desenvolvimento do indivíduo, o aumento da tensão nas fibras de colágeno provoca um aumento do número de ligações cruzadas com o objetivo de produzir as propriedades mecânicas ótimas para dada função no organismo.

Inicialmente, a formação de ligações cruzadas é mediada pela enzima lisil-oxidase durante a formação das fibrilas e sua atividade é limitada pelas regiões telopeptídicas. Enquanto as fibrilas se associam, os aldeídos podem reagir espontaneamente. As ligações cruzadas intermoleculares ocorrem entre as regiões dos telopeptídeos de uma molécula de colágeno com a região de hélice quaternariamente organizada da molécula adjacente.

No tecido ósseo, as moléculas de colágeno estão unidas por três resíduos do aminoácido hidroxilisina, lisina ou seus derivados, de maneira que cada duas moléculas de colágeno estão unidas entre si por uma estrutura cíclica fluorescente chamada piridinolina. Durante o processo de remodelação óssea, os telopeptídeos carboxiterminal e aminoterminal do Col I, cujas cadeias protéicas estão unidas entre si através da estrutura piridinolínica, são liberados durante a degradação do Col I, dando origem aos telopeptídeos carboxiterminal (ICTP) e aminoterminal (INTP). Essas substâncias circulam no sangue e são excretados na urina (VARGAS *et al.*, 1997).

2.4.1.2 - COLÁGENO TIPO I EM BIOMATERIAIS

Nas décadas de 1970 e 1980, as pesquisas e aplicações de biomateriais médicos em tecidos conjuntivos expandiram academicamente sob orientação de cientistas. Muitos materiais baseados em Col I foram utilizados como implantes biomédicos para uma variedade de aplicações. Pesquisas laboratoriais comerciais focaram seus estudos nesta proteína estrutural. Ao mesmo tempo, o processo tecnológico melhorou e novos produtos baseados em Col I foram muito bem aceitos no mercado médico e farmacológico para regeneração tecidual guiada no tecido ósseo (JIANG *et al.*, 2005).

Col I é conhecido pela sua excelente biocompatibilidade assim como sua baixa toxicidade e reações imunogênicas, e até a década de 1950, a antigenicidade do Col I foi assumida como inexistente. A alta similaridade da seqüência dos aminoácidos entre as diversas espécies e o baixo conteúdo de aminoácidos aromáticos contribuíram para essa idéia. Uma distinção necessária é entre imunogenicidade, indução da resposta com anticorpos, e a antigenicidade, a existência de anticorpos (FRIESS, 1998).

Outro importante argumento para a aplicação da proteína fibrilar estrutural Col I é sua alta estabilidade conformacional. Além disso, Col I é particularmente resistente aos ataques de proteases neutras, provavelmente por sua função de proteína estrutural primária dos principais tecidos do organismo. Estas propriedades são importantes no desenvolvimento biológico da nova MEC (SCHARNWEBER *et al.*, 2004).

O colágeno pode ser fabricado como gel, esponjas, fibras e filmes, próteses de válvulas cardíacas e vasos sanguíneos, tratamento de defeitos na pele e córnea. Esses materiais servem de base para a engenharia de tecidos com expressiva biocompatibilidade, dando suporte à adesão celular, e biodegradabilidade porque pode ser degradado e reabsorvido pelo corpo (LIN & LIU, 2005; WAHL & CZERNUSKA, 2006). Essas matrizes promovem o suporte mecânico atuando como um arcabouço, assistindo à reconstrução do tecido lesado.

Enquanto o transporte de substâncias e as propriedades biológicas dos materiais baseados em colágeno produzem dados satisfatórios, a resistência mecânica destes é muito baixa. A introdução de ligações covalentes intermoleculares – ligações cruzadas – é responsável pela estabilidade química e térmica do sistema fibroso em muitos materiais (JIANG *et al.*, 2005). É essencial que as propriedades físicas desses materiais sejam similares aos tecidos que irão iniciar o reparo a partir do material biológico.

Além disso, esses materiais são geralmente estabilizados por ligações cruzadas para reduzir sua imunogenicidade e controlar sua biodegradação durante a implantação (JIANG *et al.*, 2005). KIKUCHI *et al.* (2004) demonstrou, a partir de compósitos sem tratamento químico prévio com ligações cruzadas, que estes degradam rapidamente *in vivo*, resultando no decréscimo da resistência mecânica.

FRIESS (1998) observou que filmes de colágeno que não sofreram ligações cruzadas químicas adicionais são degradados em 2-7 semanas. A degradação do material pode se dar pela fagocitose (englobamento de partículas sólidas pelas células) das fibrilas de colágeno ou secreção de enzimas de pH ácido.

Estudos realizados por LANDIS & SILVER (2002) revelaram que, na substituição de tendões e ligamentos, a biodegradação ótima dos arcabouços ocorre em

cerca de 20 semanas após a implantação, porém a perda inicial de cerca de 75% da resistência à tração acontece em aproximadamente 4 semanas.

Métodos de modificações químicas são utilizados, e vários agentes de ligações cruzadas, como o glutaraldeído (GTA, $\text{OHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$), podem auxiliar no processo de aumento da resistência à biodegradação dentro do organismo. GTA é o reagente mais extensivamente utilizado para formar ligações cruzadas via base de Schiff entre os grupos ϵ -amino das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos lisina e hidroxilina presentes na estrutura primária das fibras de colágeno. Entretanto, GTA é conhecido por sua citotoxicidade em contato com tecidos vivos no organismo. Outros tratamentos químicos que promovem a formação de ligações cruzadas são: esterificação, acilação, deaminação do grupo ϵ -amino da lisina e o impedimento de grupos guanidina dos resíduos de arginina (BET *et al.*, 2001)

CHARUTALHA E RAJARAM (2003) compararam diversos agentes de ligações cruzadas obtendo o máximo de pontos de ligações cruzadas quando utilizado GTA. O aumento da resistência à tração e à degradação por ação enzimática também foram observadas.

As ligações cruzadas intermoleculares são removidas pela ação do pH ácido de algumas soluções contendo ácido clorídrico ou acético. Essas moléculas de colágeno podem ser reconstituídas com propriedades semelhantes às das fibrilas nativas através do ajuste de pH ou temperatura da solução. O uso de enzimas que desfazem as ligações cruzadas adicionais e a suspensão ou dissolução das estruturas insolúveis em ácidos pode ser realizado sem causar maiores danos à estrutura das fibrilas. A estrutura em tripla-hélice é relativamente resistente às proteases (pronase[®], ficina ou pepsina) em temperaturas de aproximadamente 20°C.

A eficácia do tratamento enzimático depende da quebra das regiões que não formam a hélice nas extremidades da molécula e das ligações cruzadas próximas. O material resultante, chamado de atelocolágeno, tem removidas as regiões dos telopeptídeos que causam antigenicidade.

2.5 - COMPONENTES INORGÂNICOS

Arranjos altamente organizados de minerais são freqüentemente observados em outros organismos multicelulares, como os corais. A peculiar morfologia, tamanho e orientação cristalográfica destes minerais são decorrentes de mecanismos eletrostáticos, estruturais e estereoquímicos entre materiais orgânicos e inorgânicos. O osso humano é um bom exemplo, pois é composto de nanocristais de HA (material cerâmico) e Col I (polímero natural), ambos contribuindo para as propriedades mecânicas do osso (KIKUCHI *et al.*, 2001).

Os materiais cerâmicos abrangem uma grande variedade de substâncias naturais e sintéticas e possuem como característica sua constituição formada por metais e não-metais. A maior parte das fases cerâmicas é cristalina. Porém, ao contrário dos metais, suas estruturas cristalinas não apresentam um grande número de elétrons livres. Os elétrons estão sendo compartilhados por covalência ou são transferidos de um átomo para outro, formando ligações iônicas. As ligações iônicas conferem aos materiais cerâmicos uma estabilidade relativamente alta. De uma maneira geral, são também mais duros e resistentes às alterações químicas.

Com exceção de uns poucos materiais, os materiais cerâmicos possuem alta resistência ao cisalhamento e baixa resistência à tração. Conseqüentemente, eles não apresentam fratura dúctil. A ausência praticamente total de deslizamento de planos nas fases cerâmicas dos materiais tem muitas conseqüências: não apresentam ductilidade, podendo ser solicitados por tensões de compressão muito elevadas (desde que não possuam poros presentes) e, existe a possibilidade teórica de se ter um limite de resistência à tração elevado. Na prática, freqüentemente, o limite de resistência à tração não é alto. Qualquer tipo de irregularidade produz concentração de tensões no material (VAN VLACK, 1975).

Os fosfatos de cálcio podem ser classificados em grupos de acordo com sua razão Cálcio/Fósforo (Ca/P). Geralmente vários tipos de fosfatos de cálcio, com razões Ca/P variando entre 0,5 a 2,0, podem ser sintetizados misturando soluções de íons cálcio e fosfato em condições de pH controlados (AOKI, 1994).

As apatitas biológicas de ossos e dentes consistem basicamente em HA contendo algumas substituições iônicas em sua estrutura, geralmente formando HA carbonatada (razão Ca/P igual a 1,67) (AOKI, 1994). HA corresponde a 5% do peso corporal e confere aos ossos a característica de reservatório de ions cálcio e fosfato (fósforo). Sua deposição ou retirada é controlada por ação hormonal (item 2.2) A fórmula molecular da HA está representada abaixo:

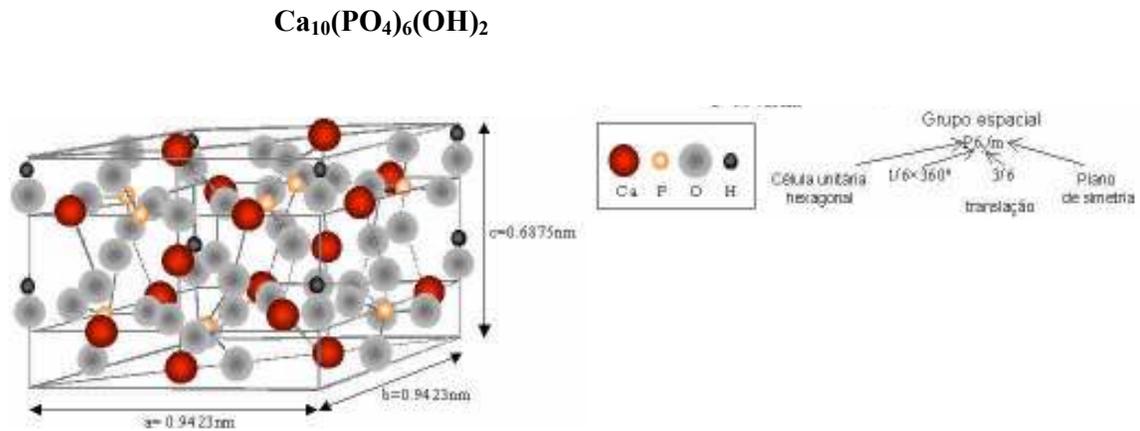


Figura 2.5 - Diagrama mostrando o arranjo atômico da hidroxiapatita (modificada de MCGREGOR, 1998).

A estrutura cristalina da HA foi determinada por NÁRAY-SZABÓ & MEHMEI independentemente em 1930. A HA possui estrutura hexagonal com as dimensões da célula unitária $a = b = 9,423$ e $c = 6,875$. O átomo de cálcio é rodeado por seis átomos de oxigênio ligados a grupos PO_4 e grupos OH^- . Os átomos de cálcio formam triângulos normais ao eixo c que giram mutuamente 60° ao longo desse eixo. Em compósitos HA-Col I, o eixo cristalográfico c dos cristais de HA tem o alinhamento preferencial paralelo à direção longitudinal das fibrilas de colágeno (KIKUCHI *et al.*, 2001; SIPERKO & LANDIS, 2001).

A HA é uma cerâmica bioativa comumente utilizada no organismo humano sob formas particuladas em vários sítios de reparo ósseo, no revestimento de próteses metálicas para o melhoramento de suas propriedades biológicas, e ainda como substrato para liberação controlada de drogas. HA é, termodinamicamente, o mais estável dos

fosfatos de cálcio em relação à mudanças de pH, temperatura e composição do fluido biológico.

2.5.1-SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO

Podemos variar as características do material final durante o processo de produção dos fosfatos de cálcio. A HA pode ser produzida por métodos aquosos e não-aquosos. Entre os processos aquosos podemos realizar precipitação, síntese hidrotérmica ou hidrólise a partir de outros fosfatos de cálcio e, entre os métodos não-aquosos, reação em fase sólida. Esta reação utiliza altas temperaturas por longo tempo e produz materiais geralmente estequiométricos, cristalinos e puros. No caso de precipitação em soluções aquosas, onde a temperatura não excede 100°C, pode-se preparar cristais de tamanhos nanométricos ou até milimétricos, dependendo das condições de síntese (ELLIOT, 1994; BOHNER, 2000).

Os principais métodos de produção de HA em meio aquoso são apresentados resumidamente a seguir (AOKI, 1994; RHEE *et al.*, 2001):

- a) Método de precipitação por titulação:



- b) Reação por precipitação:



- c) Biomimético:

São muito utilizados para recobrimento de superfícies metálicas através da precipitação de fosfatos de cálcio. São nomeados como biomiméticos por que as concentrações iônicas da solução são próximas às do plasma sanguíneo.

As estruturas cristalinas podem ser observadas em muitos materiais cerâmicos. Os materiais mais fortes e estáveis, geralmente, possuem estruturas tridimensionais com ligações fortes nas três direções. A complexidade e maior resistência das ligações tornam as reações cerâmicas mais lentas (VAN VLACK, 1975). Fases estáveis das cerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio dependem consideravelmente da temperatura

e da presença de água durante o processo de reparo no ambiente utilizado. À temperatura corporal, somente dois fosfatos de cálcio são estáveis quando em contato com fluidos do corpo. Em $\text{pH} < 4,2$, a fase estável é o $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato dicálcico ou bruxita; C_2P), enquanto em $\text{pH} > 4,2$ a fase estável é a $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hidroxiapatita). Em temperaturas mais altas, outras fases como o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -tricálcico fosfato; C_3P ou TCP) e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (Fosfato tetracálcico; C_4P) são presentes (RATNER *et al.*, 1996).

2.6 - BIOMATERIAIS

Os materiais utilizados no reparo ou substituição de órgãos não devem produzir substâncias tóxicas ou causar reações biológicas adversas. Vários materiais como metais, cerâmicas, polímeros e compósitos podem ser utilizados como biomateriais desde que não apresentem citotoxicidade, possuam resistência à corrosão e módulo de elasticidade e resistência mecânica compatíveis com seu uso (CALLISTER, 2000).

Além disso, um biomaterial deve apresentar biocompatibilidade e biofuncionabilidade. A biocompatibilidade está relacionada à compatibilidade entre o material utilizado e o ambiente biológico no qual deve permanecer e a biofuncionabilidade é o conjunto de propriedades que permitem ao material desempenhar sua função.

De acordo com VALLET-RÉGI (1997) os materiais biocompatíveis são classificados como biotoleráveis, bioinertes e bioativos. Todos os materiais bioinertes e biotoleráveis geram resposta imune e sofrem encapsulamento fibroso. A partir da classificação de SYKARAS *et al.* (2000), os materiais considerados bioativos permitem uma interação íntima entre o material implantado e o tecido vivo adjacente, sem nenhum encapsulamento fibroso. Assim permitem a formação de um novo osso em sua superfície e a troca iônica com o tecido hospedeiro.

Materiais para implantes metálicos têm um significativo impacto econômico e clínico no campo de biomateriais. Os metais e suas ligas são utilizados em implantes para a recuperação de fraturas, fixação interna, artroplastias, implantes dentários,

craniofaciais, cardiovasculares, entre outros. Entretanto, WAHL & CZENUSKA (2006) demonstraram que partículas de titânio atuam como supressoras da diferenciação osteogênica em células de medula óssea nos humanos, além de inibir a mineralização da matriz extracelular.

Os materiais poliméricos são constituídos por moléculas com longas cadeias formadas por repetições de unidades denominadas monômeros. A grande variedade de polímeros inclui os naturais e os sintéticos. Estes podem ser sintetizados em laboratório a partir de monômeros selecionados, em ambiente controlado. Porém a degradação de alguns polímeros pode induzir, local ou sistematicamente, reações que causam complicações clínicas. Por exemplo, a degradação de ácido lático (oriundo da degradação do poli-ácido lático) pode criar respostas celulares adversas no sítio do implante, reduzir o pH local e levar a uma reabsorção óssea pela ação de prostaglandinas (mediadores inflamatórios e de reabsorção óssea) (WAHL E CZENUSKA, 2006). Algumas cerâmicas e polímeros biotolerantes apresentam um comportamento que poderia levar ao aumento no risco de fraturas ou inibir uma futura regeneração óssea, respectivamente (KIKUCHI *et al.*, 2004).

Os materiais compósitos possuem grande sucesso porque unem as melhores propriedades dos componentes que o formam, sendo um material promissor na construção de novos biomateriais. Os compósitos podem apresentar uma boa osteocondutividade como a da HA (e outras cerâmicas). Excepcionalmente demonstram também boa integratividade ao formar lacunas de Howship no processo de reabsorção óssea com subsequente formação de novo osso pela atividade de osteoblastos periféricos ao local (KIKUCHI *et al.*, 2004).

2.6.1 – BIOMATERIAIS À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO

Os fosfatos de cálcio são utilizados como biomateriais para reparo de tecido ósseo desde o início do século XX. ALBEE & MORRISSON utilizaram fosfato tricálcico em 1920 numa primeira aplicação médica de biocerâmicas com sucesso. Em 1975, NERY *et al.* produziu a primeira aplicação dentária em animais com cerâmicas. A partir de inúmeros estudos, podemos trabalhar com fosfatos de cálcio com diferentes

características, variando sua composição, forma, propriedades físico-químicas e estrutura (LEGEROS, 2002).

Durante os últimos 50 anos, pesquisas em biocerâmicas como alumina, zircônia, hidroxiapatita, fosfato tricálcico e vidros bioativos contribuíram significativamente para o desenvolvimento da indústria de cuidados com a saúde e aumentou a qualidade de vida humana. Essas são as cerâmicas que podem ser utilizadas dentro do corpo sem causar rejeição ou danos ao sistema músculo-esquelético (KALITA *et al.*, 2006). Em um curto espaço de tempo as biocerâmicas obtiveram grande sucesso e foram encontradas aplicações em diferentes sítios como dentes, ossos do ouvido e em reparos de doenças periodontais.

Materiais cerâmicos apresentam expressiva contribuição aos implantes para regeneração óssea. Substitutos ósseos a partir de fosfatos de cálcio são biocompatíveis e osteocondutivos porque são formados por substâncias inorgânicas similares à fase inorgânica do osso. Entretanto, as cerâmicas são frágeis ($K_c \leq 1 \text{MPa.m}^{-1}$) e não apresentam sozinhas as propriedades mecânicas do osso cortical ($K_c \sim 2-12 \text{MPa.m}^{-1}$), dependendo, portanto, da habilidade de suportar o complexo estado de tensão local. Mesmo assim, fosfatos de cálcio são utilizados em áreas submetidas a, relativamente, baixas tensões ou como recobrimento de implantes metálicos.

HA sintética é uma das biocerâmicas mais utilizadas em aplicações médico-odontológicas por sua estrutura química e razão Ca/P similares à HA natural presentes nos ossos e dentes (TACHIBANA *et al.*, 2005). HA é considerada uma cerâmica bioativa porque possui a habilidade de ligar-se diretamente ao tecido ósseo sem nenhuma interface com camada de tecido mole (ROUABI *et al.*, 2006). Para uso clínico, os materiais cerâmicos não apresentam unicamente boa compatibilidade e osteointegrabilidade, mas também alta biodegradabilidade (UEMURA *et al.*, 2003).

Algumas aplicações requerem a biodegradação e substituição do material por novo tecido formado enquanto outras requerem a permanência do material no local de instalação. A partir disso, as características do material como porosidade e propriedades da superfície podem influenciar significativamente no processo de biodegradação. Complicações no desenvolvimento de biocerâmicas reabsorvíveis são (1) manutenção

da resistência e estabilidade da interface durante o período de degradação e substituição por tecido natural novo e (2) a razão de substituição para a razão de reparo dos tecidos do corpo (alguns materiais se dissolvem muito rapidamente ou muito lentamente).

A HA é solúvel em solução ácida, insolúvel em solução alcalina e ligeiramente solúvel em água destilada. A solubilidade da HA muda em presença de aminoácidos, proteínas, enzimas e outros componentes orgânicos. Entretanto, a taxa de solubilidade depende das diferentes morfologias, porosidades, tamanho dos cristais e cristalinidade (AOKI, 1994).

2.6.2 - COMPÓSITOS HA-COL I

Os tecidos calcificados, em nanoescala, são essencialmente materiais compósitos baseados nas fibras de Col I, o biopolímero mais abundante no corpo e um componente mineral, o fosfato de cálcio. A organização desse componente mineral com as fibras de colágeno permite a organização do sistema harvesiano, por exemplo, observada ao microscópio óptico. Muitas das funções fisiológicas e características mecânicas do osso são dependentes do tamanho dos mineralitos de apatita e sua relação espacial tridimensional com as moléculas de colágeno na matriz orgânica (KATZ *et al.*, 2007).

Materiais baseados somente em colágeno possuem propriedades mecânicas baixas em comparação ao osso ($E \sim 100\text{MPa}$; $E \sim 2\text{-}50\text{GPa}$, respectivamente). Isso pode ser melhorado aumentando as ligações cruzadas do material ou ainda produzindo compósitos como os de colágeno com glicosaminoglicanas, para regeneração em pele, ou Col I com HA, para regeneração óssea (WAHL E CZENUSKA, 2006).

Algumas desvantagens limitam o uso de biomateriais baseados somente em HA. O aumento da porosidade resultando na diminuição da resistência mecânica é um conflito que impede que formemos um material próximo ao ideal. A fim de minimizar esse problema, podemos adicionar à HA algum tipo de ligante como alginato, quitina ou colágeno (DU *et al.*, 2000).

HA e Col I são componentes naturais do osso e seu compósito mostra-se um promissor arcabouço na reação natural com o tecido ósseo. Muitas pesquisas têm como foco o desenvolvimento de compósitos HA-Col I. Entretanto os tecidos e materiais devem ser estudados a cada nível de organização: nano-, micro- e macroestrutura, nessa ordem, para se entender seu comportamento intrínseco e determinar o design apropriado para a aplicação do material compósito na engenharia de tecidos (KATZ *et al.*, 2007).

Um grande avanço na produção do compósito HA-Col I tem sido observado. Um aspecto fundamental, e que atualmente é conseguido, é a nucleação da HA dentro e sobre as fibras de Col I. Isso ocorre porque a formação da HA e polimerização das fibrilas de Col I acontecem simultaneamente (KANNAN *et al.*, 2001).

TENHUISEN *et al.* (1995) produziram compósitos de HA deficiente em cálcio microcristalina e Col a partir da reação ácido-base com CaHPO_4 com uma HA precursora. Verificou-se que a taxa de formação da HA aumenta à medida que a concentração de colágeno aumenta. BRADT *et al.* (1999) formaram fosfato de cálcio e polimerizaram fibrilas de colágeno concomitantemente na reação. KIKUCHI *et al.* (1999; 2001) produziram provavelmente os compósitos mais próximos à realidade estrutural da matriz óssea. Utilizaram soluções de Ca(OH)_2 e H_3PO_4 em concentrações que permitam formar compósitos com proporções em massa desejadas. Os autores obtiveram nanocristais de HA com seu eixo c alinhado ao longo das fibras de Col I através de sínteses sob pH 8-9 e a 40°C (KIKUCHI *et al.*, 1999; KIKUCHI *et al.*, 2001).

Atualmente os autores sintetizam nanocompósitos HA-Col I com estrutura similar à óssea num mecanismo de autorganização sob condições biomiméticas em relação ao próprio processo de ossificação natural.

O objetivo de se produzir esse compósito está relacionado, a médio prazo, em sua taxa de substituição por tecido novo formado. O interessante desses substitutos temporários é que eles permitem o suporte mecânico até o tecido regenerar-se e remodelar-se naturalmente. Podem ser implantados com células específicas no estágio desejado e com moléculas sinalizadoras a fim de maximizar o crescimento dos tecidos e, portanto, a velocidade do reparo. As razões de degradação e absorção desses implantes no corpo também podem ser controladas (WAHL & CZENUSKA, 2006).

Os biomateriais com interconectividade promovem uma rápida reconstrução óssea. Os arcabouços com arquitetura tri-dimensional permitem um crescimento ósseo acelerado, devido à rápida penetração das células, nervos e vasos sanguíneos em direção ao interior do material, o que resulta na manutenção da sua função biológica (YUNOKI *et al.*, 2006). Em uma larga variedade de sistemas de cultivo celular *in vitro*, a adesão ao substrato, a qualidade da MEC formada, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) - levando oxigênio e recolhendo excretas das células - e de novos nervos são fundamentais para a estabilização do modelo de cultivo celular na matriz produzida em laboratório.

2.7 - BIOENGENHARIA TECIDUAL

Nos recentes anos uma grande explosão de tecnologia em engenharia de tecidos vem ampliando as pesquisas no uso de diferentes e novos arcabouços ou matrizes biológicas. Um dos muitos objetivos da engenharia de tecido ósseo é criar um substituto com propriedades mecânicas e biológicas semelhantes ao do osso natural.

Um material para ser empregado na engenharia de tecidos dentro dos organismos vivos deve possuir baixa citotoxicidade; propriedades mecânicas semelhantes ao tecido originalmente substituído; porosidade que permita a neo-vascularização e colonização de novas células; baixa imunogenicidade; bioatividade e biodegradabilidade.

Tipicamente, a engenharia de tecidos visa criar matrizes ou arcabouços acelularizados, com inoculação de células *in vitro* ou inoculação de células posterior à implantação no organismo (VERNON *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* indicam que as respostas celulares quando em contato com os materiais artificiais são básicas para se conhecer a dinâmica da interação entre o implante e o tecido vivo participante. Por apresentarem estruturas vivas, os estudos de determinadas interações celulares com os diversos materiais possuem alguns inconvenientes, como o envolvimento de muitos e simultâneos parâmetros, os quais alguns não podem ser completamente controlados (ANSELME & BIGERELLE, 2006).

O autêntico substrato para a maioria das células que vivem no organismo é sua própria matriz extracelular (MEC), que possui composição molecular e dinâmica fisiológica complexas. A adesão célula-matriz é mediada por respostas fisiológicas à regulação de fatores de crescimento, migração, diferenciação, organização tecidual e processo de remodelação da matriz. Portanto, o novo biomaterial deve conter propriedades e características que cheguem o mais próximo da estrutura natural (CUKIERMAN *et al.*, 2002)

Os efeitos da composição dos materiais, assim como sua topografia e química de superfície, na adesão e proliferação celular são atualmente amplamente estudados em testes *in vitro* com células de linhagem óssea. O que se tem demonstrado é que a composição do material sempre influencia o processo de adesão celular (ANSELME & BIGERELLE, 2006). O processo de adesão envolve vários fenômenos naturais mesmo quando estamos observando a integração com um biomaterial. A biocompatibilidade dos biomateriais segue uma relação particularmente estreita com o ambiente de contato e a adesão das células na superfície.

O reconhecimento, adesão e espraiamento da célula serão iniciados a partir dos primeiros contatos célula/material e, a qualidade desse primeiro contato, terá influência para a capacidade proliferativa e de diferenciação dessas células em contato com o enxerto (ANSELME, 2000).

Para células que necessitam de ancoragem, a adesão é um pré-requisito para as subseqüentes funções celulares ligadas, entre outras atividades, à síntese de proteínas. Mecanismos de adesão mediados por proteínas envolvem interações de receptores da membrana celular – integrinas - com domínios específicos das proteínas da MEC contendo seqüência de peptídeos, chamada RGD (Glicina – Arginina - Asparagina (Gly-Arg-Asp)) (BER *et al.*, 2005). A construção de uma matriz interconectada é necessária não apenas para ancoragem, mas também para suportar a proliferação celular e manter sua função de diferenciação em um segundo momento. Esta arquitetura da matriz, assim como as moléculas envolvidas, define os tipos celulares do novo osso e cartilagem adjacente (HUTMACHER, 2000). A cultura de células com capacidade osteogênica

(contendo ácido ascórbico, β -glicero-fosfato, e dexametasona) diferencia os osteoblastos e formam nódulos ósseos mineralizados *in vitro* (KIHARA *et al.*, 2006).

O transplante de osteoblastos do próprio paciente expandidos em cultura é uma boa alternativa para um candidato ao tratamento de regeneração óssea. Primeiramente desenvolvido por BRUDER *et al.* (1997), esta técnica foi aplicada a pacientes que perderam grandes porções do osso por tumores ósseos. O procedimento é a utilização de células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea expandidas em cultura. A diferenciação osteogênica da cultura de células estromais medulares na superfície de biomateriais tem sido satisfatoriamente demonstrada com bons resultados (BEREILLE *et al.*, 2000).

BEREILLE *et al.* (2000) demonstraram que, em estudos utilizando HA porosa e células precursoras osteogênicas humanas, as células exibiram morfologia da linhagem osteoblástica e uma proliferação similar às observadas em culturas confluentes. Técnicas imunológicas demonstraram que estas células exibiam características osteoblásticas (atividade de fosfatase alcalina e síntese de Col I, entre outras). Provavelmente, o contato com o material induziu quimicamente as respostas observadas nos experimentos.

2.8 - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA

2.8.1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) utiliza, como meio de formação da imagem, um feixe de elétrons oriundo de um filamento de tungstênio. O feixe é acelerado através de uma diferença de potencial. Durante todo o caminho dos elétrons, que é feito em ambiente controlado a vácuo (933-1333Pa), o feixe eletrônico atravessa um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas, incidindo na câmara que contém a amostra, varrendo sua superfície (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Nessa interação feixe eletrônico-amostra, são emitidos sinais que devem ser detectados e amplificados de maneira segura, com a menor perda possível de informação. Os sinais são emitidos na forma de elétrons secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados, entre outros, e de fótons. A captura dos sinais é realizada através da interação com detectores apropriados, sendo amplificados e processados em um sistema analisador específico para cada tipo de sinal.

A MEV permite a captação de imagens amplificadas com aparência tridimensionais e que apresentam resoluções de até 0,5nm com excelente profundidade de foco. Muitas imagens biológicas podem ser adquiridas por esse método. Porém, a utilização de um tratamento prévio é essencial para obtenção de resultados semelhantes à realidade.

Para amostras biológicas serem observadas na MEV, deve ser realizada uma fixação anterior com agentes fixadores recomendados pela literatura (HADDAD *et al.*, 2007). O agente fixador garantirá a integridade da amostra até a observação no microscópio eletrônico de varredura. Após a fixação da amostra, segue a desidratação do material e secagem em aparelho de ponto crítico. Esse aparelho tem como princípio a transformação da fase líquida para a fase gasosa do CO₂ sem causar danos à estrutura física do material.

Materiais não-condutivos observados em MEV são tipicamente recobertos por uma fina camada de metal para minimizar o acúmulo de carga negativa do feixe atômico. As amostras biológicas secas ainda devem passar por um processo de metalização para se tornarem condutoras e melhorarem a emissão dos sinais na câmara que comporta a amostra. Microscópios ambientais ou de baixo vácuo dispensam a metalização e permitem a observação de amostras com diferentes níveis de umidade.

2.8.1.1 - ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA

A técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) é muito utilizada conjuntamente ao MEV devido à disponibilidade de ambos os equipamentos serem montados juntos. Utilizando os dois métodos, não apenas a aquisição da imagem da amostra pode ser obtida, mas também informações químicas em áreas da ordem de micrômetros.

As informações qualitativas e quantitativas sobre os elementos presentes são obtidas pela captação dos raios-X característicos resultantes da interação do feixe primário com a amostra. A análise química da amostra é dada em um espectro criado a partir da energia dos raios-X detectados e é convertida em contagem eletrônica através de um analisador multicanal. O espectro pode então ser observado, indicando a composição química da amostra.

2.8.2 - DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Raios-X são radiações eletromagnéticas de curto comprimento de onda produzida pela desaceleração de elétrons de alta energia ou pela transição eletrônica envolvendo elétrons nos orbitais internos dos átomos. A faixa de comprimento de onda coberta pelos raios-X varia de aproximadamente 10^{-5} a 100 ângstroms aproximadamente.

Para utilizar essa técnica, um gerador de raios X é essencial. Uma fonte de feixe de elétrons acelerados, a partir de uma diferença de potencial, colide com um alvo metálico provocando a emissão dos raios-X. Essa emissão ocorre a partir de um

fenômeno de decaimento de elétrons da camada mais externa para a mais interna, devido a remoção destes, nos átomos que compõe o alvo. Os raios-X alcançam o material de observação e, ocorrendo interferência construtiva entre os raios difratados, é observada a difração (RATNER *et al.*, 1996).

Os raios-X são gerados quando uma partícula de alta energia cinética é rapidamente desacelerada. Os métodos mais utilizados são (1) o bombardeamento de um alvo metálico ou de uma substância com um feixe de elétrons de alta energia ou (2) pelo emprego de uma fonte radioativa que, durante seu processo de decaimento, gera raios-X. O fenômeno da difração ocorre quando há mudança de uma onda por centros de espalhamento cujos espaçamentos são aproximadamente do mesmo tamanho do comprimento de onda da radiação.

Se o comprimento de onda da radiação for da ordem de 0,1nm, a passagem pelos planos atômicos de cristais de uma amostra, com espaçamento conhecido, gera o fenômeno de difração. Desta forma é possível a caracterização da estrutura cristalina de um material através da difração de raios-X (DRX).

Esta condição será satisfeita quando a diferença do comprimento dos caminhos entre os raios X adjacentes for igual a um número inteiro (n) de comprimento de onda (λ). A relação que demonstra esta condição é a equação de Bragg:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\theta$$

onde d é o espaço interplanar e θ é o ângulo de espalhamento.

A técnica de DRX é importante porque permite identificar as fases cristalinas de um material observado. Considerando que os materiais possuem arranjos cristalinos únicos que permitem sua interpretação e identificação, a DRX pode ser empregada para determinar a constituição das fases, tamanho de cristalitos, orientação preferencial dos cristais, entre outras características.

2.8.3 - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada há 40 anos devido a sua abrangente serventia em diversas áreas como engenharia de materiais, física, química, ciências biológicas e biomédicas. Sua análises permitem observar moléculas orgânicas e inorgânicas na faixa de número de onda de 4.000 a 400cm^{-1} . Essa técnica produz informações sobre a vibração das unidades atômicas e moleculares. É um método analítico padronizado que pode revelar informações químicas e da orientação das estruturas. A espectroscopia de infravermelho é aplicada para análises qualitativas e semi-quantitativas.

Todos os corpos com temperatura acima do zero absoluto irradiam no infravermelho, ainda que com intensidade reduzida. Para que haja absorção da radiação no infravermelho, uma molécula deve sofrer uma mudança no momento dipolo, como uma consequência de sua movimentação vibracional ou rotacional. Os momentos dipolo são criados pela distribuição das cargas nas moléculas e grupamentos químicos presentes nestas. Como as moléculas vibram e possuem momento dipolo, um campo é estabelecido e este pode interagir com o campo elétrico associado à radiação.

A absorção de radiações eletromagnéticas por átomos ou moléculas exige que elas tenham energia apropriada e que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia. Essa transferência está relacionada aos dipolos oscilatórios interagindo com o campo elétrico oscilatório da radiação infravermelha, dependendo da frequência.

Quando a radiação na região do infravermelho é direcionada para a superfície da amostra sólida, podem ocorrer dois tipos de energia refletida. Uma é a refletância especular (que é a energia não absorvida pela amostra) e a outra é a refletância difusa (que é a energia que penetra dentro da amostra e, em seguida, emerge). A amostra é normalmente granulada e misturada a um material, brometo de potássio (KBr), que atua como matriz não-absorvente, diluindo-a (10% a 5% em peso). Através disso, aumenta-se a proporção do feixe de infravermelho que é refletido de forma difusa pelo material.

A utilização de espectrômetros de infravermelho operando com adição de interferômetros permite a análise de um espectro inteiro, acelerando o processo de aquisição destes. Usando espectrômetros de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) pode-se obter uma grande melhora na razão sinal/ruído e na acurácia espectral.

2.8.4 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica (AFM) possui como princípio de funcionamento a interação da superfície da amostra com uma ponteira (ou sonda). Este microscópio pode ser operado em diversos modos, e, como consequência, pode medir a força de interação da ponteira com a superfície da amostra, força magnética, força de imersão, força de fricção e força eletrostática, entre outras.

A ponteira utilizada é acoplada a um suporte e as deflexões desse suporte são medidas ao longo da utilização do equipamento. A extremidade livre desse suporte recebe a emissão de laser que, de acordo com a topografia da superfície da amostra, apresenta as deflexões a serem medidas. As deflexões da ponteira, assim como a movimentação da cerâmica piezoelétrica (base do porta-amostra), são passadas para um detector que transforma as informações obtidas em um sistema eletrônico que permite a formação das imagens.

O microscópio de força atômica pode operar nos modos: contato, não-contato e contato intermitente. A escolha do melhor modo é estabelecida de acordo com a composição química da amostra, tipo e geometria da ponteira, presença de contaminantes, ambiente em que a amostra está embebida (seco ou úmido), entre outros fatores.

Quando operado no modo não-contato, a separação entre a ponteira e a superfície da amostra é da ordem de 10-100nm, e as forças como de Van der Waals, eletrostáticas, magnéticas, capilares e outras, podem ser medidas e fornecerem informações sobre a amostra. No modo contato intermitente, a ponteira toca a superfície da amostra em uma frequência determinada. Com separações menores a 10-100nm (da

ordem de \AA) a ponteira está em contato com a superfície da amostra, sendo utilizado então o modo contato.

3- OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Preparar um protocolo de extração de colágeno tipo I (Col I). Produzir e caracterizar compósitos HA-Col I para uso como enxerto ósseo.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Extração de Col I com o uso de duas soluções ácidas (ácido acético e ácido fosfórico).
- b) Produção de compósitos HA-Col I empregando planejamento fatorial com 3 variáveis (solução de extração do colágeno; fonte de íons cálcio e tempo de digestão) em dois níveis cada.
- c) Avaliação do efeito da precipitação salina e glutaraldeído (GTA) em sínteses selecionadas.
- d) Observação do comportamento do compósito em cultura.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - COLÁGENO

O protocolo de extração desenvolvido visou a obtenção de uma solução ácida de fibrilas de colágeno oriundos de tendão de pata bovina. A utilização do colágeno em uma solução de fibrilas dissociadas proporciona uma interação mais efetiva entre a molécula de colágeno e a fase mineral formada, em comparação com outras formas de uso como mantas ou blocos cilíndricos (Sena, 2003). Os tendões bovinos foram obtidos ainda frescos e utilizados em uma única extração a fim de evitar o congelamento da peça ou uma possível desnaturação da proteína.

Assim que foram coletados, os tendões foram lavados em água corrente e destilada, cortados em cubos de 1mm^3 e mantidos em álcool 70% por 1 hora. Após esse tempo, os fragmentos foram separados em duas porções e adicionados às soluções previamente preparadas.

A solução de ácido acético 1M para a dissociação das fibras de colágeno tipo I (Col I) é vastamente utilizada. Entretanto, ao final do processo de extração das fibrilas de Col I, estas devem ser passadas à uma solução de ácido fosfórico 59,32mM para o início do processo de produção dos compósitos hidroxiapatita-colágeno tipo I (HA-Col I). Portanto ambas as soluções foram escolhidas para a extração das fibrilas de Col I a fim de otimizar o processo total de produção dos compósitos HA-Col I.

Soluções aquosas de ácido acético 1M (ácido acético glacial, MERCK) e ácido fosfórico 59,32mM (ácido ortofosfórico, MERCK) foram preparadas com água destilada e a temperatura ajustada para 29°C . De acordo com as massas de cada porção, foram calculadas as massas de pepsina (pepsina extraída de mucosa suína, SIGMA) a serem adicionadas às soluções numa razão de 10%(em peso). As soluções, com os fragmentos, foram agitadas durante 24 horas e a temperatura foi mantida em 29°C a fim de garantir total ação enzimática.

As soluções obtidas após a dissociação completa dos fragmentos foram colocadas em tubos de 50ml e centrifugadas a 2000G por 3 horas (EPPENDORF, CENTRIFUGE 5810R) para a total limpeza do material. Os sobrenadantes foram recolhidos e os materiais restantes no fundo dos tubos foram descartados.

Alguns autores afirmam que a etapa de precipitação salina é importante para a separação das fibrilas de Col I do conteúdo orgânico total presente no tendão. Uma solução de NaCl 20% foi adicionada causando a precipitação das fibrilas de colágeno nas soluções. Novamente as soluções foram centrifugadas a 2000G por 3 horas. Desta vez, os sobrenadantes foram descartados e os materiais restantes no fundo dos tubos foram recolhidos.

Os materiais recolhidos foram, separadamente, redissolvidos em soluções de ácido fosfórico 59,32mM e mantidos a 4°C até sua utilização.

Amostras duplicatas de 5 ml foram separadas e secas por liofilização a fim de se obter a concentração das soluções. Entretanto, o comportamento da solução de Col I extraída em solução aquosa de ácido fosfórico 59,32mM não permitiu a obtenção da concentração por esse método. Amostras duplicatas de 5ml das soluções foram recolhidas e mantidas em estufa a 100°C por 3 dias para a obtenção dos valores de concentração.

O produto da liofilização da solução contendo fibrilas de Col I extraídas previamente em solução aquosa de ácido acético 1M, foi analisado por FTIR (NICOLET, MagnaIR-760), para identificação de grupamentos químicos das fases inorgânica e orgânica, e MEV (ZEISS, DMS 940A) para avaliação de sua morfologia.

Na segunda fase desse trabalho, as fibrilas de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M com precipitação salina foram lavadas extensivamente em água destilada para a retirada dos cristais de NaCl aderidos à superfície das fibrilas. Após as lavagens, o solvente foi trocado para solução de ácido fosfórico 59,32mM para o início da produção dos compósitos.

4.2 - PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS HA-COL I

A produção dos materiais compósitos seguiu o protocolo descrito por SENA (2004). Objetivou-se compósitos com fase orgânica (colágeno tipo I – Col I) e fase inorgânica (hidroxiapatita - HA) na proporção 50:50 (em peso). O cálculo das concentrações dos reagentes utilizados está relacionado com a razão entre as fases e foi baseado em trabalhos desenvolvidos por KIKUCHI *et al.* (2001). Entretanto, algumas variáveis foram selecionadas e seus níveis combinados de acordo com o planejamento fatorial apresentado na Tabela 4.1. A tabela 4.2 apresenta as combinações dos níveis das variáveis na produção dos compósitos.

As variáveis selecionadas foram: solução de extração das fibrilas de Col I; solução fonte de íons cálcio e tempo de envelhecimento do material. Os níveis das variáveis estão apresentados a seguir e as sínteses foram replicadas (1/1a – 8/8a). O planejamento fatorial permite a observação da significância dos efeitos de cada variável e, até mesmo, das combinações entre as variáveis na variável resposta.

Variável 1: solução de extração das fibrilas de colágeno tipo I

Níveis:

1. solução ácido acético 1M (CA) ----- -
2. solução ácido fosfórico 59,32mM (CF)----- +

Variável 2: solução fonte de íons cálcio

Níveis:

1. solução hidróxido de cálcio (HC) ---- -
2. solução nitrato de cálcio (NC) ----- +

Variável 3: tempo de envelhecimento do material após gotejamento

Níveis:

1. 0 hora (0h)---- -
2. 3 horas (3h) ----- +

Tabela 4.1 - Planejamento fatorial 2^k da produção de compósitos HA-Col I.

Sínteses	Variável 1	Variável 2	Variável 3
1 / 1a	-1	-1	-1
2 / 2a	+1	-1	-1
3 / 3a	-1	+1	-1
4 / 4a	+1	+1	-1
5 / 5a	-1	-1	+1
6 / 6a	+1	-1	+1
7 / 7a	-1	+1	+1
8 / 8a	+1	+1	+1

Tabela 4.2 - Legenda das combinações realizadas entre os níveis das variáveis na produção de compósitos HA-Col I.

Sínteses	Legenda
1 / 1a	CA + HC + 0h
2 / 2a	CF + HC + 0h
3 / 3a	CA + NC + 0h
4 / 4a	CF + NC + 0h
5 / 5a	CA + HC + 3h
6 / 6a	CF + HC + 3h
7 / 7a	CA + NC + 3h
8 / 8a	CF + NC + 3h

Na preparação dos compósitos, duas soluções foram gotejadas, com o auxílio de bombas peristálticas, em um becher contendo, previamente, 25ml de água destilada (Figura 4.1). A solução contendo ácido fosfórico 59,32mM com fibrilas de Col I anteriormente precipitadas e redissociadas foi mantida em temperatura ambiente. No início da síntese e durante seu decorrer, a temperatura e o pH foram ajustados para 38°C e 9, respectivamente. De acordo com KIKUCHI *et al.* (2004a), estes seriam a temperatura e pH ótimos para o máximo de nucleação e crescimento de cristais de HA nas fibrilas de Col I em polimerização. O pH foi ajustado e mantido através do gotejamento de NH_4OH concentrada (hidróxido de amônio P.A., MERCK). Nas

sínteses com tempo de digestão de 3 horas, as condições de síntese foram mantidas até o final do experimento.



Figura 4.1 – Produção do compósito HA-Col I no Laboratório de Biomateriais (PEMM/COPPE).

Os produtos das sínteses foram mantidos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 24 horas para ajuste do pH próximo ao fisiológico (pH=7,4). Os materiais foram liofilizados em formas cilíndricas e amostras foram separadas para análises Difração de Raios-X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para sua caracterização.

Em adição, sínteses controle foram realizadas com o objetivo de se avaliar separadamente a fase mineral dos produtos obtidos. As condições das sínteses foram mantidas e produtos formados unicamente pelos precipitados, sem a presença das fibrilas de Col I, foram obtidos de acordo com os níveis das variáveis. Esse material também foi analisado por DRX e FTIR.

Para as análises de DRX um difratômetro de pó (BRUKER, D8Focus) operando com radiação $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54$ foi utilizado. As condições foram: 33kV, 50mA,

incremento 0,02 no intervalo de 5 a 60 graus por 5s. Os DRXs foram comparados com os padrões disponíveis no banco de dados ICDD (International Center for Diffraction Data, antigo JCPDS – Joint Committee of Powder Diffraction Standards) da ASTM para os vários fosfatos de cálcio.

Para o refinamento dos difratogramas foi utilizado o programa FullProf. Uma estrutura padrão obtida no banco de dados do ICSD foi utilizada. Foram refinados o fator de escala, o zero, ruído de fundo, U V W (fórmula de Cagliotti) além de outros parâmetros como: as posições atômicas dos átomos, ocupação, parâmetros de rede, etc. A função utilizada para ajustar os difratogramas gerados pelas amostras foi a pseudo-Voigt modificada por Thompson.

4.3 - TRATAMENTOS “PÓS-SÍNTESES”

Para a realização da fase II deste trabalho foi selecionado o compósito proveniente da combinação de níveis das variáveis que apresentou os resultados mais satisfatórios nas análises realizadas. Somente a partir dessa escolha, uma nova etapa deste trabalho pode seguir adiante. Nesta nova etapa, o interesse principal foi otimizar o as propriedades do compósito para seu futuro uso em bioengenharia tecidual.

Duas novas variáveis foram escolhidas e observadas: a presença da etapa de precipitação salina e o uso de glutaraldeído (GTA) como agente de ligação cruzada. A precipitação salina é importante para garantir a extração total das fibrilas de Col I, porém pode causar um ambiente hipersalino (hipertônico) quando em contato com as células, levando-as, provavelmente, ao fenômeno de apoptose (morte celular programada).

O contato com GTA tende a formar ligações cruzadas que são importantes no processo de reestruturação do tecido ósseo durante o tempo em cultivo celular e posterior aplicação no sítio da lesão. Porém sua citotoxicidade é conhecidamente alta quando em contato com células e tecidos. Em razão disto, foi realizado um teste de citotoxicidade (ISO 10993-3) nos compósitos que entraram em contato com esse agente químico.

Novas sínteses foram realizadas com soluções de Col I extraídos em solução de ácido acético 1M com e sem precipitação salina. As condições foram mantidas ao longo de todo o experimento e os produtos liofilizados. Amostras foram selecionadas para análises em DRX e FTIR. Para obtenção de imagens de MEV, as amostras foram fixadas, desidratadas, secas em aparelho de ponto crítico de CO₂ (BAL-TEC CPD 030) e cobertas por uma camada de ouro.

Para a amostra de Col I extraído em solução de ácido acético 1M sem precipitação salina, a substituição do solvente para solução de ácido fosfórico 59,32mM foi realizada através de diálise. Trocas foram feitas 2 vezes por três dias para garantir a total substituição do solvente anterior.

Adicionalmente, as soluções contendo fibrilas de Col I sem e com precipitação salina foram observadas por AFM (ACCUREX). As soluções foram gotejadas em lamínulas, fixadas, desidratadas e secas no aparelho de ponto crítico de CO₂. Os resultados foram obtidos em modo de contato intermitente e usou-se ponteira NSC14/AIBS. Foram realizadas imagens de 8 campos selecionados aleatoriamente para a medição da largura das fibrilas de Col I em ambas as soluções.

A formação de ligações cruzadas foi realizada nos compósitos liofilizados com a adição de uma solução de GTA 0,25% em PBS por 2 horas. Aos compósitos do grupo controle, foi adicionada solução de PBS. Após o período, os compósitos foram lavados com PBS sucessivamente e extensivamente para retirada total de resíduos de GTA. Esse material foi utilizado para o ensaio de durabilidade em cultura e no teste de citotoxicidade.

4.3.1 - ENSAIO DE DURABILIDADE EM AMBIENTE DE CULTURA DE CÉLULAS

O comportamento dos compósitos produzidos de acordo com o tópico 4.3 foi observado em ambiente de cultura de células. Os compósitos mantidos em PBS foram colocados em placas de cultivo e imersos em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os compósitos foram mantidos por 3 e 7 dias em estufa úmida a

37°C e 5% de CO₂. Após os tempos selecionados, os compósitos foram fixados, desidratados, secos em aparelho de ponto crítico de CO₂, cobertos com uma camada de ouro e observados em MEV.

4.3.2 - TESTE DE CITOTOXICIDADE

A análise de citotoxicidade dos compósitos é importante para a futura aplicação destes materiais em cultura de células, ou até mesmo, dentro do organismo. Esta análise permite avaliar o efeito do glutaraldeído (GTA) como agente de ligação cruzadas resultando em respostas satisfatórias ou não à viabilidade celular.

A citotoxicidade dos materiais foi determinada utilizando a norma ISO 10993-3, como descrito por TAKAMORI (2004), que realizou o experimento numa densidade celular mínima da ordem de 10⁴ células/cm², com o objetivo de utilizar as culturas semeadas em placas de 24 poços.

Após tratamento com GTA, os compósitos foram lavados com PBS sucessivamente e extensivamente para retirada total de possíveis resíduos de GTA. Também foi realizado um grupo controle. As amostras foram mantidas em PBS e as análises foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia, Biomateriais e Mineralização Biológica (Departamento de Biologia, Universidade Federal Fluminense, UFF) sob a supervisão do prof. Dr. José Mauro Granjeiro.

Fibroblastos de camundongos da linhagem Balb/c 3T3 (clone A31) na passagem 11, foram cultivados, em densidade de 30.000 células/ml (1ml/poço), em placas de 24 poços contendo meio de cultura (Meio Dulbecco MEM/ Nutriente HAMF-12-DMEM). As amostras foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida, com composição de 95% de ar e 5% de CO₂ por 24 horas.

Amostras sem precipitação e sem tratamento com GTA (SPSG), sem precipitação e com tratamento com GTA (SPCG), com precipitação e sem tratamento com GTA (CPSG) e com precipitação e com tratamento com GTA (CPCG), foram avaliadas em triplicatas e durante todo o teste procurou-se não saber qual material

estava sendo testado a fim de manter a imparcialidade. Realizou-se a obtenção e extrato pelo método indireto de grânulos imersos em DMEM sem soro por 24 horas armazenados em estufa de CO₂.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.1.1 – COLÁGENO

Os espectros de infravermelhos (FTIR) (Figura 5.1) das amostras de colágeno tipo I (Col I) extraído em solução de ácido acético 1M sem precipitação salina (SPS) e com precipitação salina (CPS) exibem bandas características da proteína. A presença das bandas 1658cm^{-1} (amida I), 1540cm^{-1} (amida II; N-H) e 1450cm^{-1} (amida III; C-N) indicam que a composição das cadeias polipeptídicas presentes nas fibras de Col I foram mantidas. Também podemos notar a presença da banda 1450cm^{-1} dos anéis pirrolidínicos do aminoácido prolina (hidroxiprolina), muito abundante nas fibras colágenas, e da banda 1330cm^{-1} correspondente ao estiramento assimétrico dos grupos carboxila dissociados ($-\text{COO}^-$) (ZHAI *et al.*, 2005; KIKUCHI *et al.*, 1999).

Os colágenos também apresentam bandas 1046cm^{-1} e 1086cm^{-1} relacionadas aos grupamentos fosfatos (PO_4^{3-}). As bandas 1237cm^{-1} , 1657cm^{-1} , 3082cm^{-1} e 3327cm^{-1} , apresentadas pelo espectro do Col I SPS, estão de acordo com os encontrados por JIANG *et al.* (2005). FIGUEIRÓ *et al.* (2006) afirma que mudanças conformacionais e de cargas podem levar a modificações nos espectros e vibrações das bandas de FTIR, o que explicaria a ausência das bandas no espectro da amostra tratada CPS.

Alguns autores (GENTLEMAN *et al.*, 2003; LIN & LIU, 2005; FIGUEIRÓ *et al.*, 2006) realizam o processo de tratamento com precipitação salina a fim de separar as fibrilas de Col I de outras substâncias orgânicas (proteoglicanas, glicosaminoglicanas, outros tipos de colágeno, células) presentes nas matérias-primas utilizadas. Para separar Col I solubilizado, WAHL & CZERNUSZKA ((2006) indicam o uso de sais neutros (NaCl), solventes ácidos (tampão citrato), tratamento com álcali (hidróxido de sódio ou sulfato de sódio) ou enzimas como pepsina e quimotripsina.

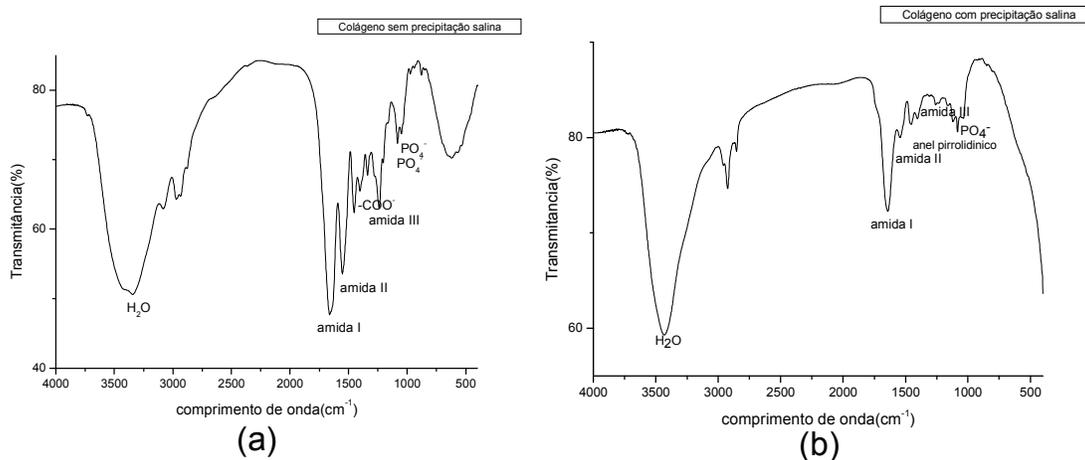


Figura 5.1 - Espectros de FTIR de Col I extraído em solução de ácido acético 1M: (a) SPS; (b) CPS.

O processo de precipitação salina provoca a interação das fibrilas de Col I com íons sódio (Na^{+1}) e cloro (Cl^{-1}) em solução. À medida que a solução salina é adicionada, verifica-se a agregação das fibrilas que, provavelmente, é provocada por ligações químicas catalisadas por esses íons. A superfície das fibrilas de Col I possui cargas positivas e negativas que interagiriam com esses íons. Essas cargas da superfície são oriundas dos resíduos aminoácidos que formam as próprias cadeias polipeptídicas (LANDIS & SILVER, 2002).

De acordo com KIKUCHI *et al.* (2001) os íons neutralizariam a superfície das fibrilas de Col I. A superfície neutra do colágeno também promove a fibrilogênese da proteína.

Não foi possível a análise de Col I extraído em solução de ácido fosfórico 59,32mM por espectro de FTIR devido à rápida rehidratação do material liofilizado.

5.1.2 - HIDROXIAPATITA

A figura 5.2 mostra o FTIR e DRX do precipitado formado na ausência de Col I. O espectro FTIR (figura 5.8 (a)) mostra as bandas na região $500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ característica de PO_4^{3-} como: 560 cm^{-1} e 604 cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_4), 961 cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_1), 1030 cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_3), além das bandas 873 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} que estão

relacionadas à substituição CO_3^{2-} no sítio B (ZHAI *et al.*, 2005; SCHARNWEBER *et al.*, 2004; SLÓSARCZYK *et al.*, 2005). O DRX apresenta picos característicos de HA como: 25.90° , 31.7° e 45.4° , de acordo com a ficha 86.1199 do JCPDS). O difratograma da HA sem a presença da proteína apresenta picos melhor definidos que os apresentados pelos compósitos HA-Col I.

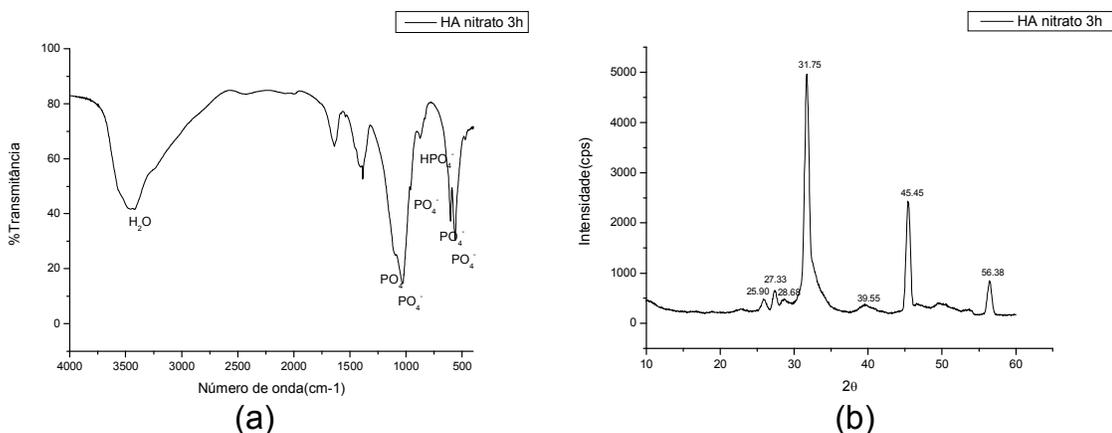


Figura 5.2 – (a) Espectros de FTIR e (b) DRX da amostra controle de HA produzida a partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e envelhecida por 3 horas nas mesmas condições das sínteses.

A partir da análise por FTIR e DRX, foi selecionada a síntese que apresentou os melhores resultados na incorporação da fase mineral sobre as fibras de Col I. Dentre as variáveis e seus níveis, o compósito produzido a partir de fibrilas de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M CPS, utilizando como fonte de cálcio a solução de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) e três horas de envelhecimento, apresentou bandas de FTIR, picos de DRX e diagrama de Rietveld característicos de compósitos HA-Col I. Além disso, os índices de refinamento das fases são os mais próximos aos dados da literatura (KIKUCHI *et al.*, 2001; KIKUCHI *et al.*, 2004a; LEGEROS, 1994).

5.1.3 – COMPÓSITOS HA-COL I

As figuras 5.3 e 5.4 apresentam espectros de FTIR de compósitos produzidos com Col I extraído em solução de ácido acético CPS e solução de ácido fosfórico CPS, respectivamente.

Similar aos resultados obtidos por KIKUCHI *et al.* (2001), as sínteses de hidroxiapatita (HA) em solução de colágeno (Col I) em temperatura e pH iguais a 38°C e 9, respectivamente, apresentam boas condições para a auto-organização dos constituintes no meio reacional. Além disso, dados da literatura afirmam que formação de nanocristais de HA é estável em pH 8-9. Nestas condições é promovido o acúmulo de íons Ca^{2+} , primeira fase da nucleação de HA, nos grupos carboxila da superfície de Col I.

Foram observadas as seguintes bandas relacionadas à proteína Col I: 1540cm^{-1} (amida II), 1240cm^{-1} (amida III); 1450cm^{-1} (anéis pirrolidínicos da prolina) e 1330cm^{-1} correspondente ao grupamento carboxila ($-\text{COO}^-$) (ZHAI *et al.*, 2005; FIGUEIRÓ *et al.*, 2006; KIKUCHI *et al.*, 1999). Essa última banda, em comparação ao espectro de Col I sem deposição mineral, é menos intensa devido à ligação química entre os íons Ca^{2+} da HA com os grupamentos $-\text{COO}^-$ do Col I.

Todos os compósitos produzidos a partir das sínteses planejadas exibem, em seus espectros de FTIR (Figura 5.3 e 5.4) bandas características da proteína e grupamentos fosfato (PO_4^{3-}) e carbonato (CO_3^{2-}). As bandas características de PO_4^{3-} , 473cm^{-1} , 560cm^{-1} e 604cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_4), 961cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_1), 1030cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_3) indicam a formação de HA (ZHAI *et al.*, 2005; SCHARNWEBER *et al.*, 2004; SLÓŠARCZYK *et al.*, 2005).

As bandas 1550cm^{-1} , 1420cm^{-1} (CO_3^{2-} , γ_3), características de CO_3^{2-} em substituição aos grupamentos PO_4^{3-} , indicam a formação de uma HA carbonatada do tipo B. WOPENKA *et al.* (2005) afirma que a substituição de PO_4^{3-} por CO_3^{2-} leva a um déficit de carga negativa, sendo compensado pela liberação de íons Ca^{2+} a fim de equilibrar as cargas na estrutura da HA. A presença da banda de HPO_4^{2-} , 873cm^{-1} , indica a formação de HA deficiente em cálcio. O processo de fabricação do compósito é realizado sem controle da atmosfera e com movimentação do meio reacional. É possível que o gás carbônico presente no ar, em contato com a solução aquosa da reação, reaja incorporando o grupamento CO_3^{2-} ao processo.

SLÓŠARCZYK *et al.* (2005) utilizaram aditivos para acrescentar íons carbonato à estrutura da HA. Entre seus resultados, ocorreu a incorporação de pequeno conteúdo de íons carbonato mesmo sem o uso dos aditivos. Nenhum dos compósitos apresentou bandas relacionadas com CO_3^{2-} em substituição à OH^- , que caracteriza a HA carbonatada do tipo A. A formação desse tipo de fosfato de cálcio depende de temperaturas acima de 800°C .

A banda 960cm^{-1} de PO_4^{3-} aparece nos espectros 5.3 (c) e 5.4 (a, c). Esses espectros são resultados de compósitos formados a partir de reações utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como fonte de cálcio. O espectro 5.3 (b) possui uma maior intensidade da banda 873cm^{-1} e desaparecimento das bandas da região de 602cm^{-1} . Esses resultados devem estar relacionados com alterações na formação dos compósitos no meio reacional, decorrentes do uso de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como fonte de cálcio.

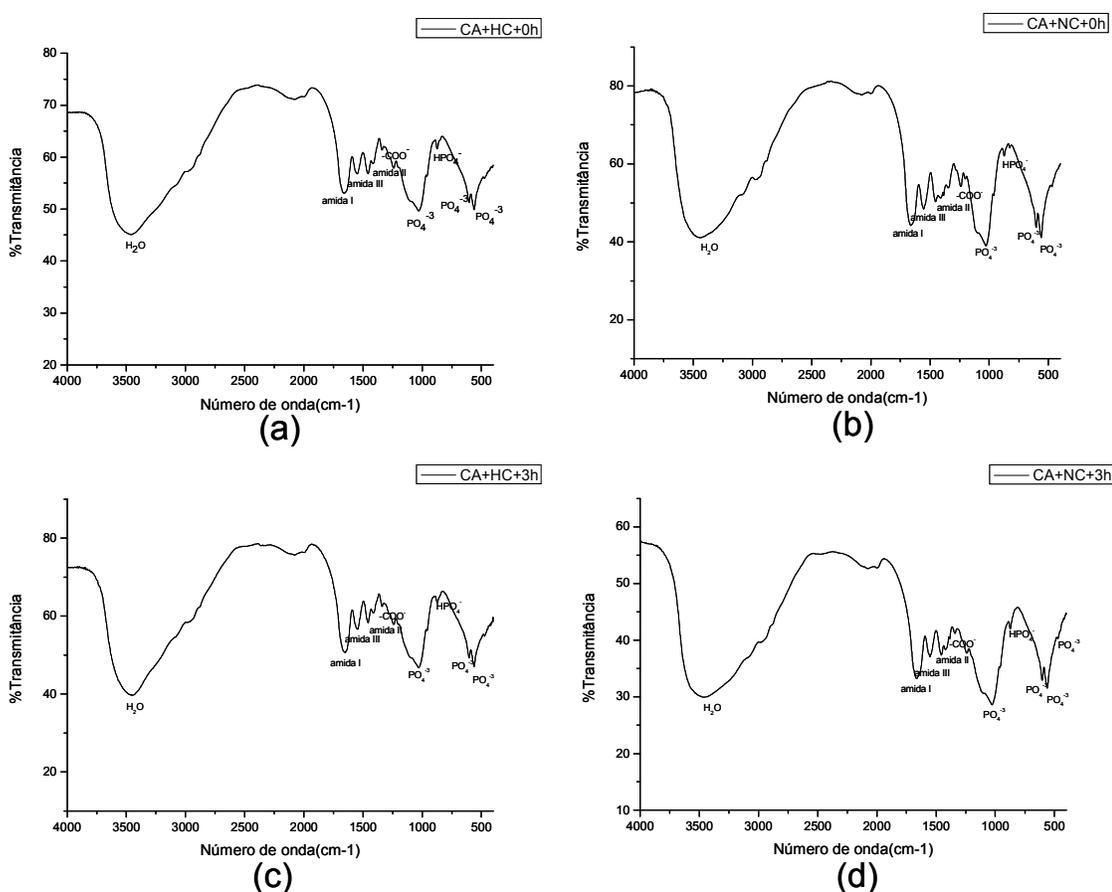


Figura 5.3 - Espectros de FTIR dos compósitos formados por Col I extraído em solução de ácido acético 1M CPS e HA: (a) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0h de envelhecimento; (b) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 0h de

envelhecimento; (c) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 3h de envelhecimento; (d) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 3h de envelhecimento.

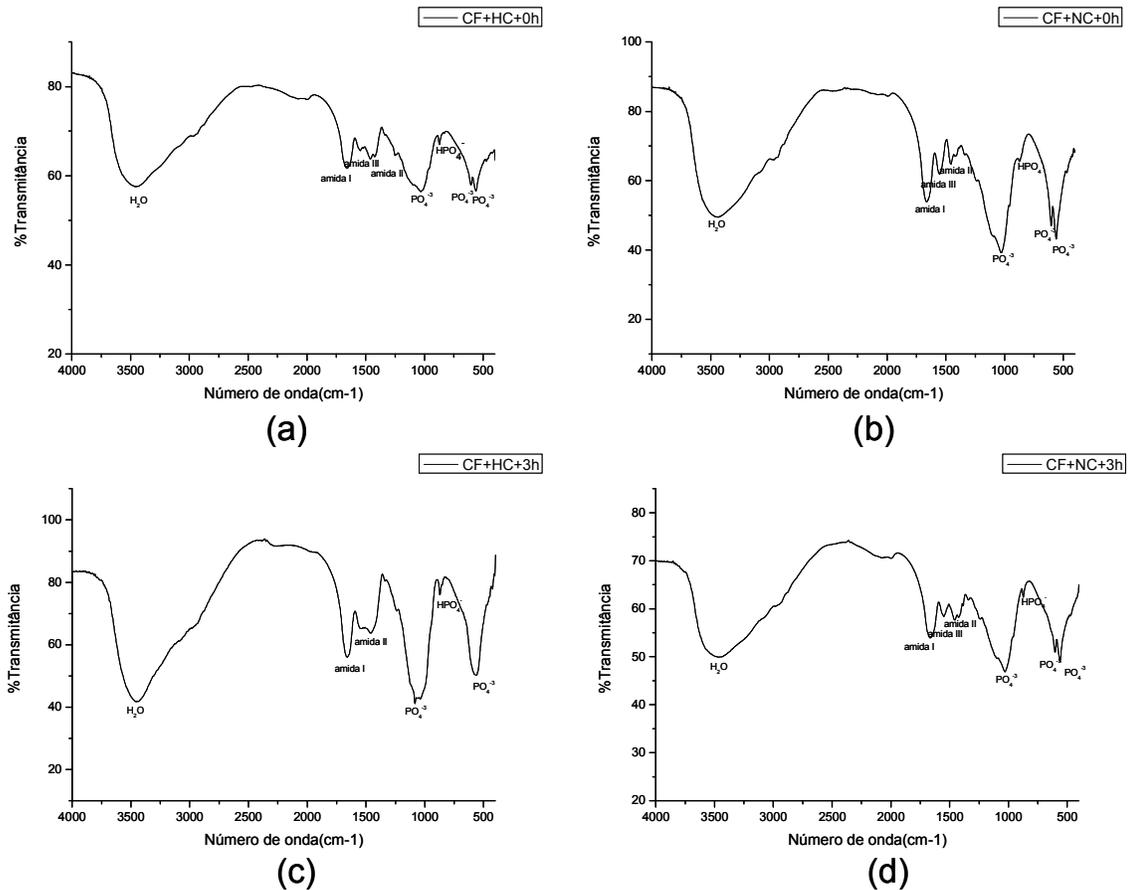


Figura 5.4 - Espectros de FTIR dos compósitos formados por Col I extraído em solução de ácido Fosfórico 59,32mM CPS e HA; (a) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0h de envelhecimento; (b) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 0h de envelhecimento; (c) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 3h de envelhecimento; (d) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 3h de envelhecimento.

As figuras 5.5 a 5.8 apresentam difratogramas de Raios-X (DRX) e diagramas de Rietveld dos compósitos produzidos. Para cada espectro, foram determinados os índices de concordância apresentados na tabela 5.1. O índice de ajuste ou qualidade de refinamento (χ^2) deve estar próximo a 1, indicando que a convergência do refinamento (dado por R_{wp}) está sendo bem sucedida. Em alguns refinamentos, o valor

de Chi² ficou maior que 2 (Tabela 5.1), pois algumas intensidades experimentais estavam maiores que as calculadas. Entre outros fatores, este fato pode ser devido (1) a problemas na eletrônica de detecção, (2) as condições em que foram realizadas as medidas (que foram as mesmas condições para todas as amostras) ou (3) até a preparação das amostras (PAIVA-SANTOS, 2001).

Tabela 5.1 – Índices de concordância finais do refinamento dos compósitos.

Amostra	R_p%	R_{wp}%	R_e%	Chi²
CA + HC + 0h	42.3	29.2	24.7	1.398
CA + NC + 0h	38.1	26.2	25.1	1.083
CA + HC + 3h	28.5	22.4	14.3	2.468
CA + NC + 3h	21.8	17.3	15.7	1.214
CF + HC + 0h	38.4	33.3	13.2	2.408
CF + NC + 0h	42.2	32.3	20.6	2.446
CF + HC + 3h	33.4	25.9	16.6	2.449
CF + NC + 3h	33.7	24.5	16.9	2.090
HA (sem Col I)	30.7	24.8	21.7	1.305
HA-COL I sem precipitação	39.6	31.4	24.2	1.678
HA-COL I com precipitação	21.9	12.8	6.0	1.815

Os compósitos apresentam picos de DRX correspondentes ao da HA controle e, conseqüentemente, aos da ficha da JCPDS. Foi observado o deslocamento de 1 grau nos picos de todos os difratogramas.

Os difratogramas dos compósitos obtidos pelas reações do Col I extraído em solução de ácido acético 1M CPS (figuras 5.5 e 5.6) são muito semelhantes, apresentando melhor definição dos picos nas amostras com três horas de envelhecimento (Figura 5.6). Já os compósitos empregando Col I extraído em solução de ácido fosfórico 59,32mM (Figuras 5.7 e 5.8) tiveram espectros menos definidos ou com picos ausentes.

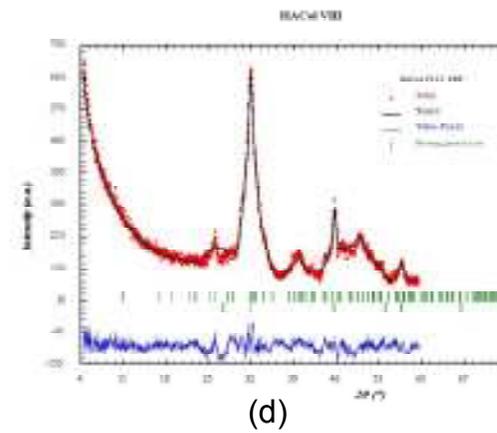
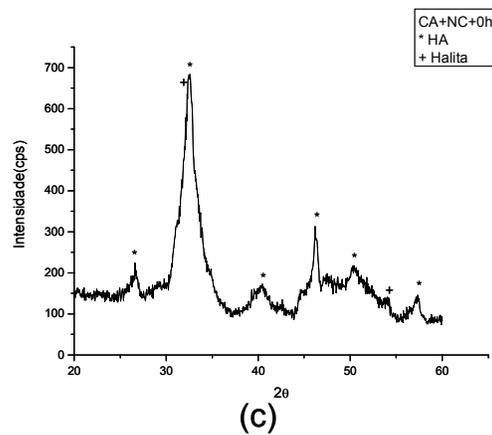
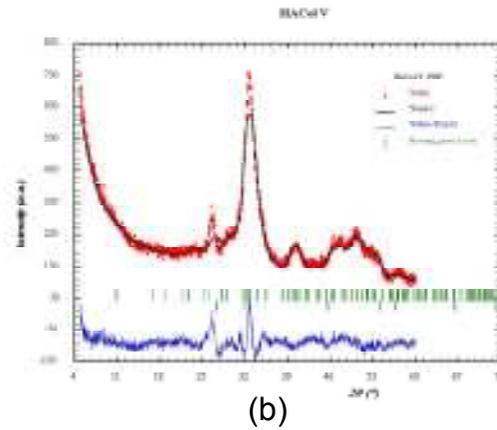
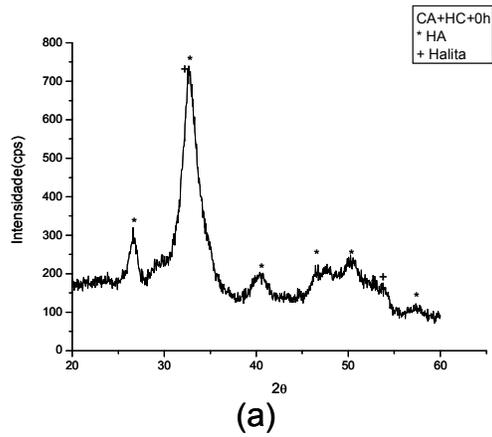


Figura 5.5 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compósitos formados por Col I (extraído em solução de ácido acético 1M CPS) e HA: (a; b) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0h de envelhecimento; (c; d) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 0h de envelhecimento. (vermelho – experimental; preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).

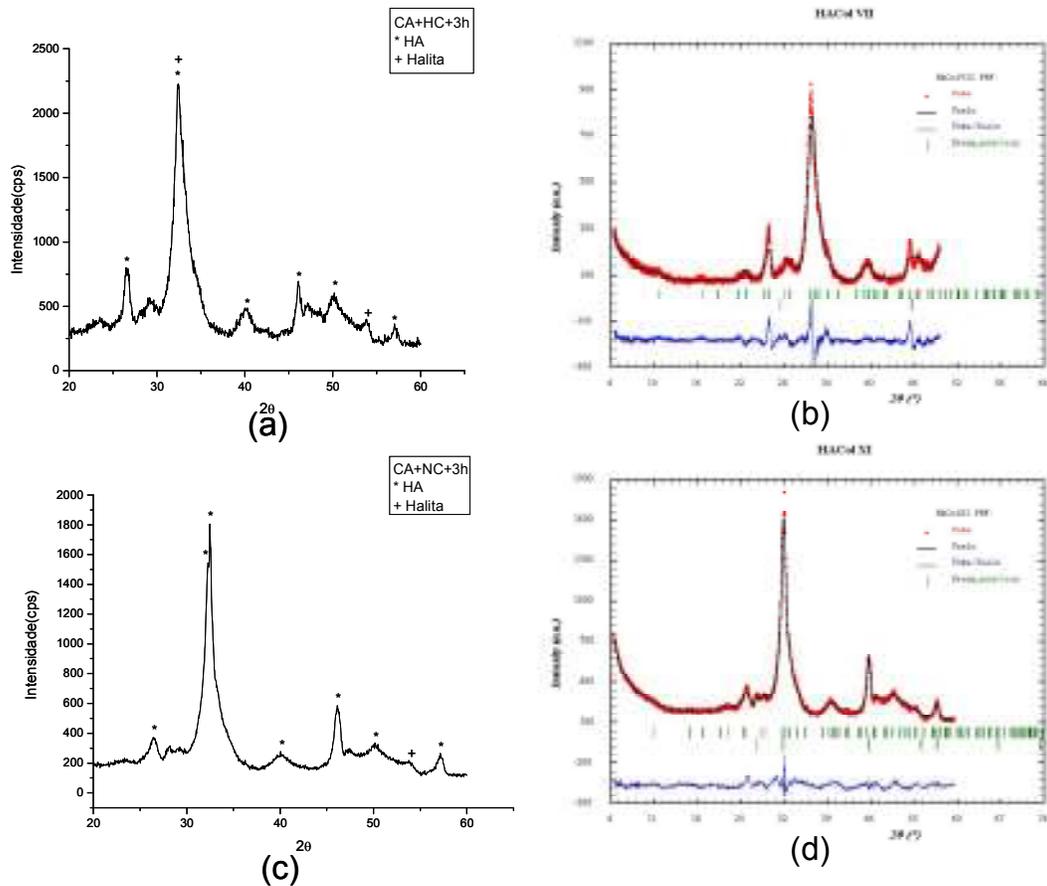


Figura 5.6 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compósitos formados por Col I (extraído em solução de ácido acético 1M CPS) e HA: (a; b) compósito baseado em Col I com Ca(OH)_2 e 3h de envelhecimento; (c; d) compósito baseado em Col I com $\text{Ca(NO}_3)_2$ e 3h de envelhecimento. (vermelho – experimental; preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).

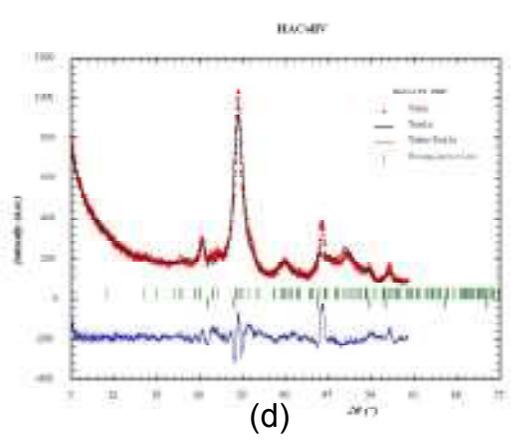
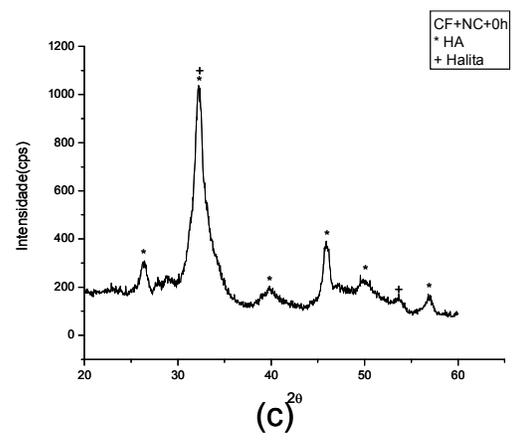
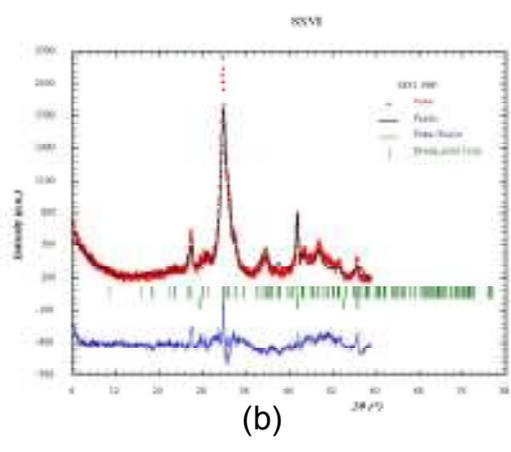
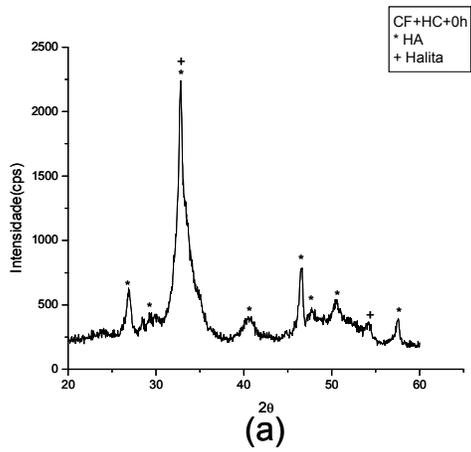


Figura 5.7 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compósitos formados por Col I (extraído em solução de ácido fosfórico 59,32mM CPS) e HA: (a; b) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 0h de envelhecimento; (c; d) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 0h de envelhecimento. (vermelho – experimental; preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).

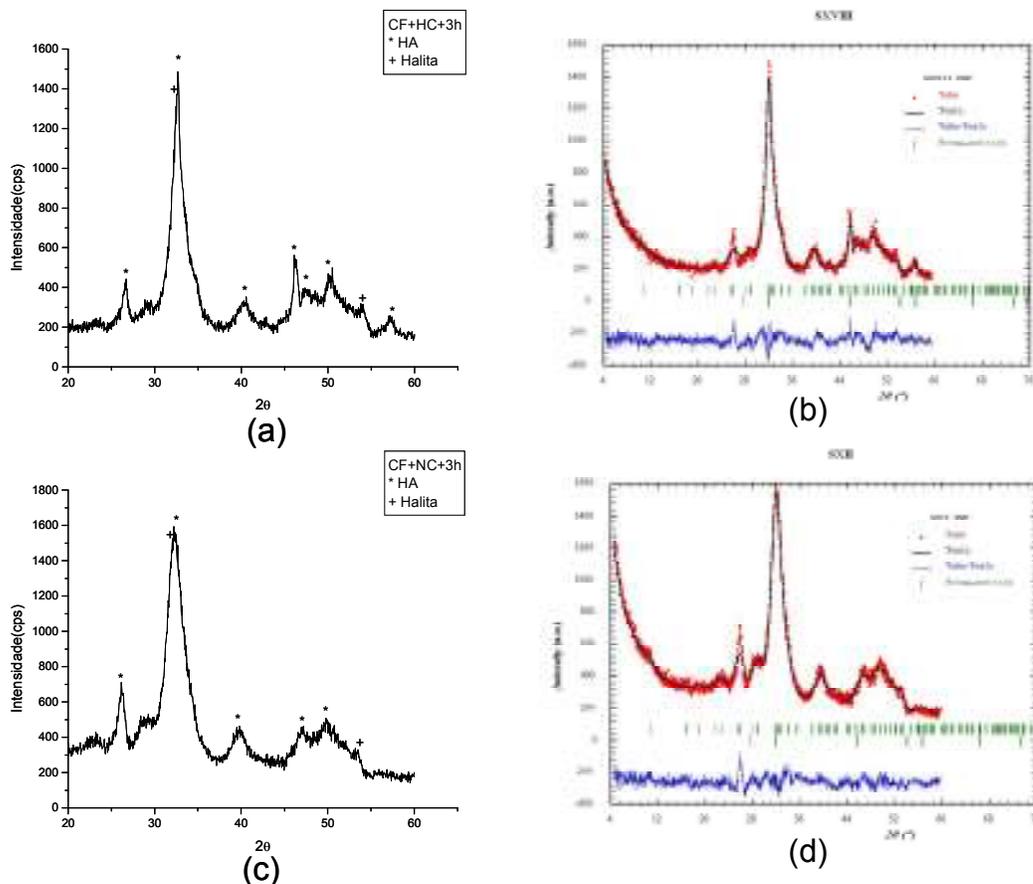


Figura 5.8 - DRX e diagramas de Rietveld para as fases presentes nos compósitos formados por Col I (extraído em solução de ácido fosfórico 59,32mM CPS) e HA: (a; b) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e 3h de envelhecimento; (c; d) compósito baseado em Col I com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e 3h de envelhecimento. (vermelho – experimental; preto – perfil calculado; verde – reflexões de Bragg; azul – diferenças dos perfis calculados e observados).

Todos os DRX apresentaram padrões semelhantes. Pela comparação com as fichas do JCPDS foi possível identificar picos característicos de HA e Halita (cristais de NaCl). Os picos da Halita são observados em: 27.3° , 31.6° , 45.4° e 56.4° . Como resultado, podemos observar muitas sobreposições e, possível interferência, entre os picos de HA e Halita.

A Halita provavelmente está em resíduos da solução de NaCl utilizada no processo de precipitação das fibras. Os perfis apresentaram picos largos, indicando

baixa cristalinidade da fase mineral formada. Podemos observar que, para ambos os colágenos, o tempo de envelhecimento de três horas mantendo as condições de reação (Figuras 5.6 e 5.8) permite a formação de estruturas minerais que possuem picos menos largos, indicando aumento da cristalinidade ou crescimento dos cristais (LEGEROS, 1994).

Os DRX dos compósitos apresentam picos semelhantes aos da HA formada sem a presença das fibras de Col I (Figura 5.2 (b)). Porém os picos das amostras sem a presença das fibras são mais estreitos, consequência da não interação com as fibras de Col I. É possível que ocorra a formação de cristais maiores. Sabe-se que estruturas orgânicas influenciam a nucleação e crescimento dos cristais formados em suas vizinhanças (WOPENKA *et al.*, 2005; LEGEROS, 1994). Também não é observada a formação da fase Halita (cristais de NaCl).

A análise dos parâmetros da célula de HA (Tabela 5.2) mostra a formação de cristais com dimensões semelhantes aos de ossos jovens. Resultados semelhantes foram obtidos por SENA (2004). Neste trabalho, SENA (2004) obteve compósitos HA-Col I apresentando cristais de HA nanométricos. A presença de colágeno provoca a diminuição do tamanho dos cristais formados, principalmente ao longo da direção (002) (LEGEROS, 2004).

Tabela 5.2 – Parâmetros da HA presente nos compósitos HA-Col I.

Amostra	a = b (Å)	c (Å)
CA + HC + 3h	9,4564	6,8836
CA + NC + 3h	9,4564	6,8836
CF + HC + 3h	9,4564	6,8836
CF + NC + 3h	9,4564	6,8836
HA (sem Col I)	9,4564	6,8836
HA-COL I sem prec.	9,4564	6,8836
HA-COL I com prec.	9,44403	6,8985
HA ^[a]	9,4220	6,8833
Osso de fetos ^[b]	9,4411	6,8845
Osso de adultos ^[b]	9,3836	6,8745

[a] MENEGHINI *et al.* (2003) e LEGEROS (2002) – hidroxiapatita sintética.

[b] MENEGHINI *et al.* (2003) – ossos humanos refinados pelo método de Rietveld.

5.1.4 – EFEITO DA PRECIPITAÇÃO SALINA

Os espectros de FTIR dos compósitos da Figura 5.9 constituídos por Col I SPS e CPS, respectivamente, exibem semelhantes modos vibracionais das estruturas orgânica e inorgânica aos já apresentados. Ocorre a presença das bandas relacionadas à proteína Col I: 1540cm^{-1} (amida II), 1240cm^{-1} (amida III); 1450cm^{-1} (anéis pirrolidínicos da prolina) e 1330cm^{-1} correspondente ao grupamento carboxila ($-\text{COO}^-$) e das bandas características de PO_4^{3-} , 473cm^{-1} , 560cm^{-1} e 604cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_4), 961cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_1), 1030cm^{-1} (PO_4^{3-} , γ_3). Também são observadas as bandas: 1550cm^{-1} , 1420cm^{-1} (CO_3^{2-} , γ_3), características de CO_3^{2-} em substituição aos grupamentos PO_4^{3-} , indicando a formação de uma HA carbonatada do tipo B (KIKUCHI *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2005; ZHAI *et al.*, 2005).

Em comparação com os compósitos produzidos e estudados na fase I deste trabalho, esses espectros apresentam bandas não antes relatadas como 3410cm^{-1} , 3470cm^{-1} , 3470cm^{-1} e 3550cm^{-1} . Esse resultado é devido a ausência do tratamento salino e das sucessivas lavagens em água destilada quando este foi utilizado.

Os difratogramas e diagramas de Rietveld das amostras de compósitos constituídos por Col I SPS e CPS, respectivamente, estão apresentados na figura 5.10. Os DRX apresentam padrões semelhantes, além dos picos descritos anteriormente, porém ocorre a presença de fases da Halita (cristais de NaCl) na amostra que sofreu CPS (Figura 5.10 (c; d)). A figura 5.10 (a) possui picos melhor definidos, indicando uma organização da fase mineral mais pronunciada, provavelmente devido à ausência dos cristais de Halita em contato com a estrutura orgânica..

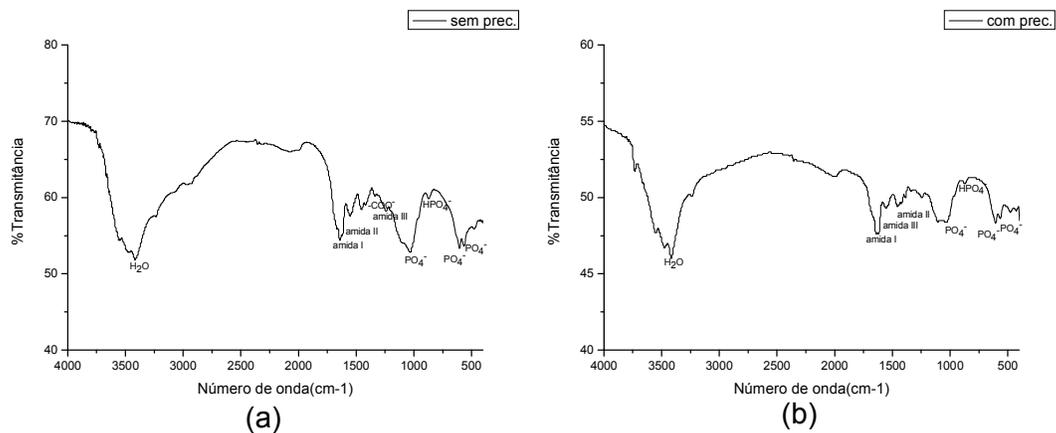


Figura 5.9 – Espectros de FTIR dos compósitos produzidos a partir de Col I extraído em solução ácido acético 1M SPS (a) e CPS (b). Ambos os compósitos foram produzidos com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e envelhecidos por 3h.

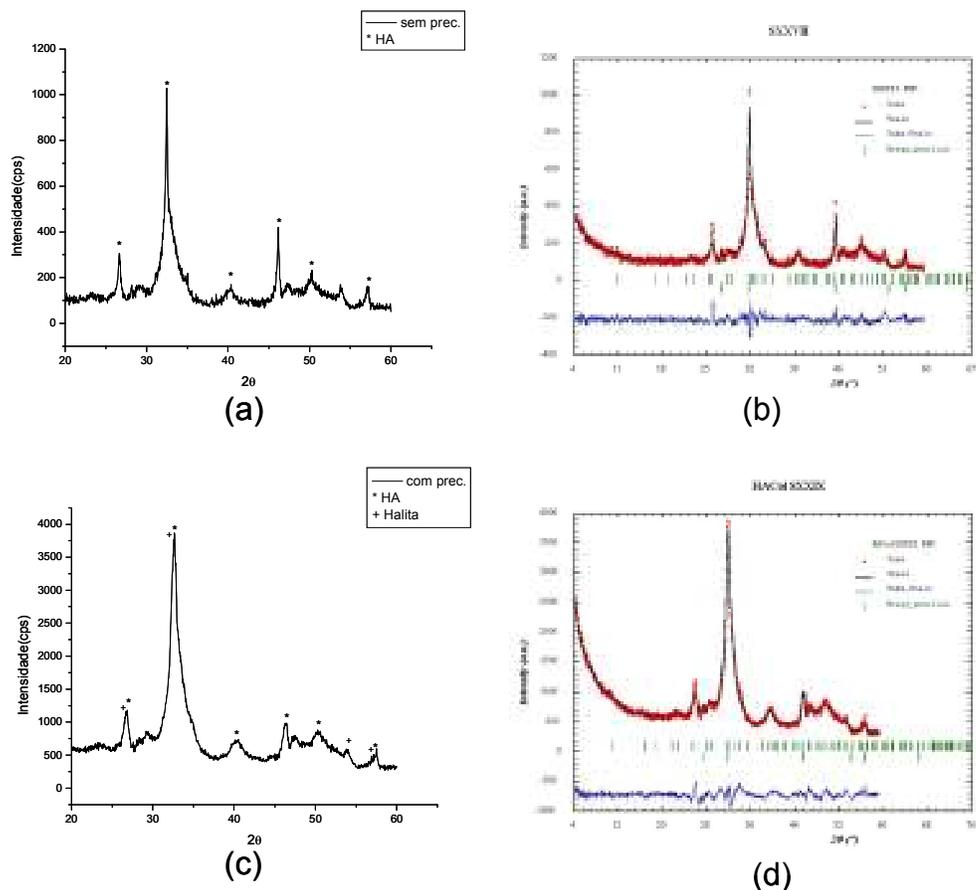


Figura 5.10 – DRX e diagramas de Rietveld dos compósitos produzidos a partir de Col I extraído em solução ácido acético 1M SPS (a; b) e CPS (com posterior lavagem) (c; d). Ambos os compósitos foram produzidos com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e envelhecidos por 3h.

5.2- CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

5.2.1 – COLÁGENO

A figura 5.11 evidencia as fibras de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M SPS e CPS em imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A partir dela podemos observar que as fibras que não sofreram precipitação salina (Figura 5.11 (a)) estão organizadas em feixes finos, enquanto aquelas que sofreram tratamento salino (Figura 5.11 (b)) apresentam-se mais agregadas. Os detalhes das fibras de Col I SPS (Figura 5.11 (c)) mostram que uma única estrutura é formada pela união de várias fibras de diâmetros menores (Figura 5.11 (c) (seta)). Ge *et al.* (2007) encontra fibrilas muito finas e proximamente empacotadas. As fibras são agregados de fibrilas que se organizam na mesma orientação.

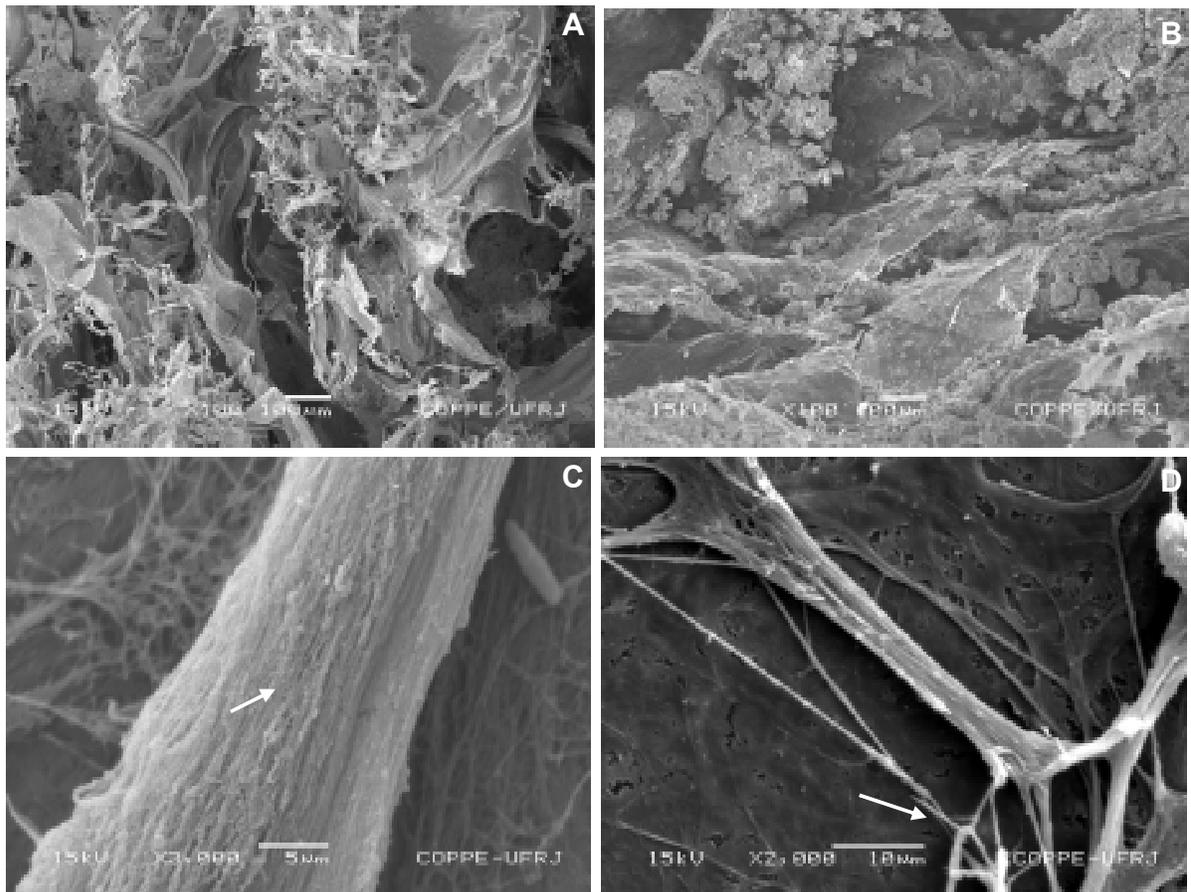


Figura 5.11 - Micrografias (MEV) do Col I obtido pela extração em solução de ácido acético 1M: (a) SPS (b) CPS; (c,d) detalhe das fibras de Col I obtidas pela extração em solução ácido acético 1M SPS.

É importante observar que algumas conexões são estabelecidas entre as fibras de menor e maior diâmetro, e que na maioria das vezes, as conexões são realizadas por regiões das fibras pouco ou não mineralizadas (Figura 5.11 (d) (seta)). É possível que nessas regiões existam resíduos de aminoácidos na superfície que realizam interações eletrostáticas mantendo a interconectividade da estrutura tri-dimensional.

A figura 5.12 apresenta micrografias de topografia e contraste de fase realizadas em AFM de fibrilas de Col I SPS e CPS. O filme de Col I observado por AFM mostra a formação de uma rede de fibrilas conectadas (Figura 5.12 (a; c)). Pode-se perceber que as fibrilas ligam-se em uma orientação formando fibrilas de ordem maior. Ainda assim,

outras fibrilas formam ligações entre as várias camadas depositadas na superfície da lamínula de vidro (Figura 5.12 (a)).

A figura 5.12 (b) mostra a micrografia em contraste de fase do filme de Col I sobre a lamínula de vidro. É possível perceber a formação de uma única fase indicando que as fibrilas de colágeno interligam-se, através de ligações cruzadas intermoleculares, formando um filme homogêneo sobre a superfície.

A micrografia de contraste de fase (figura 5.12 (d)) evidencia a precipitação de cristais de NaCl adjacentes à superfície das fibrilas (fase mais escura). Isso demonstra que, mesmo após a redissociação das fibrilas em solução de ácido fosfórico 59,32mM, os cristais permanecem aderidos à superfície das fibrilas.

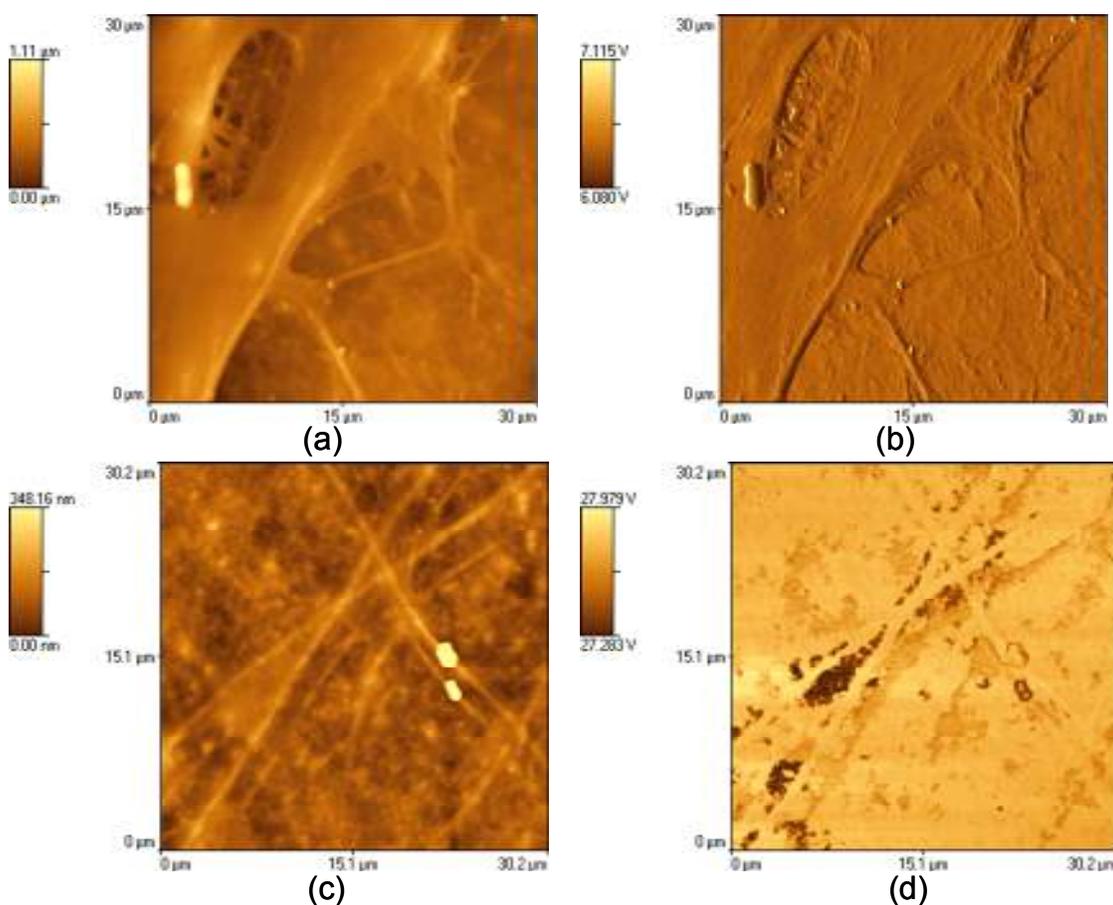


Figura 5.12 – Micrografias (AFM) de filme de Col I SPS; (a) micrografia da topografia; (b) micrografia de contraste de fase. Fibras de Col I CPS; (c) micrografia da topografia; (d) micrografia de contraste de fase.

A partir de micrografias das fibrilas de Col I SPS e CPS, medições de suas larguras foram realizadas. As fibrilas de Col I que não sofreram precipitação salina possuem largura igual a $0,65\mu\text{m}$ ($\pm 0,17\mu\text{m}$). As fibrilas após a precipitação salina apresentam largura igual a $0,96\mu\text{m}$ ($\pm 0,28\mu\text{m}$). Observando a largura média das fibrilas CPS pode-se concluir que, durante a agregação das fibrilas no processo de precipitação, estas continuam interligadas mesmo após a redissolução em ácido fosfórico 59,32mM.

STRASSER *et al.* (2007) obteve fibrilas com largura igual a $0,27\mu\text{m}$, corroborando o fato de que as fibrilas observadas mantêm-se agregadas em feixes mesmo após o tratamento ácido e enzimático. É possível que esse comportamento leve a diferenças na interação destas com a fase mineral formada no meio reacional durante a produção dos compósitos. Como consequência, pode-se esperar diferentes resultados no processo de mineralização das fibras e na morfologia final dos compósitos.

5.2.2 – COMPÓSITOS HA-COL I

As figuras 5.13 e 5.14 apresentam micrografias de compósitos sintetizados com Col I SPS e CPS, respectivamente. Todos os compósitos apresentaram espaços e poros que, a princípio, permitirão uma futura vascularização e migração de células para o interior dos materiais, ideal para utilizações *in vivo*. Os compósitos apresentam interconectividade da superfície em direção ao seu interior. As fibras unem as camadas do material compósito formando uma rede que pode contribuir para a migração e ancoragem quando em contato com células.

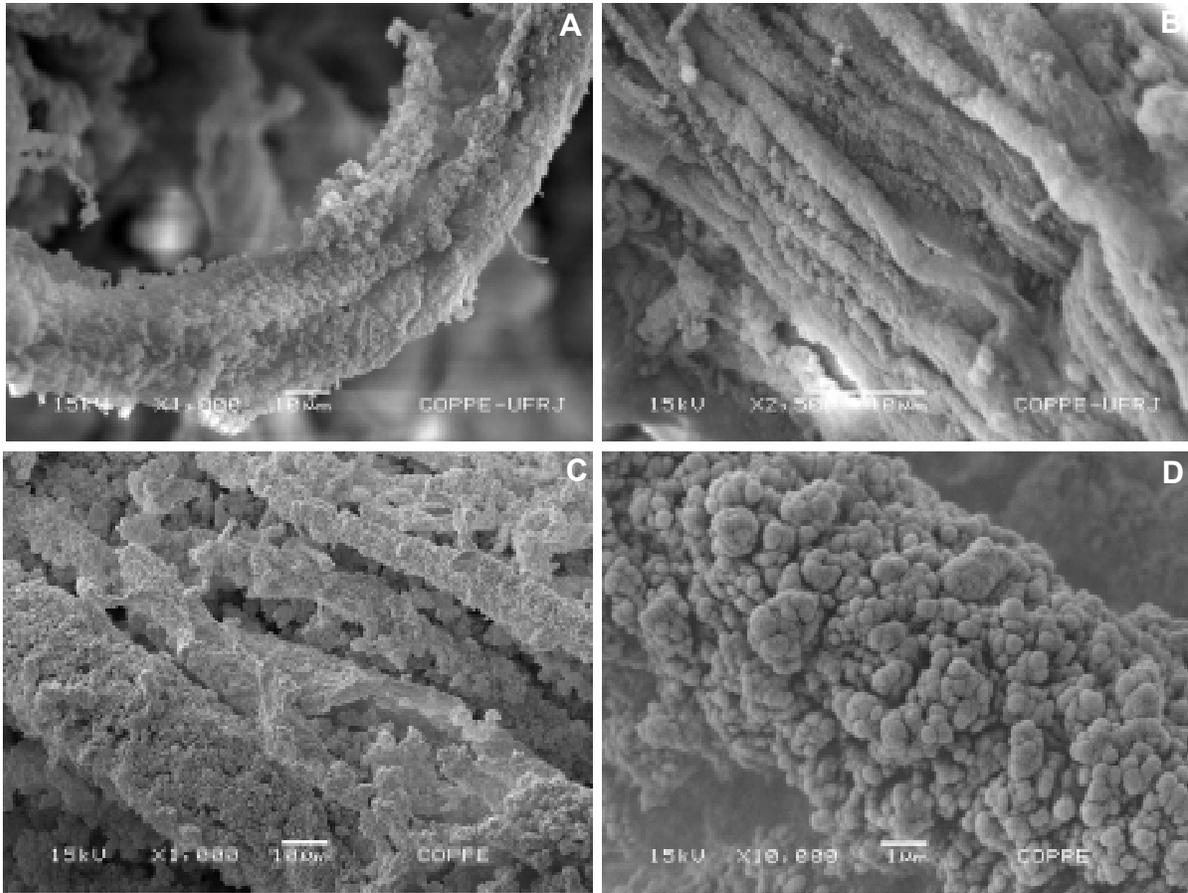


Figura 5.13 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução de ácido acético 1M SPS) e por HA: (a; d) detalhes da deposição mineral sobre as fibras; (b; c) detalhes de uma possível organização das fibras de Col I longitudinalmente.

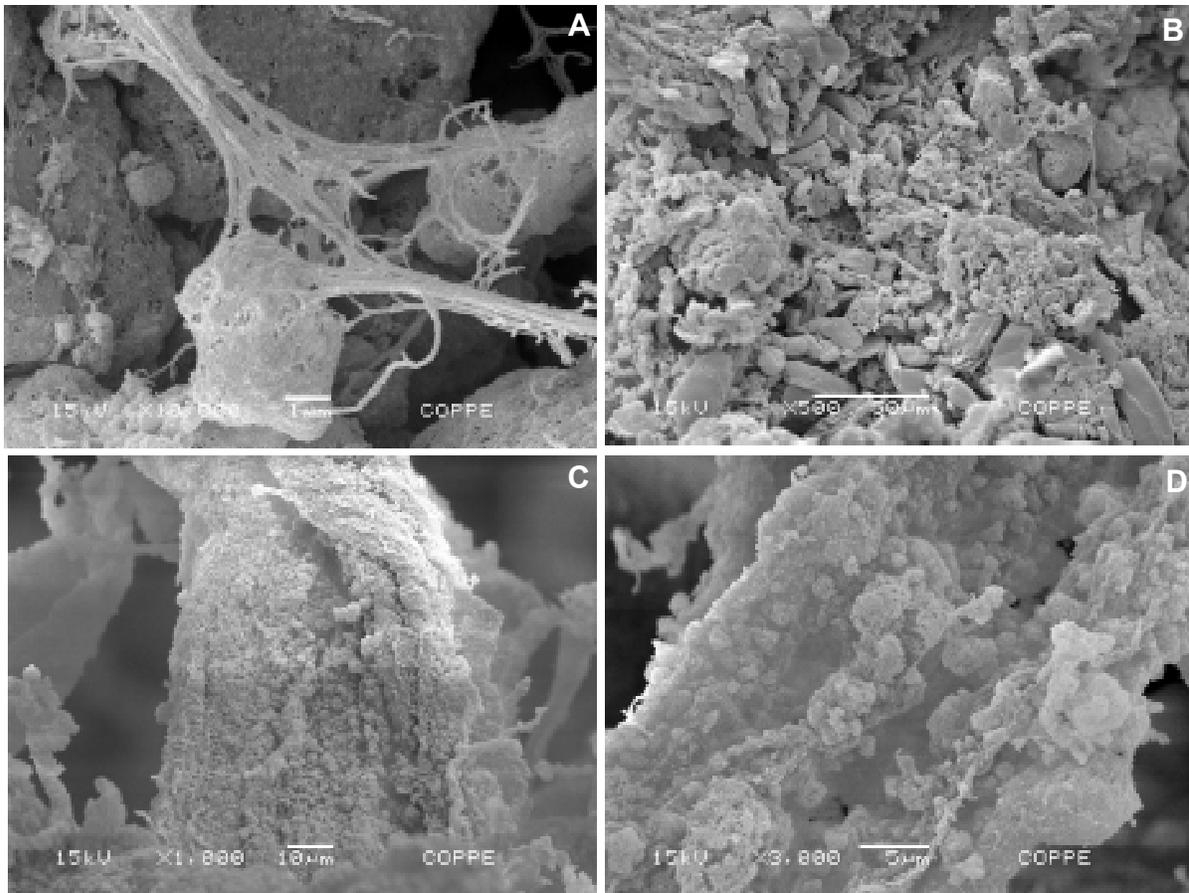


Figura 5.14 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução de ácido acético 1M CPS) e por HA: (a) detalhe da interação entre as fibras de Col I; (b) observação da deposição mineral não organizada; (c,d) detalhes da deposição mineral sobre as fibras.

A partir da figura 5.13 (b; c), pode-se observar que, em algumas regiões do compósito, as fibras organizam-se em feixes paralelos longitudinalmente. Grande parte das fibras apresenta deposição mineral em sua superfície. Essa deposição é observada também nos compósitos HA-Col I produzidos por SENA (2004). Os compósitos constituídos por Col I CPS (Figura 5.14) apresentam fibras ricamente mineralizadas formando estruturas maiores que as observadas na figura 5.14. Também foi possível notar que a deposição mineral sobre as fibras foi realizada sem orientação (Figura 5.14 (b)).

Observações da figura 5.15 indicam diferenças na morfologia dos depósitos minerais sobre as fibras de Col I SPS e CPS. A morfologia apresentada pela

micrografia 5.15 (a) é semelhante ao observado por SENA (2004). Os compósitos produzidos por SENA (2004) eram constituídos por HA e Col I sem tratamento salino. Os depósitos minerais observados sobre as fibras que sofreram tratamento salino (Figura 5.15 (b)), possuem uma morfologia em forma de rosetas semelhantes aos encontrados por LEGEROS *et al.* (2003).

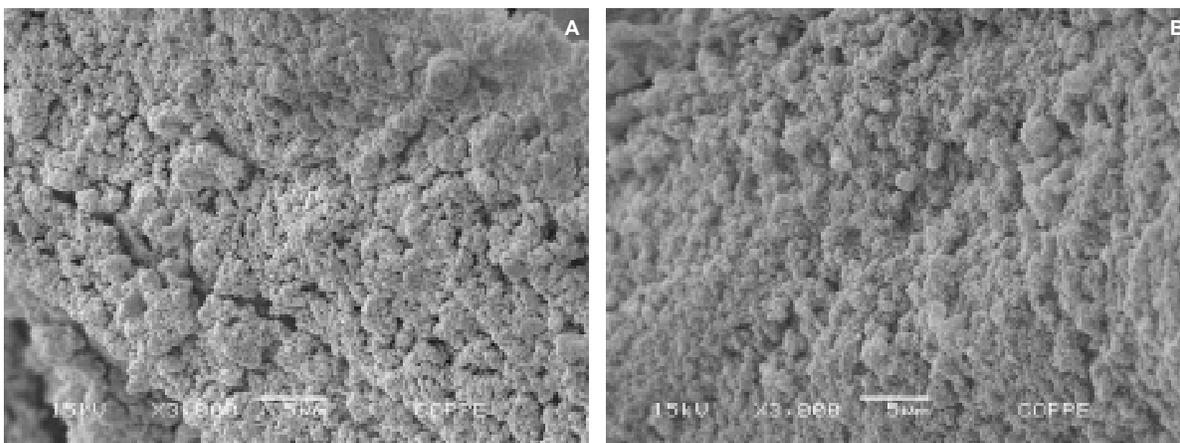


Figura 5.15 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M e HA. (a) fibras SPS; (b) fibras CPS.

A figura 5.16 mostra os espectros de EDS de fibras de Col I SPS sem mineralização e do compósito HA-Col I. A partir dos EDS (Figura 5.16 (a)) podemos observar a existência de picos de carbono (C), nitrogênio (N) e oxigênio (O), que estão presentes na composição das cadeias polipeptídicas que formam as fibras de Col I.

Na figura 5.16 (b), podemos novamente notar a presença dos picos de C, N e O, indicando a preservação da composição das fibras de Col I utilizadas na produção dos compósitos. Adicionalmente existem picos de cálcio (Ca) e fósforo (P) devido ao processo de deposição mineral ocorrido durante a síntese do compósito. A presença de picos de ouro (Au) é consequência da metalização, essencial para as observações do material biológico no equipamento utilizado.

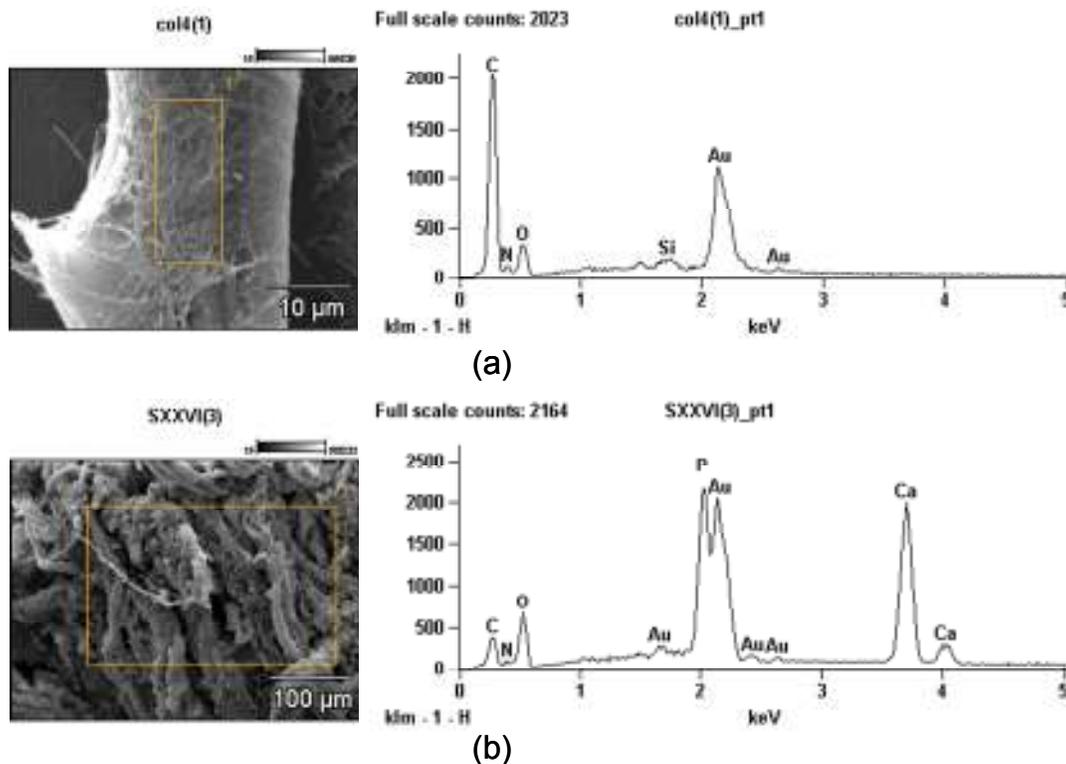


Figura 5.16 - Micrografias (MEV) e espectros de energia dispersiva (EDS) de: (a) fibras de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M SPS sem mineralização; (b) compósito baseado em Col I (extraído em solução ácido acético 1M SPS) e HA.

5.3 -ENSAIO DE DURABILIDADE EM CULTURA

A partir das figuras 5.17 a 5.20 contendo micrografias de MEV podemos observar a morfologia dos compósitos mantidos em contato com meio de cultivo por até 7 dias. Os compósitos apresentam aglomerados de fibras recobertas por deposição mineral. Alguns poucas fibras aparecem “nuas” demonstrando ausência de recobrimento. Nos compósitos produzidos a partir de Col I extraídos em solução de ácido acético 1M SPS, a fase mineral aparece melhor distribuída sobre a superfície das fibras.

Os compósitos tratados com glutaraldeído (GTA) apresentaram-se intactos durante os 7 dias de cultivo. Os compósitos sem GTA iniciaram um processo de degradação já visualizado aos 3 dias de cultivo. A resistência à degradação observada nos compósitos tratados com GTA é devido a formação das ligações cruzadas além da

retenção de fragmentos do próprio material que forma novas ligações cruzadas, mantendo sua integridade.

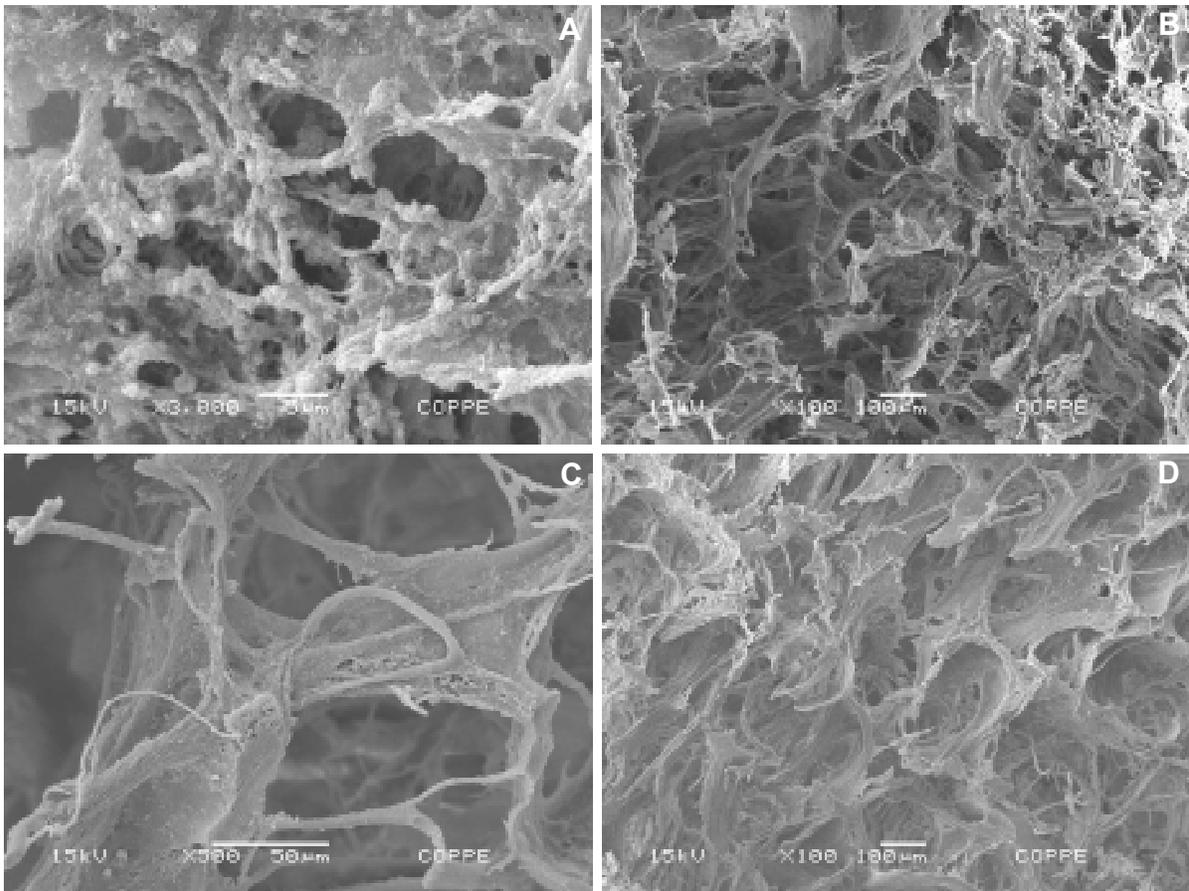


Figura 5.17 - Micrografias (MEV) dos compostos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético 1M SPS) e por HA. Os compostos não foram tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; b) detalhe da deposição mineral; (c; d) detalhe da estrutura lamelar formada.

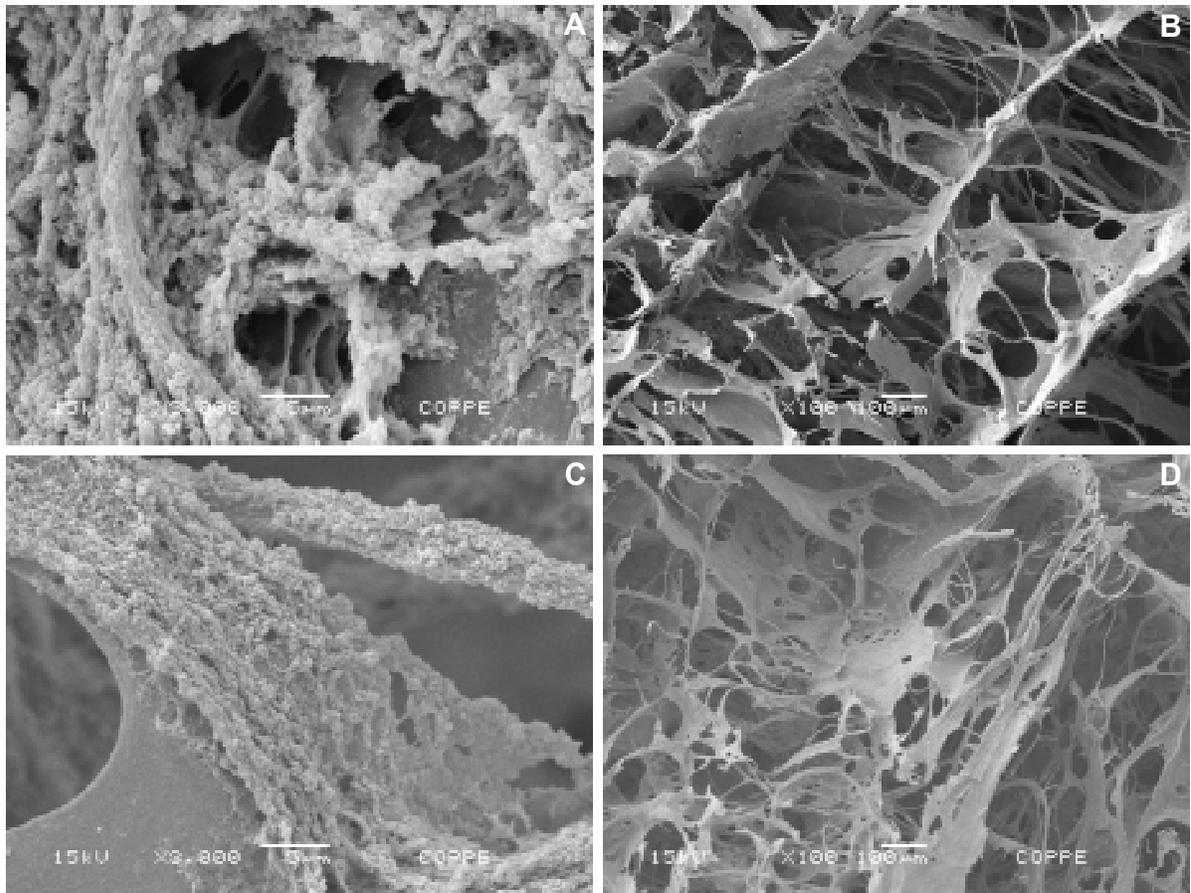


Figura 5.18 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético 1M SPS) e por HA. Os compósitos foram tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; b) detalhe da deposição mineral; (c; d) detalhe da estrutura lamelar formada.

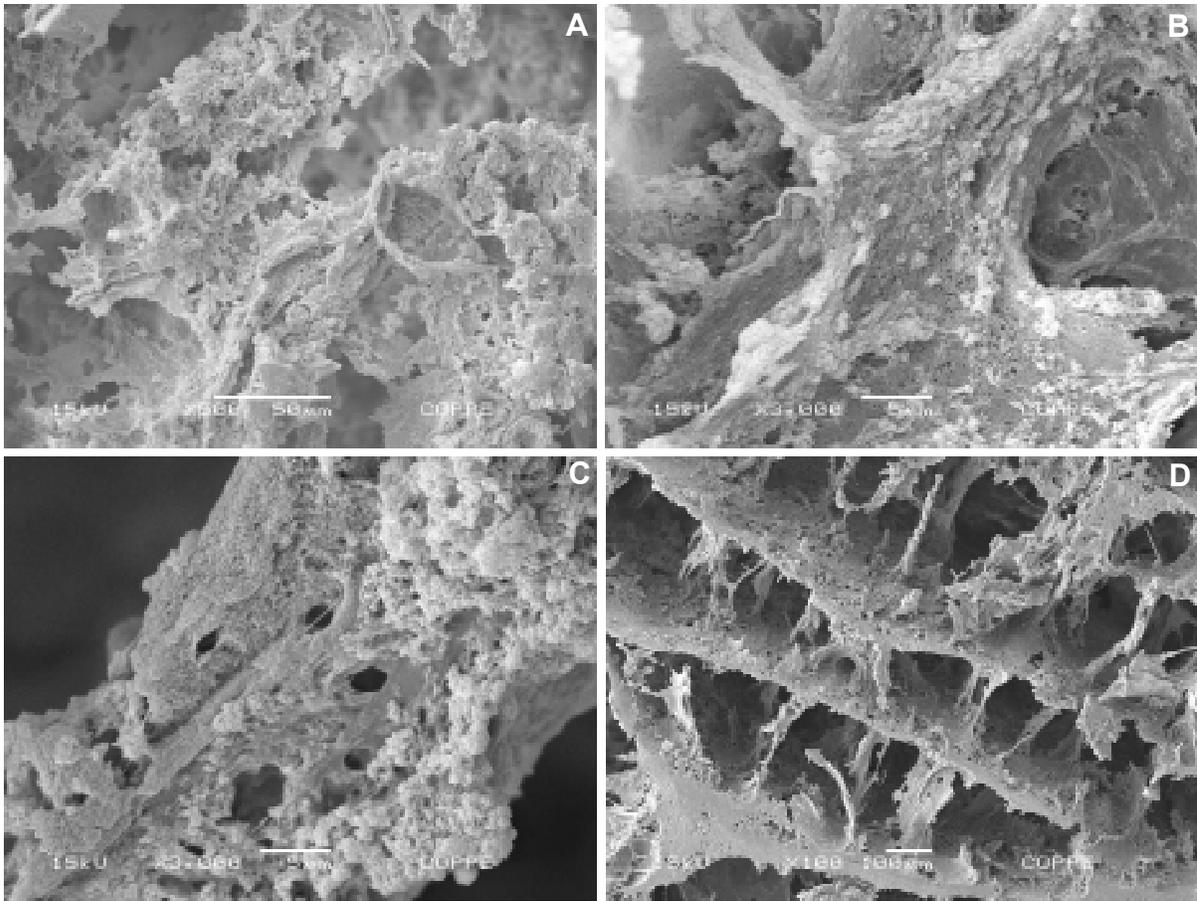


Figura 5.19 - Micrografias (MEV) dos compostos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético 1M CPS) e por HA. Os compostos não foram tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; b; c) detalhe da deposição mineral; (d) detalhe da estrutura lamelar formada.

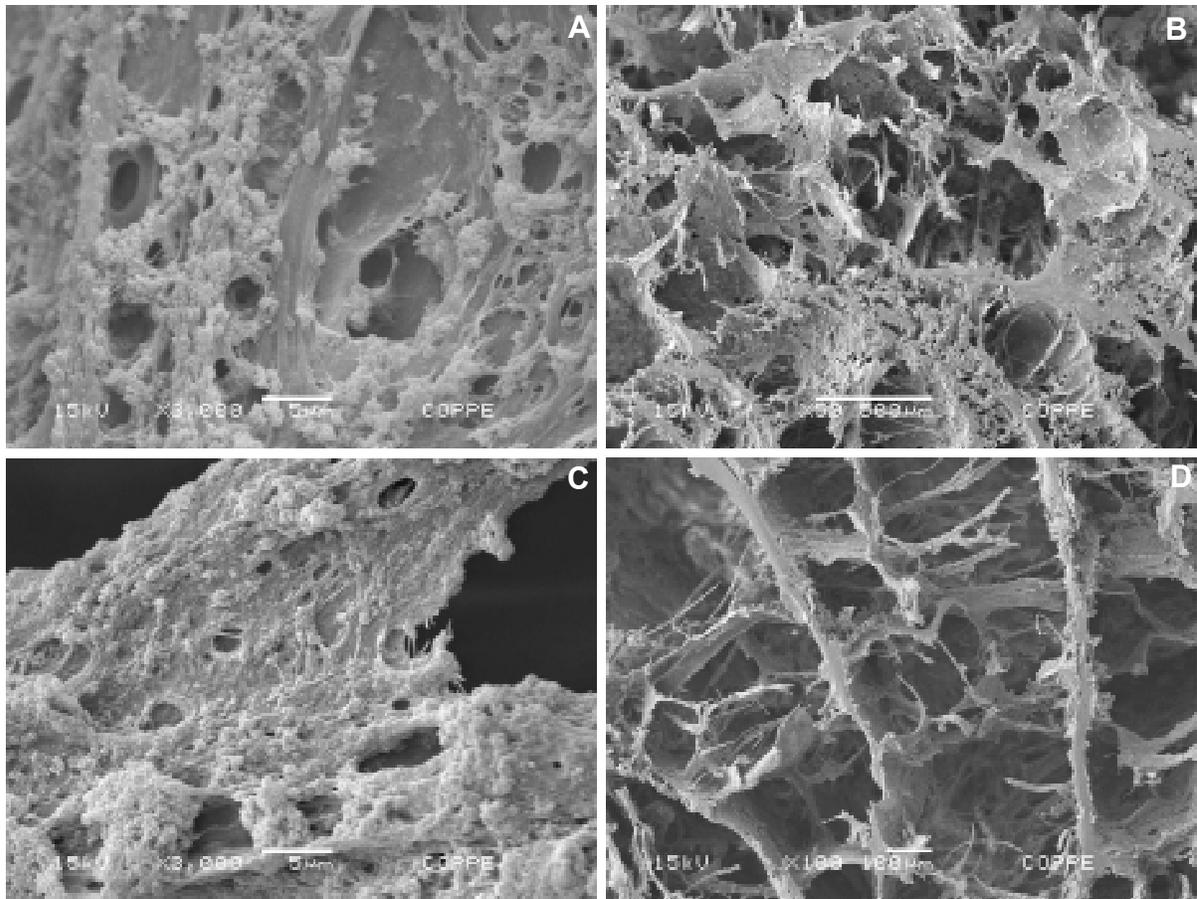


Figura 5.20 - Micrografias (MEV) dos compósitos formados por fibras de Col I (extraídas em solução ácido acético CPS) e por HA. Os compósitos foram tratados com GTA e foram mantidos em meio de cultura por 3 dias (a; b) e 7 dias (c; d). (a; c) detalhe da deposição mineral sobre as fibras; (b; d) detalhe da estrutura lamelar formada.

A figura 5.20 mostra compósitos produzidos com Col I extraído em solução de ácido acético 1M CPS e posterior tratamento com GTA. Esses compósitos apresentaram, após 7 dias, uma organização em camadas ou lamelar (Figura 20 (d)). Também pode ser observada essa organização estrutural nas figuras 5.18 (d) e 5.19 (d). A Figura 5.17 (b) apresenta essa organização com três dias de cultivo, porém a estrutura é perdida aos sete dias.

Os compósitos mantidos em meio de cultivo celular não apresentaram liberação da fase mineral no meio, indicando que os depósitos minerais foram mantidos ligados à estrutura orgânica. Isso pode ser corroborado observando-se as micrografias das figuras 5.18 (a) e 5.19 (c). Ambas demonstram que a deposição mineral é mantida com três e

sete dias de cultivo em meio de cultura. É possível que a ausência de células e, conseqüentemente, de suas enzimas, mantenha o pH fisiológico do meio sem que resulte na dissolução da fase mineral do compósito.

O compósito apresentado na figura 5.17 apresentou maior degradação que o compósito apresentado na figura 5.19. O primeiro foi produzido a partir de Col I SPS e o segundo Col I CPS durante sua extração. Ambos não foram tratados com GTA. Aos 7 dias de cultivo nota-se uma menor degradação no compósito constituído por fibras de Col I CPS e HA. A precipitação salina leva a uma deposição mineral mais agregada e menos uniforme enquanto os compósitos originados de Col I SPS apresentam minerais mais bem distribuídos. É provável que a presença de regiões sem deposição mineral leve a interações entre a fase orgânica e mineral mais íntimas, com formação de ligações cruzadas intermoleculares, mesmo que em pouquíssimo número. Isso explicaria seu melhor desempenho entre os compósitos não tratados com GTA.

5.4 - ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A figura 5.21 apresenta a avaliação da citotoxicidade dos compósitos constituídos por Col I extraído em solução de ácido acético 1M SPS e CPS além da presença ou não de glutaraldeído (GTA). Foi possível notar que durante o período de incubação para a obtenção do extrato os compósitos mantiveram-se íntegros. Não foi verificada acidificação do meio durante a obtenção do extrato (DMEM sem soro).

Para a confecção do gráfico da figura 5.21, o número de células na ausência do extrato foi considerado como 100%. Os dados foram normalizados pela média dos controles de todos os experimentos. As barras de erro representam o desvio padrão da média.

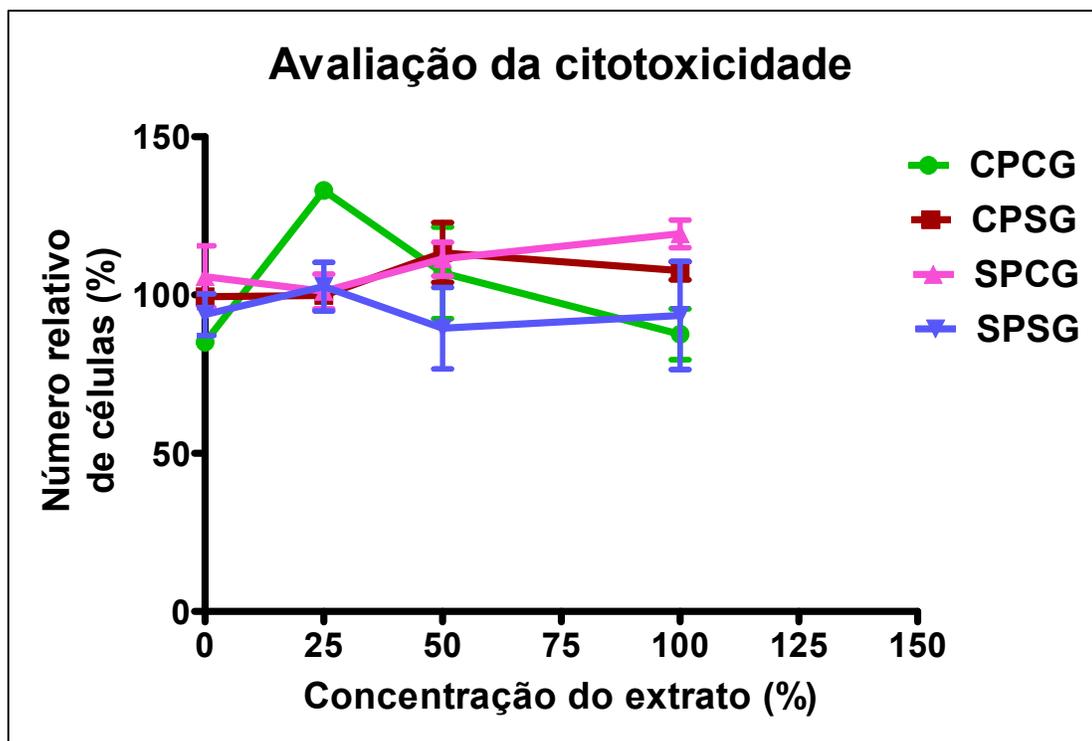


Figura 5.21 –Avaliação da citotoxicidade dos compósitos HA-Col I com e sem precipitação salina e tratados ou não com GTA. CPCG = com precipitação salina e com tratamento com GTA; CPSG = com precipitação salina e sem tratamento com GTA; SPCG = sem precipitação salina e com tratamento com GTA; SPSG = sem precipitação salina e sem tratamento com GTA.

Os dados mostram que nenhum dos compósitos apresentou resíduos tóxicos sendo, portanto, biocompatíveis *in vitro*. Em função da utilização de GTA, testes de genotoxicidade são indicados, bem como de implantação em subcutâneo de camundongos e intra-ósseos.

As imagens da figura 5.22 mostram que após 24 de incubação com DMEM sem soro, os compósitos haviam absorvido a cor do meio (figura 5.22 (7)). Os compósitos mostraram-se moldáveis, sendo manipulados com auxílio de uma pinça. Após o teste, foram observadas alterações na forma (figura 5.22 (6)).

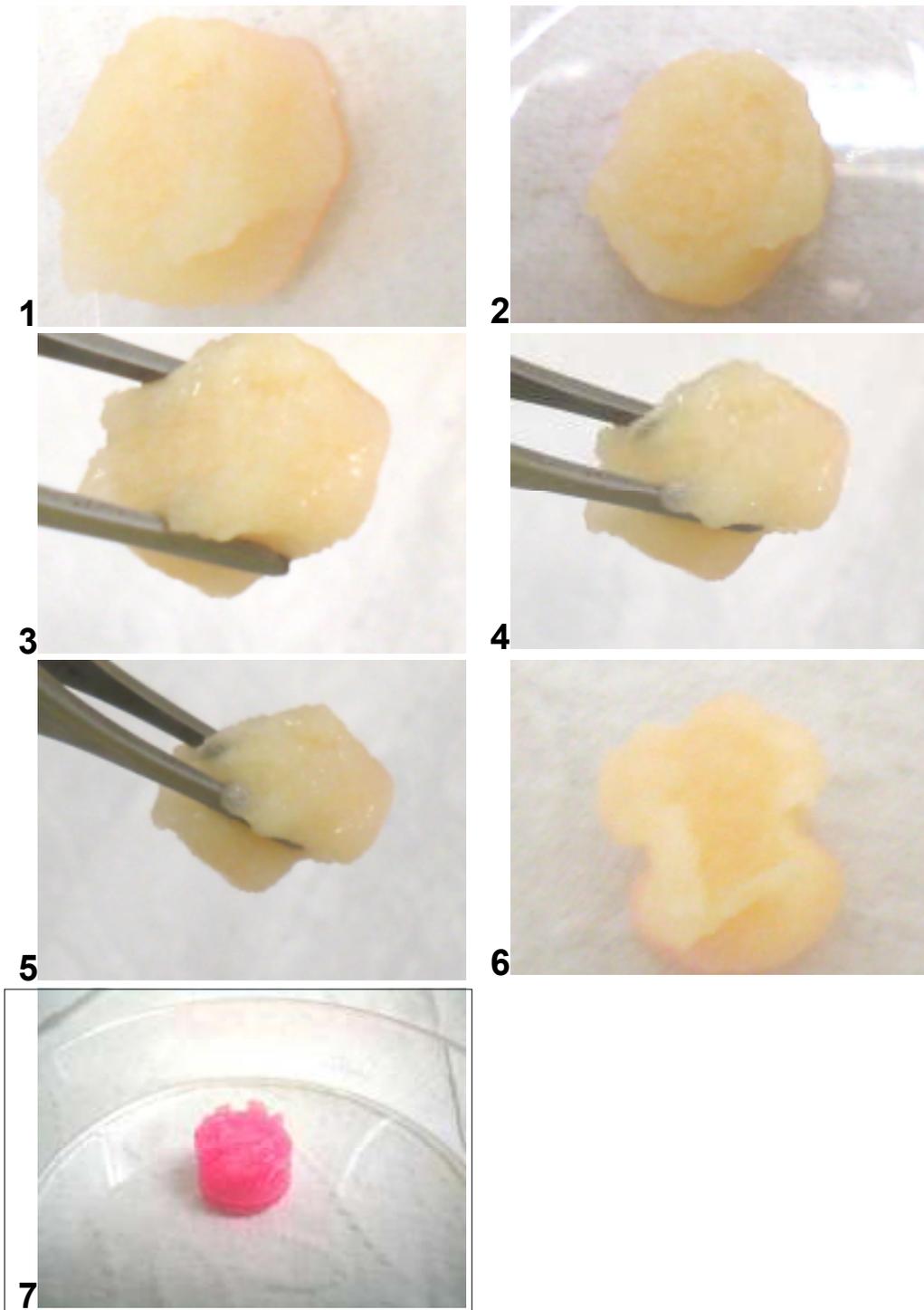


Figura 5.22 – (1; 2) Aspecto do material após o teste; (3; 4; 5) material sendo lavado com solução salina; (6) Aspecto do material após a manipulação mostrando que houve alteração parcial da forma; (7) Aspecto do material após a obtenção do extrato puro (modificação da cor pelo contato com DMEM e manutenção da integridade).

6.0 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de materiais que substituam sítios de lesões no organismo vem sendo cada vez mais aprimorada por grupos de pesquisa em todo o mundo. O material exigido atualmente é aquele que não gera problemas posteriores à sua implantação e, sempre que possível, não exija substituição após o decorrer de sua vida útil.

A produção de materiais com essa tecnologia leva em consideração a aceleração do processo de recuperação do tecido, uma vez que o paciente deve retornar ao seu estado saudável, além exercer suas funções na sociedade, o mais rápido possível. As pesquisas em bioengenharia tecidual visam à produção deste tipo de material. Arcabouços constituídos de materiais naturais (substâncias orgânicas como proteínas e hormônios) e células do próprio paciente, vêm se tornando opções no tratamento de alguns tipos de lesões.

Nesse trabalho, objetivou-se o estabelecimento de um protocolo de extração de fibras de colágeno tipo I (Col I) a partir de tendão de pata bovina e produção de um arcabouço compósito constituído de Col I e hidroxiapatita (HA) produzido de forma a mimetizar o tecido ósseo. Como referências para a produção do material compósito, utilizou-se SENA (2004) e KIKUCHI *et al.* (1999; 2001).

A extração das fibrilas de Col I se deu de maneira semelhante para as duas soluções ácidas utilizadas (ácido acético 1M e ácido fosfórico 59,32mM). A dissociação das fibras foi mais rápida em contato com a solução de ácido acético. A presença da enzima pepsina (SIGMA) é essencial para a retirada dos telopeptídeos e separação das fibrilas.

Durante a precipitação salina com adição de NaCl 20%, as fibrilas agregaram-se em feixes não organizados e a posterior redissociação foi mais rápida que a extração inicial. No entanto, a precipitação salina tem como desvantagem a manutenção dos cristais de NaCl ligados à superfície das fibrilas dissociadas. Essa característica reflete diretamente sobre a morfologia da deposição mineral observada nos compósitos.

O processo de precipitação salina garante a separação das fibrilas de Col I de outras substâncias orgânicas. A alta concentração da solução salina utilizada pode ter comprometido a retirada dos cristais de NaCl no processo de redissociação das fibras em solução de ácido fosfórico 59,32mM. Sucessivas lavagens com água destilada levaram a formação de compósitos com menor deposição de Halita na superfície das fibras. Portanto é possível a utilização da etapa de precipitação salina porém esta deve ser acompanhada de sucessivas lavagens com água destilada por diálise anterior a redissociação em solução de ácido fosfórico 59,32mM.

Os espectros de infravermelho (FTIR) demonstraram a preservação dos grupos característicos da proteína colágeno. As micrografias de força atômica (AFM) indicam que as fibrilas ainda estão agrupadas e que formam filmes através de suas ligações cruzadas intermoleculares. Também foi possível observar que as fibrilas que sofreram precipitação salina mantêm cristais de NaCl adjacentes à sua superfície mesmo após a redissociação destas em solução de ácido fosfórico 59,32mM. A presença desses cristais também foi observada após a formação dos compósitos através dos picos de Halita (cristais de NaCl) presentes nos difratogramas de raios-X e nas análises de Rietveld.

O meio reacional manteve-se estável durante as sínteses, com pouca adição de hidróxido de amônio para estabilização do pH igual a 9. Não foi verificada deposição da fase mineral no fundo do recipiente em nenhuma das reações e tampouco após a liofilização e esterilização. Isso indica que, mesmo em velocidade de agitação do meio, os precipitados de HA interagem e se mantêm unidos às fibras de Col I.

A formação dos compósitos foi diferente para cada Col I utilizado. As fibrilas extraídas em solução de ácido acético 1M rapidamente sofreram fibrilogênes e aderiram à haste de agitação utilizada para misturar as soluções no meio reacional. As fibras de Col I extraídas em solução de ácido fosfórico 59,32mM também sofreram fibrilogênese no meio reacional porém, somente nas reações com 3 horas de envelhecimento, algumas fibras se enovelaram ao redor da haste.

A utilização da solução de nitrato de cálcio mostrou-se mais eficiente quando comparada à solução de hidróxido de cálcio na liberação do cátion em solução resultando em uma formação mineral mais perfeita. A manipulação e gotejamento dessa

solução também é melhor pois esta não se deposita na vidraria tampouco na mangueira da bomba peristáltica, garantindo a estequiometria calculada anteriormente.

Quando comparados os compósitos constituídos por fibras de Col I extraídas em solução de ácido acético 1M com e sem precipitação salina, observou-se a formação mais rápida do novelo pelas fibras sem precipitação salina (SPS). A deposição mineral também foi mais homogênea nesse caso. A formação de HA em solução e a polimerização das fibras de Col I ocorrem de maneira simultânea no processo de produção dos compósitos.

Os compósitos apresentaram-se moldáveis, de fácil esterilização e manipulação. A morfologia dos compósitos apresenta poros, fibras agrupadas com a superfície mineralizada e fibras não-mineralizadas fazendo conexões entre as diferentes regiões. A morfologia condiz com o objetivo de fornecer um arcabouço poroso para a cultura de células e enxerto ósseo. A adesão de células à superfície dos compósitos é possível devido à presença da substância orgânica colágeno.

Nenhuma liberação da fase mineral foi verificada no período em contato com o meio de cultivo celular. O fato dos compósitos retardarem a liberação de sua fase mineral no meio de cultura diminui o risco de fagocitose dos precipitados pelas células cultivadas, impedindo que elas entrem em processo apoptótico (morte celular programada). A presença da fase mineral é importante para a manutenção das propriedades mecânicas do compósito, constituindo-se na fase de reforço.

Em estudos recentes de KIKUCHI *et al.* (2001), compósitos de HA-Col I foram utilizados em lesões ósseas e apresentaram incorporação ao tecido ósseo adjacente sem formação de encapsulamento fibroso. Na periferia do compósito, células da linhagem óssea foram observadas em um intenso processo de remodelação óssea e formação de lacunas de Howship provocadas por osteoclastos. Esse comportamento é devido à alta similaridade da composição e nanoestrutura do compósito com o osso natural, indicando que, em processos que exijam a biodegradação e substituição da matriz implantada, o compósito HA-Col I corresponde ao objetivo (ROCHA *et al.*, 2002).

O grupo de KIHARA *et al.* (2006) estudaram o comportamento celular em experimentos com células em presença de Col I exógeno. Seus resultados demonstraram que Col I exógeno facilita a diferenciação osteogênica e mineralização da matriz por células tronco mesenquimais. Também ocorre a formação de nódulos de mineralização mais rapidamente na presença da proteína.

Alguns compósitos apresentaram uma estrutura lamelar nas micrografias de MEV. É possível que o envelhecimento na haste agitadora leve à deposição em camadas na formação do novelo, resultando nessa deposição de fibras em camadas. Regiões não-mineralizadas poderiam realizar ligações cruzadas entre as fibras de Col I presentes nas camadas adjacentes, produzindo a estrutura observada.

A presença dos cristais de NaCl na superfície das fibras tratadas com precipitação salina (CPS) resultou em uma morfologia dos depósitos minerais diferentes do que aqueles observados nas fibras sem precipitação salina. É bem possível que ocorram mudanças de cargas na superfície das fibrilas de Col I devido aos íons Na^+ e Cl^- . KIKUCHI *et al.* (2001) refere-se ao tratamento salino como uma “neutralização das cargas superficiais do colágeno”.

Os compósitos tratados com glutaraldeído (GTA) permaneceram intactos após 7 dias em contato com meio de cultivo celular. Aqueles que não permaneceram em contato com GTA sofreram modificações em sua forma já com 3 dias. Através do teste de citotoxicidade realizado constatou-se que os compósitos HA-Col I produzidos SPS e CPS e tratados ou não com GTA não apresentam citotoxicidade às células cultivadas.

7.0 – CONCLUSÕES

Os compósitos hidroxiapatita-colágeno tipo I (HA-Col I) foram produzidos em duas fases nesse trabalho. Na primeira fase, objetivou-se selecionar a melhor combinação entre três variáveis com dois níveis cada. Na segunda fase, a combinação selecionada para a produção do compósito HA-Col I foi otimizada a fim de aumentar sua durabilidade em cultura. As seguintes conclusões resultaram deste trabalho.

1-) O protocolo de extração de colágeno tipo I (Col I) que apresentou melhores resultados utilizou solução de ácido acético para extração, pepsina, seguido de precipitação salina e sucessivas lavagens em água destilada.

2-) O método de produção dos compósitos HA-Col I utilizando solução de nitrato de cálcio como fonte de cálcio é mais eficiente que a solução de hidróxido de cálcio, pois os íons cálcio apresentam-se mais dissociados. Isso resulta em garantia da estequiometria calculada anteriormente para a produção do compósito. Os picos dos difratogramas de raios $-X$ e diagramas de Rietveld são mais estreitos, indicando uma melhor organização da fase mineral ou cristais maiores.

3-) Utilizando a espectroscopia de infravermelho observou-se, no compósito, a preservação da proteína Col I e incorporação de íons carbonatos à fase mineral formada.

4-) O tempo de envelhecimento de três horas foi importante para a obtenção de difratogramas de raios-X e diagramas de Rietveld melhor definidos. Não houve, entretanto, diferença significativa nos parâmetros de rede quando comparado às sínteses não envelhecidas (tempo de envelhecimento igual a zero). Para o compósito produzido a partir de colágeno extraído em solução de ácido fosfórico não há praticamente diferença nas intensidades observadas.

5-) Os compósitos não apresentaram liberação de sua fase mineral quando expostos ao meio de cultivo celular por tempos de até 7 dias. Possuem uma morfologia adequada à adesão e migração celular, com poros e fibras conectadas. Além disso, os compósitos

são moldáveis, o que lhes permite grande variedade de aplicações em sítios de lesões ósseas.

6-) O tratamento com glutaraldeído (GTA) mostrou-se fundamental para a manutenção da estrutura do compósito em meio de cultivo celular pelo período de sete dias. Os compósitos que permaneceram em contato com GTA não apresentaram citotoxicidade.

8.0- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1-) Estudos bioquímicos relacionados à proteína Col I de acordo com os protocolos desenvolvidos.
- 2-) Estudo da fase mineral, por microscopia eletrônica de transmissão, dos tamanhos dos cristais formados a partir das combinações das variáveis e seus níveis.
- 3-) Incorporação de fármacos à estrutura do compósito com a intenção de liberação controlada quando colocado no sítio da lesão.
- 4-) Estudo do comportamento celular quando em contato com o compósito HA-Col I.
- 5-) Avaliação *in vivo* dos compósitos HA-Col I no processo de recuperação de lesões ósseas.

9.0 - REFERÊNCIAS

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2006, *Biologia Molecular da Célula*. 4 ed. Porto Alegre, Artmed.

ANSELME, K., 2000; “Osteoblasts Adhesion on Biomaterials”, *Biomaterials*, v. 21, pp. 667-678.

ANSELME, K., BIGERELLE, M., 2006, “Modeling Approach in Cell/Material Interactions Studies”, *Biomaterials*, v. 27, pp. 1187-1199.

AOKI, H., 1994, *Medical applications of hydroxyapatite*. ed. Tokyo, Ishiyaku EuroAmerica.

BER, S., TURON-KÖSE, G., HASIRCI, V., 2005; “Bone Tissue Engineering on Patterned Collagen Films: an *in vitro* Study”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 1977–1986.

BEREILLE, R., LAFAGE-PROUST, M., H, FAUCHEUX, C., LAROCHE, N., WENZ, R., DARD, M., AMÉDÉE, J., 2000; “Various Evaluation Techniques of Newly Formed Bone in Porous Hydroxyapatite Loaded with Human Bone Marrow Cells Implanted in an Extra-osseous Site”. *Biomaterials*, v. 21, pp. 1345-1352.

BET, M.R., GOISSIS, G., LACERDA, C.A, 2001; “Characterization of Polyanionic Collagen Prepared by Selective Hydrolysis of Asparagines and Glutamine Carboxyamine Side Chains”, *Biomacromolecules*, v. 2, pp. 1074-1079.

THE BIOMET ADVANTAGE – BIOMET Annual Report; <http://www.biomet.com/ci/investors/financials/2006.pdf>; acesso em 23 de Janeiro de 2008.

BOHNER, M., 2000; “Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphates Cements”, *Injury International Journal of the Care of the Injury*, v. 31, pp. 37-47.

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

CALLISTER, W.D., 2000, *Materials Science and Engineering: An Introduction*, 5ed. Rio de Janeiro, LTC.

CARVALHO, H.F, COLLARES-BUZATO, C.B., 2005, *Células: Uma Abordagem Multidisciplinar*, 1 ed. São Paulo, Manole.

CHARULATHA, V., RAJARAM. A., 2003; “Influence of Different Crosslinking Treatments on the Physical Properties of Collagen Membranes”, *Biomaterials*, v. 24, pp. 759-767.

COMARCK, D.H, 1991, *Ham Histologia*, 9 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.

COOL, S.M., FORWOOD, M.R., CAMPBELL, P., BENNETT, M.B., 2002; “Comparisons Between Bone and Cementum Compositions and the Possible Basis for Their Layered Appearances”, *Bone*, vol. 30, n.2, pp. 382-392.

CUI, F-Z., LI, Y., GE, J., 2007, “Self-assembly of Mineralized Collagen Composites”, *Materials Science and Engineering*, vol. 57, pp. 1-27.

CUKIERMAN, E., PANKOV, R., YAMADA, K.M., 2002; “Cell Interactions with Three-Dimensional Matrices”, *Current Opinion in Cell biology*, v.14, pp. 633-639.

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

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

FIGUEIRÓ, S.D., MACÊDO, A.A.M., MELO, M.R.S., FREITAS, A.L.P., MOREIRA, R.A., de OLIVEIRA, R.S., GÓES, J.C., SOMBRA, A.S.B., 2006, “On the Dielectric Behaviour of Collagen-Algal Sulfated Polysaccharide Blends: Effect of Glutaraldehyde Crosslinking”, *Biophysical Chemistry*, v. 120, pp. 154-159.

FRANZ-ODENDAAL, T.A., HALL, B.K., WITTEN, P.E., 2006; “Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes”, *Developmental Dynamics*, v. 235, pp. 176-190.

FRIESS, W., 1998; “Collagen – Biomaterial for Drug Delivery¹”, *European Journal of Pharmaceutics*, v. 45, pp. 113-136.

GE, J., CUI, F-Z., WANG, X., WANG, Y., 2007; “New Evidence of Surface Mineralization of Collagen Fibrils in *Wild Type* Zebrafish Skeleton by AFM and TEM”, *Materials Science and Engineering C*, v. 27, pp. 46-50.

GENTLEMAN, E., LAY, A.N., DICKERSON, D.A., NAUMAN, E.A., LIVESAY, G.A., DEE, K.C., 2003, “Mechanical Characterization of Collagen Fibers and Scaffolds for Tissue Engineering”, *Biomaterials*, v.24, pp. 3805-3813.

HADDAD, A., SESSO, A., WEISSMULLER, G., ROCHA, G.M., ATTIAS, M., FARINA, M., MOTTA, M.C., MEIRELLES, M.N., SILVEIRA, M., CENCHIMOL, M., MONÇORES, M.C., SOARES, M.J., BARTH, O.M., ZORN, T.M.T., PADRON, T.S., LINS, U.C., SOUZA, W., 2007, *Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas*, 1 ed. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia (SBMM).

HUTMACHER, D.W., 2000; “Scaffolds in Tissue engineering Bone and Cartilage”, *Biomaterials*, v. 21, pp. 2529-2543.

JIANG, B., WU, Z., ZHAO, H., TANG, F., LU, J., WEI, Q., ZHANG, X., 2005; “Electron Beam Irradiation Modification of Collagen Membrane”, *Biomaterials*, v. 22.

KALITA, S.J., BHARDWAJ, A., BHATT, H.A., 2006; “Nanocrystalline Calcium Phosphate Ceramics in Biomedical Engineering”, *Materials Science and Engineering C*, vol.27, 441-449.

KANNAN, S., BALAMURUGAN, A., RAJESWARI, S., 2001; “Bio-composites: A Review of Literature”, *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 14, n.2, pp. 30-36.

KARAGEOURGIOU, V., KAPLAN, D., 2005; “Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 5474–5491.

KATZ, J.L., MISRA, A., SPENCER, P., WANG, Y., BUMRERRAJ, S., NOMURA, T., EPPELL, S.J., TABIB-AZAR, M., 2007; “Multiscale Mechanics of Hierarchical Structure/Property Relationships in Calcified Tissues and Tissue/material Interfaces”, *Materials Science and Engineering C*, v. 27, pp. 450-468.

KIHARA, T., HIROSE, M., OSHIMA, A., OHGUSHI, H., 2006; “Exogenous Type I Collagen Facilitates Osteogenic Differentiation and Acts as a substrate for Mineralization of Rat Marrow Mesenchymal Stem Cells *in vitro*”, *Biochemical and Biophysical Communications*, v. 341, pp. 1029-1035.

KIKUCHI, M., SUETSUGU, Y., TANAKA, J., ITOH, S., ICHINOSE, S., SHINOMIYA, K.S., HIRAOKA, Y., MANDAI, Y., NAKATANI, S., 1999; “The biomimetic synthesis and biocompatibility of self-organized hydroxyapatite/collagen composites”, *Bioceramics*, v. 12, pp. 393-396.

KIKUCHI, M., ITOH, S., ICHINOSE, S., SHINOMIYA, K., TANAKA, J., 2001; “Self-Organization Mechanism in a Bone-Like Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Synthesizes *in vitro* and its Biological Reaction *in vivo*”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 1705-1711.

KIKUCHI, M., IKOMA, T., ITOH, S., MATSUMOTO, H.N., KOYAMA, Y., TAKAKUDA, K., SHINOMIYA, K.; TANAKA, J., 2004a; “Biomimetic Synthesis of

Bone-Like Nanocomposites Using the Self-Organization Mechanism of Hydroxyapatite and Collagen”, *Composites Science and Technology*, v. 64, pp. 819-825.

KIKUCHI, M., MATSUMOTO, H.N., YAMADA, T., KOYAMA, Y., TAKAKUDA, K., TANAKA, J., 2004b; “Glutaraldehyde Cross-linked Hydroxyapatite/Collagen Self-Organization Nanocomposites”, *Biomaterials*, v. 25, pp. 63-69.

KOIDE, T., HOMMA, D.L., ASADA, S., KITAGAWA, K., 2005; “Self-Complementary Peptides for the Formation of Collagen-Like Triple Helical Supramolecules”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, pp. 5230-5233.

LANDIS, W.J., SILVER, F.H., 2002; “The structure and Function of Normally Mineralizing Avian Tendons”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 133, pp. 1135-1157.

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

LEGEROS, R.Z., 2002; “Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphate”, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 395, pp. 81-98.

LEGEROS, R.Z., LIN, S., ROHANIZADEH R., MIJARES, D., LEGEROS, J.P., 2003, “Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics: Preparation, Properties and Applications”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 14, pp. 201-209.

MACKIE, E.J., 2003; “Osteoblasts: Novel roles in Orchestration of Skeletal Architecture”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, pp. 1301-1305.

MENEGHINI, C., DALCONI, M.C., NUZZO, S., MOBILIO, S., WENK, R.H., 2003, “Rietveld Refinement on X-Ray Diffraction Patterns of Bioapatite in Human Fetal Bones”, *Biophysical Journal*, v. 84, pp. 2021 – 2029.

MIZUNO, M., FUJISAWA, R., KUBOKI, Y., 2000, “Type I Collagen-Induced Osteoblastic Differentiation of Bone-Marrow Cells Mediated by Collagen- α 2 β 1 Integrin Interaction”, *Journal Of Cellular Physiology*, v. 184, pp. 207–213.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S., 2005; “Development of Nanocomposites for Bone Grafting”, *Composites Science and Technology*, v. 65, pp. 2385-2406.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S., 2006, *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*, 1 ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica.

PAIVA-SANTOS, C.O., 2001, *Caracterização de Materiais pelo Método de Rietveld com Dados de Difração Pó Policristais: Aplicações do Método de Rietveld*. Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

PROVENZANO, P. P., VANDERBY, R.J., 2006; “Collagen Fibril Morphology and Organization: Implications for Force Transmission in Ligament and Tendon”, *Matrix Biology*, v. 25, pp. 71-84.

RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E., 1996, *Biomaterial Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 1 ed. Estados Unidos da América, Endorsed by the Society for Biomaterials.

RHEE, S-H., SUETSUGU, Y., TANAKA, J., 2001; “Biomimetic Configurational Arrays of Hydroxyapatite Nanocrystals on Bio-Organics”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 2843-2847.

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

ROUahi, M., CHAMPION, E., GALLET, O., JADA, A., ANSELME, K., 2006; “Physico-Chemical Characteristics and Protein Adsorption Potential of Hydroxyapatite Particles: Influence on *in vitro* Biocompatibility of Ceramics After Sintering”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 47, pp. 10-19.

SAMIRIC, T., ILIC, M.Z., HANDLEY, C.J., 2004; “Characterisation of Proetoglycans and Their Catabolic Products in Tendon and Explant Cultures of Tendon”, *Matrix Biology*, v. 23, pp. 127-140.

SCHARNWEBER, D., BORN, R., FLADE, K., ROESSLER, S., STOELZEL, M., WORCH, H., 2004, “Mineralization Behaviour of Collagen Type I Immobilized on Different Substrates”, *Biomaterials*, v. 25, pp. 2371-2380.

SENA, L.A., 2003; *Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações biomédicas: síntese e Caracterização*. Exame de Qualificação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SENA, L.A., 2004, *Produção e Caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações biomédicas*. D.Sc. Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

SIPERKO, L.M., LANDIS, W.J., 2001, “Aspects of Mineral Structure in Normally Calcifying Avian Tendon”, *Journal of Structural Biology*, v. 135, pp. 313–320.

SLÓSZARCZYK, A., PASZKIEWICZ, Z., PALUSZKIEWICZ, C., 2005, “FTIR and XRD Evaluation of Carbonated Hydroxyapatite Powders Synthesized by Wet Methods”, *Journal of Molecular Structure*, v. 744-747, pp. 657-661.

STRASSER, S., ZINK, A., JANKO, M., HECXL, W.M., THALLHAMMER, S., 2007, “Structural investigations on Native Collagen Type I Fibrils Using AFM”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 354, pp. 27-32.

TACHIBANA, A., KANEKO, S., TANABE, T., YAMAUCHI, K., 2005; “Rapid Fabrication of Keratin-Hydroxyapatite Hybrid Sponges Toward Osteoblast Cultivation and Differentiation”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 297-302.

TAKAMORI, E.R., 2004, *Estudo in vitro da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado*, M.Sc. Dissertação, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.

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

TORTORA, G.J., 2000, *Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e Fisiologia*, 4 ed. Porto Alegre, Artmed.

UEMURA, T., DONGD, J., WANGA, Y., KOJIMA, H., SAITOF, T., IEJIMA, G.D., KIKUCHI, M., TANAKA, J., TATEISHIC, T., 2003, “Transplantation of Cultured Bone Cells Using Combinations of Scaffolds and Culture Techniques”, *Biomaterials*, v. 24, pp. 2277-2286.

VALLET- REGÍ, M., 1997; “Introduction to the World of Biomaterials”, *Anales de Química Int. Ed.*, v. 93, pp. S6-S14.

VAN VLACK, L.H., 1975, *Princípios de Ciência dos Materiais*. 2 ed. São Paulo, Edgard Blücher LTDA.

VARGAS, D.M., AUDÍ, L., CARRASCOSA, A., 1997; “Peptídeos Derivados do Colágeno: Novos Marcadores do Metabolismo Ósseo”, *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 4.

VERNON, R.B., GOODEN, M.D., LARA, S.L., WIGHT, T.N., 2005, “Microgrooved Fibrillar Collagen Membranes as Scaffolds for Cell Support and Alignment”, *Biomaterials*, v.26, pp. 3131-3140.

WAHL, D.A., CZERNUSZKA, J.T., 2006; “Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair”, *European Cells and Materials*, v. 11, pp. 43-56.

WOPENKA, B., PASTERIS, J.D., 2005, “A Mineralogical Perspective on the Apatite in Bone”, *Materials Science and Engineering*, v. 25, pp. 131-143

YUNOKI, S., IKOMA, T., MONKAWA, A., OLITA, K., KIKUCHI, M., SOTOME, S., SHINOMIYA, K., TANAKA, J., 2005, "Control of Pore Structure and Mechanical Property in Hydroxyapatite/Collagen Composite Using Unidirectional Ice Growth", *Materials Letters*, vol.60, pp. 999-1002.

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

ZHAI, Y., CUI, F.Z., WANG, Y., 2005; "Formation of Nano-Hydroxyapatite on Recombinant Human-Like Collagen Fibrils", *Current Applied Physics*, v. 5, pp.429-432.