



ESTUDO DA DEGRADAÇÃO “IN VITRO” DO COMPÓSITO 3-D  
HIDROXIAPATITA/COLÁGENO TIPO I SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Marianna de Oliveira da Costa

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

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Rio de Janeiro  
Março de 2014

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO “IN VITRO” DO COMPÓSITO 3-D  
HIDROXIAPATITA/COLÁGENO TIPO I SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Marianna de Oliveira da Costa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

---

Prof<sup>a</sup>. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.

---

Dra. Márcia Soares Sader, D. Sc.

---

Prof. Marcos Farina de Souza, D. Sc.

---

Dra. Elena Mavropoulos Oliveira Tude, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL  
MARÇO DE 2014

Costa, Marianna de Oliveira

Estudo da Degradação *in vitro* do compósito 3-D hidroxiapatita/colágeno tipo I sob condições estática e dinâmica./ Marianna de Oliveira da Costa – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014

XIII, 69 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2014.

Referencias Bibliográficas: p. 62 - 69.

1. Biomateriais. 2. Colágeno. 3. Hidroxiapatita. 4. Engenharia tecidual. Óssea I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título

*A mamãe, Manilda, por nunca ter medido  
esforços para que eu chegasse até aqui.  
Obrigada por todo amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma etapa cumprida e por todo o aprendizado nesses dois anos de mestrado.

A minha mãe, por ter me dado todo o suporte para que eu completasse essa jornada. Obrigada pelo amor incondicional e por ser meu porto seguro.

A prof<sup>a</sup> Glória Soares, por me orientar desde tão jovem e acreditar no meu potencial, mesmo eu sendo de uma área diferente. Obrigada pelo incentivo, pela ajuda, pelos grandes conselhos e por ser um exemplo de vida.

A Dra Márcia Sader, por ser minha verdadeira “mãe científica”. Sou grata por tudo que aprendi em anos de iniciação científica e pela grande ajuda no mestrado. Obrigada pela grande amizade e carinho de sempre.

A prof<sup>a</sup> Rossana Thiré, que, com a aposentadoria da prof<sup>a</sup> Glória, me aceitou como aluna de mestrado. Obrigada pela orientação, pela ajuda, pela paciência, pela amizade e pelos bons conselhos tanto na vida profissional quanto na pessoal.

Ao meu grande amigo e namorado, Oberdan Assis, por me apoiar, ter paciência, ser companheiro e me animar quando eu não acreditava mais em mim. Obrigada por fazer com que eu me torne uma pessoa melhor a cada dia e por me dar todo amor do mundo.

A minha família e aos meus amigos não científicos, obrigada pelos momentos de descontração e por ouvirem meus desabafos acadêmicos.

A banca, por aceitar participar da avaliação dessa dissertação e enriquecer esse trabalho com suas sugestões.

Aos velhos amigos do antigo laboratório de Biomateriais, Márcia, Dóris, Helena, Cris, Lígia, Renatinha, Ana Paula, entre outros, pela boa convivência e aprendizado nos anos de iniciação científica.

Aos novos amigos do laboratório de Biopolímeros, Bruna, Márcio, Taíla, Raquel, Lilian, Patrícia e Paulo Henrique. Com vocês, o cotidiano foi mais leve e divertido.

Aos amigos que fiz no primeiro ano de mestrado, Patrícia, Paulo Henrique, Jéssica, Marlon, Danielle, Carol e Camila, obrigada pelo incentivo nos momentos difíceis, pelas horas enriquecedoras de estudo e pela parceria de sempre.

Ao prof Marcos Farina, físico e professor do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), pelas imagens de MET, pelas ricas conversas e grandes conselhos.

Aos técnicos Rodrigo (DSC), Márcia (MEV) e Ana Paula (DRX e FTIR) do PEMM pelas análises. À técnica Mair Machado, ICB, pela preparação das amostras de MET e pela ajuda de sempre.

A prof<sup>a</sup> Verônica Maria de Araújo Calado e a pesquisadora Sirley Garcia Secchi, do LABTeR - Laboratório de Termo Análises e de Reologia, pelas análises de TGA. Em especial, agradeço a Sirley Secchi por ser tão gentil e não pestanejar em me ajudar.

A pesquisadora Elena Mavropoulos Oliveira Tude, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) por doar as células MC3T3. Ao aluno William Querido, pelo teste de citotoxicidade e pela grande ajuda.

A todos que, mesmo não lembrados, me ajudaram de forma direta ou indireta na produção desse trabalho.

A Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

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

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO “IN VITRO” DO COMPÓSITO 3-D  
HIDROXIAPATITA/COLÁGENO TIPO I SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA

Marianna de Oliveira da Costa

Março/2014

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A engenharia de tecidos combina os conceitos de engenharia e ciências da vida, tendo como objetivo principal a produção de substitutos biológicos que ajudam a restaurar e/ou manter as funções de um determinado tecido perdido devido a trauma ou tumores. A produção de *scaffolds* à base de hidroxiapatita e colágeno tipo I é uma alternativa para restaurar o tecido ósseo lesado, uma vez que estes são os principais constituintes da matriz óssea. É importante também estudar o comportamento da degradação do arcabouço em condições que mimetizem o ambiente do implante, na presença de uma solução simuladora de fluido corpóreo, temperatura e pHs . O objetivo do presente trabalho foi estudar a degradação “*in vitro*” do compósito 3D hidroxiapatita/colágeno tipo I sob condições estática e dinâmica. Os arcabouços foram reticulados com glutaraldeído a 0,125 %, para manter a sua estabilidade em condições de unidade. Caracterizações físico-químicas como MEV, MET, FTIR, DRX e TGA foram realizadas. Além disso, o comportamento dos compósitos e a liberação dos principais produtos de degradação , cálcio e fósforo, em condições que imitam o fluido corporal (pH 7,4) e de uma resposta inflamatória (pH 4,0), foram avaliados.

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

STUDY OF "IN VITRO" DEGRADATION OF 3-D HYDROXYAPATITE/COLLAGEN  
TYPE I COMPOSITES UNDER STATIC AND DYNAMIC CONDITIONS

Marianna de Oliveira da Costa

March 2014

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Department: Metallurgical and Materials Science Engineering

Tissue engineering combines the concepts of engineering and life sciences and its main goal is the development of biological substitutes that help to restore and / or to maintain the functions of a particular tissue, damaged due to trauma or tumors. The production of scaffolds based on hydroxyapatite and collagen type I is an alternative for restoring damaged bone tissue, since these are the main constituents of bone matrix. It is also important to study the behavior of the degradation of the scaffold under conditions that mimic the environment of the implant, in the presence of a simulated body fluid solution, at the characteristic temperature and in the adequate pH. The aim of this work was to study the "in vitro" degradation of the composite 3D hydroxyapatite/type I collagen under static and dynamic conditions. The scaffolds were crosslinked with glutaraldehyde 0.125 % to maintain its stability under conditions of unity. The scaffolds were characterized via SEM, TEM, FTIR, XRD and TGA. Moreover, the behavior of the composite and release of the major degradation products, calcium and phosphorus in conditions that mimic body fluid (pH 7.4) and that mimic an inflammatory response (pH 4.0 ) were studied.

## ÍNDICE

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2. <b>OBJETIVOS</b> .....	4
3. <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
3.1 Engenharia Tecidual e Biomateriais.....	5
3.2 Tecido Ósseo.....	7
3.3 Colágeno tipo I.....	10
3.4 Fosfatos de cálcio.....	12
3.4.1 Hidroxiapatita.....	14
3.5 Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno.....	16
3.6 Interações biomaterial-tecido ósseo.....	18
3.7 Ensaio de Degradação.....	19
4. <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Extração do colágeno bovino e produção do compósito 3-D hidroxiapatita- colágeno (65:35).....	21
4.2 Caracterizações físico-químicas dos compósitos.....	23
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): .....	23
4.2.2 Difração de raios-x (DRX) e Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	25
4.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....	27
4.2.4 Porosidade Aparente.....	28
4.2.5 Citotoxicidade.....	29
4.3 Ensaio de Degradação <i>in vitro</i> .....	30
4.3.1 Fotometria.....	32
4.4 Análise Estatística.....	33
5. <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
5.1 Caracterizações físico-químicas do compósito HA/Col (65:35).....	34
5.1.1 Caracterização da fase mineral na ausência de colágeno.....	35
5.1.2 Estudos térmicos dos compósitos HA/Col (65:35).....	37
5.1.3 Porosidade.....	38
5.2 Caracterizações morfológicas do compósito HA/Col (65:35).....	39
5.3 Citotoxicidade do arcabouço compósito HA/Col reticulado.....	42
5.4 Estudos de degradação <i>in vitro</i> .....	43
5.4.1 Degradação estática.....	44

5.4.2	Degradação dinâmica.....	50
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	60
7.	<b>TRABALHOS FUTUROS</b> .....	61
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Morfologia do osso (Adaptado de An & Draughn, 2000).....	9
<b>Figura 3.2.</b> Esquema representativo da formação da tripla hélice do colágeno (Fonte: Goissis, 2007).....	11
<b>Figura 3.3.</b> Arranjo atômico da hidroxiapatita (Ivanova, 2001).....	15
<b>Figura 4.1.</b> Macrografia dos compósitos 3-D hidroxiapatita:colágeno (65:35).....	23
<b>Figura 4.2.</b> Biorreatores em estufa de CO <sub>2</sub> .....	31
<b>Figura 5.1.</b> Espectro do compósito hidroxiapatita/colágeno reticulado (A) e do colágeno extraído de tendão bovino puro (B).....	35
<b>Figura 5.2</b> Espectro do compósito HA:Col antes (A) e após tratamento com hipoclorito de sódio 3% (B).....	36
<b>Figura 5.3.</b> Difratoograma da fase inorgânica do compósito HA/Col (65/35) sintetizado em pH = 9 e 38°C.....	36
<b>Figura 5.4.</b> Análise termogravimétrica do compósito HA/Col (65:35) .....	37
<b>Figura 5.5.</b> Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do compósito HA/Col (65:35) reticulado em diferentes aumentos. Em (D), temos o detalhe da deposição dos cristais de HA nas fibras de colágeno.....	39
<b>Figura 5.6.</b> Micrografias de MET do compósito HA/Col sintetizado. Em (A), observa-se as fibras de colágeno e a grande deposição dos cristais de HA em sua periferia, em (B) a fibra de colágeno e em (C) o destaque para os cristais de HA.....	41
<b>Figura 5.7.</b> Citotoxicidade do compósito HA/Col reticulado segundo MTT. Diferenças significativas entre os grupos (*). $p < 0.05$ .....	43
<b>Figura 5.8.</b> Micrografias do compósito HA/Col submetido às condições estáticas em pH ácido após 6 horas (A), 168 horas (B) e 336 horas (C).....	44
<b>Figura 5.9.</b> Micrografias do compósito HA/Col submetido às condições estáticas em pH neutro após 6 horas (A), 168 horas (B) e 336 horas (C).....	44
<b>Figura 5.10.</b> Micrografias dos arcabouços HA/Col submetido às condições estáticas em pH ácido.....	45
<b>Figura 5.11.</b> Micrografias dos arcabouços HA/Col submetido às condições estáticas em pH neutro.....	46
<b>Figura 5.12.</b> Liberação de cálcio (Ca) em meio ácido e neutro, sob condições estáticas. Diferenças significativas entre os tempos (*, **). $p < 0,05$ .....	47
<b>Figura 5.13.</b> Liberação de fósforo (P) em meio ácido e neutro, sob condições estáticas.....	48

<b>Figura 5.14.</b> Curvas de perda de massa dos compósitos HA/Col submetidos a 7 e 14 dias de ensaio, sob condições estáticas.....	49
<b>Figura 5.15.</b> Micrografias de MEV do compósito HA/Col submetido às condições dinâmicas em pH ácido onde (A) em 6 horas, (B) em 168 horas e (C) em 336 horas.....	50
<b>Figura 5.16.</b> Micrografias de MEV do compósito HA/Col submetido às condições dinâmicas em pH básico onde (A) em 6 horas, (B) em 168 horas e (C) em 336 horas.....	51
<b>Figura 5.17.</b> Micrografias dos arcabouços HA/Col submetido às condições dinâmicas em pH ácido.....	52
<b>Figura 5.18.</b> Micrografias dos arcabouços HA/Col submetido às condições dinâmicas em pH neutro.....	53
<b>Figura 5.19.</b> Liberação de Cálcio em meio ácido e neutro sob condições dinâmicas.....	54
<b>Figura 5.20.</b> Liberação de fósforo em meio ácido sob condições dinâmicas.....	55
<b>Figura 5.21.</b> Micrografias de MET do compósito HA/Col antes (A) e após ensaios dinâmicos em pH ácido (B).....	56
<b>Figura 5.22.</b> Micrografias de MET do compósito HA/Col após ensaios dinâmicos em pH neutro.....	57
<b>Figura 5.23.</b> Curvas de perda de massa dos compósitos HA/Col submetidos a 7 e 14 dias de ensaio, sob condições dinâmicas.....	58
<b>Figura 5.24.</b> Variação de pH da solução ácida (A) e neutra (B), nos ensaios estáticos e dinâmicos.....	59

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Fosfatos de cálcio existentes em sistemas biológicos (modificado de Moreira, 2006, Guastaldi & Aparecida, 2010 e Basu <i>et al</i> , 2009).....	13
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

A perda ou lesão de um órgão gera perda de função e transtornos ao ser humano, além de diminuir suas atividades sociais. Com o aumento da expectativa de vida, problemas decorrentes de doenças degenerativas, fragilidade dos ossos, entre outros, tornaram-se comuns, levando à perda das funções normais do tecido ósseo. Tais perdas vêm sendo consideradas uma questão de saúde preocupante em todo o mundo, gerando um aumento dos gastos no setor de saúde.

No Brasil, de acordo com o Sistema Único de Saúde (SUS), o gasto com fraturas de idosos chegou a aproximadamente oitenta e um milhões de reais em 2009. Além disso, o gasto do SUS com motociclistas tem aumentado significativamente, pois o número de atendimentos médicos a acidentados dobrou em um período de três anos, elevando os gastos com esse tipo de atendimento em 113% de 2008 a 2011 (Fonte: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>. Data de acesso: 11 de novembro de 2012).

O tratamento de lesões ósseas causadas por qualquer trauma, ou mesmo tumores, são as maiores preocupações na cirurgia ortopédica. Existem algumas estratégias para o tratamento de lesões e perdas ósseas os quais incluem métodos tradicionais como a retirada do mesmo tipo de tecido do próprio paciente (enxertos autógenos) ou de outro indivíduo da mesma espécie (enxertos alógenos). Ambos são considerados boas terapias, mas tem suas limitações. O uso de enxertos alógenos ou xenógenos, proveniente de animais, aumentam as chances de incompatibilidade entre os indivíduos, ocasionando reações imunológicas indesejáveis. Quando ocorrem grandes defeitos com a perda de um maior volume ósseo, há a necessidade de uma grande quantidade de material para o preenchimento. O uso de biomateriais sintéticos

é capaz de diminuir complicações práticas que surgem ao usarem-se enxertos autógenos e alógenos (WOPENKA & PASTERIS, 2005).

Nessa conjuntura, está em evidência uma área de pesquisa que tem como fundamento a união de conceitos de engenharia e ciências da saúde, visando a produção de biomateriais que mantenham ou restaurem as funções de um determinado tecido ou órgão. Tal área de pesquisa é denominada Engenharia Tecidual (GRANJEIRO *et al*, 2011).

O osso humano é um órgão extremamente complexo, composto de materiais orgânico e inorgânico, onde a hidroxiapatita e o colágeno são bem organizados numa estrutura hierárquica (SIONKOWSKA & KOZLOWSKA, 2010). Em lesões ósseas, tais substitutos devem apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas essenciais para tornarem-se fortes candidatos a atuarem como arcabouços, material granulado ou microesferas, estimulando a proliferação, crescimento e remodelamento da matriz óssea.

A escolha de um biomaterial depende de algumas questões, tais como o objetivo de sua aplicabilidade, o local a ser inserido, o período de tempo e qual propriedade esse material deve desenvolver. Aspectos como a química de superfície, a biologia do tecido que entrará em contato direto com o implante, a área de superfície do material, entre outros, também precisam ser estudados. O material que servirá de substituto ósseo requer uma porosidade interconectada que permita a neovascularização além da troca de gases e nutrientes, biocompatibilidade e bioatividade, devendo apresentar boa resistência mecânica e a capacidade de serem moldáveis (LI & CHANG, 2005).

O colágeno (Col) é a proteína mais abundante nos invertebrados, sendo uma importante proteína estrutural do tecido conjuntivo, estando presente na pele de animais e osso, constituindo 30% de sua proteína total (Z-R LI *et al*, 2013). A hidroxiapatita (HA), por sua vez, é o principal componente inorgânico de tecidos calcificados. Nas últimas décadas, muitas pesquisas foram realizadas em torno destes dois materiais, com o objetivo de fabricar um biomaterial que seja compatível com o sítio ao qual será inserido. Sendo estes os principais componentes da matriz óssea, a formulação de um biomaterial com tal composição aumenta a osseointegração do material com o sítio hospedeiro. Compósitos de colágeno e hidroxiapatita tem a capacidade de mimetizar o tecido ósseo. Estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, mostram a importância do tipo de colágeno, das condições de fabricação do arcabouço, da porosidade e da reticulação (WAHL *et al.*, 2006).

Estudos de degradação de compósitos utilizados na engenharia tecidual são importantes para avaliar seus subprodutos de degradação em determinados meios e condição padrão. Além disso, estes testes são importantes para estudar a taxa de dissolução/precipitação em diversas soluções, já que o desenvolvimento de biomateriais para enxertia óssea e engenharia de tecidos prevê que o material se degrade de forma gradual e compatível com a taxa de formação do novo tecido. Ensaio dinâmico são importantes para se conhecer o provável comportamento do material implantado *in vivo*, uma vez que se aproximam da situação clínica, com a presença de fluxo constante da solução simuladora de fluido corpóreo. Tradicionalmente, testes estáticos são realizados seguindo a Norma ISO 10993 parte 9 (1994) que prevê o estudo de fosfatos de cálcio em soluções aquosas com pH 4 e 7,4 em sistemas fechados. SILVA e colaboradores (2010) propuseram testes sob condições dinâmicas, com o uso de biorreatores, visando compreender a influência das condições de imersão na superfície das cerâmicas estudadas.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a degradação *in vitro* dos compósitos hidroxiapatita/colágeno tipo I (HA/Col) (65:35), sob condições estática e dinâmica, para aplicações em preenchimento ósseo.

### 2.1 *Objetivos específicos*

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Produzir e caracterizar o compósito 3-D hidroxiapatita/colágeno obtido.
- Estudar o teor de liberação de cálcio e fósforo presentes em soluções simuladoras de pH fisiológico (7,4) e em pH 4,0, mimetizando uma resposta inflamatória.
- Observar o comportamento e as modificações estruturais do compósito submetido às diferentes condições de ensaio.
- Analisar a citotoxicidade do compósito.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Engenharia Tecidual e Biomateriais

Uma das mais importantes áreas de pesquisa da ciência de materiais abrange o desenvolvimento de sistemas e/ou dispositivos aplicáveis à área da saúde, especialmente na cirurgia de reconstrução. Devido ao aumento da expectativa de vida com provável fragilidade dos ossos em pessoas idosas, fraturas ósseas se tornaram frequentes. Com isso, o desenvolvimento de biomateriais que restabeleçam, total ou parcialmente, a função do tecido lesado ganhou destaque. Dentro desta área multidisciplinar, que é a Engenharia Tecidual, materiais que mimetizam a matriz extracelular destacam-se por possuírem características que interagem facilmente com o tecido original adjacente, dispensando novas intervenções cirúrgicas.

O osso é um órgão que está em constante remodelamento, durante toda a vida do indivíduo, pela ação incessante de suas células ósseas. Quando há a intervenção da funcionalidade natural desse tecido, em consequência de traumas ou lesões, essas células entram em ação na reconstrução tecidual, devolvendo a integridade mecânica e funcional ao tecido (COSTA *et al*, 2005). Entretanto, dependendo da idade do paciente, do tipo de tecido ósseo e da extensão do dano, tais células não sejam capazes de regenerar por completo tal lesão, interferindo diretamente no bem estar do paciente. A inserção de biomateriais compatíveis com a matriz óssea é uma das opções de tratamento de lesões ou fraturas, servindo de suporte para as células ósseas na reconstituição do novo tecido ósseo.

De acordo com KUMAR *et al* (2009), um biomaterial pode ser brevemente definido como sendo um material sintético, projetado para induzir uma específica atividade biológica. No caso do tecido ósseo, para que tal atividade seja estimulada (a

remodelação e reconstrução do tecido ósseo lesado) a biocompatibilidade, a biofuncionalidade e a taxa de biodegradação/reposição do tecido natural são alguns dos aspectos necessários nesses biomateriais (CAMPOS, 2012). O biomaterial ideal deve mimetizar o tecido lesionado, de modo a estimular o crescimento celular e a regeneração do tecido. A escolha da matéria-prima para a fabricação de um biomaterial depende da finalidade de sua aplicação. Um biomaterial para substitutos ósseos é utilizado para auxiliar a recuperação e função da matriz extracelular, no suporte a fixação, diferenciação e proliferação celular (ABOU NEEL *et al*, 2012). Sendo assim, um arcabouço deve mimetizar a forma e as propriedades do sítio lesionado, evitando uma possível rejeição pelo organismo.

No início da formulação de biomateriais utilizados no reparo de tecidos duros, surgiram as próteses metálicas que atendiam aos requisitos mecânicos do osso, juntamente com próteses poliméricas, cerâmicas e materiais compósitos. Os materiais comumente utilizados para o tratamento de fraturas eram bioinertes e biotoleráveis, ou seja, estáveis quimicamente, sem produzir resposta biológica adversa. Alumina e zircônia (cerâmicas), por exemplo, são materiais muito estáveis em ambientes biológicos, não apresentando rejeição quando aplicadas no organismo. Porém, tais materiais induzem a formação de uma cápsula fibrosa, que isola o material do tecido adjacente, não restaurando as funções normais do tecido ósseo. Posteriormente, com os avanços na pesquisa de biomateriais para implantes ósseos, surgiram os materiais bioativos. Estes, por sua vez, são materiais biocompatíveis que favorecem a interação entre o biomaterial e o tecido ósseo adjacente (osseointegração), sem a formação de invólucros fibrosos, sendo capaz de suportar cargas funcionais.

Mais recentemente, surgiram os biomateriais reabsorvíveis, que são gradualmente absorvidos pelo corpo, sendo substituídos por um novo tecido ósseo totalmente regenerado. Muitas pesquisas foram feitas para a produção de tal material,

tais como o fosfato tricálcico (TCP), a hidroxiapatita (HA), entre outros, sendo interessantes por não necessitarem de nova intervenção cirúrgica para a sua retirada (GRANJEIRO *et al*, 2011).

Assim, um arcabouço para o tecido ósseo desempenha papel importante na modulação e crescimento do osso, tendo este que satisfazer requisitos básicos para tal função. WANG *et al*, (2007) e WAHL *et al*. (2006), listam alguns quesitos básicos para a formulação de um substituto biológico ósseo:

- Alta porosidade, poros de tamanho apropriado;
- Propriedades de superfície compatíveis com o tecido ósseo;
- Biocompatibilidade (permitindo a adesão, diferenciação e proliferação celular) e
- Sustentação do tecido recém formado.

De acordo com GRANJEIRO *et al* (2011), a junção de biomateriais biocompatíveis e reabsorvíveis em sistemas biomiméticos, representa o centro das investigações na Medicina Regenerativa. Vale destacar a importância dessa área, pois células e fatores de crescimento do próprio paciente podem ser cultivados nos arcabouços anterior a implantação, diminuindo as chances de rejeição pelo organismo.

### 3.2 Tecido ósseo

O osso é um tecido de dimensão nanométrica de cristais de carbonato apatita depositados numa matriz orgânica de fibras de colágeno (TREBACZ & WÓJTOWICZ, 2005) que funciona como uma estrutura hierárquica, controlando a deposição mineral durante o processo de formação do tecido (FALINI *et al*, 2008; STEVENS M.M., 2008). A associação dos cristais de HA com o colágeno, num complexo arranjo estrutural,

fornece aos ossos a resistência e a rigidez necessárias para as funções mecânicas do esqueleto (BATCHELAR *et al*, 2006).

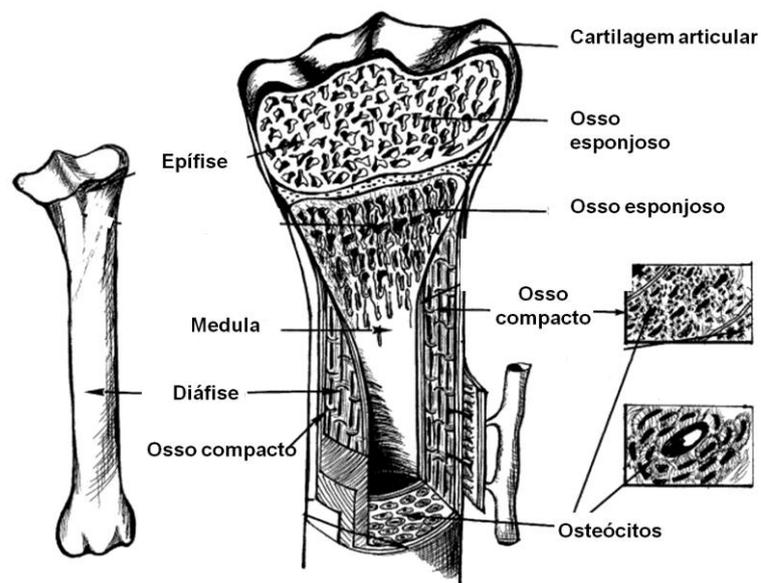
A deposição dos cristais de hidroxiapatita nas fibrilas de colágeno é um processo controlado que depende de mais de 200 proteínas diferentes, que atuam como inibidores e nucleadores no crescimento dos cristais no colágeno (GUASTALDI & APARECIDA, 2012). De acordo com VAUGHAN *et al* (2012), tais componentes são hierarquicamente organizados, proporcionando uma estrutura complexa que apresenta alta rigidez e potencial resistência a fratura. As fibras de colágeno proporcionam ductilidade aos ossos, ou seja, o grau de deformação que o tecido ósseo suporta até a sua fratura, enquanto os cristais de HA, resistência à compressão. A resistência e a rigidez são superiores a qualquer um dos componentes isoladamente.

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo rígido, que desempenha funções fundamentais no organismo. Formado por células e material extracelular calcificado (matriz óssea), é o constituinte principal do esqueleto. Protege órgãos vitais, aloja e protege a medula óssea, órgão base de sustentação do corpo e realização de movimentos. Além disso, serve como armazenador de íons cálcio, produzindo também elementos celulares sanguíneos. Tais funções desempenhadas pelo tecido ósseo dependem da participação de células ósseas e fatores locais atuantes. Quanto a sua função mecânica, a elasticidade moderada e fragilidade limitadas, tornam esse tecido ideal para a realização de movimentos (AN & DRAUGHN, 2000).

O sítio esquelético, a função fisiológica, a idade e o sexo, são fatores que influenciam na composição e estruturas ósseas, tornando tal tecido altamente heterogêneo. Em contrapartida, os componentes básicos de tal tecido não são alterados. Os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons,

armazenando-os e liberando-os de maneira controlada, de acordo com a necessidade de concentração desses íons nos líquidos corporais.

Existem dois tipos de tecido ósseo, de acordo com escala macroscópica: o osso compacto e o osso esponjoso. O primeiro não possui cavidades visíveis a olho nu, o segundo possui inúmeras cavidades intercomunicantes. Em ossos longos, as extremidades (também conhecidas como epífises), são formadas por osso esponjoso e a parte cilíndrica (diáfise) é composta por osso compacto (Fig. 3.1).



**Figura 3.1.** Morfologia do osso (Adaptado de AN & DRAUGHN, 2000).

Em uma escala microscópica, o osso é dividido em osso primário (ou imaturo) e osso secundário. O osso primário está presente no desenvolvimento embrionário e no reparo de fraturas no adulto. O osso secundário possui fibras de colágeno organizadas em lamelas paralelas, formando o sistema de Havers.

As células presentes na matriz óssea e seus sinalizadores são responsáveis pelo constante remodelamento dos ossos. Os osteócitos estão localizados em lacunas

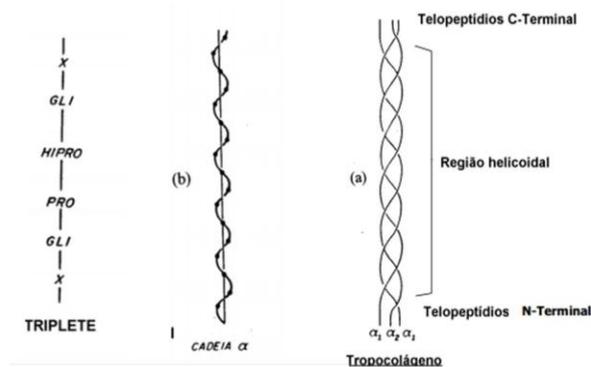
no interior da matriz, os osteoblastos possuem a função de sintetizar a parte orgânica da matriz óssea e localizam-se no contorno dos ossos; os osteoclastos são conhecidos como células gigantes que possuem mobilidade e são multinucleadas, reabsorvendo o tecido ósseo nos processos de remodelação. Apesar de sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido.

### 3.3 Colágeno tipo I

O colágeno tipo I é a proteína mais abundante nos mamíferos, tendo presença majoritária em tendões e ligamentos. É o principal constituinte da matriz orgânica óssea, participando também da composição de pele, artérias, cartilagens e da matriz extracelular em geral (FRATZL, 2008). Ele representa cerca de 30% de sua proteína total, existindo ainda mais de 20 tipos de colágenos, sendo os mais abundantes no corpo humano os do tipo I, II e III. O seu intenso uso na área biológica deve-se às suas propriedades naturais de ação hemostática, biodegradabilidade e alta biocompatibilidade comparada com outros polímeros naturais. A sua estrutura e sua interação com o tecido o torna uma eficiente matriz na fabricação de variadas formas de biomateriais e para uso na engenharia de tecidos.

O colágeno é um polímero natural da matriz extracelular, assim como os proteoglicanos, os glicosaminoglicanos e elastina. Estes polímeros desenvolvem um papel importante, controlando a estrutura do tecido e a regulação fenotípica da estrutura celular (CUNHA *et al*, 2008). A parte orgânica da matriz óssea é formada majoritariamente por fibras de colágeno (95%), constituídas de colágeno tipo I e por uma pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas.

A unidade básica das fibrilas de colágeno é a tripla hélice, formada por três cadeias interconectadas entre aminoácidos. Cada cadeia é composta de aproximadamente 330 aminoácidos, sendo esta cadeia chamada de tropocolágeno. Os aminoácidos mais abundantes são a Glicina (Gly), a Prolina (Pro) e a Hidroxiprolina. Estes formam um padrão de repetição Gly – Pro – Hidroxiprolina. A repetição da Glicina na terceira posição é o fator determinante da estrutura helicoidal do colágeno (HABERMEHL, 2005); Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Esquema representativo da formação da tripla hélice do colágeno (Fonte: GOISSIS, 2007).

Existem regiões terminais amino e carbox constituídas de 9 a 26 aminoácidos nas extremidades da molécula que não formam a estrutura hélice. Essas regiões são denominadas telopeptídeos e servem para estabilizar a molécula de colágeno em sua estrutura secundária, a tripla hélice. A pepsina (extraída de mucosa suína) é uma enzima usada na remoção desses telopeptídeos a fim de reduzir as reações adversas, pois os telopeptídeos são antigênicos. A etapa de precipitação salina é importante na separação das fibrilas de colágeno do conteúdo orgânico total presente do tendão, por isso uma solução de cloreto de sódio (NaCl) é usada para a precipitação das fibrilas (CAMPOS, 2008).

Por apresentar propriedades especiais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e por ser bioreabsorvível, o colágeno tem sido utilizado para fabricação de biomateriais para regeneração óssea. CUNHA *et al* (2008) relataram que o colágeno apresenta fraca reação antigênica e atua como suporte de proteínas de células ósseas. O colágeno influencia na diferenciação e estímulo celulares, na migração e infiltração celulares, sendo tais propriedades importantes para facilitar o processo de regeneração óssea.

As possíveis fontes de colágeno tipo I são o tendão de boi, o rabo de rato, o pericárdio bovino e a pele de animais, inclusive de peixes. Atualmente, o colágeno comercial é de origem bovina ou suína (ABOU NEEL *et al*, 2012). Segundo HABERMHEL (2005), o tendão bovino é mais adequado, pois tem uma considerável dispersão fibrilar que facilita a fabricação do biomaterial.

O colágeno tem se mostrado uma excelente opção para a fabricação de arcabouços devido a sua alta porosidade e permeabilidade (AL-MUNAJJED *et al*, 2009). No entanto, as baixas propriedades mecânicas limitam sua utilização, com o objetivo do uso de um compósito com base em colágeno. Dessa forma, alguns autores têm desenvolvido a mineralização *in vitro* do colágeno com o objetivo de preencher e restaurar tecidos calcificados (BATISTA *et al*, 2009).

### 3.4 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio têm sido amplamente utilizados nas áreas médica e odontológica devido a sua grande similaridade com a parte inorgânica da maioria dos tecidos calcificados do corpo humano. Estes têm sido desenvolvidos desde os anos 80, visando o tratamento de defeitos maxilo-facial, assim como o tratamento de fraturas. Em especial, hidroxiapatita e fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) foram alvos de muitos

estudos por serem potencialmente usados como materiais substitutos de tecido ósseo. Desde então, tem sido realizadas novas pesquisas de materiais que cumprem com os requisitos básicos para outras aplicações, tais como restauração óssea, reforço de ossos osteoporóticos, fixação de implantes metálicos em ossos enfraquecidos e em fraturas da coluna vertebral (GIBEBRA *et al*, 2012). Existem diferentes tipos de fosfatos de cálcio, na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Fosfatos de cálcio existentes em sistemas biológicos (modificado de MOREIRA 2006, GUASTALDI & APARECIDA, 2010 e BASU *et al*, 2009).

Fosfato de Cálcio	Fórmula química	Razão molar Ca/P
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
$\beta$ Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
$\alpha$ Fosfato tricálcico ( $\alpha$ TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
$\alpha^1$ Fosfato tricálcico ( $\alpha^1$ TCP)	$\alpha^1\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Hidroxiapatita deficiente	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2$	1,50-1,67
Fosfato tetracálcico (TeTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,00

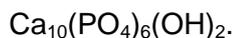
O componente mineral principal de um osso é o fosfato de cálcio, que faz parte de um grupo mineral denominado apatita. A natureza de base mineral óssea significa que as suas propriedades, tais como densidade e resistência, são controlados pelo processo de formação da apatita cristalina sólida, e não apenas pelo fluxo e disponibilidade de elementos individuais, tais como o cálcio (WOPENKA & PASTERIS, 2005).

Fosfatos de cálcio considerados biocompatíveis incluem o fosfato tetracálcico, os fosfatos de cálcio amorfos, o  $\alpha$  e o  $\beta$  TPC (fosfato tricálcico) e a hidroxiapatita. Esta família de fosfatos varia de acordo com a proporção de cálcio para os íons fosfato na sua estrutura (BEST *et al*, 2008). A solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta à

medida que a razão molar Ca/P diminui, ou seja, quanto menor esse valor, maior sua acidez e solubilidade em água (SILVA, 2009).

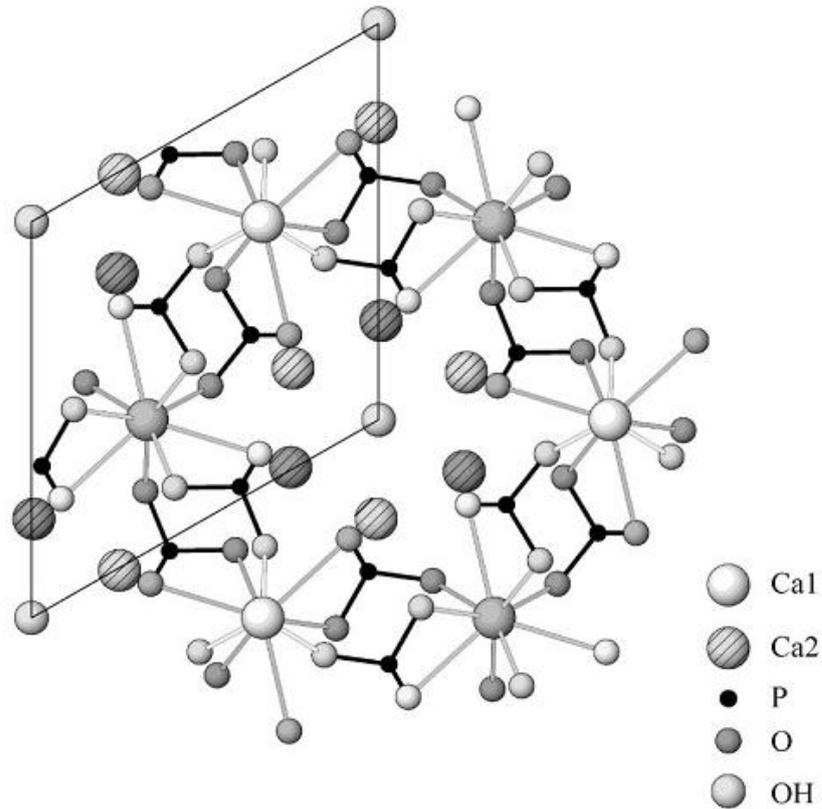
#### 3.4.1 Hidroxiapatita

O termo "apatita" se refere a um grupo de vários minerais que são de interesse e aplicação de pesquisa multidisciplinar, especialmente nas áreas de mineralogia, geologia, biomineralização, medicina e biomateriais. Hidroxiapatita é o mineral apatita de maior interesse e relevância em ciências biológicas e dos materiais, por ser importante na formação e sustentação dos ossos. O cálcio e o fósforo quando precipitados em um meio fisiológico formam a estrutura de uma hidroxiapatita, tendo a seguinte composição química:



Tais cristais não possuem a mesma periodicidade que a hidroxiapatita existente nos minerais das rochas, devido a imperfeições existentes na rede. Quanto a sua cristalografia, a HA possui sistema hexagonal, sendo a sua densidade de 3,16 g/cm<sup>3</sup> e os parâmetros de rede  $a = b = 0,9423$  nm e  $c = 0,6875$  nm. Como mostra a Figura 3.3, sua célula unitária contém 10 íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), seis íons fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) e duas hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ). Os íons cálcio estão localizados em sítios não equivalentes, onde quatro íons estão no sítio I (Ca I) e seis no sítio II (Ca II). Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de  $\text{PO}_4$  e também a 3 outros átomos de oxigênio relativamente distantes (SILVA, 2009, BASU *et al*, 2009 e COSTA *et al*, 2009). De acordo com KIKUCHI *et al* (2001), em compósitos

HA/Col I, o eixo cristalográfico c da HA tem o alinhamento preferencial paralelo à direção longitudinal das fibrilas de colágeno.



**Figura 3.3.** Arranjo atômico da hidroxiapatita (IVANOVA, 2001).

Os fosfatos de cálcio apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral óssea, biocompatibilidade, bioatividade, variáveis taxas de degradação e osteocondutividade. A HA é a mais comumente estudada para aplicações biológicas, pois possui similaridade estrutural e química com o tecido ósseo, apresentando ausência de respostas inflamatórias, ausência de toxicidade local e por possuir mobilidade aparente ao se ligar a tecidos adjacentes, permitindo a proliferação de células ósseas (GUASTALDI & APARECIDA, 2010).

Arcabouços porosos de fosfatos de cálcio estão sendo produzidos para implantes reabsorvíveis, possuindo a capacidade de manter e estimular o crescimento

de células ósseas. Poros com tamanhos variando entre 100 e 200  $\mu\text{m}$  permitem o crescimento de osteoblastos acima e dentro dos poros, levando à formação de osteóides que mineralizam dentro da matriz óssea. Condições de fabricação que resultem na presença de microporosidade de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  nas paredes dos poros são importantes para a fixação efetiva das células e crescimento interno (AZEVEDO *et al*, 2007).

### 3.5 Compósitos Hidroxiapatita - Colágeno

Arcabouços sintéticos necessitam interagir com o tecido ósseo circundante, fornecendo uma estrutura tridimensional (3D), sobre o qual as células possam aderir, proliferar e eventualmente produzir a matriz extracelular (MEC). De acordo com STEVENS e colaboradores (2008), para a produção de um enxerto ideal requisitos devem ser seguidos, tais como:

- biocompatibilidade;
- forma semelhante a estrutura óssea natural;
- microestrutura altamente porosa, com interconectividade entre os poros, permitindo o crescimento e reorganização celular;
- superfície química adequada, que promova a adesão, diferenciação e proliferação celular;
- resistência mecânica suficiente para resistir às tensões *in vivo* e as cargas fisiológicas, e
- degradação controlada, com integridade estrutural eficiente até que o tecido neoformado ocupe e suporte a função de apoio, feito pelo arcabouço até então.

Diferentes técnicas são conhecidas para a preparação de compósitos HA/Col (KIKUCHI *et al*, 2004), pois a união desses dois elementos é a melhor forma de produzir um arcabouço como substituto ósseo. FICAI *et al* (2012) relataram que o método mais adequado é aquele em que as condições de síntese não degradem a estrutura do colágeno, o qual pode sofrer desnaturação em temperaturas elevadas. O processo de nucleação é efetivado devido às interações dos componentes orgânico e inorgânico, em condições ideais de síntese.

O tamanho dos poros, a distribuição, a estrutura interconectada devem ser adaptadas para a aplicação no sítio específico, pois isto influencia na adesão e proliferação celular e produção de nova matriz óssea, como também na formação de vasos sanguíneos dentro do arcabouço, ajudando na sua degradação, concomitantemente com a formação do novo tecido.

Hidroxiapatita (HA) e colágeno (Col), juntos, têm sido bastante utilizados para a produção de biomateriais para a regeneração óssea, pois o colágeno, além de ser um bom suporte para crescimento celular, é biocompatível, biodegradável, osteoindutivo e reabsorvível, sendo responsável pela prevenção da migração de partículas até a incorporação pelos tecidos (E'GUES *et al*, 2008).

As fibrilas de colágeno tipo I (Col) servem de suporte para a deposição dos cristais de hidroxiapatita. O estudo da nucleação e crescimento dos cristais de HA sob condições próximas das condições fisiológicas (temperatura de ~37 ° C, pH 7,4) nos dá a possibilidade de modelar os processos de biomineralização e dissolução, que é a remodelação óssea. Contudo, KIKUCHI *et al* (2004a), afirmam que o pH e a temperatura ótimos para o máximo de nucleação dos cristais de HA nas fibrilas de colágeno é 9 e 38 ° C, respectivamente, pois estes são os parâmetros que permitem o processo de associação entre ambos os componentes.

Devido as propriedades destacadas anteriormente, compósitos HA/Col são bioativos. Tais compósitos também são conhecidos como materiais osteocondutores, pois favorecem o desenvolvimento das células ósseas em sua matriz colagênica juntamente com os cristais de HA. GRANJEIRO *et al* (2011), afirmam que hidroxiapatitas bioativas promovem a proliferação e diferenciação de fibroblastos e osteoclastos, induzindo a síntese de colágeno por essas células. Eles afirmam ainda, que a síntese de colágeno tipo III e V ocorrem no período imediato após a implantação. O colágeno tipo I é sintetizado posteriormente, sendo este fato apontado como aspecto positivo à biocompatibilidade do material.

As propriedades mecânicas dos arcabouços são importantes na implantação no tecido ósseo, pois estes devem suportar o tecido neoformado num intervalo de tempo considerável, sendo resistentes a degradação quando em contato com fluidos corporais. Compósitos HA/Col I podem ser quimicamente tratados com a adição de agentes formadores de ligações cruzadas, aumentando a resistência mecânica do arcabouço. O agente reticulante mais utilizado para formar ligações cruzadas no biomaterial é o glutaraldeído (GTA), uma vez que melhorar a taxa de degradação e é indispensável na realização de ensaios dinâmicos e aplicações químicas (KIKUCHI *et al*, 2004b).

### *3.6 Interação Biomaterial - Tecido Ósseo*

A interação entre o tecido ósseo adjacente ao biomaterial implantável é de extrema importância para a engenharia tecidual, de modo a entender a forma como essa comunicação ocorre em meio biológico. Esta relação dependerá fortemente das condições do hospedeiro, como a idade do paciente, resposta a implantação,

variações das condições do meio (por exemplo, mudanças de pH, concentração de íons, temperatura, entre outros).

A implantação de um biomaterial, prótese ou dispositivo médico resultam no desequilíbrio homeostático da região da lesão (ANDERSON, 2001). Com isso, tal biomaterial deve ser compatível com o sítio da aplicação, além de estimular as células desse tecido a produzir a cascata de sinalização responsável pela expressão de fatores que acarretem na cicatrização da ferida.

Segundo STEVENS e colaboradores (2008), para que o arcabouço interaja com o tecido ósseo, este deve mimetizar sua estrutura e morfologia, sendo biocompatível com o tecido. A porosidade do arcabouço também é importante, variando de 50-90%, dependendo do tipo e idade do osso. As condições do osso são fundamentais para interação osso-biomaterial. Doenças associadas a deficiência mineral, assim como a osteoporose, são fatores que prejudicam essa interação (CUNHA *et al*, 2008).

### 3.7 Ensaios de Degradação

O estudo de mecanismos físico-químicos como diluição, precipitação e dissolução são importantes fatores em um material implantável. Na Engenharia Tecidual, os testes de biodegradação são importantes para analisar a degradação dos compostos presentes na solução simuladora nos arcabouços, expostos a determinadas condições (fluido, fluxo, pH e temperatura). Tais condições devem mimetizar o que aconteceria no sítio da aplicação *in vivo*.

É preciso estudar a degradação do biomaterial, pois segundo a norma ISO 10993 parte 9 (1994) é necessário identificar e quantificar o potencial de degradação

do material testado em soluções fisiológicas, bem como analisar os seus produtos de degradação. Tal norma determina ensaios de biodegradação sob condições estáticas, pois é necessário avaliar as mudanças químicas, físicas e biológicas de materiais implantáveis quando expostos a meios fisiológicos. Estágios avançados de degradação podem resultar na mudança de suas propriedades, assim como na resposta biológica. No caso de materiais cerâmicos, por exemplo, a taxa de degradação resulta na liberação de íons que podem estimular o processo de formação óssea, ou se em excesso, provocar a morte celular.

A fim de se aproximar das condições reais quando da implantação do biomaterial, SILVA *et al* (2010) propuseram um método biomimético com o uso de biorreatores para imersão dinâmica de cerâmicas sob fluxo fisiológico constante. Esses autores avaliaram que o ensaio dinâmico tende a mostrar de forma mais marcante as diferenças entre materiais similares.

Biorreatores são utilizados para facilitar, acompanhar e controlar processos biológicos e bioquímicos, como por exemplo, no contexto de fermentação industrial, tratamento de resíduos, processamento de alimentos e na produção de produtos farmacêuticos (RAUH *et al*, 2011). O estudo da degradação de biomateriais sob condições dinâmicas em biorreatores permite conhecer o comportamento de determinado material em meios dinâmicos, utilizando-se fluidos que mimetizem o ambiente corpóreo, considerando-se o fluxo e a temperatura do sistema.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A produção dos compósitos hidroxiapatita-colágeno tipo I (65:35) baseou-se no processo de mineralização óssea que ocorre *in vivo*. Essa proporção foi escolhida por se aproximar da proporção do tecido ósseo (60:40). A hidroxiapatita foi sintetizada por meio de precipitação em solução aquosa, em presença de fibrilas de colágeno.

### *4.1 Extração do colágeno bovino e produção do compósito 3-D hidroxiapatita-colágeno (65:35)*

O colágeno foi extraído a partir de tendão bovino, seguindo um protocolo estabelecido por CAMPOS (2012). Foi feita a dissociação das fibrilas de colágeno por meio de uma solução de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 0,5 M. A retirada de telopeptídeos ocorreu simultaneamente utilizando-se uma solução de pepsina a 3% (p/v) a 30 °C por 24 horas sob agitação, para a total dissociação das fibrilas. Posteriormente, a solução obtida foi limpa por centrifugação a 90.000 G por 1 h a 4 °C, esta temperatura que evite a desnaturação da proteína.

Ao sobrenadante, foi adicionada uma solução de cloreto de sódio (NaCl) a 10% (p/v) na proporção 1:1 com o objetivo de isolar as fibras de colágeno, separando-as de outras proteínas presentes no tendão bovino. Após mais uma etapa de centrifugação a 3000 rpm, o precipitado foi novamente dissolvido em solução de ácido acético 0,5 M.

A diálise em água deionizada ( $\text{H}_2\text{O}_d$ ) foi realizada por três dias, de modo a retirar por completo os sais de NaCl. A substituição da água por solução de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0,59 M levou à reorganização dos feixes de fibras de colágeno, além de servir como fonte de íons fosfato para a posterior síntese do compósito HA:Col. A solução foi conservada em geladeira a 4 °C.

A concentração da solução de colágeno foi determinada através do peso seco, partindo-se de uma alíquota de 5 mL adicionada a um pesa-filtro previamente tarado, e mantido em estufa à 100 °C *overnight*. A diferença de peso determinou a concentração da solução de colágeno em mg/mL.

A síntese do compósito HA/Col foi feita de acordo com o protocolo estabelecido por KIKUCHI (2001) e adaptado por CAMPOS (2012), na proporção 65:35 (p/p) em massa de apatita e colágeno, respectivamente. O pH e a temperatura empregados foram ajustados para 9 e 38 °C, respectivamente, pois segundo KIKUCHI *et al* (2004) estes são a temperatura e pH para que ocorra a nucleação máxima e crescimento dos cristais de HA nas fibras de colágeno em processo de associação. A razão molar Ca/P foi estabelecida em 1,67.

A partir do gotejamento de uma solução de 0,48 M de nitrato de cálcio [Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] e uma solução de 0,59 M de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) contendo fibrilas de Col, a um vaso reacional contendo previamente 25 mL de água ultrapura, foram produzidos compósitos HA/Col. O pH foi controlado em torno de 9 com a adição de hidróxido de amônia (NH<sub>4</sub>OH) concentrada. O tempo de digestão da síntese, nas condições controladas, foi de três horas. A adição de glutaraldeído (GTA) é importante para a formação de ligações cruzadas do compósito, de modo a aumentar suas propriedades mecânicas. A concentração de GTA utilizada foi de 0,125% (v/v).

Os compósitos foram moldados, congelados e liofilizados no Liofilizador L-101, marca Liotop a temperatura de -50°C por 24 horas. Os compósitos obtidos (Fig. 4.1) foram esterilizados por radiação Gama a 25 kGy.



**Figura 4.1.** Macrografia dos compósitos 3-D hidroxiapatita:colágeno (65:35).

#### *4.2 Caracterizações físico-químicas dos compósitos*

Os compósitos foram caracterizados pelas técnicas descritas a seguir, antes e após os ensaios realizados:

##### *4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilita obter informações químicas e estruturais de um determinado material, onde o feixe de elétrons oriundo de um filamento de tungstênio é acelerado através de uma diferença de potencial. Durante todo o caminho dos elétrons, que é feito em ambiente controlado a vácuo, o feixe eletrônico atravessa um sistema de lentes eletromagnéticas, contendo diafragmas, incidindo na câmara que contém a amostra, varrendo sua superfície (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Nessa interação feixe eletrônico-amostra, são emitidos elétrons secundários e retroespalhados os quais emitidos. A MEV permite a captação de imagens amplificadas da superfície dos materiais com aparência tridimensionais e que apresentam resoluções de até 0,5 nm com profundidade de foco e de campo dependentes do aumento e dos ângulos de convergência do feixe incidente na amostra.

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.

A morfologia e a interconexão dos poros existentes nos compósitos foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), equipamento JEOL JSM 6460-LV. As amostras foram fixadas em um suporte de alumínio com cola prata, recobertas com uma fina camada de ouro para evitar carregamento elétrico e as micrografias foram obtidas utilizando-se uma voltagem de aceleração de 15 kV.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) exhibe imagens a uma resolução significativamente maior do que a de outras modalidades de microscopia, devido ao pequeno comprimento de onda dos elétrons. No microscópio eletrônico de transmissão um feixe de elétrons é emitido em direção a uma amostra ultra fina, interagindo com a amostra enquanto a atravessa.

As amostras utilizadas em MET devem ter a espessura de 500 a 5000Å (dependendo do material e da tensão de aceleração utilizada) e superfície polida e limpa dos dois lados. Utiliza-se uma grade como porta-amostra, onde o tamanho padrão da grade de um MET é um anel de 3,05 mm de diâmetro, com tamanho, espessura e malhas variando de alguns a 100 µm. A amostra é colocada sobre a malha. Os materiais mais comuns da grade são cobre, níquel, molibdênio ou ouro.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) de alta resolução, equipamento JEOL FX 2100F operando a 200 kV, avaliou a interação dos cristais de hidroxiapatita com as fibrilas de colágeno após a precipitação. Para a análise, o arcabouço foi imerso em solução fixadora de tampão cacodilado de sódio 0,1M + glutaraldeído 2,5% pH 7,2 por um período de aproximadamente 3 horas, em temperatura ambiente. Os espécimes foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, com 5 trocas de tampão por 24 horas. O processo

de desidratação das amostras foi iniciado com banhos de 10 minutos em crescentes concentrações de acetona 10%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 2x 100%. Após esta etapa, foi iniciada a infiltração das amostras em uma mistura de Spurr e acetona 1:2, 1:1, 2:1 (v/v) pelo período de 12 horas em todas as concentrações respectivamente. Posteriormente o material foi incluído em Spurr puro por um período de 8 horas. O material incluído foi transferido para molde de silicone e incubado em estufa a 70 ° C por 24 horas.

Para a obtenção de cortes finos do material, o arcabouço fixado e incluído em Spurr foi cortado com faca de diamante em micrótomo modelo Leica EM UC6.

#### 4.2.2 Difração de raios-x (DRX) e Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A difratometria de raios-x corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, podendo ser aplicada em diferentes campos do conhecimento, como na engenharia e ciências de materiais. 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 comprimentos de onda coberta pelos raios-X varia de aproximadamente  $10^{-6}$  a 100 ângstroms.

Os Raios-X são gerados quando uma partícula carregada de alta energia cinética é rapidamente desacelerada. O método mais utilizado para produzir raios-X é fazendo com que um elétron de alta energia (gerado no cátodo do tubo catódico) colida com um alvo metálico (ânodo). A emissão de raios x ocorre a partir do decaimento de elétrons de uma da camada mais externa para outra mais interna. Os raios-X alcançam o material de observação e, ocorrendo interferência construtiva entre os raios difratados, é observada a um padrão de difração (RATNER *et al.*, 1996).

Considerando-se dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que se ocorra a difração de raios-x vão depender da diferença de caminho percorrida pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg,  $n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$ , onde  $\lambda$  corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, “n” a um número inteiro (ordem de difração), “d” à distância interplanar para o conjunto de planos *hkl* (índices de Miller) da estrutura cristalina e o  $\theta$  é a metade do ângulo entre o raio difratado e o raio incidente.

Sabe-se que os materiais possuem arranjos cristalinos únicos que permitem sua interpretação e identificação pela DRX, podendo esta ser empregada para determinar a constituição das fases, tamanho de cristalitos, orientação preferencial dos cristais, entre outras características.

A caracterização das fases presentes na parte mineral do compósito HA/Col foi realizada através da técnica de difração de raios-x (DRX). Previamente, o compósito sofreu uma digestão com hipoclorito de sódio (NaOCl - 3% v/v) por 48 horas para a remoção do colágeno, de modo a observar somente a fase inorgânica formada. O pó resultante foi exaustivamente lavado com água deionizada e seco em estufa a 37 °C. Utilizou-se o difratômetro SHIMADZU vertical configuração theta-2theta, modelo XRD 6000. As condições utilizadas foram varredura de 5° a 60°, incremento de 0,02°, radiação  $\text{CuK}\alpha$ , 30 kV/30mA. O difratograma resultante foi comparado com a ficha-padrão nº 09-0432 na base do ICDD (*International Center for Diffraction Data, formerly JCPDS – Joint Committee of Powder Diffraction Standards*).

A FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que tem sido usada há algum tempo na identificação em campo de substâncias desconhecidas. Ela pode ser utilizada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. Suas análises permitem observar moléculas orgânicas e inorgânicas na faixa de número de onda de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . 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.

A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de *níveis vibracionais*). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico. 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 de 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.

De modo a obter os modos vibracionais dos grupamentos químicos presentes no colágeno tipo I e nos compósitos HA/Col, a espectroscopia no infra-vermelho com transformada de Fourier (FT-IR), equipamento NICOLET 6700, foi empregada na faixa de comprimentos de onda do infravermelho médio (4000 a 550  $\text{cm}^{-1}$ ) no módulo de ATR (*Attenuated Total Reflectance*).

#### 4.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA).

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que monitora a perda de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas. Seu princípio de funcionamento é simples: analisar a perda ou a agregação de massa à amostra em temperaturas variadas.

São frequentemente usados três modos distintos: i) análise isotérmica, na qual a massa da amostra é registrada em função do tempo, a temperatura constante; ii) análise quasi-isotérmica, na qual a amostra é aquecida até massa constante, numa série de patamares de temperatura; iii) análise dinâmica, onde a amostra é aquecida com um programa de temperatura predeterminado, preferencialmente linear.

A termogravimetria derivada (DTG) é a técnica que fornece a derivada primeira da curva TG em função do tempo ou da temperatura. Nesta técnica as perdas de massa observadas nas curvas TG são substituídas por picos que delimitam as áreas proporcionais às alterações de massa com o aquecimento (ou resfriamento) da amostra.

A análise termogravimétrica (TGA), equipamento STA 600, Perkin Elmer, indicou as variações de massa do compósito em função da temperatura, utilizando-se uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até 800 °C, podendo-se estimar a fase mineral presente nas amostras. Sob atmosfera de ar sintético (super seco) numa vazão de 30 ml/min, aproximadamente 5 mg de cada amostra foram analisados, utilizando suporte de platina.

#### 4.2.4 Porosidade aparente

Para a determinação da porosidade total do compósito foi empregado o princípio de Arquimedes, assumindo que todo corpo embebido em um fluido sofre, por parte do fluido, uma força vertical para cima, com intensidade igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo.

Para determinar a medida de densidade, utilizou-se uma balança hidrostática onde obteve-se a massa seca e a massa aparente do compósito após a imersão em etanol. Estes valores foram aplicados à Equação 1, adotando a densidade do etanol como 0,79 g/cm<sup>3</sup>.

$$Densidade = \frac{W_{seco} \times \rho_{etanol}}{(W_{seco} - W_{molhado})} \quad \text{(Equação 4.1)}$$

Onde  $W_{seco}$  é a massa referente ao arcabouço seco,  $W_{molhado}$  é a massa referente ao arcabouço imerso em etanol e  $\rho_{etanol}$  é a densidade do etanol a temperatura de execução do experimento (temperatura ambiente).

A partir das dimensões das amostras, foi possível medir o volume real dos arcabouços porosos ( $V_{real}$ ) através da Equação 4.2:

$$V_{real} = \frac{\pi d^2}{4} \quad \text{(Equação 4.2)}$$

A porosidade de um arcabouço é dada pela relação entre seu volume real e o volume de vazios. Para medir o volume dos poros ( $V_{poros}$ ), utilizou-se a equação 4.3:

$$V_{poros} = V_{real} \times \frac{W_{seco}}{densidade} \quad \text{(Equação 4.3)}$$

A porosidade aparente foi determinada de acordo com a equação 4.4:

$$Porosidade = \left( \frac{V_{poros}}{V} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 4.4)}$$

#### 4.2.5 Citotoxicidade

Foram realizados ensaios de citotoxicidade do compósito HA/Col (65:35) reticulado com GTA utilizando o reagente MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), que determina a viabilidade celular. Ele se baseia na clivagem do sal amarelo tetrazólio para cristais de formazam azuis. Extratos dos arcabouços esterilizados foram obtidos através da incubação de 100 mg/mL dos materiais imersos em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma) com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas a 37 °C. Osteoblastos de camundongo da linhagem MC3T3 foram plaqueados em placas de 96 poços ( $2.0 \times 10^4$  células/poço) e cultivados por 24 horas em meio DMEM com 10% de SFB em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. O meio de cultura foi substituído para criar as seguintes condições: (1)

Controle com meio de cultura normal; (2) Extrato 100% concentrado; (3) Extrato 25% concentrado; e (4) solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% como controle positivo da morte celular. As células foram cultivadas nestas condições por mais 24 horas. Cada condição foi analisada em quadruplicata (n=4).

O meio de todas as condições foi substituído por solução 0.5 mg/mL de MTT em tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*- PBS) a 37 °C. Poços sem células foram usados como “branco”. A placa foi incubada por 3 horas a 37 °C no escuro (envolta por papel alumínio). A solução de MTT foi retirada dos poços cuidadosamente e as amostras foram incubadas por 20 min com solução ácida de isopropanol com 0.3% de ácido clorídrico (HCl) 1N. Os poços foram observados ao microscópio ótico para verificação da dissolução completa dos cristais de formazan. A absorbância das soluções foi lida a 570 nm em leitor de placas GloMax<sup>®</sup>-Multi (Promega).

#### 4.3 Ensaio de Degradação *in vitro*

Foram feitos dois tipos de ensaio, estático e dinâmico, para a observação da liberação dos íons cálcio e fósforo, em diferentes condições.

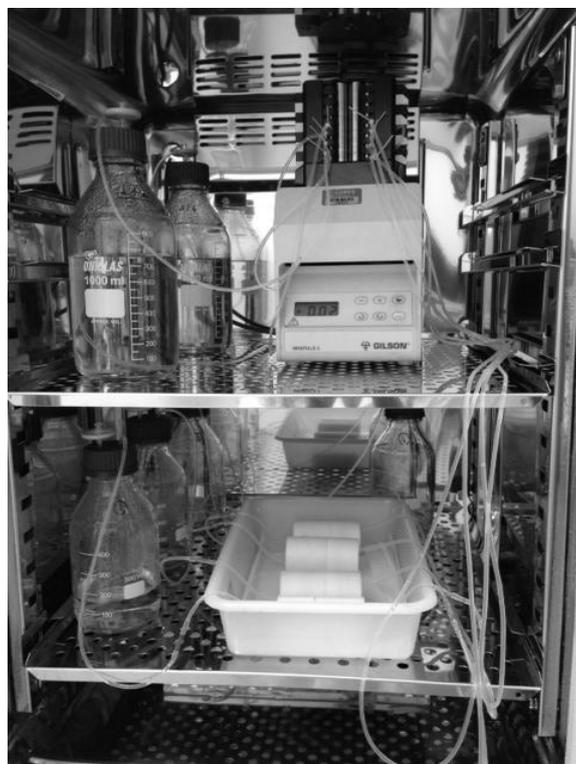
No ensaio estático, os compósitos foram colocados em tubos *falcon* com 17,76 mL de solução simuladora de fluido corpóreo de acordo com a Norma ISO 10993 parte 9 (1994), que estabelece um volume ideal dependendo o tamanho e da forma do material, contendo:

- 100 mM de cloreto de sódio (NaCl)
- 45 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)
- 2 mM de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

O pH foi ajustado para 7,4 (pH fisiológico) ou 4,0 (mimetizando uma resposta inflamatória) com ácido láctico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>). Os tubos foram colocados em uma incubadora com agitação orbital (Shaker - Mod. MSM 130/B, MS Mistura) e deixados em contato com a solução,

por 6 horas, 1, 3, 7 e 14 dias, sem troca de meio. Após os tempos definidos, os arcabouços foram lavados com água deionizada, congelados e liofilizados para análises posteriores.

No ensaio dinâmico, os compósitos foram acondicionados em biorreatores de teflon e colocados em estufa a 37 ° C e incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, como mostra a Figura 4.2. As soluções utilizadas para o estudo foram adicionadas aos biorreatores com o auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson, Minipuls 3), que mantém um fluxo constante de 2 mL/h, simulando o fluxo do fluido corpóreo humano. Os arcabouços ficaram permanentemente em contato com as soluções utilizadas como fluido nos ensaios estático e dinâmico.



**Figura 4.2.** Biorreatores em estufa de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente aos ensaios, os compósitos foram lavados com água deionizada, congelados e liofilizados. Após cada tempo uma alíquota da solução em contato com os compósitos foi analisada em um fotômetro Diasys, modelo StarDust MC15, para quantificação dos íons cálcio e fósforo.

#### 4.4 Fotometria

A fotometria é uma técnica que utiliza das propriedades dos átomos e moléculas em absorver e emitir energia eletromagnética num determinado comprimento de onda. Os comprimentos de ondas variam de menores que 1 angstrom ou 0,1 nm a maiores que 25 cm (ondas de rádio). A quantidade de energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda e, portanto os menores comprimentos de onda fornecem os maiores níveis de energia. Instrumentos modernos isolam uma faixa estreita do comprimento de onda, onde os que utilizam filtros são denominados fotômetros.

Na fotometria existem componentes básicos para a captação do comprimento de onda de uma determinada solução. Há uma fonte de energia radiante, responsável por medir os comprimentos de onda, um monocromador utilizado para o isolamento da porção desejada do espectro, um detector, utilizado para receber a energia radiante transmitida através da solução e transformá-la em energia elétrica e o circuito medidor, que recebe a energia elétrica emitida pelo detector apresentando-a ao operador sob uma forma útil de medida: absorvância ou concentração.

Quando um raio de energia radiante atravessa uma solução, a energia incidente ( $I_0$ ) será sempre mais intensa que a energia emergente ( $I$ ). Nas aplicações em fotometria, a absorção de energia é o fator primário na redução da energia incidente. Quando se usa energia monocromática (comprimento de onda simples), a fração da radiação absorvida pela solução será função da concentração da solução e da espessura da solução. Matematicamente, essa solução pode ser definida como:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-abc}$$

onde “ $I$ ” é a intensidade de energia emergente, “ $I_0$ ” é a intensidade de energia incidente, “ $e$ ” é a base dos logaritmos neperianos (2,303), “ $a$ ” é a absorvidade constante que depende do

comprimento de onda, “b” é a espessura da solução atravessada pela radiação e “c” é a concentração da solução.

Esta fórmula estabelece que, quando a energia radiante monocromática atravessa uma solução, a quantidade de energia transmitida diminui exponencialmente com: (a): aumento da espessura da solução e (b): aumento da concentração ou intensidade de cor da solução. O primeiro conceito deriva da Lei de Lambert e o segundo da Lei de Beer. Estes dois conceitos são denominados Lei de Lambert-Beer. No entanto, como as medidas fotométricas são realizadas com espessura constante de solução e somente a concentração é variável, é usual mencionar somente a Lei de Beer.

O teor de cálcio (Ca) e de fósforo (P) presentes nas soluções após os testes de biodegradação sob condições estáticas e dinâmicas em pH 4,0 e 7,4 foram quantificados através de um Fotômetro Diasys, modelo StarDust MC15.

Os resultados foram obtidos por meio de um *kit* comercial (*Kovalent do Brasil Ltda*). Para a obtenção das concentrações de cálcio, utilizou-se o meio colorimétrico do Arsenazo III. A finalidade do *kit* é determinar quantitativamente o cálcio em solução através de uma reação colorimétrica. Como princípio de ação, o cálcio reage com o Arsenazo III em pH neutro, produzindo um complexo de cor azul, cuja intensidade é proporcional a concentração de Cálcio. Para a obtenção das concentrações de Fósforo, utilizou-se o teste fotométrico UV.

#### 4.5 Análise Estatística

Diferenças estatísticas entre as amostras foram determinadas utilizando-se análise de variância do tipo ANOVA (*one-way*) seguido do teste de Tukey, sendo que diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

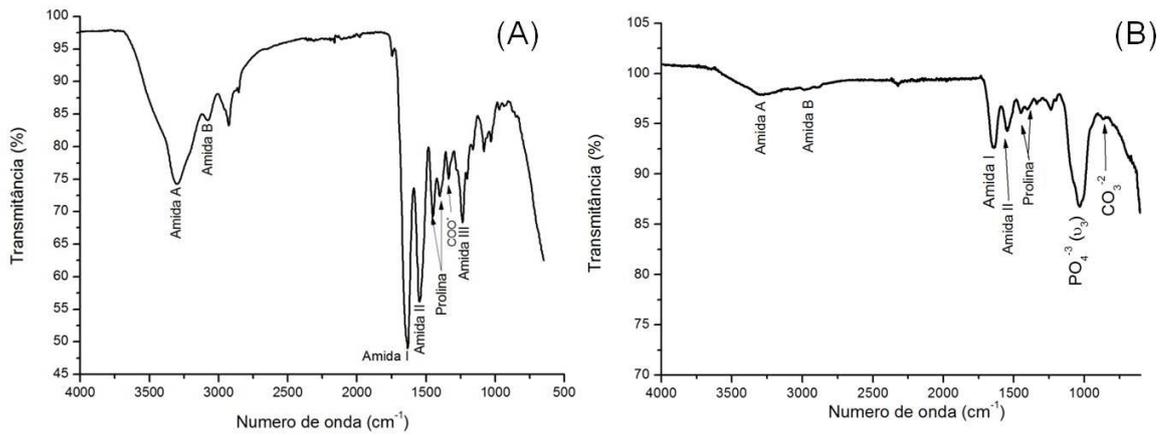
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterizações físico-químicas do compósito HA/Col (65:35)

Para a extração de colágeno do tendão de Aquiles bovino, utilizou-se o protocolo estabelecido por CAMPOS (2012), conforme detalhado na seção 4.1.1. A solução obtida apresentou uma concentração final de 17,6 mg/mL, sendo de aparência transparente e viscosa. A solução foi armazenada a 4 °C até o uso.

Na síntese do compósito HA/Col, não foi observada a presença de pó livre no meio reacional, tendo as fibras de colágeno se rearranjando quase que instantaneamente à medida que as soluções (fibras de colágeno em meio de ácido fosfórico (0,59 M) e nitrato de cálcio (0,48 M)) eram adicionadas por meio de bomba peristáltica ao meio reacional (pH 9/~38 °C). O compósito apresentou uma aparência de “algodão”, sendo altamente moldável.

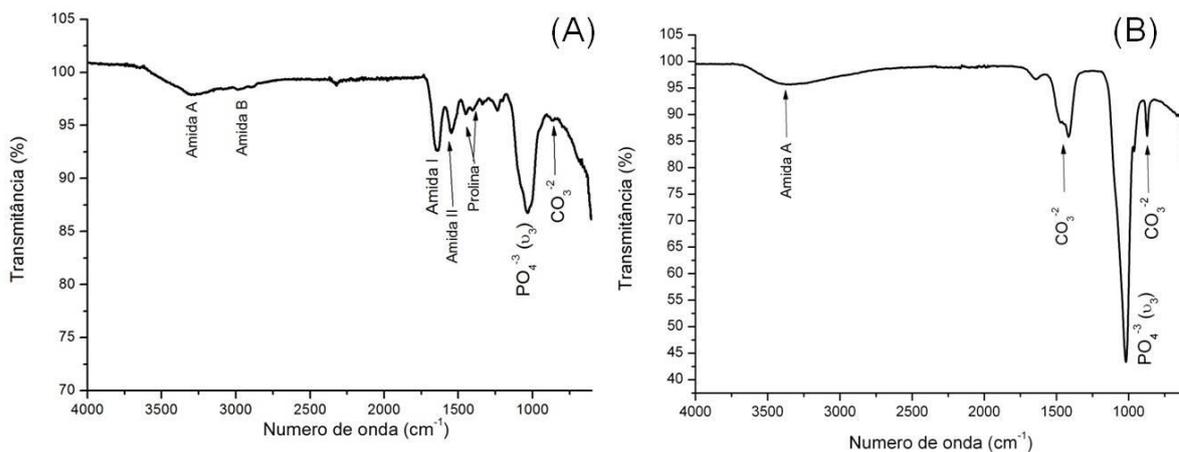
A Figura 5.1 apresenta os espectros de FTIR do colágeno obtido (B) e do compósito HA/Col (65:35) (A). De acordo com os espectros observados, as bandas características de colágeno estão presentes: 3300  $\text{cm}^{-1}$  (Amida A; N-H), 3077  $\text{cm}^{-1}$  (Amida B; C-H), 1637  $\text{cm}^{-1}$  (Amida I; C=O), 1552  $\text{cm}^{-1}$  (Amida II; N-H), 1457 e 1400  $\text{cm}^{-1}$  (Prolina), 1342  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{COO}^-$ ) e 1235  $\text{cm}^{-1}$  (amida III; C-N), com variação de intensidade. A presença das amidas no espectro do compósito indica que as cadeias peptídicas referentes ao colágeno foram preservadas, mesmo depois de passar pelas condições de síntese (LIU *et al.*, 2009). A interação da proteína com a hidroxiapatita formada foi confirmada pela presença de uma banda larga de  $\text{PO}_4^{-3}$  (1037  $\text{cm}^{-1}$ ), observando ainda a presença da banda de  $\text{CO}_3^{-2}$  (em 1456 e 873  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 5.1.** Espectro do colágeno extraído de tendão bovino puro (A) e do composto hidroxiapatita/colágeno (B).

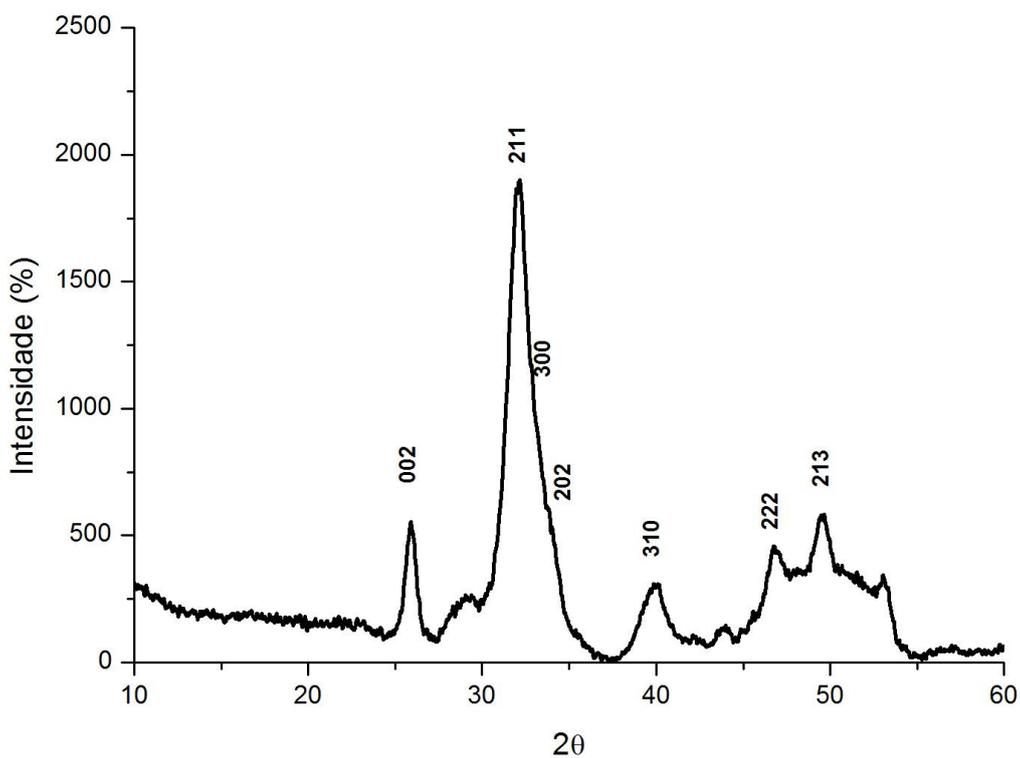
### 5.1.1 Caracterização da fase mineral na ausência de colágeno:

Para a caracterização do pó de apatita formado na síntese, a fase orgânica (colágeno) do composto foi extraída utilizando hipoclorito de sódio 3%. A Figura 5.2 mostra os espectros de FTIR comprovando que a proteína foi removida, uma vez que os picos característicos do colágeno não foram observados no espectro (B). O aumento da intensidade do pico de  $1025\text{ cm}^{-1}$  indica a presença do grupamento  $\text{PO}_4^{3-}$ , característico da fase mineral (HA). Também foi observado o aumento das bandas de  $1456\text{ cm}^{-1}$  e  $873\text{ cm}^{-1}$ , caracterizando a presença do grupamento  $\text{CO}_3^{2-}$ .



**Figura 5.2** Espectro do compósito HA:Col antes (A) e após o tratamento com hipoclorito de sódio 3% (B).

O difratograma da fase inorgânica do compósito HA/Col está apresentado na Figura 5.3.

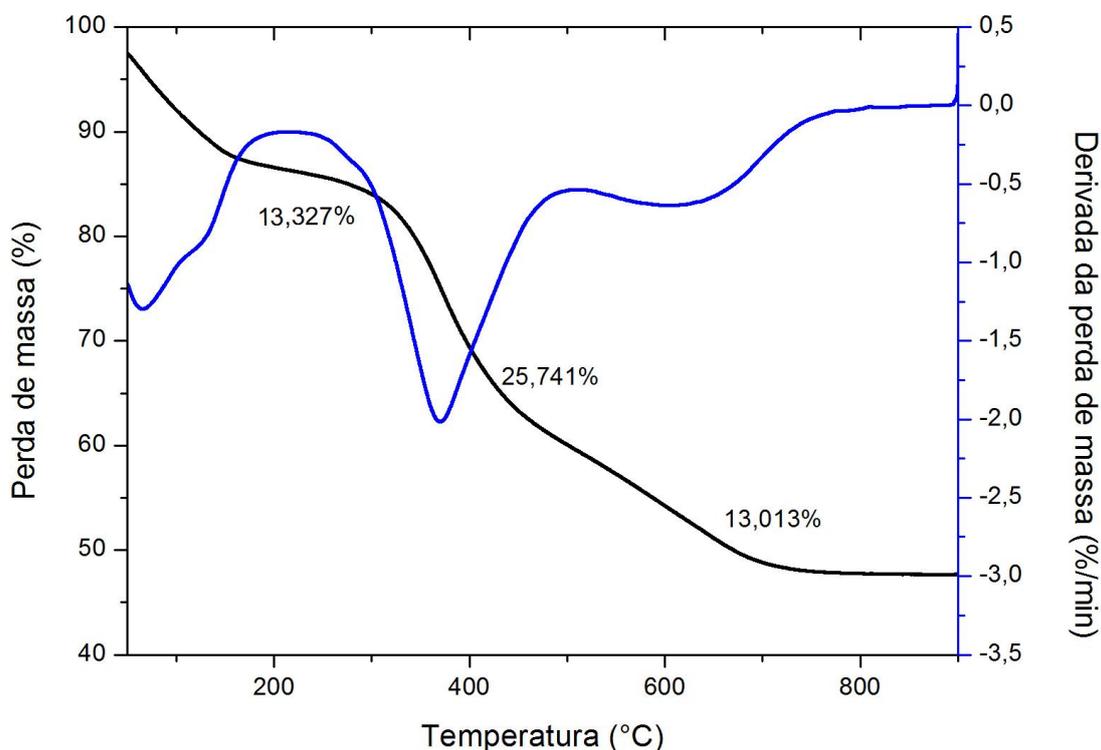


**Figura 5.3.** Difratograma da fase inorgânica do compósito HA/Col (65/35) sintetizado em pH = 9 e 38°C e após tratamento com hipoclorito de sódio 3%.

Os principais picos característicos da HA (002), (211) e (300), em  $2\theta = 25,92^\circ$ ,  $32,19^\circ$  e  $33,10^\circ$ , respectivamente, estão presentes. A fase mineral foi identificada como hidroxiapatita, embora o difratograma tenha se apresentado pouco cristalino devido à presença de resíduos da parte orgânica que não foi completamente removida. O difratograma está de acordo com a ficha do *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS) de número 09-0432 para HA. Desta forma, foi possível confirmar a presença da hidroxiapatita formada no compósito HA/Col sintetizado.

### 5.1.2 Estudos térmicos dos compósitos HA/Col (65:35).

A análise termogravimétrica dos compósitos HA/Col, Figura 5.4, foi realizada para estimar a fase mineral presente nas amostras.



**Figura 5.4.** Análise termogravimétrica do compósito HA/Col (65:35).

O comportamento térmico dos compósitos foi avaliado em três estágios de perda de massa. Pode-se observar que ocorre uma primeira perda de massa entre 25-200 °C, a qual corresponde a água adsorvida na superfície do compósito e a água estrutural presente na rede da HA. A segunda faixa de temperatura, 200-400 °C, está relacionada a degradação da estrutura da molécula de colágeno. A terceira perda de massa, que ocorreu entre 400-800 °C, pode ser atribuída a combustão do componente orgânico ainda presente na amostra. O resíduo obtido a 800 °C, 47,919%, possivelmente corresponde a parte mineral do compósito, uma vez que a hidroxiapatita é estável nessa temperatura e a impurezas provenientes do colágeno (BATISTA *et al*, 2009, LIAO *et al*, 2005, LOZANO *et al*, 2003).

### 5.1.3 Porosidade

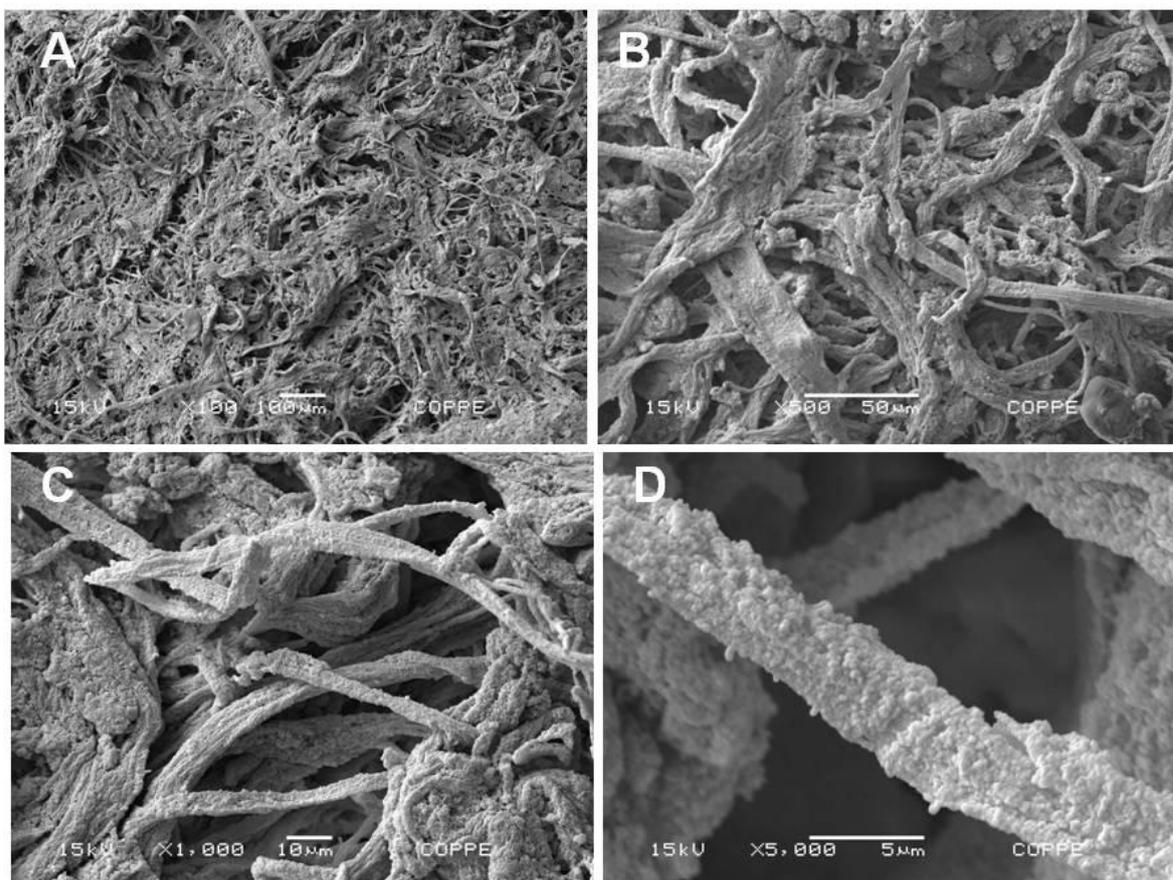
O tamanho dos poros, a distribuição, a estrutura interconectada de arcabouços implantáveis devem ser adaptados para a aplicação no sítio específico, pois isto influencia na adesão e proliferação celular e produção de nova matriz óssea, como também na formação de vasos sanguíneos dentro do arcabouço, ajudando na sua degradação, concomitantemente com a formação do novo tecido.

A porosidade média obtida de seis amostras analisadas foi de  $75 \pm 5\%$ . Tal porosidade mostra-se heterogênea. Tal morfologia é similar à microestrutura do osso trabecular, que possui tanto nano poros como macroporos. KARAGEORGIU & KAPLAN (2005) expõem que grandes porosidades não afetam a ligação da célula óssea com o arcabouço, desde que isso facilite o transporte de nutrientes e oxigênio.

Nesse trabalho, a porosidade não foi controlada, sendo resultado do processo de moldagem e liofilização. Esta pode ser a razão do desvio padrão elevado da análise.

## 5.2 Caracterizações morfológicas do compósito HA/Col (65:35)

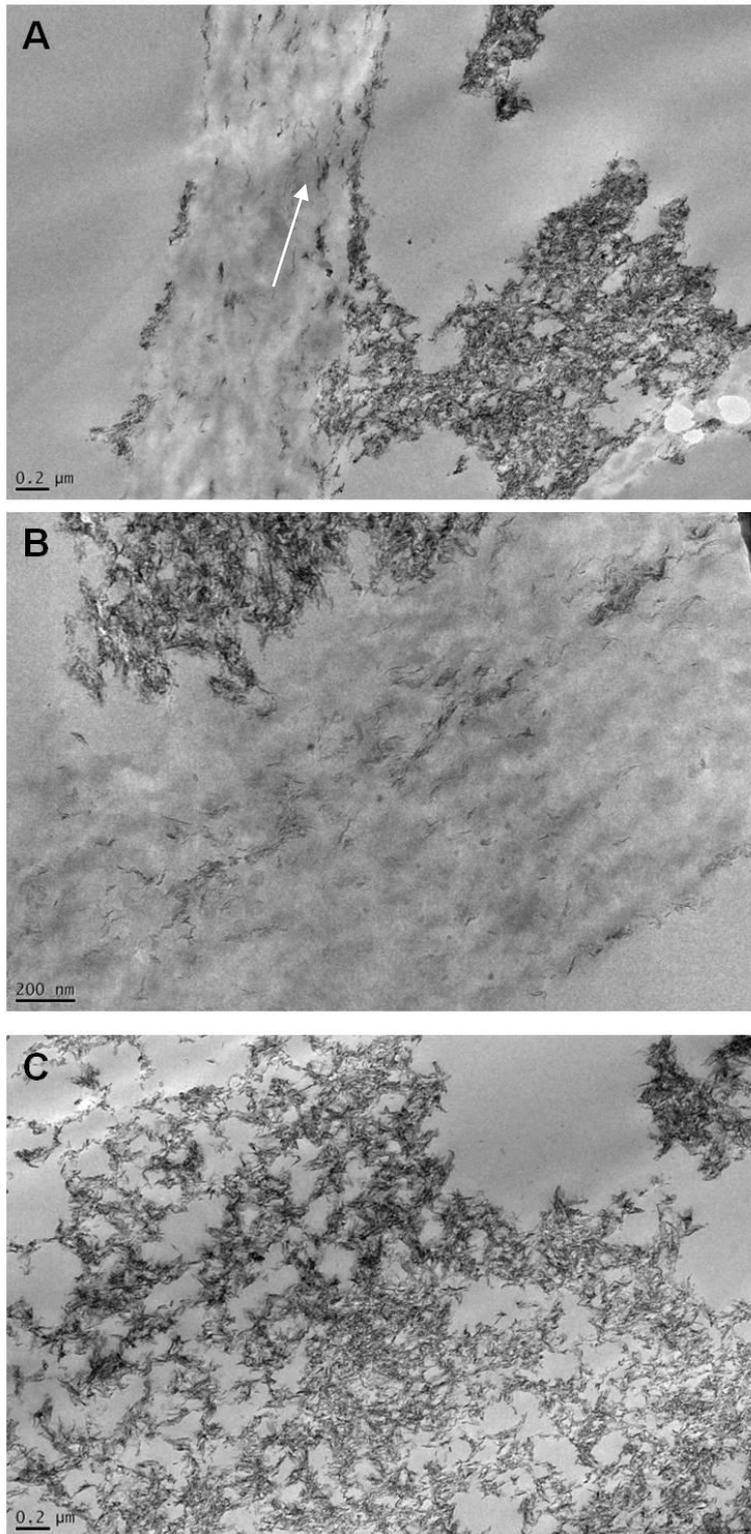
A caracterização morfológica do compósito HA/Col (65:35) foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV) Figura 5.5 e de transmissão (MET), Figura 5.6.



**Figura 5.5.** Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do compósito HA/Col em diferentes aumentos. Em (D), temos o detalhe da deposição dos cristais de HA nas fibras de colágeno.

As micrografias da superfície externa do compósito mostram uma morfologia heterogênea, com grande distribuição e tamanho de poros variados. Observou-se também que as fibras de colágeno foram totalmente recobertas pelo depósito de hidroxiapatita na produção do compósito HA/Col (65:35).

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostram numerosos cristais de hidroxiapatita nas fibras de colágeno (Figura 5.6). Observa-se uma orientação preferencial dos cristais nucleados nas fibras de colágeno (indicada pela seta, Fig. 5.6 (A)).



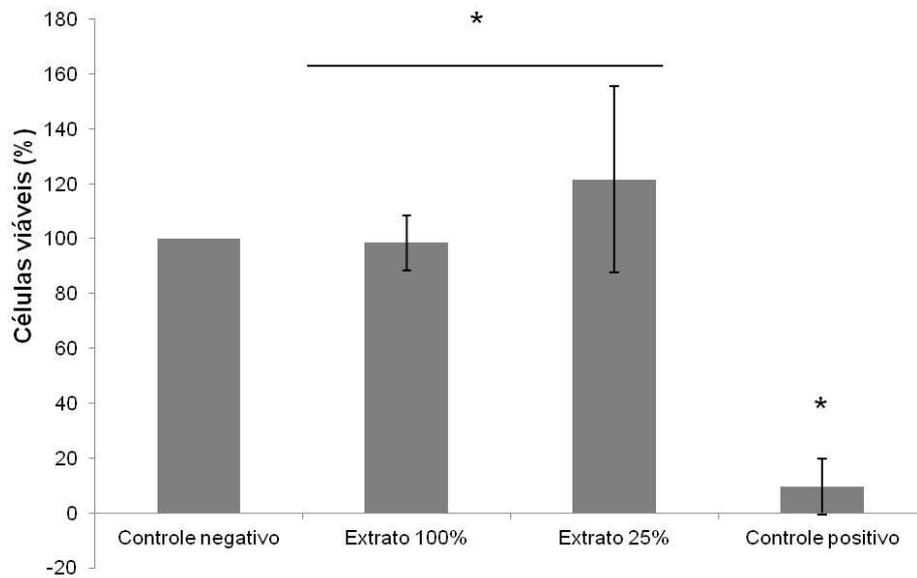
**Figura 5.6.** Micrografias de MET do compósito HA/Col sintetizado. Em (A), observa-se as fibras de colágeno e a grande deposição dos cristais de HA em sua periferia, em (B) a fibra de colágeno e em (C) o destaque para os cristais de HA.

Nota-se uma predominância de precipitação dos cristalitos de hidroxiapatita nas periferias das fibras de colágeno (Fig. 5.6 (B)). Por meio destas imagens, não foi possível confirmar se a deposição dos cristais ocorreu nas regiões de *gap*, como acredita-se que ocorra a nucleação da apatita *in vivo* (ZHANG *et al*, 2010).

### 5.3 Citotoxicidade do arcabouço compósito HA/Col

Os resultados do ensaio de MTT para as células MC3T3 incubadas em diferentes extratos estão apresentadas na Figura 5.7. A análise de variância (ANOVA) mostrou que existe diferença significativa entre os grupos para  $p < 0,05$ . O teste de Tukey mostrou que houve diferença significativa entre os extratos e o controle positivo e que não houve diferença significativa entre os extratos e o controle negativo.

Os resultados mostram que nenhum dos extratos testados apresentou citotoxicidade para as células, uma vez que apresentaram diferença significativa na viabilidade celular em comparação com o controle negativo (SDS 1%). Logo, podemos concluir que o compósito HA/Col (65:35) não é citotóxico, mesmo utilizando solução de glutaraldeído a 0,125% (v/v) com agente de reticulação.



**Figura 5.7.** Citotoxicidade do compósito HA/Col reticulado segundo MTT. Diferenças significativas entre os grupos (\*).  $p < 0,05$ .

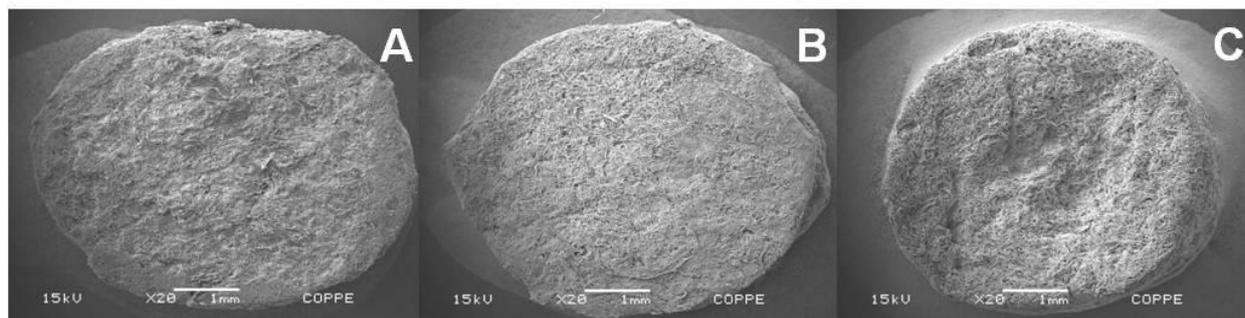
#### 5.4 Estudos de Degradação *in vitro*

Com o intuito de estudar a taxa de degradação do compósito em soluções que mimetizem os meios fisiológicos, quantificou-se a liberação dos íons cálcio (Ca) e fósforo (P) nas soluções com diferentes pHs.

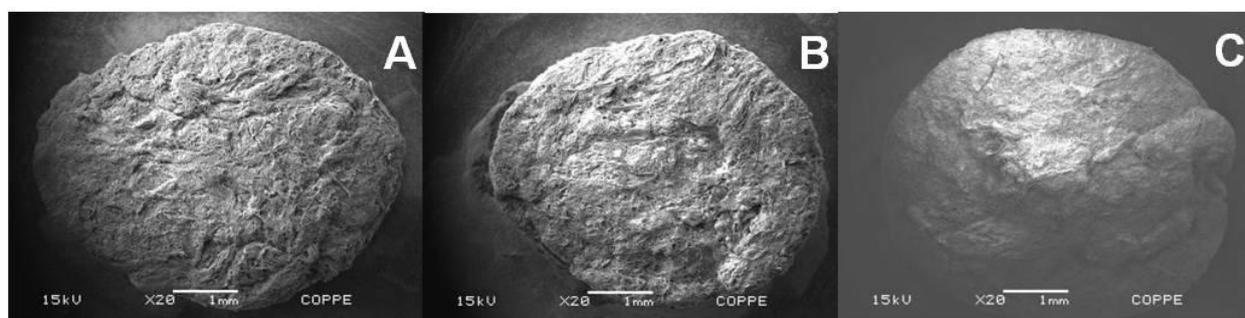
Estudos estáticos e dinâmicos foram realizados a fim de averiguar a taxa de dissolução do compósito HA/Col, em diferentes condições de experimento.

#### 5.4.1 Degradação estática

As micrografias em baixas magnificações para ensaio estático em pH ácido (4,0) e neutro (7,4) mostram que o arcabouço manteve sua estrutura ao longo dos dias de ensaio, como mostrado nas Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente.



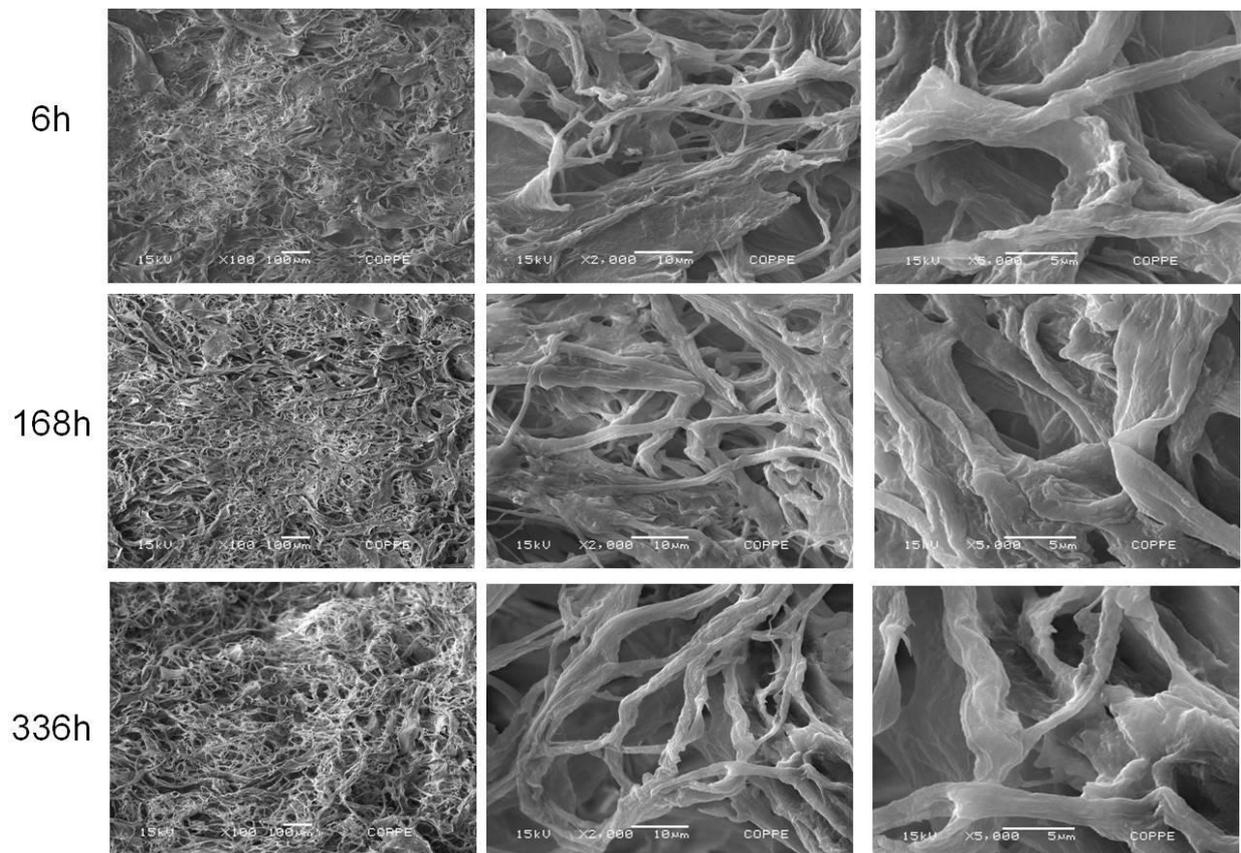
**Figura 5.8.** Micrografias do compósito HA/Col submetido às condições estáticas em pH ácido após 6 horas (A), 168 horas (B) e 336 horas (C).



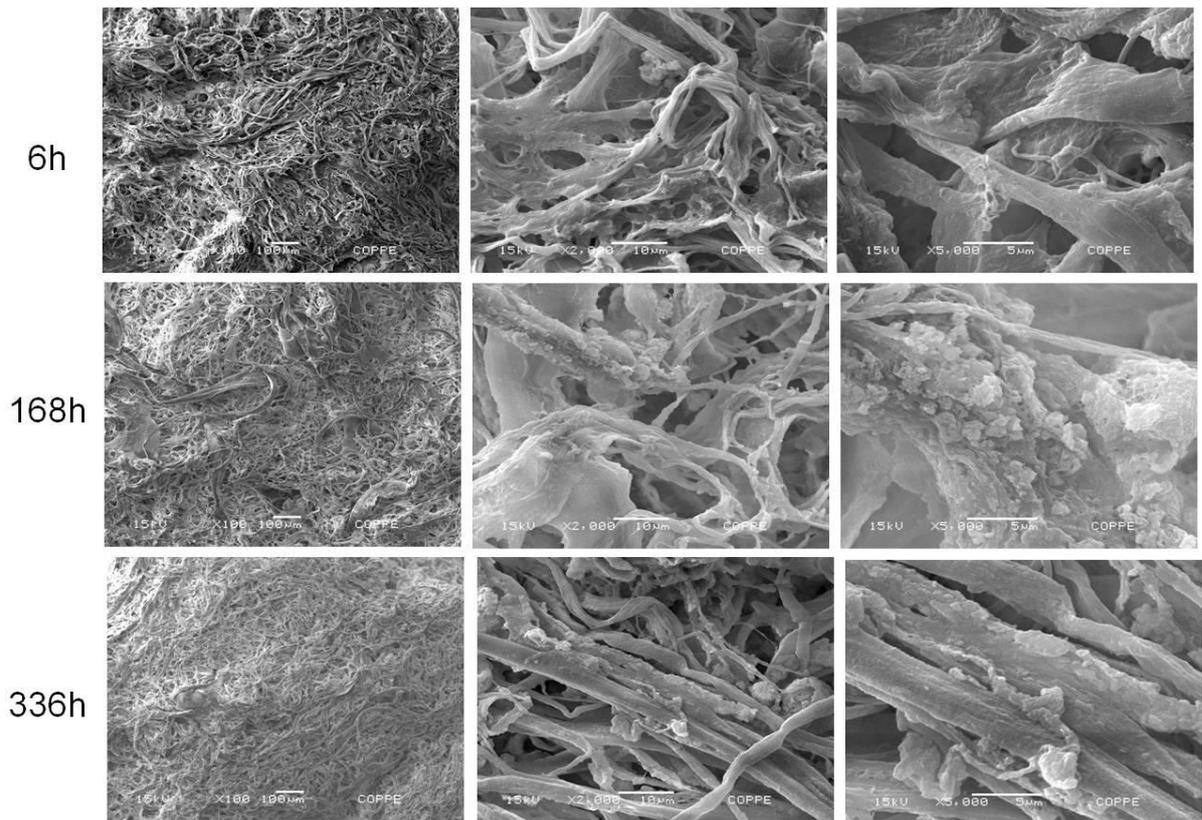
**Figura 5.9.** Micrografias do compósito HA/Col submetido às condições estáticas em pH neutro após 6 horas (A), 168 horas (B) e 336 horas (C).

A reticulação do compósito HA/Col (65:35) com 0,125% de GTA foi importante para manter a estrutura dos compósitos nos ensaios estáticos durante 14 dias. Em maiores magnificações, observamos a diminuição da quantidade de cristais depositados nas fibras de colágeno, como mostram as Figuras 5.10 e 5.11.

As micrografias indicam uma ausência quase completa de cristais de hidroxiapatita nos arcabouços expostos a pH ácido, porém em pH neutro ainda é possível observar cristais de HA nas fibras de colágeno após 336 horas de ensaio.



**Figura 5.10.** Micrografias dos arcabouços HA/Col submetido às condições estáticas em pH ácido.

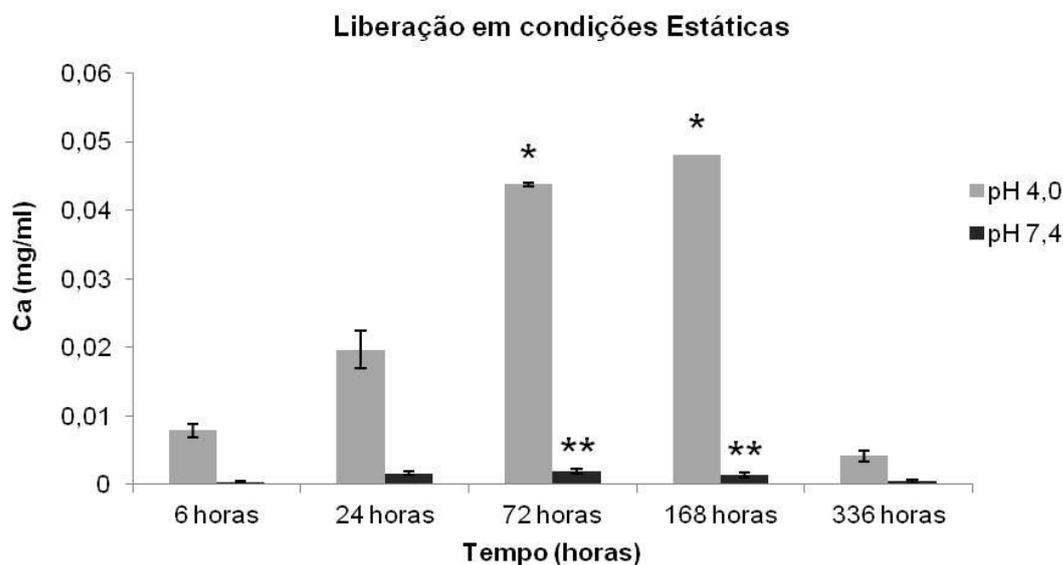


**Figura 5.11.** Micrografias dos arcabouços HA/Col submetido às condições estáticas em pH neutro.

As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam a concentração de cálcio (Ca) e fósforo (P) em função do tempo nos meios ácido e neutro após ensaio em condições estáticas.

Na Figura 5.12, nota-se maior liberação de cálcio em meio ácido, possivelmente devido a maior solubilidade do colágeno em pHs mais ácidos (Kittiphattanabawon *et al*, 2005). Observa-se um aumento da liberação de cálcio até 168 horas para o pH 4,0 e em seguida uma diminuição da concentração em 336 horas. Este fato pode estar relacionado com a supersaturação do meio, que originalmente não contém cálcio, tentando manter a homeostasia. O enriquecimento localizado de íons na superfície do compósito gera uma supersaturação que induz a re-precipitação contendo cálcio e fósforo.

Observa-se o mesmo perfil para o pH neutro, porém com menor concentração de cálcio liberado.

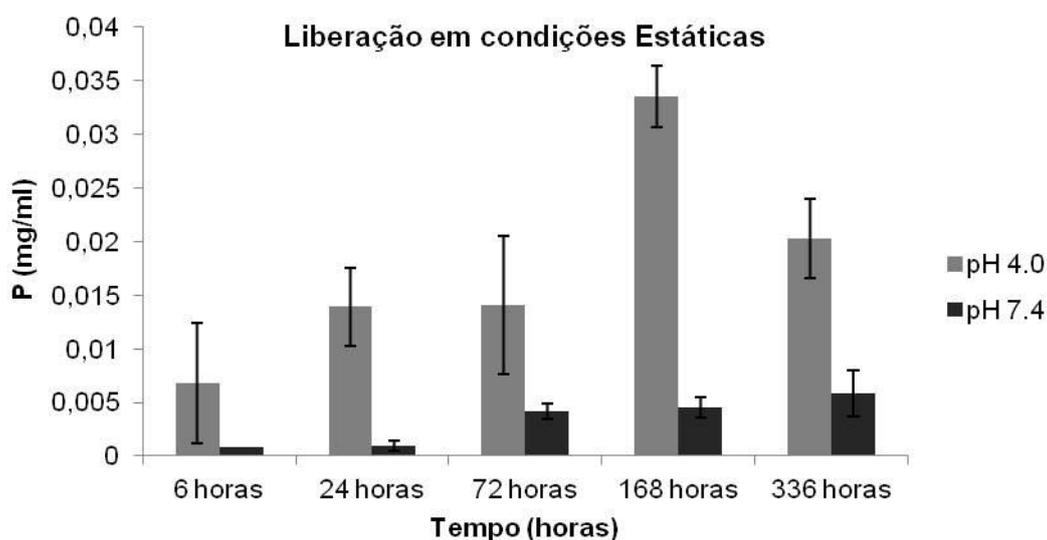


**Figura 5.12.** Liberação de cálcio (Ca) em meio ácido e neutro, sob condições estáticas. Diferenças significativas entre os tempos (\*, \*\*).  $p < 0,05$ .

A Figura 5.13 apresenta a concentração de fósforo (P) em meio ácido e neutro, em função do tempo de ensaio. A concentração de fósforo em solução foi menor em pH neutro do que em pH ácido. Em pH ácido, a concentração de fósforo aumentou e depois se manteve constante em 24 e 72 horas. Houve um aumento na concentração de fósforo na solução em 168 horas e diminuição em 336 horas, havendo assim um perfil de dissolução em até 168 horas de imersão e precipitação em 336 horas de imersão.

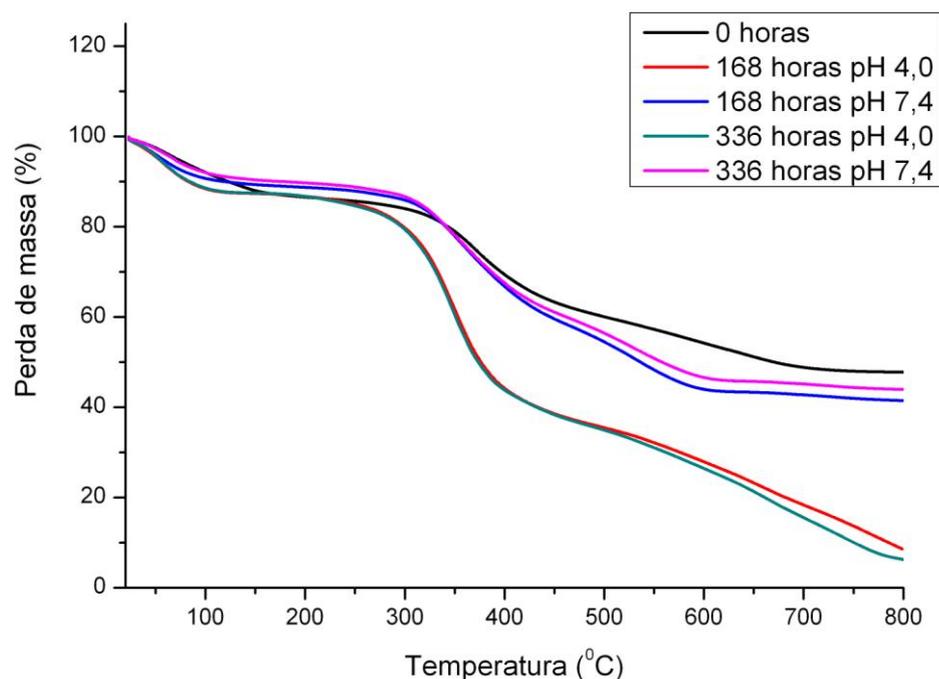
A fina camada de apatita, que teria sido formada com a precipitação dos íons cálcio e fósforo após 336 h de imersão, não pode ser visualizada nas imagens de MEV (Figuras 5.10 C e 5.11 C), possivelmente em função da irregularidade da superfície das fibras de colágeno.

Em pH neutro, observou-se um singelo e progressivo aumento na concentração de fósforo na solução até 336 horas, não havendo precipitação nesse intervalo de tempo.



**Figura 5.13.** Liberação de fósforo (P) em meio ácido e neutro, sob condições estáticas.

As curvas de perda de massa dos compósitos submetidos a 7 e 14 dias de ensaio, em pH ácido e neutro, estão apresentadas na Figura 5.14. Após a imersão, os compósitos também apresentaram 3 estágios de perda de massa, sendo que os 1º e 2º estágios de perda de massa ocorreram a temperaturas menores do que os observados para o compósito antes da imersão. Observou-se também que os compósitos imersos em solução a pH ácido apresentaram maior perda de massa quando comparados aos demais compósitos.



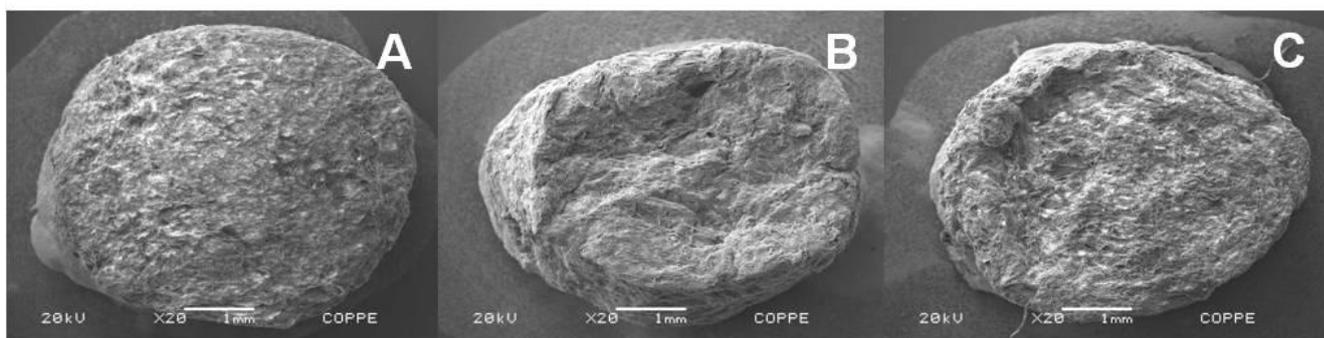
**Figura 5.14.** Curvas de perda de massa dos compósitos HA/Col submetidos a 7 e 14 dias de ensaio, sob condições estáticas.

Conforme discutido no item 5.1.2, o resíduo obtido ao final da análise termogravimétrica dos compósitos pode estar relacionada à fração de hidroxiapatita presente e às impurezas do colágeno. Desta forma, a fração de fase inorgânica dos compósitos após os ensaios de degradação sob condições estáticas por 14 dias em pHs ácido e neutro pode ser estimada por TGA. O resíduo encontrado ao final do ensaio de degradação em pH ácido (6,427%) diminuiu consideravelmente quando comparado com a amostra antes da imersão (47,919%). Por outro lado, após imersão em pH neutro, o valor do resíduo após 14 dias de ensaio (43,856%) foi próximo ao observado para amostra antes da imersão. Portanto, pode-se supor que ocorreu uma maior dissolução da parte mineral do compósito em pH 4 devido à instabilidade da HA nesse meio. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados para a liberação de íons cálcio e fósforo, onde foi verificado que ocorreu maior liberação de Ca e P no meio ácido quando comparado com o pH neutro (Figuras 5.12 e 5.13).

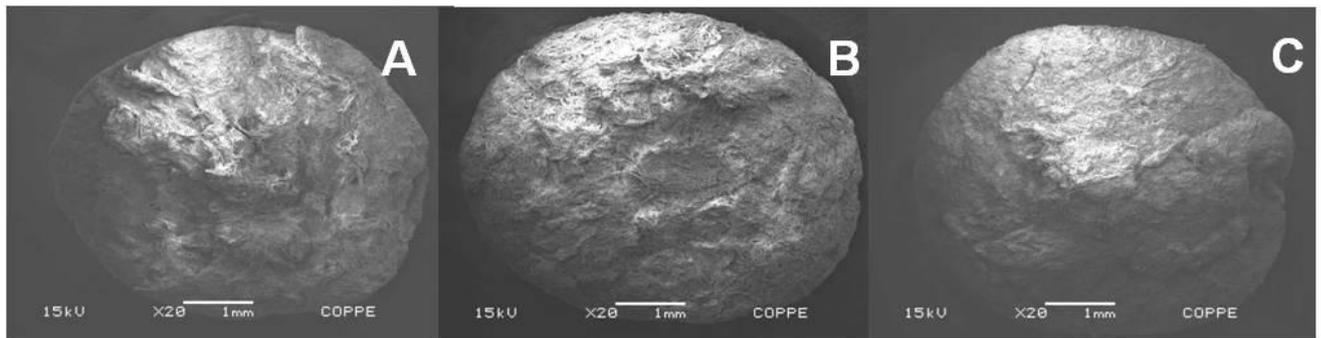
As imagens de microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços expostos a pH ácido após 14 dias, Fig.5.10, apresentaram as fibras de colágeno mais expostas com ausência dos cristais de HA corroborando com os resultados acima. Em pH neutro observa-se ainda a presença de cristais de apatita após 14 dias de ensaio, Fig. 5.11, confirmando uma menor dissolução do compósito nesse meio.

#### 5.4.2 Degradação dinâmica

Assim como nos ensaios estáticos, foram feitas micrografias de MEV em baixas magnificações para ensaio dinâmico em pH ácido (4,0) e neutro (7,4), mostrando que o arcabouço manteve sua estrutura morfológica macroscópica ao longo dos dias de ensaio, como mostrado nas Figuras 5.15 e 5.16.

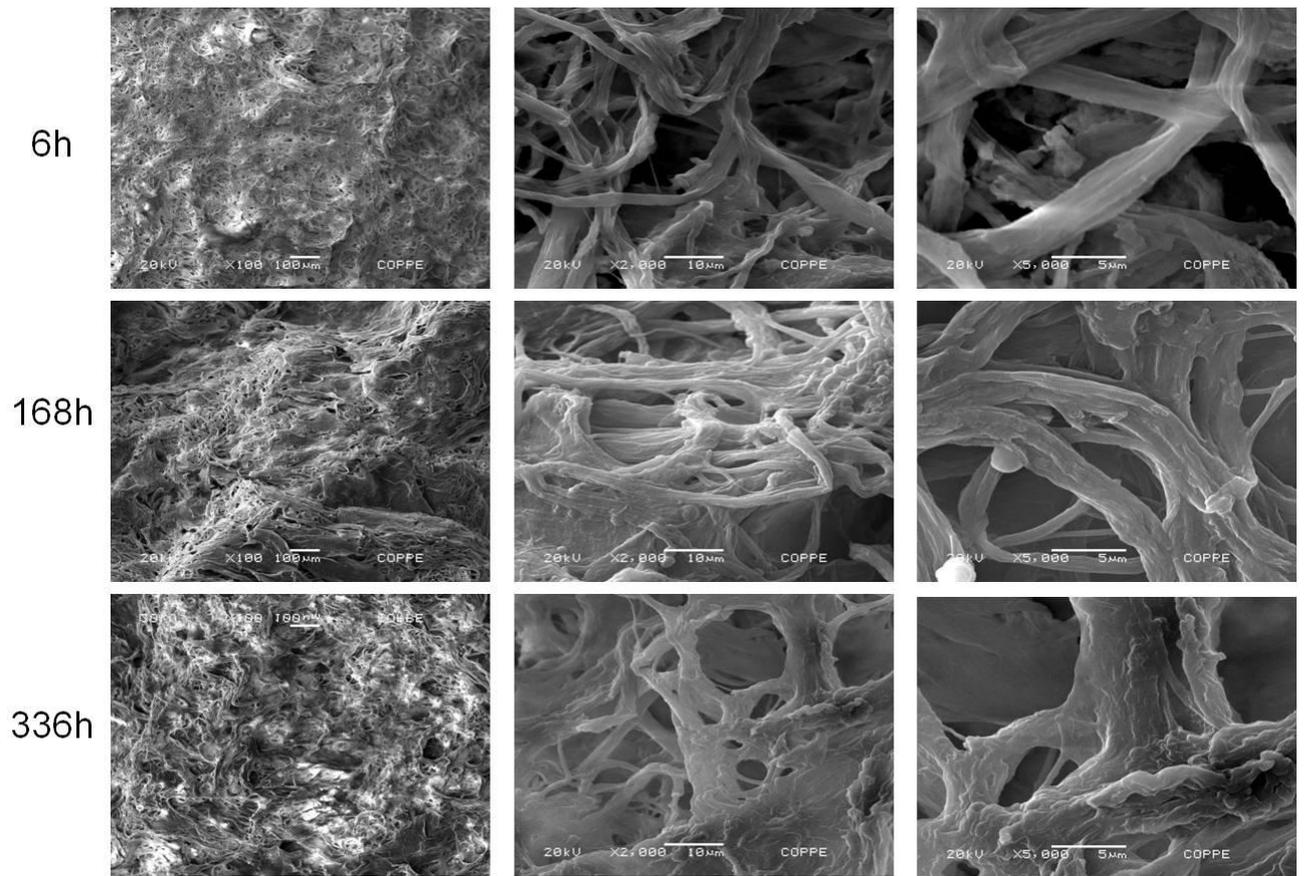


**Figura 5.15.** Micrografias de MEV do compósito HA/Col submetido às condições dinâmicas em pH ácido onde (A) em 6 horas, (B) em 168 horas e (C) em 336 horas.

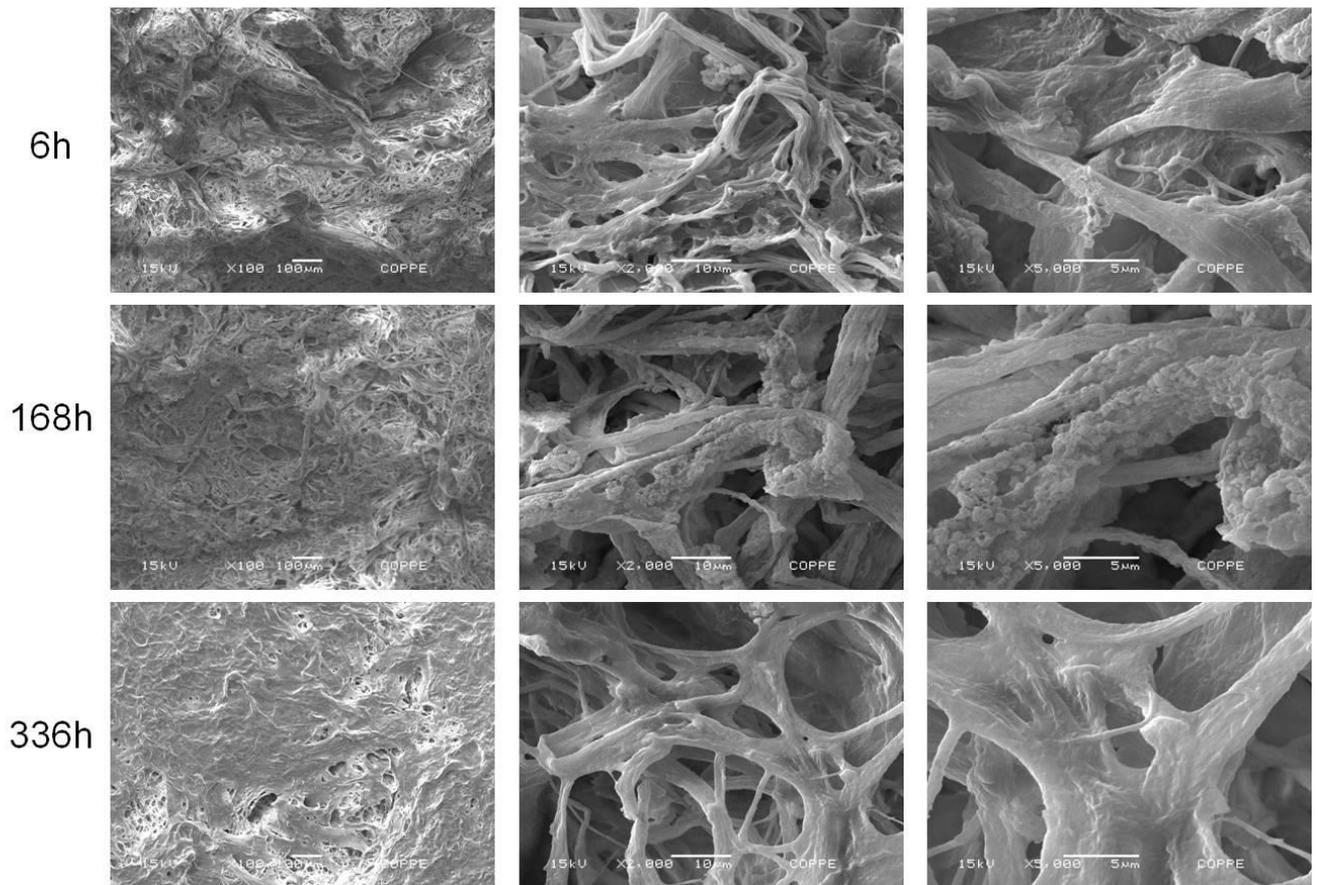


**Figura 5.16.** Micrografias de MEV do compósito HA/Col submetido às condições dinâmicas em pH básico onde (A) em 6 horas, (B) em 168 horas e (C) em 336 horas.

Em maiores magnificações, observa-se a diminuição da quantidade de cristais depositados nas fibras de colágeno, como mostram as Figuras 5.17 e 5.18. Nesse caso, ainda é possível verificar pequenos cristais de HA mesmo após 336 h de imersão tanto em pH ácido quanto em pH neutro. Sendo que a maior quantidade de cristais é observada após imersão em solução a pH 7,4.



**Figura 5.17.** Micrografias dos arcabouços HA/Col submetido às condições dinâmicas em pH ácido.

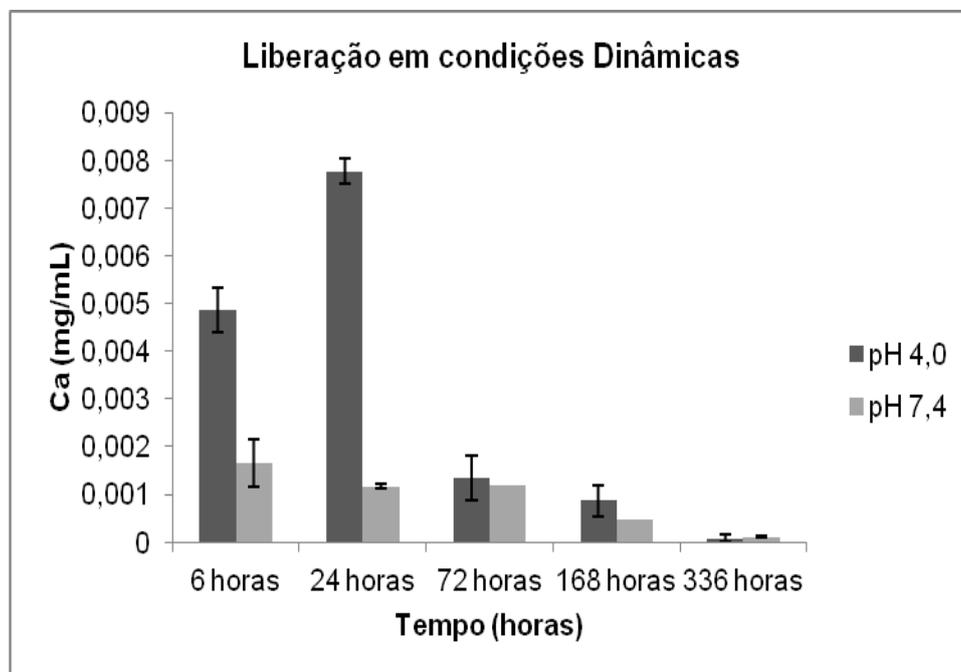


**Figura 5.18.** Micrografias dos arcabouços HA/Col reticulados submetido às condições dinâmicas em pH neutro.

As Figuras 5.19 e 5.20 apresentam a concentração de cálcio (Ca) e fósforo (P) em função do tempo nos meios ácido e neutro após ensaio em condições dinâmicas.

De acordo com a Figura 5.19, a concentração de liberação de cálcio foi maior em solução ácida. Nas primeiras 24h de imersão do compósito em pH ácido observou-se uma máxima liberação de cálcio. Após este tempo, houve uma diminuição da concentração desse elemento no meio até 336 horas. Conforme observado nos testes estáticos, onde há um aumento da solubilidade do colágeno e da hidroxiapatita em baixos valores de pH.

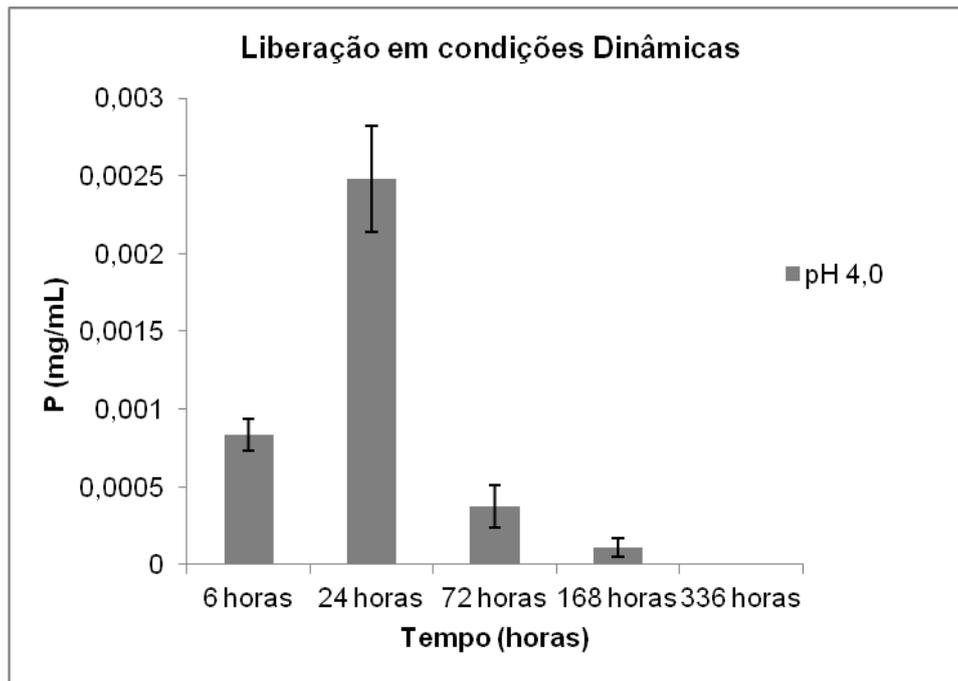
Para os ensaios em pH neutro, observou-se uma maior concentração de cálcio no meio nas primeiras horas de imersão seguida de uma constante diminuição de sua liberação até próximo de zero em 336 horas.



**Figura 5.19.** Liberação de Cálcio em meio ácido e neutro sob condições dinâmicas.

A liberação de fósforo foi observada em pequenas concentrações somente em solução ácida, como exposto na Figura 5.20. Houve uma grande liberação de fósforo nas primeiras 24 horas, diminuindo sua concentração significativamente em 72 horas e chega a perto do zero em 336 horas. O mesmo perfil foi encontrado por SILVA (2009) para hidroxiapatita contendo silício, onde houve uma diminuição da concentração de fosfato após 72 horas em condições dinâmicas de imersão.

Acredita-se que houve liberação de fósforo em solução de pH neutro, provavelmente em concentrações muito pequenas que ultrapassam os limites de detecção do equipamento.



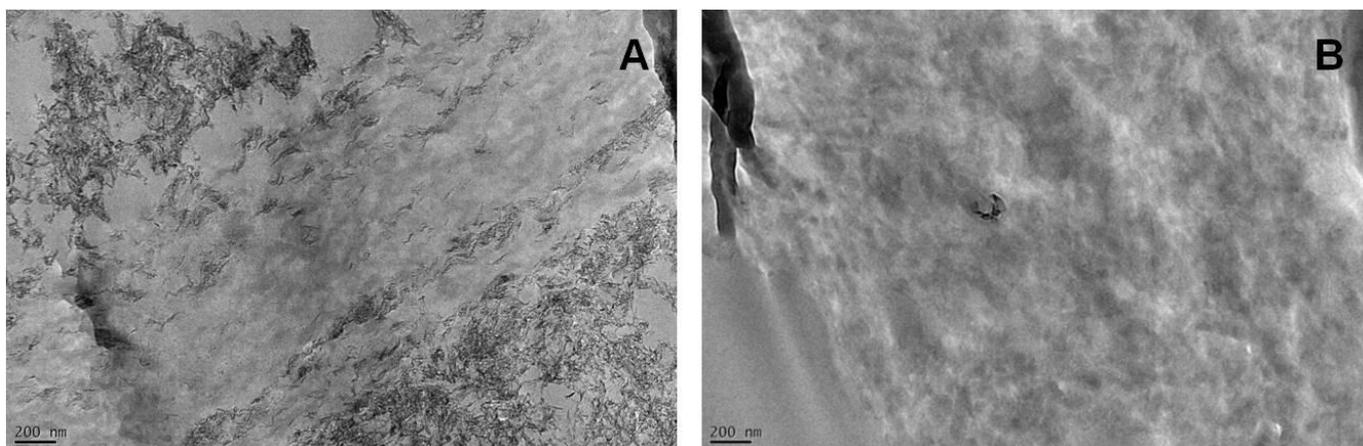
**Figura 5.20.** Liberação de fósforo em meio ácido sob condições dinâmicas.

Nos ensaios dinâmicos, observou-se a concentração máxima dos íons em um tempo bem menor (24 h) do que o observado para os ensaios estáticos (168 h), possivelmente devido à renovação constante do fluido. Semelhante aos ensaios estáticos, a precipitação de apatita também não pode ser observada nas imagens de MEV dos compósitos submetidos à degradação dinâmica (Figuras 5.17 e 5.18).

Observa-se que, nos ensaios dinâmicos, as concentrações (em mg/mL) liberadas de cálcio e fósforo foram bem menores do que as observadas nos ensaios estáticos. A forma com que o material entrou em contato com o meio pode ter contribuído para esta grande diferença de concentração observada entre os dois métodos. Nos testes estáticos, não houve troca de meio e, portanto, pode ter havido competição entre os mecanismos de dissolução e precipitação dos íons, em função da saturação da solução. Por outro lado, nos testes dinâmicos, os arcabouços foram constantemente "lixiviados" pelo meio e, portanto, os íons dissolvidos podem ter sido carregados pelo fluxo de solução, diminuindo, assim, a taxa de dissolução.

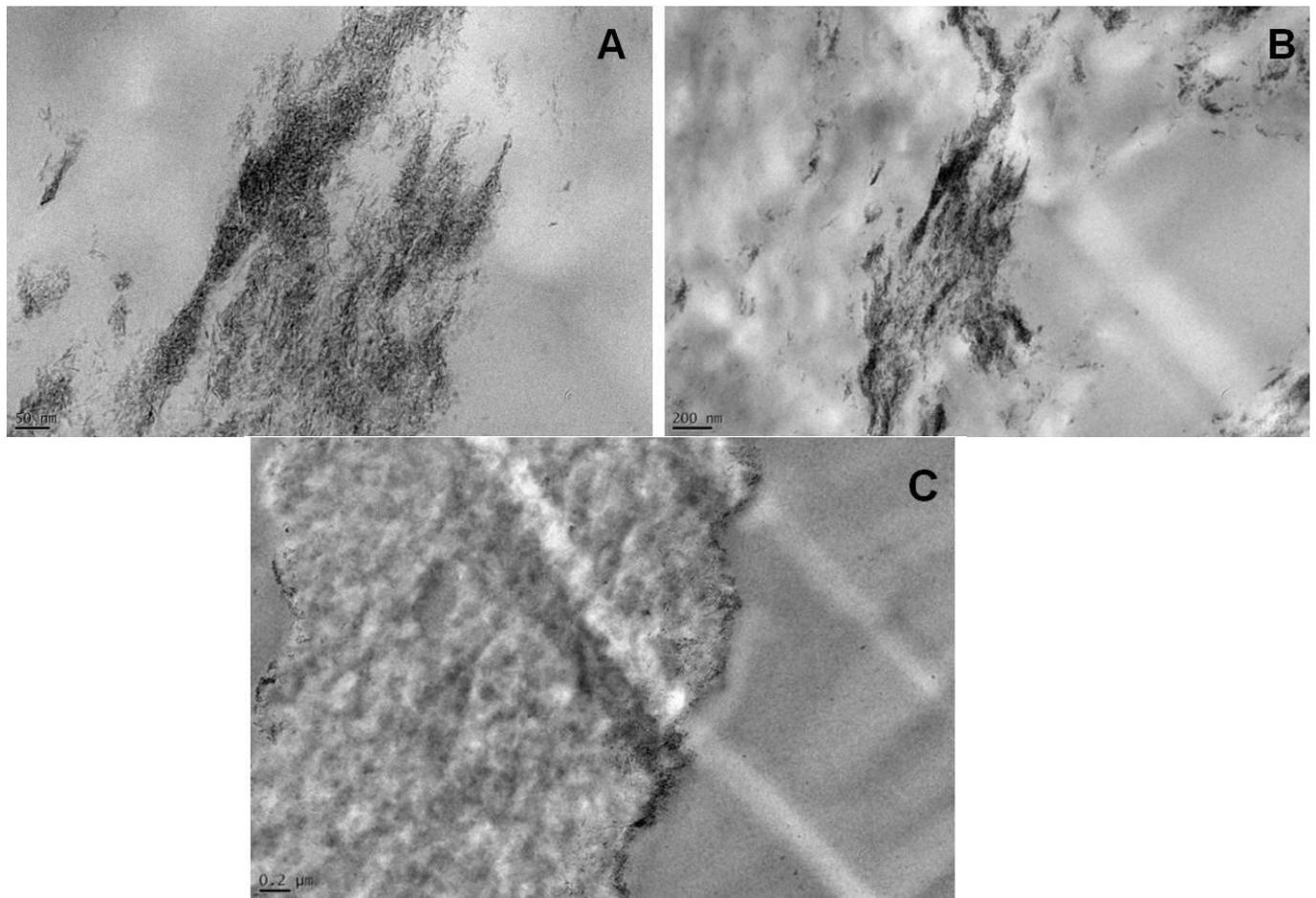
Apesar das condições de ensaio estático e dinâmico serem muito diferentes, uma vez que o último tenta mimetizar o fluxo corpóreo em contato com o biomaterial, a diferença dos teores de cálcio e fósforo liberados para o meio mostra uma menor degradação dos compósitos em ensaios dinâmicos. A taxa de degradação do implante deve ser lenta garantindo que as células ósseas secretem sua matriz extracelular e depositem uma fase mineral usando o compósito como suporte estrutural 3D para o tecido neoformado (SHIN *et al*, 2003). O implante deve ser degradado, reabsorvido e seus subprodutos metabolizados.

As micrografias de MET dos arcabouços compósitos antes e após 336 horas de ensaio em solução de pH ácido e neutro estão expostas nas Figuras 5.21 e 5.22 respectivamente. No controle (A), é possível identificar os cristais de hidroxiapatita presentes em sua maioria na periferia das fibrilas de colágeno e algumas precipitações no seu interior. Em (B), observamos somente as fibrilas de colágeno.



**Figura 5.21.** Micrografias de MET do compósito HA/Col antes (A) e após ensaios dinâmicos em pH ácido (B).

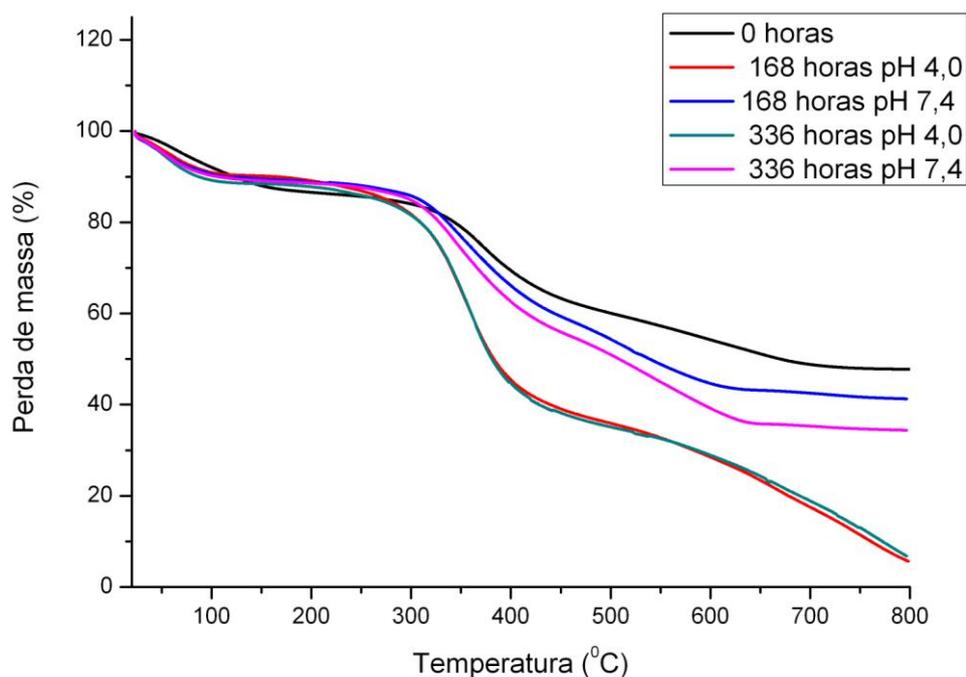
Quando exposto em solução de pH neutro (7,4), é possível observar cristais de HA aglomerados na periferia das fibrilas de colágeno (Figura 5.22).



**Figura 5.22.** Micrografias de MET do compósito HA/Col após ensaios dinâmicos em pH neutro, com diferentes ampliações.

A Figura 5.23 mostra as curvas de perda de massa dos compósitos após os ensaios de degradação sob condições dinâmicas por 14 dias em pHs ácido e neutro. Assim como nos ensaios estáticos, observou-se também que os compósitos imersos em solução a pH ácido apresentaram maior perda de massa quando comparados aos demais compósitos. O resíduo inorgânico encontrado ao final do ensaio de degradação em pH ácido (9,011%) é bem menor que a parte mineral estimada na amostra antes da imersão (47,919%). Em pH neutro, o valor do resíduo após 14 dias de ensaio foi de 34,383%. Como nos ensaios estáticos ocorreu uma maior dissolução da parte mineral do compósito em pH 4 devido a maior solubilidade da HA nesse meio.

Isso também foi confirmado pela máxima liberação de Ca e P na primeiras 24 h de ensaio.

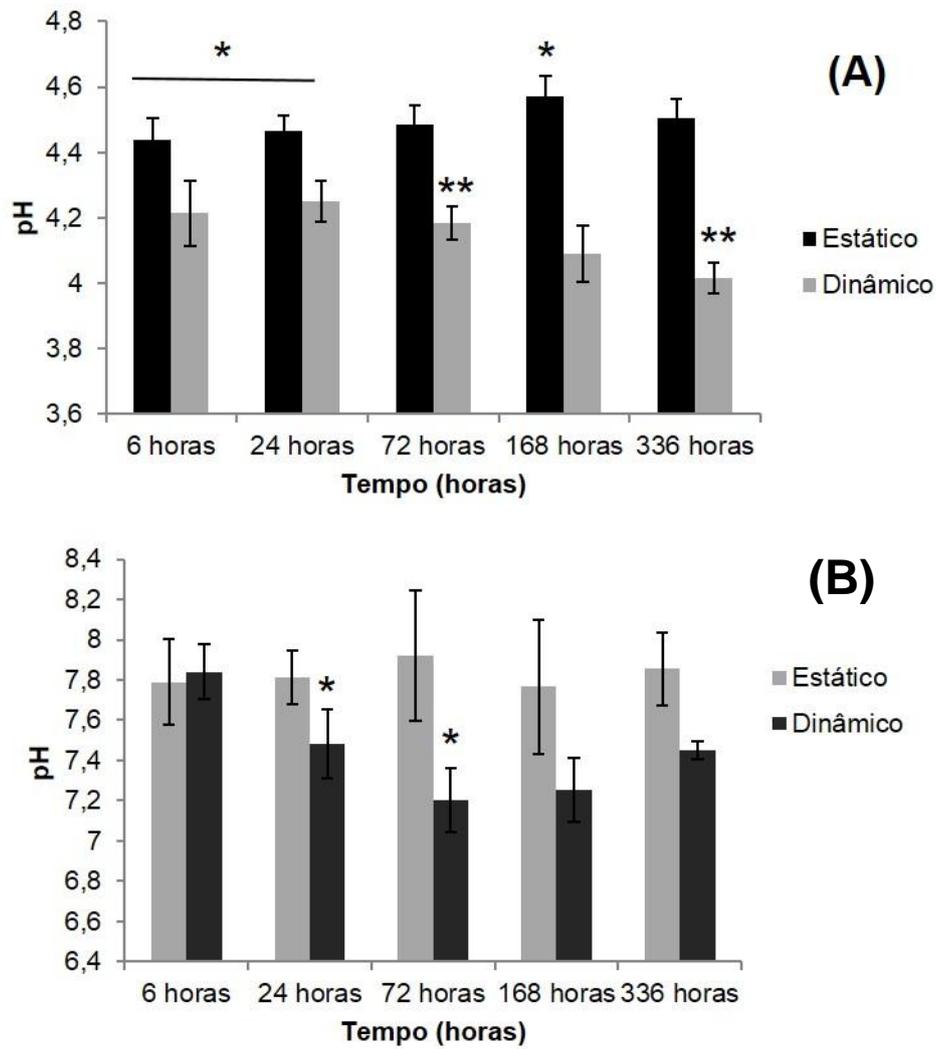


**Figura 5.23.** Curvas de perda de massa dos compósitos HA/Col submetidos a 7 e 14 dias de ensaio, sob condições dinâmicas.

Na imagem de microscopia eletrônica de transmissão dos arcabouços expostos a pH ácido após 14 dias, Fig.5.21 B, não observou-se a presença de cristais de HA nas fibras de colágeno confirmando uma maior dissolução da parte mineral após o ensaio. Em pH neutro observa-se ainda a presença de cristais de apatita após 14 dias de ensaio na periferia das fibrilas de colágeno, Fig. 5.22, confirmando uma menor dissolução do compósito nesse meio.

Após os tempos de ensaio, o pH das soluções foi medido para observar sua variação, como exposto na Figura 5.24. Observa-se uma variação em ambos os pHs

de experimento, com um aumento tanto em pH ácido quanto em pH neutro. Sabe-se que íons cálcio e fosfato possuem um caráter básico, explicando o singelo aumento de pH nos ensaios estáticos. Nos ensaios dinâmicos, essa variação não foi significativa.



**Figura 5.24.** Variação de pH da solução ácida (A) e neutra (B), nos ensaios estáticos e dinâmicos.

## 6. CONCLUSÕES

Foi possível produzir arcabouços compósitos hidroxiapatita/colágeno tipo I por meio de síntese em solução aquosa.

Os compósitos apresentaram a hidroxiapatita como única fase mineral, distribuídos heterogeneamente pelas fibras de colágeno, dando preferência por formar aglomerados de cristais de HA na periferia das fibrilas.

A alta porosidade dos arcabouços e sua heterogeneidade morfológica não interferiram na integridade do material, mesmo após 14 dias de ensaio.

Os compósitos não apresentaram citotoxicidade apesar da utilização de glutaraldeído como agente reticulador. Concluimos que, em pequenas concentrações, este reagente não interfere na viabilidade celular.

Houve degradação dos principais íons de formação óssea, mostrando que em ensaios estáticos houve maior liberação desses produtos.

O resíduo inorgânico foi menor em pHs mais ácidos, mostrando uma maior liberação da fase inorgânica nessas condições.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

Estudar o comportamento de dissolução *in vitro* do arcabouço produzido utilizando meio de cultura de células como solução irrigadora.

Fazer estudos do comportamento dos arcabouços HA/Col (65:35) *in vitro* utilizando células ósseas.

Avaliar por meio de microscopia eletrônica de transmissão a orientação cristalográfica dos cristais de hidroxiapatita após a imersão em soluções a pH neutro e a pH ácido, a fim de confirmar se houve reprecipitação.

## 8. REFERÊNCIAS

ABOU NEELI, E. A., BOZEC L., KNOWLES J. C., *et al*, 2012. “Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.010>> (data de acesso: 9 de novembro de 2012).

AL-MUNAJJED, A.A., PLUNKETT A.N., GLEESON P. J., *et al*, (2009), “Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique”, *J. Biomed Mater Res: Appl Biomater*, 90B: 584-59.

AN Y. H., DRAUGHN R. A., 2000. “*Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*”. 1ª edição. Editora CCR, EUA.

ANDERSON M. J., 2001. “Biological responses to materials”, *Annu. Rev. Mater. Res.* 31: 81–110.

AZEVEDO V. V. C., CHAVES S. A., BEZERRA D. C., COSTA A. C. F. M., 2007. “Materiais cerâmicos utilizados para implantes”. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3: 35-42.

BASU B., KATTI D. S., KUMAR A., 2009. “*Advanced Biomaterials – Fundamentals, Processing, and Applications*”, The American Ceramic Society, editora Wiley.

BATCHELAR D. L., DAVIDSON M. T. M., DABROWSKI W., CUNNINGHAM I. A., 2006. “Bone-composition imaging using coherent-scatter computed tomography: Assessing bone health beyond bone mineral density”, *Med. Phys.* v. 33: 904 – 915.

BATISTA T.M., MARTINS V. C. A., PLEPIS M.A.G. (2009). “Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices”. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 95, 3: 945 – 949.

BEST S. M., PORTER A.E., THIAN E.S., HUANG J., 2008. “Bioceramics: Past, present and for the future”. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 28, 1319–1327.

BUIJS T. J, PLUIJM G., 2009. “Osteotropic cancers: From primary tumor to bone”. *Cancer Letters* 273: 177–193.

CAMPOS D. M., 2008. “*Produção e Caracterização de Colágeno tipo I e de Compósitos Hidroxiapatita - Colágeno para Regeneração Óssea.*” Tese de M.Sc., Programa de Engenharia Metalúrgica e Materiais, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

CAMPOS, D.M., 2012. “*Cultivo de células osteoprogenitoras em compósito 3-D hidroxiapatita-colágeno sob condições estática e dinâmica*”, Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Metalúrgica e Materiais, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

CHIARA G., LETIZIA F., LORENZO F., *et al*, 2012. “Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction”, *Int. J. Molecular Sciences* v. 13, 737-757.

COSTA A. C. F. M., LIMA M. G., LIMA L. H. M. A., *et al*, 2009. “Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações”, *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.4.3: 29-38.

COSTA R. C. C., MIGUEL F. B., ROSA F. P., 2005. “Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea”, *R. Ci. méd. biol.*, v. 4, n. 1: 70-76.

CUNHA M. R., SANTOS JR. A. R., GOISSIS G., GENARI S. C., 2008. “Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats”. *J Mater Sci: Mater Med* 19: 1341–1348.

E’GUES M. A. M., PAULA M., GOISSIS G., 2008. “Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia: preparação e caracterização”. *Rev. Odonto Ciência*; 23 (2): 134-140.

FALINI, G., FERMANI S., PALAZZO B. E ROVERI N., 2007. “Helical domain collagen substrates mineralization in simulated body fluid”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87A, Ed. 2: 470-476.

FICAI A., ANDRONESCU E., VOICU C., GHITULICA C., FICAI D., 2010. “The influence of collagen support and ionic species on the morphology of collagen/hydroxyapatite composite materials”, *Materials Characterization* 61: 402 – 407.

FRATZL P., 2008. “*Collagen: Structure and Mechanics*”. Editora Springer.

GELINSKY M., WELZEL P.B., SIMOM P., BERNHARDT A. E KÖNIG U., 2008. “Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite”, *Chemical Engineering Journal* v. 137, 84-96.

GINEBRA M.-P., CANAL C., ESPANOL M., *et al*, 2012. “Calcium phosphate cements as drug delivery materials”. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 64, 1090–1110.

GOISSIS A. P. A., 2007. “Análise estrutural do colágeno tipo I. Correlação estrutura: atividade biológica”, Tese de M.Sc., Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, Brasil.

GUASTALDI A. C., APARECIDA A. H., 2010. “Fosfatos de Cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos”, *Quim. Nova*, v. 33, No. 6: 1352-1358.

GRANJEIRO J. M., SOARES G. D. A. e autores, 2011. “*Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações*”. 1ª edição, VM Cultural Editora.

HABERMEHL, J. (2005). “*Development and validation of a collagen-based scaffold for vascular tissue engineering*”, Tese de M.Sc., Faculdade de Ciência e Engenharia, Universidade Laval, Québec, Canadá.

HELMUS, M. N., GIBBONS D. F., CEBON D., 2008. “Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices”, *Toxicologic Pathology*, vol 36: 70-80.

IVANOVA, T. I. *et al*, 2001. “Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition”, *Journal of Solid State Chemistry* 160, 340 – 349.

KARAGEORGIU V., KAPLAN D., 2005. "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis", *Biomaterials*, 26, 5474 – 5491.

KIKUCHI M., IKOMA T., ITOH S., *et al*, 2004a. "Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen", *Composites Science and Technology* 64: 819–825.

KIKUCHI M., MATSUMOTO H. N., YAMADA T., *et al*, 2004b. "Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites", *Biomaterials* 25: 63–69.

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

KITTIPHATTANABAWON P., BENJAKUL S., VISESSANGUAN W., NAGAI T., TANAKA M., 2005. "Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)", *Food Chemistry* 89, 363–372.

KOZLOWSKA J. E SIONKOWSKA A., 2010. "Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as potential bone substitute", *International Journal of Biological Macromolecules*, 47: 483-487.

LI X., CHANG J., 2005. "Preparation and characterization of bioactive collagen/wollastonite composite scaffolds", *Journal of Materials Science: Mat. In Medicine*, 16: 361-365.

LIAO, S., WATARI, F., U.O.M. *et al.*, 2005, "The Preparation and Characteristics of a Carbonated Hydroxyapatite / Collagen Composite at Room Temperature", *J. Biomed Mater Res PartB: Appl Biomater. B*, 74: 817–821.

LIU C., HAN Z., CZERNUSZKA J.T., 2009. "Gradient collagen/nanohydroxyapatite composite scaffold: Development and characterization", *Acta Biomaterialia*, 5: 661–669.

MOREIRA, A. P. D., 2006. "Síntese e caracterização de carbonato apatitas nanoestruturadas", Tese de M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Química Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

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

PLUNKETT N. E O'BRIEN F. J., 2011. "Bioreactors in tissue engineering". *Technology and Health Care* 19: 55–69.

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

RAUH J., MILAN F., GÜNTHER K-P., STIEHLER M., 2011. "Bioreactor Systems for Bone Tissue Engineering", *Tissue Engineering: part B*, 17, n 4: 263-280.

SHIN H., JO S., G. MIKOS A., 2003. "Biomimetic materials for tissue engineering", *Biomaterials* 24, 4353–4364.

SILVA H. M., 2009. “Avaliação In Vitro de Hidroxiapatita Contendo Silício sob Condições Estática e Dinâmica”. Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Metalúrgica e Materiais, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

SILVA, H. M., MATEESCU M., DAMIA C., CHAMPION E., SOARES G., ANSELME K., 2010. “Importance of dynamic culture for evaluating osteoblast activity on dense silicon-substituted hydroxyapatite”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80, 138–144.

STEVENS B., YANG Y., MOHANDAS A., STUCKER B., NGUYEN K. T., 2008. “A Review of Materials, Fabrication Methods, and Strategies Used to Enhance Bone Regeneration in Engineered Bone Tissues”. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 85B: 573 – 582.

STEVENS M. M., 2008. “Biomaterials for bone tissue engineering”, *Materials Today*, v.11, nº 5, 18-25.

“SUS gasta quase 81 milhões com fraturas em idosos em 2009. Saiba mais!”, fonte: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=33674&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=33674&janela=1), data de acesso: 11 de novembro de 2012.

TREBACZ H., WÓJTOWICZ K. (2005), “Thermal stabilization of collagen molecules in bone tissue”, *Intern. Journal of Biological Macromolecules*, 37: 257-262.

VAUGHAN T. J., MCCARTHY C. T., MCNAMARA L. M., 2012. “A three-scale finite element investigation into the effects of tissue mineralization and lamellar organisation

in human cortical and trabecular bone”. *Journal of the Mechanical behavior of Biomedical Materials*, 1 2: 50-62.

WAHL D.A. & CZERNUSZKA J. T., 2006. “Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair”, *European Cells and Materials*, v. 11, 43-56.

WANG H., LI Y., ZUO Y., ET AL, 2007. “Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering”, *Biomaterials* 28: 3338 – 3348.

WOPENKA B., PASTERIS J. D. (2005). “A mineralogical perspective on the apatite in bone”. *Materials Science and Engineering C* 25: 131–143.

PEK Y. S, GAO S., MOHAMED ARSHAD M.S., LECK K-J., YING J. Y., 2008. “Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds”, *Biomaterials* v. 29, 4300-4305.

ZHANG, L., TANG, P., XU, M., ZHANG, W., CHAI, W., WANG, Y., 2010. “Effects of crystalline phase on the biological properties of collagen-hydroxyapatite composites”, *Acta Biomaterialia*, v. 6, 2189-2199.

Z-R LI, WANG B., CHI CHANG-FENG, ZHANG Q-H, GONG Y-D, J-J TANG, H-Y LUO, G-F DING, 2013. “Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*)”, *Food Hydrocolloids*, 31, 103-113.