

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas**

**TESE DE DOUTORADO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE  
BIOCOMPÓSITOS FOSFATOS DE CÁLCIO/COLÁGENO  
DOPADOS COM ZINCO**

**AUTORA: MARIA HELENA SANTOS**

**ORIENTADOR: Dr. HERMAN SANDER MANSUR**

**CO-ORIENTADOR: Dr. LUIZ GUILHERME DIAS HENEINE**

**Belo Horizonte**

**2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas**

**MARIA HELENA SANTOS**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE  
BIOCOMPÓSITOS FOSFATOS DE CÁLCIO/COLÁGENO  
DOPADOS COM ZINCO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Metalúrgica e de Minas, área de concentração Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: **DR. HERMAN SANDER MANSUR**  
Co-orientador: **DR. LUIZ GUILHERME DIAS HENEINE**

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia - UFMG  
2005

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos Serafim, Adriano, Josiana e Juliana.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser realizado sem a ajuda de várias pessoas a quem presto minha homenagem.

Ao Prof. Dr. Herman Sander Mansur pela orientação e participação, confiança e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pela orientação e entusiasmo durante os experimentos no Laboratório de Imunologia do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias – FUNED.

Ao grupo de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Minas – UFMG, Professores Dr. Herman Sander Mansur, Dra. Marivalda Magalhães Pereira e Dr. Rodrigo Lambert Oréfica pelos ensinamentos e pela motivação.

Ao Prof. Dr. Alfredo de Miranda Goes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> M. Fátima Leite, à doutoranda Patrícia Valerio e especialmente à Ana Paula do Laboratório de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, pela contribuição neste trabalho.

Ao Departamento de Odontologia das Faculdades Federais Integradas de Diamantina pelo apoio e oportunidade.

À Prof<sup>a</sup> Cíntia T. Pimenta de Araújo pelo apoio e dedicação à Disciplina de Materiais Dentários do Departamento de Odontologia – FAFEID.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Minas – UFMG, especialmente do Laboratório de Microscopia Eletrônica e do Laboratório de Raios-X, grandes contribuidores para a realização deste trabalho.

A todos os pesquisadores dos Laboratórios de Análise de Superfícies e Materiais – LASMAT, DEMET/EE-UFMG pela amizade e preciosas colaborações, especialmente à Alexandra, Eliane, Guilherme, Lívio, Luciana e Marise.

À Denise pela presteza e auxílio durante os experimentos no Laboratório de Análise de Superfícies e Materiais – LASMAT, DEMET/EE-UFMG.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos pesquisadores e funcionários do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias – FUNED especialmente a Álvaro, Ana, Augusto, Beth, D.Alice, Dário, Elaine, Horácio, Inácia, Nelman, Paulo, Regina, Roberta, Theonys, à Dr<sup>a</sup> Consuelo e ao Dr. Ricardo pelas colaborações, amizade e convivência.

À Patrícia Cota Campos pela inestimável dedicação, disponibilidade e amizade.

Aos meus pais, irmãos e toda a minha família pelo carinho e incentivo.

À Antonieta, Emílio e José Flávio pela amizade.

“A gente não faz amigos, reconhece-os”.

(Vinícius de Moraes)

“Na vida, às vezes, somos chamados a enfrentar situações em que temos certeza de que nossa força não garantirá a vitória. Mesmo assim seguimos em frente confiando na outra força que nos protege e orienta. Aprendemos que nem sempre Deus escolhe os mais capacitados, mas Ele sempre capacita os escolhidos”.

(Chris Linnares)

*“Ousar é perder o equilíbrio momentaneamente, não ousar é perder-se”.*

(Kierkegaard)

## RESUMO

Santos, M.H. Síntese e caracterização de biocompósitos fosfatos de cálcio/colágeno dopados com zinco. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas, área de concentração Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

Ainda hoje, um grande desafio é o desenvolvimento de materiais biocompatíveis por processos viáveis economicamente. Neste estudo foram desenvolvidos compósitos fosfatos de cálcio/colágeno dopados com zinco para aplicação na regeneração óssea. Hidroxiapatita e hidroxiapatita- $\beta$ fosfato tricálcico foram sintetizados tendo como precursores, hidróxido de cálcio e ácido ortofosfórico. A razão molar Ca/P foi fixada em 1,67 e foram variados parâmetros de síntese, como tratamentos químico e térmico. Também se sintetizou hidroxiapatita e hidroxiapatita/ $\beta$ fosfato tricálcico dopados com nitrato de zinco durante a síntese. O colágeno, extraído de pericárdio bovino, foi submetido à digestão enzimática e purificado pela cromatografia de troca iônica. Obteve-se colágeno tipo I puro, COL, que foi dialisado, caracterizado por eletroforese e liofilizado. Compósitos de hidroxiapatita e hidroxiapatita- $\beta$ fosfato tricálcico dopados e não dopados com Zn/COL e hidroxiapatita/COL/Zn foram desenvolvidos, usando a proporção 80%/20% em peso. Todos os materiais foram caracterizados através da análise química elementar, microscopias de luz e eletrônica de varredura, difração de raios-X e espectroscopia de infravermelho. Os compósitos apresentaram características morfológicas e estruturais semelhantes aos seus materiais constituintes. A avaliação biológica dos compósitos *in vitro* mostrou viabilidade celular, apresentando proliferação e produção de fosfatase alcalina dos osteoblastos. Os biocompósitos desenvolvidos, possivelmente, poderão ser usados na reconstituição do tecido ósseo.

Palavras-chave: biomateriais, compósitos, hidroxiapatita, colágeno, zinco, purificação.

## ABSTRACT

Santos, M.H. Synthesis and characterization of calcium phosphates/collagen biocomposites doped with zinc. Thesis (Doctorate in Metallurgical and Mines Engineering, area of concentration Science and Engineering of Materials) - School of Engineering, Federal University of Minas Gerais, 2005.

Just now, a great challenge is the development of biocompatible materials for economically feasible processes. In this study were developed calcium phosphate/collagen composites doped with zinc for application in bone regeneration. Hydroxyapatite and hydroxyapatite- $\beta$ -tricalcium phosphate were synthesized having calcium hydroxide and orthophosphoric acid as precursors. The Ca/P molar ratio was fixed at 1.67 and were varied synthesis parameters as chemical and heat treatments. Hydroxyapatite and hydroxyapatite- $\beta$ -tricalcium phosphate were synthesized and doped with zinc nitrate during the synthesis. The collagen, extracted from bovine pericardium, was submitted to the enzymatic digestion and purified by ion-exchange chromatographic method. High purity grade type I collagen (COL) was obtained, dialyzed, characterized by electrophoresis and lyophilized. Hydroxyapatite and hydroxyapatite- $\beta$ -tricalcium phosphate composites were produced with collagen, by using the ratio 80/20 (CaP/COL, weight%). Also, they were doped with zinc by using  $Zn(NO_3)_2$  salt. All samples were characterized by chemical analysis, light and scanning electron microscopy, X-ray diffraction and infrared spectroscopy. The composites presented morphologic and structural characteristics similar to their constituent materials. The biological evaluation of the composites *in vitro* showed cellular viability, presenting proliferation and production of alkaline fosfatase of the osteoblasts. Probably, the developed biocomposites can be used for rebuilding bone tissue in the future.

**Keywords:** biomaterials, composites, hydroxyapatite, collagen, zinc, purification.

# SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	21
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO TEMÁTICA	24
2.1 TECIDOS	24
2.1.1 Dente	24
2.1.1.1 Esmalte	24
2.1.1.2 Complexo dentina-polpa	25
2.1.1.3 Periodonto	28
2.1.2 Osso	28
2.1.2.1 Remodelação óssea	30
2.2 BIOMATERIAIS	32
2.3 BIOCERÂMICAS	35
2.3.1 Biocerâmicas Fosfatos de Cálcio	36
2.3.1.1 Hidroxiapatita (HAP)	37
2.3.1.2 $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)	40
2.3.1.3 Fosfato de cálcio bifásico HA $\beta$ TCP	41
2.4 POLÍMEROS NATURAIS	41
2.4.1 Colágeno	41
2.5 BIOMATERIAIS COMPÓSITOS	45
2.5.1 Compósitos hidroxiapatita/zinco	46
2.5.2 Compósitos fosfatos de cálcio/colágeno	47
2.6 TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA	47
2.6.1 Cromatografia de troca iônica	49
2.7 ELETROFORESE	50
2.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio	50
2.7.2 <i>Western blotting</i>	51
2.8 BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE	51
2.8.1 Avaliação da biocompatibilidade	52
2.8.1.1 Avaliação da citocompatibilidade	53
3 OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
CAPÍTULO II – FOSFATOS DE CÁLCIO	57

1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	58
1.1 MATERIAIS	58
1.1.1 Materiais e equipamentos usados na síntese de fosfato de cálcio	58
1.1.2 Materiais e equipamentos usados na caracterização de fosfato de cálcio	59
1.2 SÍNTESE DE FOSFATO DE CÁLCIO	59
1.2.1 Rota 1 (R1)	59
1.2.1.1 Procedimentos e condições experimentais	60
1.2.1.2 Tratamento químico	60
1.2.1.3 Tratamento térmico	61
1.2.2 Rota 2 (R2)	62
1.2.2.1 Procedimentos e condições experimentais	62
1.2.3 Rota 3 (R3)	63
1.2.3.1 Procedimentos e condições experimentais	63
1.3 CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO	65
1.3.1 Fluorescência de raios-X (XRF)	65
1.3.2 Microscopia de luz (ML) e Microscopia de luz transmitida (MLT)	65
1.3.3 Análise quantitativa de elementos químicos	66
1.3.4 Espectroscopia dispersiva de energia de raios-X (EDS)	66
1.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	66
1.3.6 Difração de raios-X (XRD)	66
1.3.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	67
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
2.1 SÍNTESE DE HAP	68
2.2 CARACTERIZAÇÃO	69
2.2.1 ML	69
2.2.2 MLT	70
2.2.3 XRF	70
2.2.4 MEV/EDS	72
2.2.5 Análise quantitativa de elementos químicos	75
2.2.6 XRD	76
2.2.7 FTIR	83
CAPÍTULO III - COLÁGENO	90
1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	91
1.1 MATERIAIS	91
1.1.1 Materiais usados na obtenção de colágeno	91
1.1.2 Materiais e equipamentos usados na caracterização de colágeno	93
1.2 COLETA DE PERICÁRDIO BOVINO (PB)	94
1.3 CARACTERIZAÇÃO DE PB	94

1.3.1 MEV/EDS	94
1.3.2 FTIR	95
1.4 PREPARAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I (COL)	95
1.5 PURIFICAÇÃO DE COL	96
1.5.1 Primeiro estágio	96
1.5.1.1 Caracterização de COL bruto	96
1.5.1.2 Seleção da matriz para a coluna de cromatografia	96
1.5.1.3 Determinação do pH	96
1.5.1.4 Procedimentos de purificação	97
1.5.1.5 Definição da concentração da solução eluente	97
1.5.2 Segundo estágio	97
1.5.2.1 Preparação da solução tampão (ST) e da solução eluente (SE)	97
1.5.2.2 “Empacotamento” da coluna para cromatografia de troca iônica	98
1.5.2.3 Procedimentos de purificação	98
1.5.2.4 Diálise e concentração das amostras	98
1.6 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS	99
1.7 CARACTERIZAÇÃO DE COL	99
1.7.1 MLT	99
1.7.2 Dosagem de proteína	100
1.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	100
1.7.4 <i>Western blotting</i>	101
1.7.5 Determinação do peso molecular	102
1.7.6 EDS	102
1.7.7 MEV	103
1.7.8 FTIR	105
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
2.1 PERICÁRDIO BOVINO (PB)	104
2.2 CARACTERIZAÇÃO DE PB	104
2.2.1 MEV/EDS	104
2.2.2 FTIR	105
2.3 OBTENÇÃO DE COLÁGENO TIPO I (COL)	106
2.4 PURIFICAÇÃO DE COL BRUTO E CARACTERIZAÇÃO POR SDS-PAGE	108
2.5 CONCENTRAÇÃO DE COL	117
2.6 <i>WESTERN BLOTTING</i>	118
2.7 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR	119
2.8 MLT	121
2.9 MEV/EDS	121
2.10 FTIR	124

CAPÍTULO IV – COMPÓSITOS FOSFATOS DE CÁLCIO/COL	130
1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	131
1.1 MATERIAIS	131
1.1.1 Materiais e equipamentos usados na síntese e na avaliação da biocompatibilidade dos compósitos	131
1.1.2 Ferramentas e equipamentos utilizados na caracterização dos compósitos e na avaliação da biocompatibilidade	132
1.2 DESENVOLVIMENTO DOS COMPÓSITOS	132
1.2.1 Compósito HAP/COL (C1)	132
1.2.2 Compósitos HAPZn/COL (C2), HAP $\beta$ TCP/COL (C3), HAP $\beta$ TCPZn/COL (C4)	133
1.2.3 Compósitos HAP/COL/Zn	133
1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS	133
1.3.1 EDS	134
1.3.2 MEV	134
1.3.3 XRD	134
1.3.4 FTIR	134
1.4 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DOS COMPÓSITOS	134
1.4.1 Preparo das amostras	134
1.4.2 Cultura de osteoblastos	134
1.4.3 Viabilidade celular	135
1.4.4 Ensaio de apoptose	135
1.4.5 Produção de fosfatase alcalina	135
1.4.6 Teste estatístico	136
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS	137
2.1.1 MEV/EDS	138
2.1.2 XRD	144
2.1.3 FTIR	147
3 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DOS COMPÓSITOS	153
3.1 VIABILIDADE CELULAR	153
3.2 PRODUÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA E MORFOLOGIA DOS OSTEOLASTOS	153
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES, REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS E ANEXOS	161
1 CONCLUSÕES	161
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
3 ANEXOS	174
3.1 ANEXO I	174
3.2 ANEXO II	175

## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 - Representação esquemática da estrutura do dente.	25
Figura I.2 - Esmalte dental condicionado com ácido fosfórico a 37% por 30 s, mostrando a estrutura prismática; Ratner et al., 1996.	26
Figura I.3 - Microscopia eletrônica de varredura da dentina condicionada expondo as fibras colágenas na dentina inter e peritubular; Lambrechts et al., 1996.	27
Figura I.4 - Esquema da distribuição dos túbulos dentinários na dentina superficial e profunda e no cimento; Pashley et al., 2002.	28
Figura I.5 - Corte transversal do fêmur (A) e da crista ilíaca (B): camada externa de osso compacto e rede interna de osso trabecular.	29
Figura I.6 – Diagrama dos processos de remoção e de formação do tecido ósseo, a remodelação óssea.	31
Figura I.7 - Esquema representativo de atividades biológicas que podem ser substituídas por biomateriais; adaptado de Silver e Doillon, 1989 e Park, 1992.	34
Figura I.8 – Desenho esquemático da HAP pura: unidade de célula hexagonal com 10 íons $\text{Ca}^{+2}$ no sítio Ca1, alinhados em triângulos equiláteros perpendiculares à direção <i>c</i> , ocupando duas posições diferentes, e quatro no sítio Ca2 alinhados em coluna; triângulos equiláteros de íons $\text{O}^{-2}$ e de íons $\text{Ca}^{+2}$ ligados entre si por dois íons fosfato situados em planos perpendiculares à direção <i>c</i> e outros dois paralelos a esta direção.	38
Figura I.9 – Desenho esquemático da organização do colágeno na sua estrutura supermolecular; adaptado de Ten Cate, 1994 e Yannas, 1996.	44
Figura I.10 – Conformação de uma das três cadeias polipeptídicas (A), que se apresentam na forma helicoidal (B) e unem-se numa tríplice hélice formando a estrutura molecular do colágeno tipo I, unidade monomérica com duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ (C); configuração local de cada uma das cadeias polipeptídicas, ilustrando a tríplice seqüência Gli-Pro-Hip (D); adaptado de Ten Cate, 1994; Yannas, 1996 e Dornelles, 2003.	45
Figura II.1 – Esquema das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho, com evidência	

da etapa referente ao capítulo II.	57
Figura II.2 – Fluxograma da seqüência de procedimentos empregados em R1.	61
Figura II.3 – Fluxograma da seqüência de procedimentos empregados em R2.	62
Figura II.4 – Fluxograma da seqüência de procedimentos empregados em R3.	64
Figura II.5 – Perfil da temperatura x tempo usada no tratamento térmico a 900°C (A) das amostras A2 e A4 (R1) e no tratamento térmico a 1100°C (B), da amostra A6 (R1).	64
Figura II.6 – Fotografias do pó sintetizado referente à amostra A2 (A) e do pó de HAc (B); fotografias das imagens tridimensionais observadas em lupa estereoscópica dos aglomerados das partículas do pó sintetizado, 16X de aumento (C), e do pó de HAc, aumento de 50X (D).	71
Figura II.7 – Fotografias em microscópio de luz transmitida das partículas dispersas em álcool benzílico da amostra A3 após peneiramento em malha de 38 µm, com aumento de 100X (A) e com aumento de 400X (B), e das partículas da amostra de HAc, aumento de 40X. (C);	71
Figura II.8 – Micrografia de MEV da amostra A1, antes do tratamento térmico, aumento de 10.000X, 15 keV (A); espectro de EDS com picos dos principais constituintes, Ca e P, e dos traços de elementos da amostra (B).	73
Figura II.9 – Micrografia de MEV da amostra A2, após tratamento térmico a 900°C (A); espectro de EDS com picos de maior intensidade de Ca e P, 10.000X, 15 keV (B).	74
Figura II.10 – Micrografia de MEV da amostra A10, após tratamento térmico a 900°C, aumento de 2000X, 15 KeV (A); espectro de EDS com picos de maior intensidade de Ca e P, e presença de picos de baixa intensidade de Mg, Si, K e Zn (B).	74
Figura II.11 – Espectros de EDS da amostra A2 do pó sintetizado após tratamento térmico (A), e da amostra de HAc (B).	74
Figura II.12 – Micrografias de MEV das partículas precipitadas no gel obtido da amostra A1 em R1, 15.000X, 10 keV (A), em maior aumento, forma acicular de tamanho nanométrico das partículas, 40.000X, 10 keV (B).	75
Figura II.13 – Difratograma da amostra A1 de HAP, após secagem a 100°C, com grande quantidade de fase amorfa.	77

- Figura II.14 – Difractogramas de HAP após secagem a 100°C na R1 (A1), na R2 (A7), e de hidroxiapatita pura relatada nos estudos de Peters et al., 2000 (\*HA) e Oliveira, 2004 (\*\*HA). 78
- Figura II.15 – Difractogramas de HAP dopada com Zn (HAPZn), após secagem a 100°C, na amostra A9 em R3; e de HAP não dopada (HAP) na amostra A1 em R1. 78
- Figura II.16 – Difractogramas de A1 após secagem a 100°C, com picos largos e aproximadamente 60% de fase amorfa (A); e de A3 após o tratamento térmico a 900°C com picos mais estreitos e de maior intensidade, com aproximadamente 75% de fase cristalina (B). 79
- Figura II.17 – Difractograma da amostra A3 de HAP, após tratamento térmico a 900°C, com grande quantidade de fase cristalina. 80
- Figura II.18 – Difractograma padrão de HAP obtida através de R1 com presença da fase  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e da fase CaO (A2); diminuição gradativa de CaO nas amostras A6, A5 e A4; e desaparecimento de CaO após o tratamento térmico com resfriamento bruto (A3). 81
- Figura II.19 – Representação gráfica da intensidade relativa dos planos dos cristais de HAP (002) e dos cristais de CaO (200) em difractogramas de amostras das rotas R1 e R2. 81
- Figura II.20 – Difractogramas com principais picos de A3 (HAP) e A5 (HAP $\beta$ TCP) e de CaP dopadas com Zn, A10 (HAPZn) e A11 (HAP $\beta$ TCPZn); presença de óxido (seta). 82
- Figura II.21 – Espectro de FTIR com as bandas de absorção no infravermelho referentes às ligações químicas dos grupamentos funcionais da composição da amostra A2 (HAP) e A5 (HAP $\beta$ TCP). 84
- Figura II.22 – Espectros de FTIR de A2 e A5 sintetizadas em pH  $7\pm 0,2$  com presença de maior quantidade das moléculas de água e de  $\text{CO}_2$  (A); e hidroxiapatita (Oliveira, 2004) sintetizada em pH  $10\pm 1$  (B). 85
- Figura II.23 – Espectros de FTIR da amostra A2 (HAP), HAc e HA da literatura (Oliveira, 2004). 87
- Figura II.24 - Espectros de FTIR de A2 (HAP), HA $\beta$ TCP da literatura (B) (Oliveira, 2004) e A5 (HAP $\beta$ TCP). 87
- Figura II.25 – Espectros de FTIR de A2 (HAP) e A10 (HAPZn), A5 (HAP $\beta$ TCP) e A11 (HAP $\beta$ TCPZn). 88

Figura III.1 – Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho, com evidência da segunda etapa.	90
Figura III.2 – Fotografias das fêmeas de camundongos (A) usadas para inoculação subcutânea de ColC no seu dorso (B - seta), durante quatro semanas.	99
Figura III.3 – Micrografia de MEV da estrutura densa de PB desidratado, com ondulações paralelas de suas fibras no sentido longitudinal; aumento de 2.000X, 15 KeV (A); espectro de EDS com análise semiquantitativa dos elementos (C e O) constituintes do PB desidratado (B).	105
Figura III.4 – Micrografias de MEV da estrutura anisotrópica de PB com suas fibras seguindo uma orientação dominante, não muito organizada, aumento de 5.000X, 15 KeV (A); aspecto envelado das fibras, em maior aumento, da área demarcada em (A), aumento de 20.000X, 15 KeV (B).	105
Figura III.5 – Representação gráfica da estrutura química das amidas I, II e III (A); espectro de FTIR para PB desidratado com picos característicos das amida nas proteínas (B).	106
Figura III.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%: amostras de COL bruto diluídas (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, sem redução (A) e com redução (B); padrão de alto peso molecular (P); diluição 1/2 (1); diluição 1/10 (2); diluição 1/50 (3); diluição 1/100 (4); diluição 1/200 (5).	110
Figura III.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%: padrão de proteínas de alto peso molecular (1); banda mais forte de IGG de coelho com anti-IGG de carneiro (135000 Da) (2); pepsina (34700 Da) (3); COL bruto, diluição 1/2 (4); COL bruto, diluição 1/10 (5); COL bruto, diluição 1/50 (6).	110
Figura III.8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%: aplicações dos sobrenadantes coletados após a centrifugação da DEAE com as amostras de COL bruto pH 6,8 (1), 7,4 (2), 8,2 (3) e 10,0 (4); aplicações de proteína eluída da DEAE pH 6,8 (5), 7,4 (6), 8,2 (7) e 10,0 (8), usando solução de NaCl 0,1 M.	111
Figura III.9 - Esquema do grupamento químico da DEAE, carregada positivamente e de aminoácidos que formam a molécula de colágeno, carregada negativamente pelo controle do pH com valor acima do pI das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno bovino tipo I; interação das moléculas da amostra de COL bruto, pH 10,0, com a DEAE, pH 10,0, através de força iônica.	112
Figura III.10 – Gráfico da leitura de absorvância, no comprimento de onda de 226 nm, das soluções de lavagem da DEAE + COL bruto, com concentrações diferentes de NaCl.	112

- Figura III.11 - Cromatograma das leituras de absorvância no comprimento de onda de 226 nm das frações coletadas (●) durante o processo de purificação; aplicação da ST, da SE NaCl 0,25 M, e da SL (setas verticais); *pools* (a, b, c, d) das frações coletadas após aplicação de ST, SE e SL (setas horizontais) (A); gel de eletroforese com aplicação dos *pools* a, b, d, c, c, d nas canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6 respectivamente (B). 115
- Figura III.12 - Cromatograma das leituras de absorvância no comprimento de onda de 226 nm das frações coletadas (●) durante a aplicação da SE NaCl 0,15 M (seta) (A); gel com aplicação nas canaletas 2, 3, 4, 5 e 6 das frações coletadas 2, 3, 4, 5 e 6 correspondentes ao pico formado na eluição da proteína (B). 116
- Figura III.13 - Cromatograma das leituras de absorvância no comprimento de onda de 226 nm das frações coletadas (●) durante a aplicação da SE NaCl 0,10 M (seta) (A); gel com aplicação nas canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, do padrão de pureza (1), do padrão de peso molecular (2), e das frações coletadas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondentes ao pico formado na eluição da proteína (B). 117
- Figura III.14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% de COL: padrão de alto peso molecular (1); colágeno bovino tipo I comercial, ColC (2); COL puro liofilizado (3); frações de COL durante a purificação (4, 5, 6); extrato de COL bruto (7). 118
- Figura III.15 – *Western blotting* de Colc (A), e COL (B); padrão de peso molecular (P). 119
- Figura III.16 – Representação gráfica da curva do padrão de peso molecular (a) e da curva do peso molecular das bandas de COL (b) (A), calculadas a partir da caracterização no gel de poliacrilamida do padrão de alto peso molecular (canaleta 1) e da amostra de COL (canaleta 2) (B); bandas com pesos moleculares de 125380 e 117330 Da correspondentes às cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  típicas do colágeno tipo I. 120
- Figura III.17 – Fotografias de MLT das amostras de ColC, com aumento de 100X (A); e das amostras liofilizadas de COL, com aumento de 100X (B), e de 400X (C). 121
- Figura III.18 – Micrografias de MEV da estrutura de COL (A) com aumento de 1.000X, com aumento de 5.000X (C); de ColC (B) com aumento de 200X, e com aumento de 2.000X (D); da estrutura de PB com aumento de 5000X (E), e com aumento de 2000X (F); 15 keV. 122
- Figura III.19 – Micrografias de MEV da estrutura amorfa de COL, aumento de 200X (A), com aparência de fitas desorganizadas, aumento de 500X (B); de áreas com presença de nanofibras (C e D), aumento de 1.200X e 15.000X, e de áreas com estrutura de aspecto esponjoso (E e F), aumento de 600X e 700X; 15 keV. 123

Figura III.20 – Espectros de EDS de PB desidratado (A), COL (B) e ColC (C).	125
Figura III.21 - Micrografias de MEV das amostras de COL liofilizadas, antes do procedimento de diálise (A e B), e após a diálise (E); espectros de EDS de COL antes (C e D) e após a diálise (F); cristais de sal na superfície do COL (B – círculos) detectados no EDS como Na e Cl (D).	126
Figura III.22 – Espectros de FTIR de COL bruto (A) e PB (B).	127
Figura III.23 – Representação gráfica da estrutura química de amidas (A) e da seqüência de aminoácidos que formam a cadeia $\alpha$ da molécula de colágeno tipo I: glicina, prolina e hidroxiprolina (B); espectro de FTIR de COL com as ligações químicas referentes aos grupos funcionais presentes e identificação de suas respectivas bandas de absorção (a), espectro de FTIR de COL bruto (b).	128
Figura III.24 – Espectro de FTIR de COL (A) e de ColC (B).	128
Figura IV.1 – Esquema das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho, com evidência da etapa referente ao capítulo IV.	130
Figura IV.2 – Fotografia dos compósitos com diferentes proporções de HAP/COL (A); compósito C1 na proporção 80%/20% após liofilização (B); e variados modelos obtidos do compósito em formas de silicone (C).	137
Figura IV.3 – Fotografia na lupa estereoscópica de uma porção da manta do compósito C1 (A); e da manta de um compósito hidroxiapatita/colágeno comercial, 32X (B).	138
Figura IV.4 – Micrografia de MEV da superfície da amostra C1, HAP/COL, com distribuição das partículas de HAP na matriz de COL (A), aumento de 1000X, 15 KeV; espectro de EDS com picos de alta intensidade dos principais constituintes do compósito: C, Ca e P (B).	139
Figura IV.5 – Micrografias de MEV pela técnica de elétrons retroespalhados da superfície de ruptura da manta do compósito C1: partícula de HAP exposta (seta larga) e partícula de HAP envolta por colágeno (seta estreita), aumento de 750X, 15 KeV.	140
Figura IV.6 - Espectros de EDS pontuais da partícula de HAP exposta (A) (Fig. IV.5 - seta larga), e da partícula envolta pela matriz de COL (B) (Fig. IV.5 - seta estreita), com picos de alta intensidade de seus principais constituintes.	140
Figura IV.7 - Micrografias de MEV das partículas de HAP concentradas em determinadas	

áreas no compósito (A), aumento de 300X, 15 KeV; espectro de EDS pontual da partícula de HAP indicada por seta na micrografia (B).	141
Figura IV.8 - Micrografia de MEV do compósito hidroxiapatita/colágeno comercial (A), aumento de 200X, 15KeV; e seu espectro de EDS (B).	141
Figura IV. 9 – Micrografias de MEV do compósito HAP $\beta$ TCPZn/COL com partículas de HAP $\beta$ TCPZn agregadas ao colágeno com aumento de 500X (A e B), de 550X (C); e de 1500X (D); 15 KeV.	142
Figura IV. 10 – Micrografias de MEV das partículas de HAP carbonada no compósito HAP/COL (A); estruturas de COL recobertas com partículas de HAP $\beta$ TCPZn (B) e de HAP (C); e respectivos espectros de EDS.	143
Figura IV.11 – Difratoograma de raios-X do compósito C1, HAP/COL, com presença de picos característicos de HAP e de fase amorfa correspondente ao COL.	144
Figura IV.12 – Difratoogramas de raios-X do compósito HAP/COL (A), da HAP (B) e do COL (C).	145
Figura IV.13 - Difratoograma de raios-X do compósito C1 com a relação 60%:40% com presença de picos de HAP e grande quantidade de fase amorfa referente ao COL.	145
Figura IV.14 – Perfil do difratograma do compósito preparado com a relação CaP:COL = 80%:20% (A), e do compósito C1 preparado com a relação 60%:40%.	146
Figura IV.15 – Difratoogramas para comparação entre os compósitos HAP $\beta$ TCP/COL (A), HAPZN/COL (B), hidroxiapatita/colágeno comercial (C), e HAP após secagem a 100°C (D).	146
Figura IV.16 – Grupamentos funcionais da cadeia da molécula de COL (A) e dos grupos fosfatos dos materiais CaP (B); espectro de FTIR do compósito HAP/COL (C1) com bandas características de suas ligações químicas e respectivos números de onda de absorção (C).	150
Figura IV.17 – Espectros de FTIR do compósito HAP $\beta$ TCP/COL (C2) com bandas características de suas ligações químicas, e de HAP/COL (C1) (A).	150
Figura IV.18 – Espectros de FTIR para comparação entre HAP (a), COL (b) e o compósito HAP/COL (c) (A); área ampliada do espectro com as bandas referentes à ligação C = O em 1347 cm <sup>-1</sup> no COL e sua diminuição para o número de onda 1343 cm <sup>-1</sup> no compósito HAP/COL (B).	151

Figura IV.19 – Espectros de FTIR para comparação entre HAP $\beta$ TCP (a), COL (b) e o compósito C3 HAP $\beta$ TCP/COL (c) (A); área ampliada do espectro com as bandas referentes à ligação C = O em 1347 cm<sup>-1</sup> no COL e sua diminuição para o número de onda 1344 cm<sup>-1</sup> no compósito HAP $\beta$ TCP/COL (B). 155

Figura IV.20 – Espectros de FTIR para comparação entre HAP/COL (C1), HAPZn/COL (C2), HAP $\beta$ TCP/COL (C3), HAP $\beta$ TCPZn/COL (C4) e HAP/COL/Zn (C5). 152

Figura IV.21 – Proliferação e viabilidade celular avaliados pelo ensaio de MTT: a viabilidade dos osteoblastos em presença dos compósitos, após 72 h de incubação, não mostrou diferença estatisticamente significativa comparado com os osteoblastos do grupo controle; (P<0,005). 154

Figura IV.22 – Apoptose dos osteoblastos (%) na presença dos compósitos de CaP. 154

Figura IV.23 – Produção de fosfatase alcalina medida pelo ensaio de BCIP-NBT: a fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos em presença dos compósitos, após 72 h de incubação, não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação aos osteoblastos do grupo controle; (P<0,005). 155

Figura IV.24 – Comparação gráfica dos resultados estatísticos para a produção de fosfatase alcalina dos osteoblastos nos grupos: (A) HAP/COL (C1) e HAPZn/COL (C2); (B) HAP $\beta$ TCP/COL (C3) e HAP $\beta$ TCPZn/COL (C4); (C) HAP/COL (C1) e HAP/COL/Zn (C5); e (D) HAPZn/COL (C2) e HAP/COL/Zn (C5). 156

Figura IV.25 – Imagens da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença do grupo controle (Ct); ampliação de uma célula osteoblástica (quadro azul à direita); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor vermelha); coloração das vesículas de formação de fosfatase alcalina (seta de cor verde). 157

Figura IV.26 – Imagens com aumento de 150X da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença dos grupos C1 e C2; presença do compósito (seta de cor rosa); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor amarela); coloração das vesículas de formação de fosfatase alcalina na matriz (seta de cor verde). 158

Figura IV.27 – Imagens com aumento de 150X da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença dos grupos C1 e C2; presença do compósito (seta de cor rosa); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor amarela); coloração das vesículas de formação de fosfatase alcalina na matriz (seta de cor

verde).

159

Figura IV.28 – Imagens com aumento de 150X da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença dos grupos C5; presença do compósito (seta de cor rosa); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor amarela); coloração das vesículas de formação de fosfatase alcalina na matriz (seta de cor verde).

160

## LISTA DE TABELAS

Tabela II.1 – Identificação e condições experimentais das amostras de fosfato de cálcio nas rotas de síntese.	65
Tabela II.2 – Resultados da análise química elementar por XRF de amostras dos pós sintetizados e de seus reagentes.	72
Tabela II.3 – Parâmetros estruturais de amostras dos pós sintetizados.	77
Tabela II.4 – Bandas principais no infravermelho para hidroxiapatita* e HAP com seus respectivos grupos funcionais.	84
Tabela III.1 – Bandas principais de infravermelho para proteínas e para PB desidratado e seus respectivos grupos funcionais	107
Tabela III.2 – Pesos moleculares das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ típicas do colágeno tipo I determinados por diferentes métodos de solubilização.	120
Tabela IV.1 – Identificação e composição das amostras dos compósitos CaP/COL.	133

# CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Desde épocas passadas o homem tem-se preocupado em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo. A recuperação deste tecido lesado por trauma ou doença representa, ainda hoje, um grande transtorno. Numerosas tentativas têm sido realizadas com materiais das mais diversas origens, mas poucos mostraram resultados satisfatórios. A maioria deles provoca, em maior ou menor grau, uma resposta imunológica do organismo receptor, e métodos complexos e onerosos são usados para o projeto e desenvolvimento de tais materiais.

A Engenharia de Materiais emprega conhecimentos de processamento, estrutura e propriedades para sintetizar e desenvolver materiais para suas aplicações específicas (Van Vlack, 1984; Callister Jr, 2002). Pesquisas focam o desenvolvimento de materiais engenheirados para restaurar ou substituir funções biológicas. Assim, surgiu uma nova geração de materiais, levando-se em consideração a biocompatibilidade como um parâmetro para sua formulação e uso. Denominados biomateriais, podem ser constituídos de uma ou mais substâncias, de origem natural ou sintética (Willians, 1987). O potencial dos biomateriais sintéticos na regeneração dos tecidos duros é relevante, pois não danificam tecidos saudáveis, não trazem riscos de contaminações virais e bacterianas, e podem ser disponibilizados comercialmente.

As cerâmicas especialmente desenvolvidas e fabricadas para reparar partes do corpo lesadas são chamadas de biocerâmicas, as quais se apresentam como materiais bioativos ou apenas biotoleráveis (Willians, 1987; Kawachi et al., 2000). O grupo fosfatos de cálcio, CaP, é um exemplo da classe de materiais bioativos, sendo o que mais se aproxima da porção mineral de ossos e dentes (Pereira et al., 1999; LeGeros, 2002). Seus representantes mais usados são a hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , e o fosfato tricálcico,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . A hidroxiapatita, HA, tem um lugar de destaque entre as biocerâmicas e seu uso é bastante difundido (Kawachi et al., 2000). A ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de resposta a corpo estranho ou processo inflamatório, capacidade de reabsorção e habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro são características deste material (LeGeros, 1991). A osteocondutividade, estrutura cristalográfica e composição química semelhantes à apatita óssea tornam cada vez maior a aplicação da hidroxiapatita na área médico-odontológica. O fosfato tricálcico,  $\beta$ TCP, é absorvível em condições fisiológicas, podendo ser substituído, gradativamente, por osso, quando usado como biomaterial em defeitos ósseos (Yang e Wang, 1998; Peña e Vallet-Regi, 2003). Entretanto, pode ser tóxico se usado puro. O  $\beta$ TCP pode ser sintetizado junto com HA, usando variadas relações. Essa associação determina as propriedades de biocompatibilidade e

biodegradabilidade, de acordo com a necessidade de aplicação diferenciada destes biomateriais em diversas partes do organismo.

Os polímeros naturais, como proteínas, polissacarídeos e polinucleotídeos, são usados como biomateriais. Das várias proteínas, o colágeno é o componente da matriz extracelular mais freqüentemente usado como biomaterial (Viidik e Vuust, 1980; Yannas, 1996; Lee et al., 2001; Tirrel et al., 2002). O colágeno tipo I, o mais comum tipo de colágeno, é componente majoritário de tecidos como tendões, ligamentos, pele, osso, córnea e cápsulas fibrosas dos órgãos internos (Kumudinie e Premachandra, 1999). O seu intenso uso na medicina, odontologia e farmacologia deve-se às suas propriedades naturais de ação hemostática, biodegradabilidade, baixa alergenicidade, antigenicidade e alta biocompatibilidade comparada com outros polímeros naturais. A sua interação com o tecido o torna uma eficiente matriz para a fabricação de variadas formas de biomateriais.

O processo de purificação das proteínas faz-se necessário, para que elas possam ser aplicadas biologicamente com maior segurança. De acordo com Kumudinie e Premachandra, 1999, torna-se necessário desenvolver um protocolo específico, empregando-se métodos de purificação usuais, porém de uma forma coerente com as características e necessidades do material, economizando etapas de trabalho, o que representa menor custo e maior produção. O colágeno purificado não é facilmente disponibilizado no comércio para uso na área biomédica. Geralmente, este biopolímero precisa ser importado, com um alto custo por grama de material.

O pericárdio bovino tem sido amplamente usado como matéria-prima para biomateriais em várias áreas da medicina (Liao et al., 1992; Lee et al., 2000; Martucci et al., 2000) por apresentar-se como um tecido que possui o colágeno como sua molécula estrutural fundamental (Zioupos et al., 1992). É um material biológico heterólogo com excelente biocompatibilidade, adequadas propriedades biofísicas e propriedades de elasticidade, devido ao alto conteúdo de fibras colágenas. O pericárdio bovino, além de ser material de fácil manipulação, é também de fácil obtenção e baixo custo, pois é considerado um subproduto do animal de abate.

Um compósito consiste da combinação de dois ou mais materiais ou fases visando à manipulação de propriedades e comportamento (Park e Lakes, 1992; Alexander, 1996). Suas propriedades devem ser superiores ou intermediárias àquelas dos constituintes individuais (Anusavice, 1998). O compósito, quando se deseja aplicá-lo como biomaterial, deve possuir características essenciais, tais como biocompatibilidade e, às vezes, biodegradabilidade. Os biocompósitos são extensivamente aplicados na ortopedia, cardiologia, cirurgia plástica, oftalmologia, farmacologia, odontologia e outras áreas.

O aspecto mais importante na utilização de colágeno na forma de compósitos com biocerâmicas é o fato desta proteína ser a matriz em que os sais de fosfato de cálcio se depositam para dar origem ao tecido ósseo (Mann et al., 1989). Vários compósitos de CaP/colágeno têm sido desenvolvidos como biomateriais potenciais para a substituição do osso, devido à análoga composição com esta estrutura

(Du, 1998; Bakos, 1999; Tirrel et al., 2002). O interesse nesta área deve-se às crescentes aplicações clínicas destes biomateriais, sendo que os principais estudos estão direcionados para a melhoria de suas propriedades físico-químicas e de seu processamento (Bet, 1995; Paula et al., 2002; Tonhi e Plepis, 2002; Deyl et al., 2003; Sato et al., 2003; Eriksen et al., 2004; Lin et al., 2005). Esses biocompósitos têm sido extensivamente investigados para o desenvolvimento de substitutos do osso natural, mimetizando suas propriedades de biocompatibilidade e suas propriedades mecânicas; entretanto, esses materiais idealizados para regeneração óssea ainda exibem falhas.

Pesquisas recentes (Ito et al., 2001; Ito et al., 2002; Sogo et al., 2004; Webster et al., 2004; Sogo et al., 2005; Wei e Akinc, 2005) tentaram remediar os problemas relacionados com as propriedades de bioatividade dos materiais CaP sintéticos, acrescentando à estrutura dos fosfatos de cálcio mínimas quantidades de cátions divalentes e trivalentes. A adesão de osteoblastos na superfície destes materiais aumentou significativamente. O zinco, Zn, conhecido como um material citotóxico em grandes concentrações, tem sido usado para dopar os materiais fosfatos de cálcio. Os íons  $Zn^{+2}$ , em baixas concentrações, podem comportar-se como estimuladores da formação óssea, em curto período de tempo, sendo considerado um promissor biomaterial.

A seleção de biomateriais adequados a serem usados nos tecidos vivos fundamenta-se em sólidas considerações biológicas, já que o material estará em contato com um sistema homeostático. O biomaterial não deverá perturbar este sistema ou, se isto acontecer, deverá ser da menor magnitude possível. Testes *in vitro* são aplicados aos materiais para avaliação da citocompatibilidade e, a seguir, são submetidos à avaliação em animais, simulando situações clínicas. Dessa maneira, eles poderão adquirir o nível de segurança adequada para sua aplicação real e ser comercializado dentro de padrões biológicos exigidos para um biomaterial.

Atualmente, a grande maioria dos biomateriais utilizados no Brasil ainda é importada, sendo deficiente o número de industrialização nacional nesta área. E, muitas vezes, quando desenvolvidos aqui, são utilizados processos que os tornam materiais economicamente inviáveis. Estes fatores contribuem para indisponibilizar quantidades suficientes de biomateriais para restaurar defeitos ósseos. Torna-se de relevante importância o desenvolvimento de compósitos para reconstituição do tecido ósseo, que possa atender à crescente demanda desses materiais nas aplicações biológicas das diversificadas áreas da saúde.

## 2 REVISÃO TEMÁTICA

### 2.1 TECIDOS

O conhecimento da estrutura dos tecidos é de relevante importância para a análise e entendimento de suas propriedades. Uma maior porcentagem de fase mineral no tecido afeta sua densidade, resistência, rigidez e módulo de elasticidade. Uma maior porcentagem de fase orgânica, por exemplo, fibras colágenas, maior será a tenacidade, a elasticidade e a capacidade de deformação do tecido (Park e Lakes, 1992). Segundo estes autores, os tecidos podem ser divididos em dois grandes grupos:

- tecidos mineralizados ou calcificados (tecidos duros)
  - esmalte, dentina e osso;
- tecidos não mineralizados (tecidos moles)
  - tecidos ricos em colágeno: pele, tendão, cartilagem;
  - tecidos elásticos: vasos sanguíneos, músculos, etc.

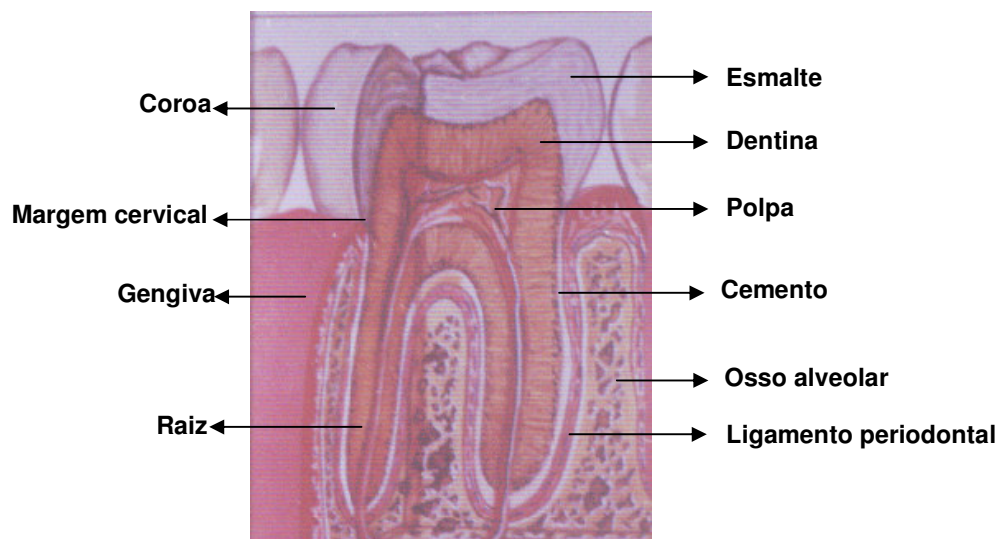
Os tecidos duros são formados por uma série de eventos envolvendo a mineralização das proteínas da matriz extracelular comandada por células com funções específicas de manter a integridade desses tecidos (LeGeros, 2002). Os tecidos mineralizados do corpo humano são esmalte, dentina e osso (Ten Cate, 1994; Jones, 2001; LeGeros, 2002).

#### 2.1.1 Dente

Os dentes exercem a função de mastigação no ser humano, também são essenciais para a fala adequada e, atualmente, uma devida atenção tem sido dada à sua estética. A estrutura histológica dos dentes é semelhante, apesar de variarem de forma e tamanho (Ten Cate, 1994). O dente compõe-se, anatomicamente, de coroa e raiz, e a união entre essas duas partes é a margem cervical (Ten Cate, 1994; Jones, 2001), como ilustrado na Figura I.1.

##### 2.1.1.1 Esmalte

A coroa clínica do dente, ou seja, a porção do dente visível na cavidade bucal, é revestida pelo esmalte (Fig. I.1). Este tecido acelular e inerte, contém cerca de 96% de material inorgânico, cristaltos de hidroxiapatita (fosfato de cálcio cristalino) e pequenas quantidades de carbonato, magnésio e sódio, sendo considerado o tecido mais altamente mineralizado do corpo humano. O esmalte possui traços de material orgânico, 1%, principalmente de natureza protéica, as enamelinas com alto peso molecular, algum material polissacarídico e aproximadamente 3% de água (Ten Cate, 1994; Jones, 2001).



**Figura I.1** – Representação esquemática da estrutura do dente.

Os prismas, estruturas básicas do esmalte, são separados pela substância interprismática, também composta de cristallitos de apatita, que estão alinhados numa direção diferente daquela dos prismas, criando, assim, a sua estrutura histológica. Em um corte perpendicular à superfície do dente pode ser observado o arranjo dos prismas com as áreas interprismáticas (Fig. I.2). (Ten Cate, 1994; Boyde, 1997).

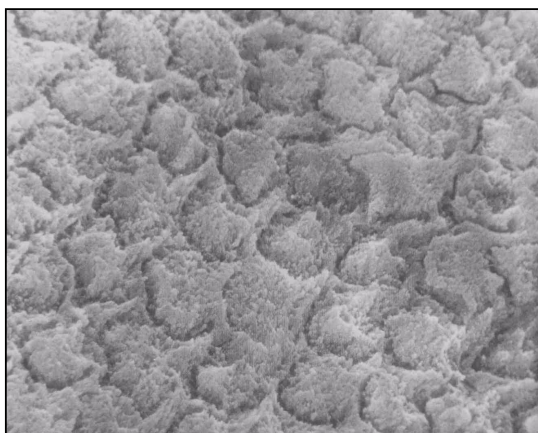
O esmalte, apesar de ser um material friável, é extremamente duro e suporta as forças mecânicas aplicadas durante a mastigação (Marshall Jr., 1993). Devido ao seu alto conteúdo mineral pode ser desmineralizado pelo ataque químico dos alimentos ácidos ou produtos do metabolismo de carboidratos das bactérias (ácidos láctico, acético, propiônico, etc.) levando à cárie dental (Marshall Jr., 1993; Ten Cate, 1994). Essa estrutura pode ser destruída pela cárie ou pelo uso, e não pode ser regenerada.

### 2.1.1.2 Complexo dentina-polpa

A dentina é um tecido mineralizado, de natureza conjuntiva, avascular, constituindo a maior parte da estrutura do dente (Fig. I.1). Devido a sua flexibilidade, suporta o esmalte, compensando sua fragilidade (Ten Cate, 1994). As propriedades físicas e químicas da dentina são bem parecidas com as do osso (Jones, 2001).

Este tecido é uma mistura biológica com cerca de 20% de matriz orgânica, 90% de fibras colágenas tipo I e 10% de proteínas não colagenosas. Junto com o colágeno, células odontoblásticas diferenciadas secretam várias proteínas não colagenosas (NPCs) dentro da matriz extra-celular da dentina: proteínas de alto grau de fosfatase, proteínas tipo osteocalcinas, glicoproteínas ácidas, as

sialoproteínas, proteínas do plasma e proteoglicanas (LeGeros, 1991; D'Souza et al., 1995; Nakabayashi e Pashley, 1998). A dentina possui também uma matriz constituída de 70% de substâncias inorgânicas, formando cristais de hidroxiapatita cálcio-deficientes com constituintes secundários, como carbonato, magnésio, sódio e cloro em maior quantidade que os cristais do esmalte (Nakabayashi e Pashley, 1998; Bottino et al., 2001). A combinação de colágeno, proteínas não colagenosas juntamente com grande quantidade de água (10%) cria uma rede insolúvel de polímeros hidrofílicos, que mantém o substrato úmido (Nakabayashi e Pashley, 1998).



**Figura I.2** – Esmalte dentário condicionado com ácido fosfórico a 37% por 30 s, mostrando a estrutura prismática; Ratner et al., 1996.

A união entre o esmalte e a dentina, conhecida como junção amelodentinária ou margem cervical, é estabelecida quando estes dois tecidos se formam (Ten Cate, 1994).

A dentina envolve uma câmara pulpar central que contém a polpa (Fig.I.1), um tecido conjuntivo frouxo. Entroncamentos nervosos, vasos sanguíneos e linfáticos encontram-se presentes, provendo um suporte metabólico para as células odontoblásticas. A polpa é responsável pela irrigação, defesa e sensibilidade do dente (Jones, 2001).

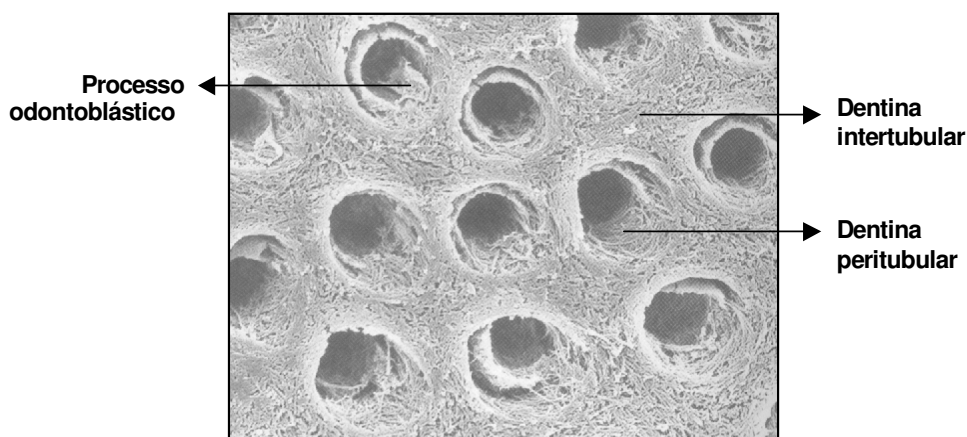
Dentina e polpa podem ser consideradas um mesmo órgão denominado complexo dentino-pulpar (Kitasako et al., 1999). Na periferia da polpa as células odontoblásticas, têm seus prolongamentos, conhecidos como processos odontoblásticos ou fibras de Tomes, situados dentro dos túbulos dentinários cônico-alongados (Fig. I.3) com 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Jones, 2001). Os túbulos contendo os processos odontoblásticos permeiam toda a extensão da dentina e se dispõem de forma radial divergente da polpa para o esmalte (Ten Cate, 1994). Eles estão preenchidos pelo fluido advindo da polpa, gerando um fluxo lento e contínuo e suas terminações nervosas estão em contato com o corpo das células odontoblásticas. Estímulos químicos, mecânicos e térmicos são transmitidos pelo fluido ao longo dos túbulos dentinários, resultando na sensibilidade do dente (Smith, 2002). Cada túbulo dentinário é circunscrito pela dentina peritubular (Fig. I.3), que é mais mineralizada (Jones, 2001).

Entre os túbulos encontra-se a dentina intertubular (Fig. I.3) constituída essencialmente de uma densa matriz de fibrilas de colágeno envoltas por cristálitos de hidroxiapatita (Nakabayashi e Pashley, 1998; Bottino et al., 2001; Jones, 2001).

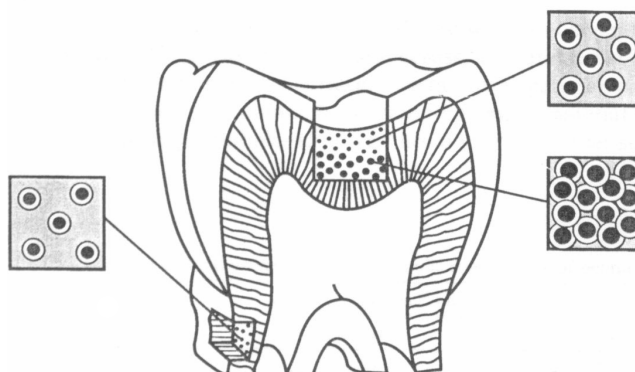
A umidade e a permeabilidade dentinária aumentam com a proximidade da polpa (Fig. I.4). A quantidade de colágeno por volume diminui da dentina superficial para a dentina profunda que apresenta túbulos mais largos e, conseqüentemente, menor quantidade de colágeno intratubular (Garberoglio et al., 1976; Marshall et al., 1997; Nakabayashi e Pashley, 1998; Jones, 2001; Smith, 2002).

As células odontoblásticas secretam colágeno, que age como uma matriz para a mineralização, ou seja, os odontoblastos secretam matriz de proteína e formam dentina durante a vida do dente (Jones, 2001). As agressões de natureza bacteriana, física ou química atuam sobre a dentina e polpa dentária induzindo a formação de dentina como um mecanismo de defesa. Dessa maneira, o conteúdo mineral da dentina pode aumentar com a idade (Ten Cate, 1994; Jones, 2001; Pashley, 2002).

A dentina na porção da raiz é recoberta pelo cemento (Fig. I.1), tecido formado pelos cementoblastos. O cemento é um tecido conjuntivo, avascular, 50% mineralizado com cristais de hidroxiapatita e com uma matriz orgânica formada de colágeno. Apresenta-se como um tecido duro semelhante ao osso e está aderido à dentina da raiz, ancorando os feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal ao dente (Fig. I.1) (Ten Cate, 1994; Avery, 1994).



**Figura I.3** – Microscopia eletrônica de varredura da dentina condicionada expondo as fibras colágenas na dentina inter e peritubular; Lambrechts et al., 1996.



**Figura I.4** – Esquema da distribuição dos túbulos dentinários na dentina superficial e profunda e no cemento; Pashley et al., 2002

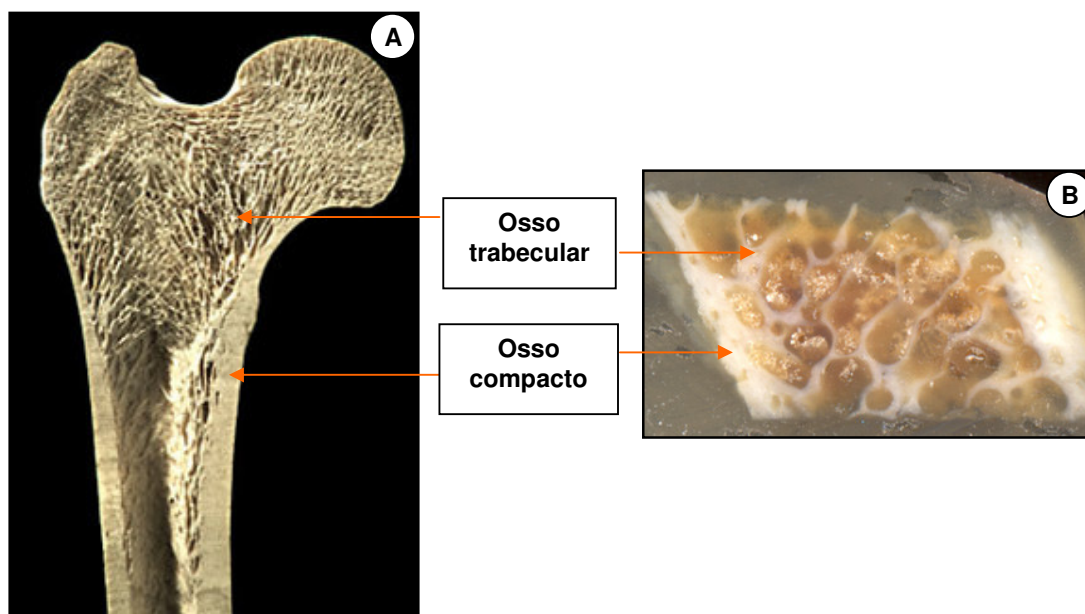
### 2.1.1.3 Periodonto

A complexa estrutura dentária, descrita acima, está unida à maxila e à mandíbula por um aparelho de suporte especializado que consiste de osso alveolar e ligamento periodontal (Fig. I.1), denominado periodonto de fixação (Figueiredo e Parra, 2002). O osso alveolar está firmemente aderido ao osso de suporte da maxila e mandíbula e mostra-se em conformidade com os dentes. A estrutura histológica do osso do processo alveolar é essencialmente a mesma daquela do osso de suporte. O ligamento periodontal é formado de um tecido conjuntivo especializado com feixes de fibras colágenas e uma matriz em forma de gel. Uma de suas funções é articular o dente ao osso alveolar de modo que possa suportar as forças da mastigação. Possui também a função sensorial fornecida por receptores sensoriais existentes no seu interior (Ten Cate, 1994; Jones, 2001; Craig e Powers, 2004). Os osteoblastos e os osteoclastos estão presentes na superfície das trabéculas ósseas do osso esponjoso; na superfície externa do osso cortical dos ossos maxilares e mandíbula; nos alvéolos, voltados para o ligamento periodontal; e, na parte interna do osso cortical voltados para os espaços medulares. O periodonto de proteção compreende a gengiva, mucosa que circunda intimamente o dente erupcionado, envolvendo todo esse complexo (Fig. I.1), (Ten Cate, 1994; Jones, 2001; Figueiredo e Parra, 2002; Craig e Powers, 2004).

### 2.1.2 Osso

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado. Este composto consiste de uma fase orgânica em torno de 25% em peso formada na sua maior parte por colágeno tipo I, aproximadamente 92%, e também por proteínas não colagenosas constituídas por osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética, proteoglicanos, sialoproteína e água. Esta matriz é permeada por cristais de hidroxapatita cálcio deficiente, formando sua fase inorgânica ou mineral, em torno de aproximadamente 75% em peso (Ten Cate, 1994), que é baseada nos componentes de fosfato de cálcio (Jones, 2001; LeGeros, 2002).

A hidroxiapatita do osso consiste de camadas ou lamelas de forma irregular e comprimentos variados com aproximadamente 30 a 45 nm de largura e 5 nm de espessura, que são orientadas paralelamente umas às outras ao longo das fibras colágenas (LeGeros, 2002). As lamelas podem estar densamente arranjadas ou não, formando o osso compacto e o osso trabecular respectivamente (Fig. 1.5). Portanto, macroscopicamente o osso divide-se em osso compacto, que não possui cavidades visíveis, e osso esponjoso, com cavidades intercomunicantes. Na constituição do osso compacto, que compõe aproximadamente 80% do esqueleto, encontra-se aproximadamente 30% de poros e consiste de densos canais, por onde passam vasos sanguíneos, circundados por osso maduro. O osso trabecular apresenta-se esponjoso, com aproximadamente 70% de poros, e altamente vascularizado. Compõe 20% do esqueleto e suas lamelas formam uma matriz menos densa que resiste às tensões aplicadas ao osso. As células do osso trabecular estimulam a formação óssea. Os ossos maduros ou adultos, sejam trabeculados ou compactos, são histologicamente idênticos (Ten Cate, 1994; Jones, 2001).



**Figura 1.5** – Corte transversal do fêmur (A) e da crista íliaca (B): camada externa de osso compacto e rede interna de osso trabecular.

Microscopicamente, o osso divide-se em primário e secundário. O osso primário é caracterizado pela desorganização das fibrilas colágenas. É altamente permeável aos raios X e são encontrados em suturas do crânio, alvéolos dentários e pontos de inserção de tendões. Normalmente, passa a ser substituído por osso secundário, onde a organização em lamelas é a característica marcante (Ten Cate, 1994).

O tecido ósseo possui funções esqueléticas de suporte, proteção e locomoção, e funciona como importante reserva de minerais. A razão entre seus componentes orgânicos e inorgânicos assegura-

lhe certa elasticidade. O osso resiste mais às forças de compressão, ou seja, forças ao longo de seus componentes fibrosos do que às forças de tração, que provocam fraturas com maior facilidade (Ten Cate, 1994).

Sistematicamente, esse tecido é controlado por fatores hormonais e, localmente, por forças mecânicas e piezoelétricas (Ten Cate, 1994), atuando como um transdutor bioelétrico (Leivas, 2004). Materiais piezoelétricos possuem a propriedade de converter energia elétrica (campo elétrico e carga elétrica) em energia mecânica (força e deslocamento) e vice-versa. O osso é definido como uma estrutura “inteligente”, ou seja, tem a capacidade de perceber alterações nas condições operacionais e promover adaptações, visando manter o comportamento mais satisfatório (Ikeda, 1996).

O tecido ósseo apresenta variação de todas as propriedades mecânicas e biológicas em função do tipo de osso, da idade, da localização anatômica, da região, da posição e da direção. Essa variação decorre da função estrutural (suporte ou sustentação de órgãos ou sistemas), transmissão de forças ou alavancas (controle de movimentos de articulações), proteção e o nível de atividade (intensidade, direção, frequência e duração das solicitações – tensões internas) (Leivas, 2004).

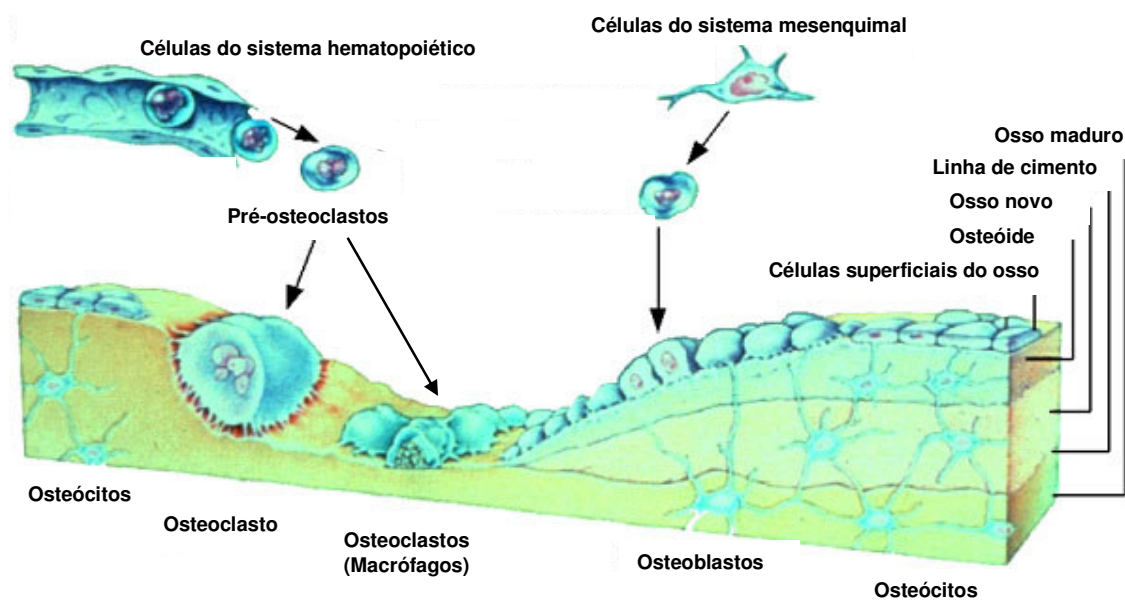
### **2.1.2.1 Remodelação óssea**

No tecido ósseo destacam-se três tipos celulares típicos: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Fig. 1.6). Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas (Ten Cate, 1994). Elas concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. A ação sistêmica e local de hormônios, fatores de crescimento, íons, lipídeos metabólicos e esteróides são reguladoras da atividade dos osteoblastos e/ou sua diferenciação. Depois que os osteoblastos terminam de sintetizar novo osso, alguns se diferenciam em osteócitos, outros permanecem na superfície do novo osso e diferenciam-se em células de recobrimento, e o resto sofre apoptose (processo regulado pelas proteínas de outras células para a programação da célula para a morte, algumas vezes chamada de suicídio celular) e desintegram-se (Oursler e Bellido, 2003; Swan, 2003).

Os osteoclastos participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas (Fig. 1.6), extensamente ramificadas. Não são derivadas da mesma linha das outras células do osso, e sim da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Nos osteoclastos jovens, o citoplasma apresenta uma leve basofilia que vai progressivamente diminuindo com o amadurecimento da célula, até que o citoplasma finalmente se torna acidófilo. Dilatações dos osteoclastos, através da sua ação enzimática, escavam a matriz óssea com ácidos e enzimas hidrolíticas, como a colagenase, e solubilizam os cristais contendo cálcio, que se destacam da matriz durante a reabsorção desta, e formam depressões conhecidas como lacunas de Howship (Ten Cate, 1994; Langer, 2000; Yang et al., 2002). Os osteoclastos são considerados macrófagos especializados, que podem fagocitar pedaços da matriz óssea e dissolvê-la. Após a reabsorção óssea eles sofrem apoptose (Oursler e Bellido, 2003; Swan, 2003).

Os osteócitos são células maduras do osso, que originam dos osteoblastos, quando estes são envolvidos completamente por matriz óssea (Ten Cate, 1994). Então, sua síntese protéica diminui e o seu citoplasma torna-se menos basófilo. Estas células são as mais abundantes do osso e são altamente diferenciadas, possuem atividade de fosfatase alcalina e funcionam como células mecânico-receptoras (Oursler e Bellido, 2003). Estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea (Fig. 1.6). Dessas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando assim a difusão de nutrientes possível graças à comunicação entre os osteócitos. A ativação dos osteócitos está vinculada ao processo de sinalização das moléculas intracelulares. A rede de osteócitos promove a organização no osso para responder às demandas mecânicas com aumento ou redução de aposição óssea. Os osteócitos têm um papel fundamental na manutenção da integridade do osso, juntamente com os osteoblastos inativos, células de revestimento situadas na superfície do osso (Ten Cate, 1994; Langer, 2000; Yang et al., 2002; Oursler e Bellido, 2003; Swan, 2003).

O tecido ósseo readequa-se constantemente através de um equilíbrio dinâmico entre os processos de remoção e de formação ósseas (Leivas, 2004). A Figura 1.6 representa a remodelação do tecido ósseo. Esse processo metabólico inclui a *degradação* e reabsorção ósseas, que são mediadas pelos osteoclastos, e os processos de estruturação e formação óssea mediada pela ação dos osteoblastos. A remodelação óssea é necessária para a manutenção da saúde global e da firmeza da trama óssea. Para isso, é importante um equilíbrio entre os processos de reabsorção e formação ósseas. Em estados alterados do metabolismo ósseo, esses processos se dissociam, ou seja, perdem o equilíbrio. Quando a reabsorção excede a formação, isso resulta numa perda de osso que pode conduzir a desordens do tecido ósseo, como as lesões provocadas por doenças (Oursler e Bellido, 2003; Swan, 2003).



**Figura 1.6** – Diagrama dos processos de remoção e de formação do tecido ósseo, a remodelação óssea.

A fosfatase alcalina óssea é uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos. Sua função ainda não está de todo elucidada, porém seu papel na mineralização do esqueleto está confirmado. A avaliação da atividade sérica da fosfatase alcalina óssea é um marcador de *turnover* ósseo que fornece informações úteis do remodelamento ósseo nas doenças ósseas, como a osteoporose, a doença de Paget e no acompanhamento de terapias preventivas e de reposição hormonal ou de outras terapias antiabsortivas (Swan, 2003).

## 2.2 BIOMATERIAS

O homem, incansavelmente, busca por padrões superiores de vida e longevidade. Cada vez mais se torna evidente a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos lesados por traumas ou doenças. Assim, novos biomateriais têm sido criados na tentativa de minimizar esses problemas e ampliar a expectativa de vida.

A Ciência dos Biomateriais originou da interação multidisciplinar, tendo como objetivo o projeto e o desenvolvimento de uma nova geração de materiais a serem utilizados para a substituição, parcial ou completa, de funções biológicas (Park, 1984; Ratner, 1996; Kousvelari, 2001). Inúmeras pesquisas têm sido realizadas na tentativa de obter informações sobre as complexidades do processo de mimetização, que requerem contribuição de diversas áreas da ciência como, medicina, odontologia, biologia, matemática, química, física (Ratner, 1996; Kousvelari, 2001) e, principalmente, de perícias da engenharia (PTEI, 2002).

A engenharia de tecidos consiste no desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos e órgãos, com crescimento em laboratório, para substituir ou apoiar a função de partes do corpo defeituosas ou injuriadas (Pereira, 2000; PTEI, 2002). A área encoraja o desenvolvimento de biomateriais capazes de auxiliar na reprodução da estrutura do corpo (anatomia) ou função (fisiologia) perdida (Langer e Vicant, 1993; Kousvelari, 2001; Tirrel et al., 2002).

Em geral, o projeto de desenvolvimento dos materiais exige um pré-requisito, o conhecimento do processamento, da estrutura e das propriedades do material. Cada material apresenta um comportamento típico diante de determinadas situações e isto caracteriza suas propriedades. As propriedades dos materiais originam-se em sua estrutura interna e esta estrutura não envolve apenas os átomos, mas também o modo como estes se associam com seus vizinhos, em cristais ou moléculas. As propriedades como elasticidade, resistência, dureza e tenacidade podem ser modificadas para se criar o material desejável. As modificações das propriedades podem acontecer toda vez que o processo de fabricação alterar a estrutura interna dos materiais. A Engenharia de Materiais, empregando conhecimentos fundamentais, sintetiza, desenvolve, prepara, modifica e aplica os materiais para suas exigências. Torna-se necessário um modelo estrutural, onde componentes

diferentes são misturados em proporções específicas para uma montagem precisa (Van Vlack, 1984; Callister Jr., 2002).

Uma clássica definição de biomaterial é relatada como sendo uma substância, com exceção de drogas, ou a combinação de duas ou mais substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado, é usada com a intenção de interagir com sistemas biológicos (Williams, 1987). Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo (Mirtchi et al., 1989). De acordo com Pereira, em 2001, muitas definições de biomaterial são encontradas na literatura:

- uma substância inerte sistemática e farmacologicamente projetada para implantação ou incorporação a um sistema vivo;
- um material usado para substituir parte de um sistema vivo ou para exercer uma função em contato íntimo com tecidos vivos;
- tudo que, de modo contínuo ou intermitente, entra em contato com fluidos corpóreos, mesmo que esteja localizado fora do corpo.

Assim, uma definição que pode ser aceita é que biomateriais são materiais biologicamente inertes ou compatíveis, implantados ou incorporados a um sistema vivo, de modo contínuo ou intermitente.

Dados históricos, que datam de 4000 anos a.C., registram a primeira utilização dos biomateriais como materiais de sutura. Placas de ouro foram utilizadas para o reparo de lesões cranianas, pelos egípcios, cerca de 1000 a.C., e são registros de biomateriais ortopédicos. Membros artificiais eram conhecidos desde a época do Império Romano até a Idade Média. No século XX surgiu a era moderna de biomateriais com a introdução dos conceitos de assepsia e esterilização (Park, 1984). Após os anos 70 surgiu o conceito de que a substituição de um tecido deve ser feita por uma estrutura funcionalmente semelhante, de acordo com a natureza e características funcionais do tecido a ser substituído. Inicialmente, tenta-se o uso de tecidos naturais, que é limitado pela disponibilidade e altos índices de reações imunológicas (Park, 1984); ou envolve o uso de materiais com características químicas similares, como por exemplo, a seda, o Nylon e o colágeno; ligas metálicas de alta resistência mecânica e livres de corrosão, como Ti-Al-V; e cerâmicas como os vidros bioativos e a hidroxiapatita (Ratner, 1996).

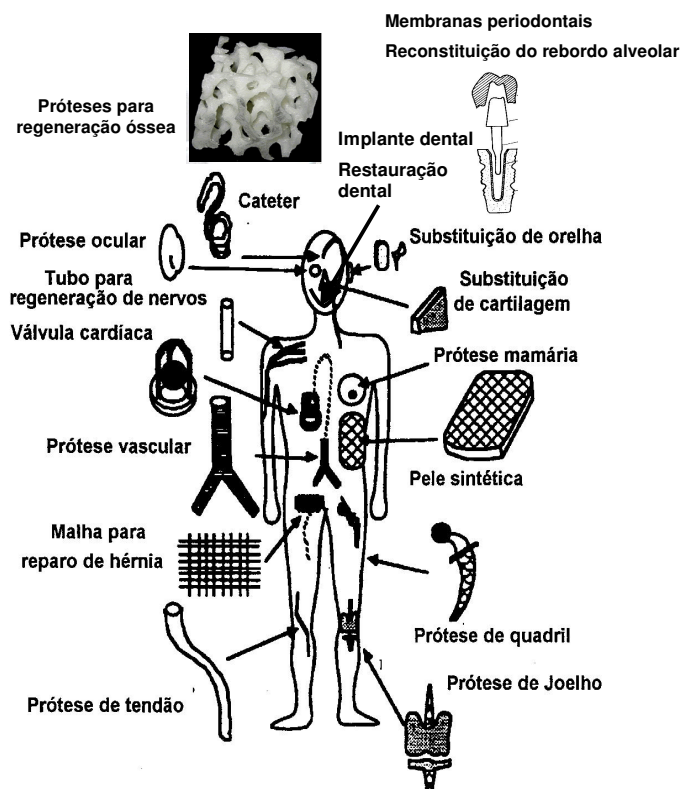
A Figura 1.7 representa várias atividades biológicas que podem ser substituídas por biomateriais (Silver e Doillon, 1989; Park, 1992).

Um material necessita atender a alguns critérios para ser aceito como um biomaterial, de acordo com a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982. De um modo geral, o biomaterial deve apresentar características fundamentais (Silver e Doillon, 1989; Park, 1984; Anusavice, 1998):

- ser biocompatível;
- não ser tóxico ou carcinogênico;

- ser quimicamente estável;
- ter estabilidade mecânica adequada ao seu uso;
- ter peso, densidade e forma adequados;
- ter custo relativamente baixo;
- ser reprodutível e de fácil fabricação;
- ser esterilizável;
- ser biofuncional, ou seja, estimular reações biológicas favoráveis e desempenhar a função para a qual foi projetado com o máximo de eficiência, pelo tempo desejado.

A biocompatibilidade é a primeira qualidade importante do ponto de vista biológico de um material, já que reúne características específicas adequadas para determinada área e para que este local se mantenha sem reações adversas. As atividades bioativas do material só poderão manifestar se houver biocompatibilidade (Park, 1984; Williams, 1987; Silver e Doillon, 1989).



**Figura I.7** - Esquema representativo de atividades biológicas que podem ser substituídas por biomateriais; adaptado de Silver e Doillon, 1989 e Park, 1992.

A biodegradabilidade é também considerada uma importante característica do biomaterial em algumas de suas aplicações. Às vezes o material precisa ser degradado pelo organismo após o

término de sua função, como por exemplo, em suporte de crescimento de tecidos e em sistemas de liberação de fármacos (Graham e Wood, 1984; Shigemasa e Minami, 1995).

Os biomateriais podem ser classificados, de acordo com a sua natureza química, em duas grandes categorias (Park, 1984; Ratner, 1996):

- naturais, como por exemplo o colágeno, a seda, a queratina;
- sintéticos, como por exemplo as cerâmicas, os polímeros sintéticos, os metais e ligas metálicas e os materiais compósitos.

De acordo com o seu comportamento fisiológico, podem ser classificados em (Hench e Wilson, 1993):

- biotoleráveis – materiais que apresentam uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro. São isolados dos tecidos adjacentes através da encapsulação por uma camada de tecido fibroso, devido à liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros. A maioria dos polímeros sintéticos e dos metais são materiais biotoleráveis.
- bioinertes – materiais que também apresentam resposta interfacial mínima, com formação de fina capa fibrosa envoltória, praticamente imperceptível, e liberação mínima de componentes. Como exemplo, podemos citar a alumina ( $Al_2O_3$ ), a zircônia ( $ZrO_2$ ) e o dióxido de titânio ( $TiO_2$ ).
- bioativos – materiais que apresentam resposta biológica caracterizada por uma interação íntima com o tecido, que parece ser química, sem a interposição da camada fibrosa. Como exemplo dessa classe de materiais temos a hidroxiapatita [ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ], o fosfato tricálcio [ $Ca_3(PO_4)_2$ ] e os biovidros.
- absorvíveis – materiais que depois de certo período de tempo em contato com os tecidos são degradados ou fagocitados pelo organismo. Os principais exemplos são o fosfato tricálcio e o ácido polilático.

## 2.3 BIOCERÂMICAS

Ao contrário dos materiais heterógenos, os materiais aloplásticos caracterizam-se por serem produzidos ou modificados em laboratório, adequando suas características físicas/biológicas às necessidades orgânicas. Podem ser utilizados sob os mais variados tipos e formas, tais como: metais, ligas, cerâmicas bioativas, Carbono e derivados, termoplásticos, elastômeros e polímeros (Magalhães, 2002).

Dentre os diversos biomateriais, destacam-se as cerâmicas bioativas: vitrocerâmicas e biocerâmicas fosfato de cálcio. As vitrocerâmicas têm bom desempenho e biocompatibilidade (Pereira et al., 2003). Atualmente, os biovidros sintetizados são usados especificamente como material constituinte de aparelhos protéticos ou como material de preenchimento para reparação de defeitos ósseos (Costa et al., 2003). Diversas composições de biovidros, como os sistemas  $Na_2O$ ,  $CaO$ ,  $P_2O_5$ ,  $SiO_2$ , são

conhecidas por serem particulados altamente bioativos, induzindo a formação de osso. A troca iônica interfacial entre as partículas destes materiais e os fluidos dos tecidos vizinhos resultam na formação de uma sílica gel, que é coberta rapidamente por uma película à base de fosfato de cálcio na sua superfície (Schepers et al., 1993). Os derivados do fosfato de cálcio são os representantes mais significativos do grupo dos materiais aloplásticos (LeGeros, 1991; LeGeros, 2002; Magalhães, 2002).

### 2.3.1 Biocerâmicas Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio são a base dos tecidos mineralizados do corpo e extensivamente utilizados na indústria (LeGeros, 1991). Este grupo de biomateriais possui propriedades e composição mais aproximada do osso mineral (Jarcho, 1976; LeGeros, 1988). Os biomateriais fosfatos de cálcio (CaP) são de especial interesse na medicina e na área biológica, especialmente na biologia oral. Eles podem existir em uma série de fases (LeGeros, 1991):

- DCPA ( $\text{CaHPO}_4$ ) - fosfato de cálcio dibásico anidro;
- DCPD ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) - fosfato de cálcio dibásico diidratado;
- $\alpha$ .TCP,  $\beta$ .TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) – fosfato de cálcio tribásico;
- ACP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) – fosfato de cálcio amorfo;
- OCP ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) – fosfato octacálcio;
- HA ou HAP ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) – hidroxiapatita;
- FA ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ) – fluorapatita ou apatita.

A primeira tentativa clínica do uso dos biomateriais CaP foi em 1920 e a segunda foi reportada somente 30 anos depois. Em 1969 e depois em 1971 foi sugerido o uso de HAP de Ca ou FA como material para osso e implantes dentários. Entre 1976 e 1986 desenvolveu-se e comercializou-se estes materiais, principalmente a HAP, como biomateriais para reparo e substituição do osso e para aumento de superfície óssea. Aproximadamente 60 anos depois do primeiro uso clínico, foram reportadas aplicações da HAP e do fosfato tricálcio em defeitos ósseos em cães, aumento de rebordo alveolar após extração e implantes, em Odontologia. Nas últimas duas décadas os fosfatos de cálcio têm tido grande aceitação em aplicações dentais e ortopédicas como, defeitos ósseos, manutenção e aumento de rebordo alveolar, implantes alveolares imediatamente após a extração dental, implantes de ouvido e coluna vertebral e em implantes dentais e ortopédicos usando os fosfatos de cálcio na forma de grânulos. Estes biomateriais comercializados atualmente diferem em origem (natural ou sintética), na forma física (particulados, blocos, cimentos e grânulos para serem usados em camadas nos implantes) e nas propriedades físico-mecânicas (LeGeros, 2002). Também diferem em composição e podem ser classificados em (LeGeros, 1991; LeGeros, 2002):

- HAP -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ;
- apatita ou apatita cálcio deficiente –  $(\text{Ca},\text{Na})_{10}(\text{PO}_4 \text{HPO}_4)_6(\text{OH})_2$ ;
- $\beta$ TCP -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;
- cálcio fosfato bifásico (mistura de HAP e  $\beta$ TCP).

Os biomateriais CaP possuem propriedades notáveis como: similaridade em composição à fração mineral do osso; bioatividade; capacidade de promover função e expressão celular que conduzem à formação de um exclusivo e forte biomaterial, semelhante ao osso em uma interface; e, osteocondutividade. Os fosfatos de cálcio com apropriada geometria tridimensional são capazes de ligar e concentrar proteínas morfogenéticas do osso em circulação, transformando-se em materiais osteocondutores (capazes de osteogênese). Desta forma, os biomateriais de fosfato de cálcio são potencialmente úteis na engenharia de tecidos para regeneração de tecidos duros (LeGeros, 2002).

### 2.3.1.1 Hidroxiapatita (HAP)

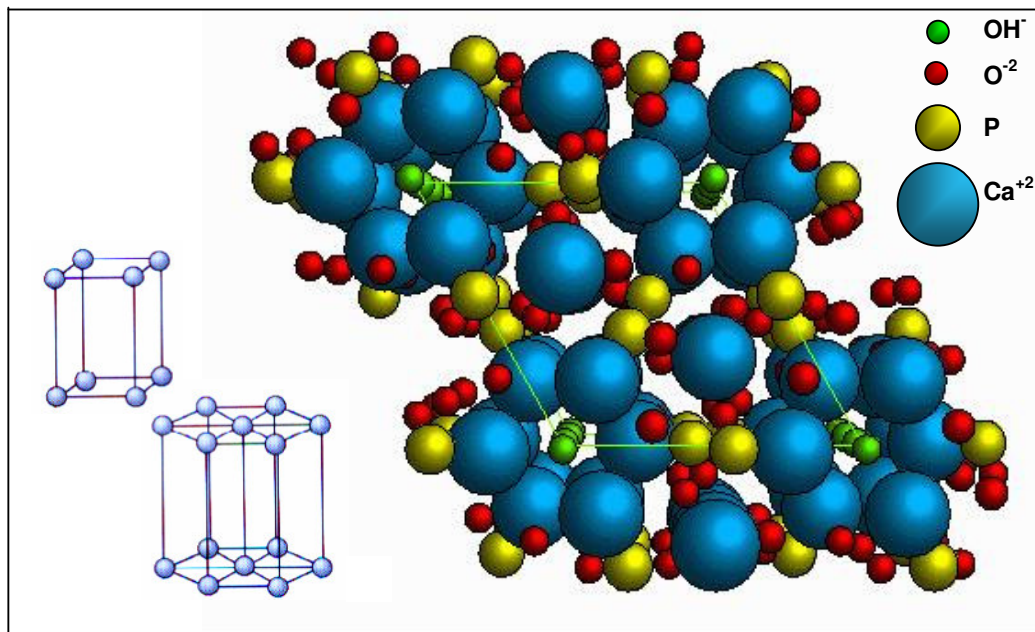
O potencial dos biomateriais CaP na regeneração de tecidos duros usando tecidos sintéticos é enorme e, dentre estes materiais os mais usados são a HAP e o  $\beta$ TCP (LeGeros, 2002). Destas combinações, a HAP é a molécula mais freqüente e mais estável e sua estabilidade relativa acontece em pH acima de 4,2.

A HAP é o material utilizado pelos vertebrados para compor o esqueleto, devido à sua capacidade de atuar como reserva de cálcio (Ca) e fósforo (P). É um fosfato de cálcio hidratado, componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos.

A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras hidroxi que se refere ao grupo hidroxila (OH) e apatita que é o grupo mineral do qual participa. Esta fase mineral apesar de ser conhecida desde 1926, foi esclarecida em 1964, quando as posições dos íons de hidrogênio foram identificadas através da difração de raios-X e análise química (LeGeros, 1991). Na representação gráfica da Figura 1.8 pode-se observar que a HAP cristaliza-se no sistema hexagonal, com cristais prismáticos, freqüentemente terminados em faces dipiramidais (Schumann, 1992). Mostra uma estrutura com grupo espacial  $P6_3/m$  e dimensões de célula unitária com eixo  $a = b = 0,9422$  nm e eixo  $c = 0,6880$  nm. A célula unitária hexagonal da HAP contém 10 íons cálcio ( $Ca^{+2}$ ) localizados em sítios não equivalentes (Ca1 e Ca2). No sítio Ca1 quatro  $Ca^{+2}$  estão alinhados em coluna, enquanto no sítio Ca2 estão alinhados em triângulos equiláteros perpendiculares à direção  $c$  da estrutura e os íons  $Ca^{+2}$  ocupam duas posições diferentes. Os grupos  $OH^-$  estão ordenados no eixo  $c$  (Videau e Dupuis, 1991; Jones, 2001). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons  $O^{2-}$  e de íons  $Ca^{+2}$  estão ligados entre si por íons fosfato. Dos quatro átomos que constituem os grupos fosfatos dois estão situados em planos perpendiculares à direção  $c$  e os outros dois são paralelos a esta direção.

Este mineral idealizado como HAP de cálcio,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , é uma HAP carbonada que possui a seguinte fórmula química aproximada:  $(Ca,X)_{10}(PO_4,HPO_4,CO_3)_6(OH,Y)_2$ , onde X são cátions (íons de Mg, Na e Sr) que podem substituir os íons Ca; e Y são ânions (íons Cl ou F) que podem substituir o grupo hidroxila (LeGeros, 2002). A HAP pura não ocorre em uma escala macroscópica nos sistemas biológicos. No esmalte, dentina, cimento e osso a HAP aparece como HAP cálcio deficiente ou HAP carbonada (Jones, 2001). A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , possui razão

Ca/P igual a 1,67, porém composições estáveis podem ter esta razão próxima a 1,5 (Fulmer et al., 1992).



**Figura I.8** – Desenho esquemático da HAP pura com unidade de célula hexagonal contendo 10 íons  $\text{Ca}^{+2}$  no sítio Ca1, alinhados em triângulos eqüiláteros perpendiculares à direção c, ocupando duas posições diferentes, e quatro no sítio Ca2 alinhados em coluna; triângulos eqüiláteros de íons  $\text{O}^{-2}$  e de íons  $\text{Ca}^{+2}$  estão ligados entre si por dois íons fosfato situados em planos perpendiculares à direção c e outros dois paralelos a esta direção.

A HAP de origem natural comercializada é derivada de determinadas espécies de coral (Porites) ou de osso bovino e não se apresenta totalmente pura, possuindo traços de elementos originais presentes no coral e no osso: Mg, Na, Sr,  $\text{CO}_3$ . No comércio, a HAP de origem sintética é uma cerâmica, material bioativo rico em Ca e P (Anusavice, 1998). É preparada pela precipitação sob condições básicas e subsequente sinterização a temperaturas acima de  $1000^\circ\text{C}$  (LeGeros, 2002).

A incorporação de Mg e  $\text{CO}_3$  em HAP sintética (apatitas biológicas) causa uma diminuição da cristalinidade e um aumento na solubilidade. Assim a baixa cristalinidade e alta solubilidade da HAP do osso e da dentina comparadas ao esmalte depende das concentrações de Mg (menos que 0,4% em peso) e  $\text{CO}_3$  (esmalte: 3,5%, dentina: 5,7%, osso: 6,4% em peso). A inclusão de Cl é bastante limitada, sendo que o esmalte possui maior quantidade, 0,3% em peso. A dissolução da dentina é maior que a do osso, que é muito maior que o esmalte. E o osso desproteínizado é maior que o osso tratado. A idade afeta as concentrações de Mg,  $\text{CO}_3$  e  $\text{HPO}_4$  (LeGeros, 1991).

A HAP sintética tem sido classificada de acordo com o modo de substituição de  $\text{CO}_3$  (LeGeros, 1991; Jones, 2001; LeGeros, 2002):

- tipo A -  $\text{CO}_3$  por OH;
- tipo B -  $\text{CO}_3$  por  $\text{PO}_4$ .

A HAP carbonada tipo B ocorre em esmalte, dentina e osso normais e em calcificações patológicas (dentais, sistema urinário e vascular). Caracteriza-se pela substituição de  $\text{CO}_3$  por  $\text{PO}_4$  e Na por Ca. É preparada em sistemas aquosos pelos métodos de precipitação ou hidrólise a 37-100°C (LeGeros, 1991 e 2002). Estudos foram desenvolvidos para o melhor entendimento da incorporação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CO}_3$  nas partículas de HAP (Cheng et al., em 1998; Okazaki e Takahashi, 1999).

Em reparo de defeitos ósseos nas aplicações odontológicas e ortopédicas, a HAP é usada como substituto do osso (Jarcho, 1981; Bauer, 1995; LeGeros, 2002). É o biomaterial de maior enfoque em aumento de rebordo alveolar e também na regeneração guiada de tecidos ósseos, como por exemplo, nas regenerações periodontais, tais como regeneração tecidual guiada (RTG) e regeneração óssea guiada (RGO) (Ellegaard e Løe, 1990; Zenóbio et al., 1998).

A HAP é um efetivo material de implante ósseo, pois contém uma rede interconectada, onde há proliferação óssea e fibrovascular nos canais formados. Seu uso tem sido extensivo na ortopedia e odontologia preventiva e restauradora (LeGeros, 1991). A HAP é usada como material de implante em odontologia e como material em implantes de próteses ortopédicas. Este material é ainda usado em reconstrução bucomaxilofacial, reparo e substituição de paredes orbitais, substituição do globo ocular e para recobrimento de implantes metálicos, compósitos e poliméricos (Jones, 2001; LeGeros, 2002).

Inicialmente, a HAP foi obtida na formulação não reabsorvível. Atualmente, pequenas partículas de HAP podem ser biodegradáveis, estimulando o crescimento ósseo. Histologicamente, muitas vezes, ocorre o encapsulamento da HAP. Desse modo, apesar da sua segurança e bom desempenho clínico, torna-se apenas um material inerte para correção dos espaços (Magalhães et al., 2002).

Na engenharia de tecidos, a HAP é potencialmente usada para regeneração de tecidos duros. Devido à sua similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos, ela é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioativo). Assim, permite a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, as quais não a distinguem da superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial. A superfície da HAP permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água e, também, proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície, induzindo, assim, a regeneração tecidual (LeGeros, 1991). A HAP possui alta afinidade por proteínas, fazendo dela uma ideal portadora de peptídeos bioativos, de fatores de crescimento do osso ou de células (LeGeros, 2002).

A variação de parâmetros nos métodos de síntese dos fosfatos de cálcio, particularmente na HAP e fosfatos tricálcicos, foi estudada para avaliação de melhorias no seu processamento. Nos resultados foram avaliados controle de fases e porosidade, morfologia e tamanho de cristais, estabilidade térmica, razão Ca/P e solubilidade dos fosfatos de cálcio (Nagai et al., 1982; Yang e Wang, 1998; Afshar et al., 2003; Mavropoulos et al., 2003; Peña e Valletti-Regi, 2003; Lyn et al., 2004; Oliveira, 2004; Garcia et al., 2005).

Uma desvantagem que limita o uso da HAP como biomaterial é apresentar a fragilidade característica das cerâmicas (Mestger et al., 1999 em Ogawa e Plepis, 2002). As HAP comerciais usadas em aplicações dentais e ortopédicas diferem do osso nas propriedades de resistência mecânica e físico-químicas (Jarcho, 1981; LeGeros, 1988) e não devem ser usadas em aplicações que suportam grande carga, devido a sua baixa resistência à fratura (Jarcho, 1981). Pesquisas tentam melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita sintética acrescentando sílica (Leventouri et al., 2003); zircônia,  $ZrO_2$ , (Oktar et al., 2005), titânio, Ti, (Sampaio et al., 2005b; Watazu et al., 2005); ou alumina,  $Al_2O_3$ , à sua estrutura (Li et al., 1995; Ruys et al., 1995; Axén et al., 2004).

A HAP tem sido amplamente utilizada na preparação de compósitos. Na Odontologia estética foi avaliado o uso de HAP como material de carga em resinas restauradoras fotoativadas, analisando-se as propriedades mecânicas do compósito através de testes de microdureza e resistência flexural. Os resultados mostraram um aumento na dureza superficial e módulo de elasticidade da resina restauradora e diminuição de sua resistência flexural (Arcís et al., 2002). Estudos têm sido reportados com o uso de HAP em filmes de gelatina (Bigi, 1998; Chang et al., 2003); polímeros naturais como quitosana (Finisic et al., 2001) e lignina (Mansur et al., 2005); polietileno de alta densidade (Wang et al., 2005), celulose (Yohisda et al., 2005) e polímeros biodegradáveis (Hsieh et al., 2004; Ban et al., 2004; Xiao et al., 2005); ou com membranas e soluções de colágeno (Bet, 1995; Du, 1998; Rhee, 1998; Kikuchi et al., 2001; Okazaki et al., 2001; Chang e Tanaka, 2002; Itoh et al., 2002; Ogawa e Plepis, 2001; Ogawa e Plepis, 2002; Kikuchi et al., 2004a e 2004b; Lin et al., 2005).

### 2.3.1.2 $\beta$ fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)

O  $\beta$ TCP,  $Ca_3(PO_4)_2$ , é um material fosfato de cálcio que possui cristal romboédrico com as medidas de  $a = 10,43\text{Å}$  e  $c = 37,37\text{Å}$ , e apresenta imperfeições na estrutura que levam a grande instabilidade. Entretanto pode ser detectado por XRD (Okazaki e Sato, 1990). O tamanho das partículas de  $\beta$ TCP e suas propriedades variam de acordo com os parâmetros de síntese. Estes materiais são absorvíveis em condições fisiológicas podendo ser substituídos por osso gradativamente, quando usados como biomateriais em defeitos ósseos (Yang e Wang, 1998; Frostnaud et al., 2002; Peña e Vallet-Regí, 2003). De acordo com o método de síntese e da estequiometria de  $\beta$ TCP, observa-se a seguinte ordem de solubilidade (LeGeros, 2002): CaP amorfo > fosfato dicálcico > fosfato tetracálcico >  $\alpha$ TCP >  $\beta$ TCP >> HA. A dissolução  $\beta$ TCP na água depende da razão Ca/P, sendo que há inicialmente, liberação de íons  $Ca^{+2}$ , para depois acontecer a liberação de íons  $PO_4^{-3}$  (Mavropoulos et al., 2003).

### 2.3.1.3 Fosfato de cálcio bifásico HA $\beta$ TCP

O  $\beta$ TCP está quase sempre associado à sínteses de HA, sendo observado em tratamentos térmicos inferiores à 1100°C (Arends et al., 1987; Yang e Wang, 1998; Frostnaud et al., 2002; Fujita et al., 2003; Peña e Vallet-Regi, 2003). Modificações nas condições de síntese deste material levam à obtenção de materiais que variam entre HA pura e  $\beta$ TCP puro, passando por composições intermediárias de HA $\beta$ TCP, e conseqüentemente levam à modificação das suas propriedades. Um material bifásico HA $\beta$ TCP com grande quantidade de HA leva a uma maior biocompatibilidade, enquanto que com maior quantidade de  $\beta$ TCP leva a uma maior biodegradabilidade.

O material bifásico HA $\beta$ TCP pode ser alterado de acordo com a proporção dos reagentes na mistura (Yang e Wang, 1998; Peña e Vallet-Regí, 2003). Assim, partindo-se de uma mistura estequiométrica para a obtenção de HA pura, se conseguiria um aumento gradativo na quantidade de formação de  $\beta$ TCP com um aumento da quantidade de fosfato adicionado na síntese. Haveria a formação de material bifásico com aumento gradativo de  $\beta$ TCP até a obtenção de  $\beta$ TCP puro. A obtenção de HA ou  $\beta$ TCP pode estar relacionado a temperatura de sinterização que, até 900°C favorece a formação de HA, de 900°C a 1100°C favorece a formação de  $\beta$ TCP e de 1100°C até 1400°C favorece novamente a formação de HA, mesmo com equação estequiométrica para obtenção de HA. Assim, pode-se controlar a concentração bifásica.

## 2.4 POLÍMEROS NATURAIS

Os polímeros naturais são bastante similares às substâncias macromoleculares, as quais o meio biológico está preparado para reconhecer metabolicamente. Os polímeros naturais ou nas suas versões modificadas quimicamente são usados como biomateriais. Estes polímeros são degradados pelas enzimas, decompõem em temperatura acima do seu ponto de fusão, e possuem uma química específica que varia de tecido para tecido, de espécie para espécie. São muito mais complexos estruturalmente do que os polímeros sintéticos (Yannas, 1996).

Há vários polímeros naturais como, por exemplo, (Yannas, 1996):

- proteínas: queratina, colágeno, gelatina, elastina, actina, miosina;
- polissacarídeos: celulose, amilose, dextran, glicosaminoglicanas;
- polinucleotídeos: ácido desoxirubonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA).

### 2.4.1 Colágeno

O colágeno, substância macromolecular, é um polímero natural (proteína) encontrado em tecidos de ligação (tendão, pele, ligamento, vasos sanguíneos, osso e dentina). Sua função fisiológica é a de suporte mecânico (Yannas, 1996). Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força elástica. Outra importante função do colágeno é orientar tecidos em desenvolvimento (Viidik

e Vuust, 1980). Desta maneira, dos vários componentes da matriz extracelular, o colágeno é o mais freqüentemente usado como biomaterial (Viidik e Vuust, 1980; Yannas, 1996).

No microscópio óptico o colágeno apresenta-se como fibras de espessura e orientação variadas, ocupando o compartimento extracelular, entre as células do tecido conjuntivo. No microscópio eletrônico pode-se verificar maiores detalhes da estrutura do colágeno. A menor unidade é a fibrila com um padrão característico de estrias periódicas, que se repetem a cada 64 nm. O diâmetro destas fibrilas varia de 0,3 a 0,25  $\mu\text{m}$ , de tecido para tecido. Geralmente as fibrilas encontram-se agregadas, formam pequenos feixes e tornam visíveis ao microscópio óptico quando excedem 0,2  $\mu\text{m}$ , sendo chamadas de fibras colágenas. Outros métodos de investigação revelaram que cada fibrila consiste de um agregado de longas (280 nm de comprimento) e finas (1,35 nm de diâmetro) moléculas de colágeno. E cada molécula de colágeno consiste de três cadeias polipeptídicas unidas numa hélice. As fibras colágenas estão embebidas numa substância amorfa (Ten Cate, 1994; Yannas, 1996). A organização estrutural do colágeno durante a fibrilogênese, ou seja, durante o processo de agregação das microfibrilas, pode ser vista na Figura I.9.

Cerca de 20 aminoácidos são encontrados no colágeno, sendo que quatro deles (glicina, alanina, prolina e hidroxiprolina) compõem dois terços da molécula (Veis, 1964; Ten Cate, 1994). Possui também outros aminoácidos que contêm apenas um grupo amino e um carboxílico (Veis, 1964). O colágeno sempre contém hidroxiprolina e uma proporção de glicina. É a única proteína que contém a hidroxilisina. Ele pode ser considerado uma glicoproteína, pois contém também pequenas quantidades de glicose e galactose, numa proporção de menos que 1% em peso (Ten Cate, 1994).

Quando a estrutura primária do colágeno é formada os aminoácidos são incorporados nas uniões covalentes do peptídeo e estes tornam-se indisponíveis para reações químicas. Os aminoácidos na cadeia peptídica disponíveis para reações químicas são os ácidos dicarboxílico, glutâmico e aspártico e os ácidos diamino, arginina e lisina. Estes aminoácidos possuem grupos amino ou carboxílico extras que não reagem e projetam-se para fora da cadeia peptídica (Nakabayashi e Pashley, 1998).

Na remodelação do tecido conjuntivo, o fibroblasto pode sintetizar o colágeno como também degradá-lo de maneira ordenada e controlada. A destruição de uma fibra colágena envolve uma enzima altamente específica chamada colagenase (Ten Cate, 1994). A razão da degradação é controlada pelo grau de reticulação entre as moléculas de colágeno.

O número, a posição e a estabilidade das ligações cruzadas do colágeno variam consideravelmente nos diferentes tecidos. O colágeno da dentina possui ligações cruzadas específicas. Estas ligações cruzadas entre as moléculas do colágeno sofrem maturação e tornam-se mais estáveis com a idade, tornando-se também menos solúvel. No colágeno existe um considerável potencial de variação que faz com que ele se adapte às necessidades funcionais do tecido conjuntivo em que ele se encontra (Ten Cate, 1994).

A estrutura do colágeno ocorre nos vertebrados, pelo menos de 18 diferentes formas (Lee et al., 2001), sendo que cada uma delas é dominante em um tecido específico (Yannas, 1996). Foram identificadas três cadeias polipeptídicas básicas no colágeno, que foram designadas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . Se três cadeias  $\alpha 1$  são combinadas para formar uma molécula de colágeno, esta molécula é chamada  $(\alpha 1)_3$ . Se duas cadeias  $\alpha 1$  forem combinadas com uma cadeia  $\alpha 2$  para formar a molécula é chamada  $(\alpha 1)_2\alpha 2$ , que é o caso do colágeno tipo I. A cadeia  $\alpha 1$  possui quatro variações importantes (Ten Cate, 1994):

- tipo I –  $(\alpha 1 I)_2\alpha 2$  – encontrado em pele, tendão e o único colágeno encontrado nos tecidos conjuntivos duros (osso e dentina) (Fig. I.10C);
- tipo II –  $(\alpha 1 II)_3$  – encontrado na cartilagem;
- tipo III –  $(\alpha 1 III)_3$  – encontrado em tecidos embrionários e nas paredes dos vasos sanguíneos;
- tipo IV – encontrado na membrana basal (separa tecido epitelial do tecido mesodermal – não contém fibrilas).

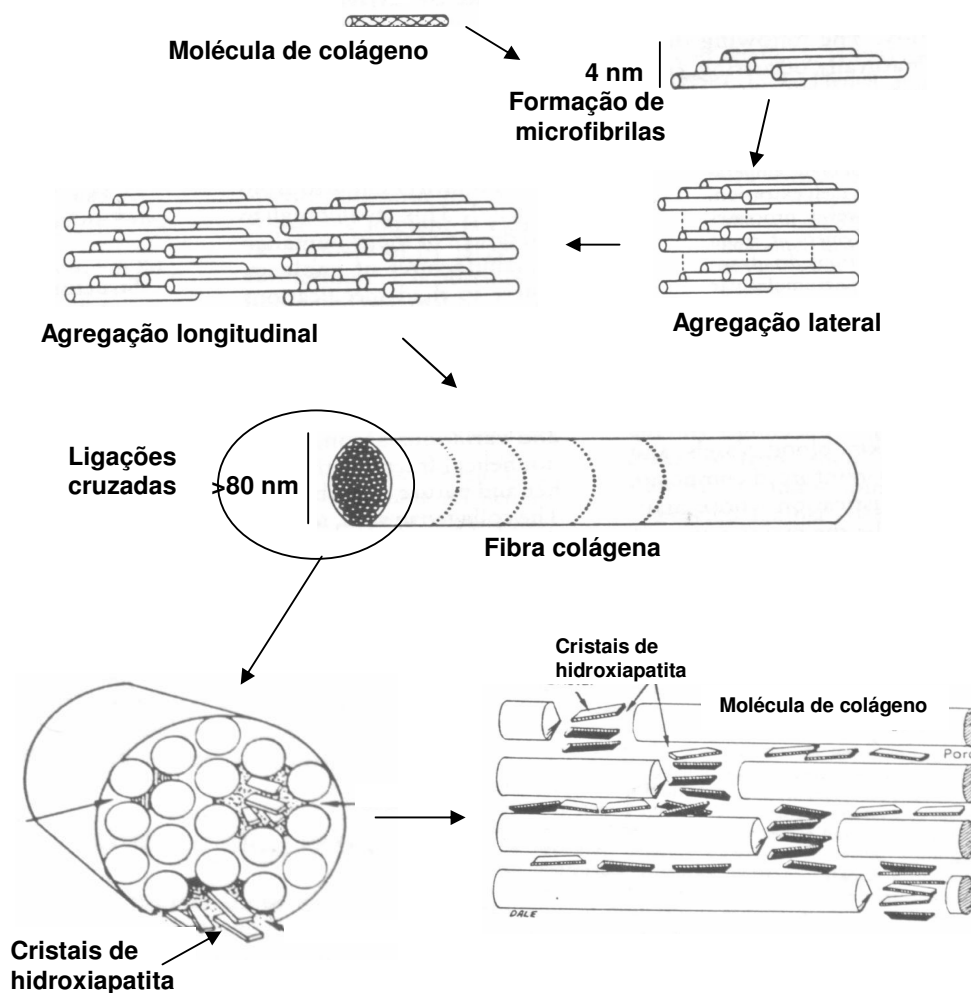
O colágeno tipo I mostra uma seqüência completa de aminoácidos ao longo de cada uma das três cadeias polipeptídicas: glicina, prolina e hidroxiprolina. A abundância de resíduos de glicina (Gly ou G) forma uma configuração típica Gly – X – Y, onde X e Y são freqüentemente os dois aminoácidos prolina (Pro ou P) ou hidroxiprolina (Hyp) respectivamente (Fig. I.10A e D), (Ten Cate, 1994; Yannas, 1996).

O colágeno possui a mais importante estrutura das proteínas dos vertebrados. Seu uso tem sido amplo no campo biomédico. Como biomaterial, o colágeno possui características importantes (Viidik e Vuust, 1980; Yannas, 1996):

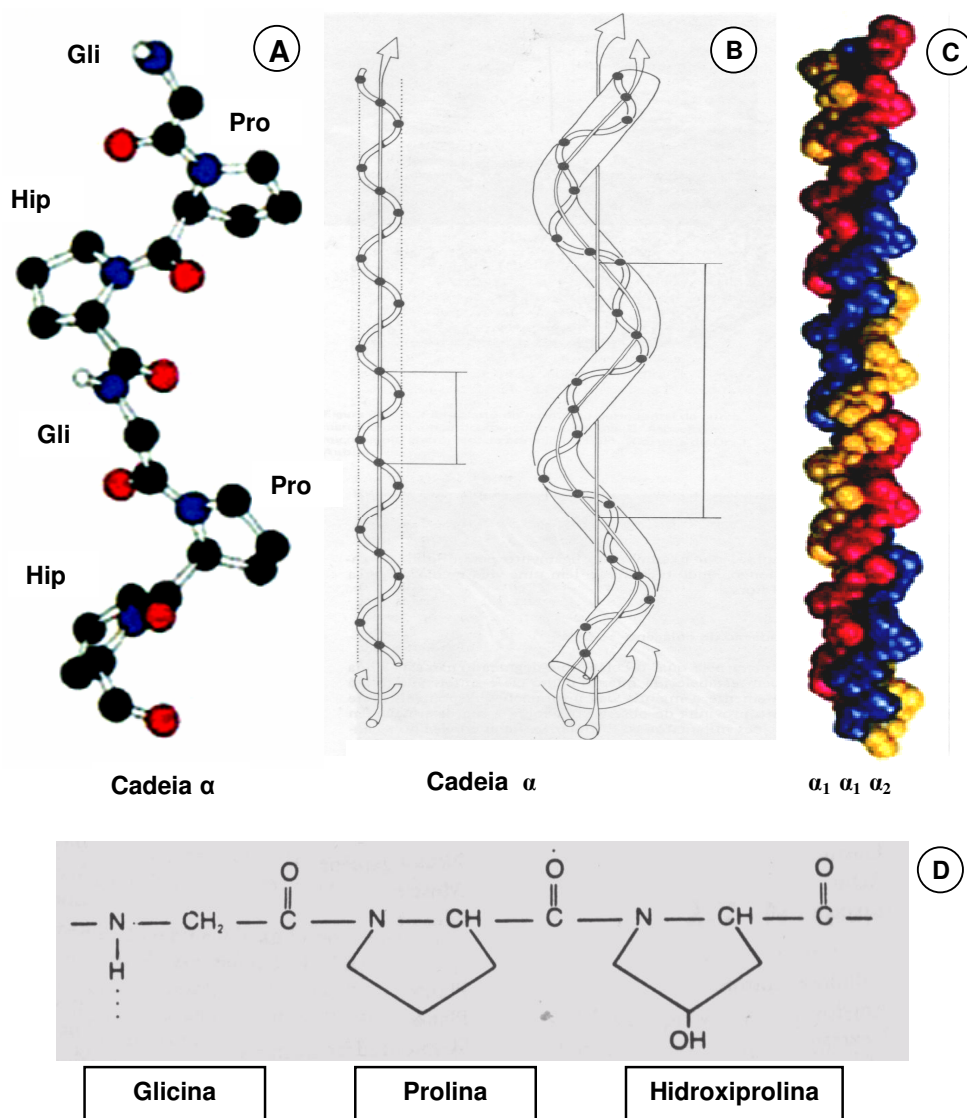
- baixa antigenicidade (2%), que pode ser ainda mais reduzida pela remoção dos telopeptídeos N e C-terminais, regiões de cadeias polipeptídicas não helicoidais, tornando o colágeno altamente biocompatível;
- biodegradabilidade, suas aplicações solúveis e fibrilares são capazes de se organizarem estruturalmente da mesma forma que o tecido nativo e com propriedades similares;
- propriedades mecânicas, hemostáticas e de matriz suporte para crescimento de células.

O colágeno tipo I derivado de diferentes tecidos animais, em suas variadas formas (solução, gel, membrana), associado ou não a outros materiais tem sido extensivamente estudado. Lacerda et al., em 1998, prepararam e caracterizaram matrizes aniônicas de colágeno a partir do pericárdio bovino para uso como biomateriais; Pieper et al., em 2002, obtiveram colágeno do tendão calcâneo comum bovino, purificaram e caracterizaram matrizes de colágeno reticuladas com sulfato de condroitina, para uso potencial na engenharia de tecido; Rocha, em 2000, estudou matrizes de colágeno aniônico, obtidas de pericárdio bovino para reparo de defeitos ósseos; Sheu et al., em 2001, estudaram o colágeno de pele de porco reticulado com glutaraldeído para aumentar sua resistência e ser usado como matriz de crescimento celular; Paula et al., em 2002, obtiveram colágeno de mucosa intestinal porcina e desenvolveram um compósito de colágeno/ramosana na forma de gel para injeção em

correções plásticas, estudando suas propriedades reológicas; Tonhi e Plepis, em 2002, obtiveram membranas de colágeno de serosa porcina e prepararam e caracterizaram blends de colágeno/quitosana, avaliando suas propriedades físico-químicas; Andrade et al., em 2004, trataram o colágeno com tetraetoxisilano (TEOS) e avaliaram a sua bioatividade; Taguchi et al., em 2004 reportaram o uso de colágeno de pele de porco reticulado com derivado de ácido cítrico para a adesão de tecidos; Vulcani, em 2004, estudou matrizes de colágeno aniônico, derivadas de serosa intestinal porcina, para liberação controlada de progesterona.



**Figura I.9** – Desenho esquemático da organização do colágeno na sua estrutura supermolecular; adaptado de Ten Cate, 1994 e Yannas, 1996.



**Figura I.10** – Conformação de uma das três cadeias polipeptídicas (A), que se apresentam na forma helicoidal (B) e unem-se numa tríplice hélice formando a estrutura molecular do colágeno tipo I, unidade monomérica com duas cadeias  $\alpha_1$  e uma cadeia  $\alpha_2$  (C); configuração local de cada uma das cadeias polipeptídicas, ilustrando a tríplice seqüência Gli-Pro-Hip (D); adaptado de Ten Gate, 1994; Yannas, 1996; Dornelles, 2003.

## 2.5 BIOMATERIAIS COMPÓSITOS

Um compósito pode ser considerado como um material que consiste de dois ou mais constituintes distintos em composição, estrutura e propriedades, a fase contínua ou matriz e a fase descontínua ou reforço, separados entre si por uma interface definida. As propriedades dos compósitos são

fortemente influenciadas pelas propriedades de seus materiais constituintes, sua distribuição e a interação entre eles (Park e Lakes, 1992; Alexander, 1996; Anusavice, 1998). O compósito deverá apresentar propriedades superiores ou intermediárias às daquelas dos constituintes individuais (Anusavice, 1998).

No nível atômico ligas metálicas associadas a polímeros podem ser chamadas de material composto. No nível microestrutural uma liga metálica contendo diferentes metais pode ser chamada de material composto, se os constituintes forem distinguíveis, quando observados em microscopia óptica. No nível molecular tecidos, como o osso, dentina e esmalte, são materiais compostos (Park e Lakes, 1992; Alexander, 1996).

Os compósitos podem ser produzidos para diferentes aplicações, como fins estruturais, ópticos, eletrônicos, biomédicos, térmicos e outros (Park e Lakes, 1992; Alexander, 1996). Os componentes individuais dos compósitos devem possuir características essenciais a um biomaterial, tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade (Ogawa e Plepis, 2001) para serem empregados nas aplicações biológicas, como os compósitos para restaurações dentárias; para próteses ortopédicas, oculares, cardiovasculares e outras, e para implantes de uma maneira geral (Jones, 2001).

Vários materiais, como por exemplo, polímeros e metais, têm sido incorporados aos materiais sintéticos HAP e HAP/TCP com o objetivo de melhorar suas propriedades. Atualmente a alumina,  $Al_2O_3$ , (Axén et al., 2004) zircônia,  $ZrO_2$ , (Oktar et al., 2005) e titânio, Ti, (Watazu et al., 2005) têm sido acrescentadas à estrutura dos fosfatos de cálcio para melhoria de suas propriedades mecânicas.

### **2.5.1 Compósitos hidroxiapatita/zinco**

O zinco (Zn), material citotóxico, usado em grandes concentrações inibe o crescimento dos cristais de apatita, retardando o crescimento ósseo. Em baixas concentrações, os íons  $Zn^{+2}$  estimulam o efeito de formação óssea (Yamaguchi et al., 1987; Moonga e Dempster, 1995), aumentando a quantidade de proteína, o conteúdo de cálcio e a atividade de fosfatase alcalina das células ósseas (Yamaguchi et al., 1987). Também tem efeito na reabsorção de osteoclastos (Miao, 2004).

A estrutura de HAP permite substituições catiônicas e aniônicas isomorficas com grande facilidade (Gauglitz, 1992; Ma et al., 1993 e 1994). Pesquisas recentes têm relatado a dopagem dos materiais fosfatos de cálcio com mínimas quantidades de alguns elementos químicos (Ito et al., 2001; Ito et al., 2002; Webster et al., 2002; Frost, 2004; Sogo et al., 2004; Webster et al., 2004; Sogo et al., 2005; Wei e Akinc, 2005), para melhoria de sua biofuncionalidade, considerando que eles estão presentes nos cristais da hidroxiapatita natural (LeGeros, 1991; Jones, 2001; LeGeros, 2002).

Os estudos reportaram que o uso de cátions divalentes e trivalentes,  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $La^{+3}$ ,  $Y^{+3}$ ,  $In^{+3}$ ,  $Bi^{+3}$ , para dopagem de fosfatos de cálcio aumentaram significativamente a adesão de osteoblastos na sua

estrutura. Um material muito usado são os íons  $Mg^{+2}$ , que na dopagem com 2 mol% promove a proliferação de osteoblastos, mas na proporção de 20% em peso pode reduzir a osteocondutividade na apatita (Serre et al., 1998). De acordo com Webster et al., em 2004,  $Zn^{+2}$ ,  $In^{+3}$  e  $Bi^{+3}$  foram os dopantes mais efetivos na resposta dos testes de crescimento celular. O Zn tem sido estudado como um dopante de materiais fosfato de cálcio. Os íons  $Zn^{+2}$  em baixas concentrações, 0,6 a 1,2 % em peso, pode comportar como estimuladores da formação óssea, em curto período de tempo (Webster et al. 2004), e também pode comportar-se como um inibidor dos osteoclastos na reabsorção óssea (Ito et al., 2001). É considerado um promissor biomaterial (Ito et al., 2002).

### **2.5.2 Compósitos fosfatos de cálcio/colágeno**

Os compósitos encontram sua principal aplicação biomédica na substituição e reparação de tecidos duros: esmalte, dentina e osso (Carrodeguas, 2004).

Vários compósitos de hidroxiapatita/colágeno têm sido desenvolvidos devido à sua análoga composição com a estrutura do osso. Os estudos objetivam melhorar suas propriedades e seu processamento. Esses compósitos têm sido extensivamente investigados para a mimetização das propriedades de biocompatibilidade, atividades biointegrativas e propriedades mecânicas do osso natural, na tentativa de torná-los biomateriais potenciais para sua substituição (Bet, 1995; Du, 1998; Bakos, 1999; Franco et al., 2001; Itoh et al., 2001; Kikuchi et al., 2001; Ogawa e Plepis, 2001; Okazaki et al., 2001; Ohta et al., 2001; Chang e Tanaka, 2002a e 2002b; Itoh et al., 2002; Ogawa e Plepis, 2002; Tirrel et al., 2002; Kikuchi et al., 2004a e 2004b; Lin et al., 2005).

Nas específicas áreas da Odontologia, tanto os biomateriais CaP como os compósitos CaP/biopolímeros são de importância primordial na reconstituição óssea. Como exemplos, podem ser citados o aumento de rebordo alveolar para a confecção de prótese total removível; cimentações e recobrimentos de peças protéticas para implantes; preenchimento e reconstrução óssea nas pequenas cirurgias, nas reabsorções ósseas e na cirurgia buco-maxilo-facial; regenerações ósseas periodontais, e outras aplicações da clínica odontológica cotidiana.

Atualmente, os materiais idealizados para regeneração óssea ainda exibem falhas, porque suas propriedades mecânicas são diferentes daquelas do osso e apresentam-se com baixa biocompatibilidade. Além disso, os biocompósitos para reparação óssea são desenvolvidos, na maioria das vezes, por técnicas complexas de processamento, transformando-os, normalmente, em materiais de alto custo. Todos esses fatores contribuem para indisponibilizar quantidade suficiente do biocompósito para restaurar o defeito ósseo.

## 2.6 TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA

As moléculas precisam ser isoladas e caracterizadas antes de um processo químico. A cromatografia é um efetivo método que utiliza diversas técnicas de isolamento e purificação de uma amostra biológica. Também pode ser usada para avaliar características físicas, químicas ou biológicas de uma biomolécula ou sistema biológico (Boyer, 1986). É considerado o método mais comumente usado para a obtenção da pureza de proteínas e peptídeos (Copeland, 1994). Este método físico-químico tem como objetivo a separação, identificação e quantificação de componentes químicos de uma mistura, com fins analíticos ou preparativos, muito utilizado em laboratórios industriais, de pesquisa e de ensino.

Todas as técnicas cromatográficas são baseadas no simples princípio da distribuição de seus componentes entre duas fases que estão em contato, uma fase estacionária e uma fase móvel (Boyer, 1986). A fase estacionária é constituída de um material, que varia entre uma técnica de cromatografia e outra, para reter de forma diferenciada os componentes da amostra. A fase móvel é o material, denominado eluente, que se desloca pela fase estacionária, arrastando os componentes da amostra mediante um fluxo. Após transitar pela fase estacionária, por uma distância adequadamente escolhida, os componentes da amostra separam-se e são mostrados na seqüência do primeiro componente menos retido ao último componente mais retido pela fase estacionária. As diferenças na mobilidade resultam em separação dos componentes da amostra em discretas bandas, que podem ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente (Boyer, 1986; Skoog e Leary, 1992).

As técnicas cromatográficas são divididas em dois tipos, de acordo com a interação das moléculas da amostra com a fase estacionária (Boyer, 1986): cromatografias de partição e de adsorção. Na de partição a distribuição da amostra acontece entre duas fases líquidas, ou entre uma fase líquida sobre uma fase sólida. A fase móvel é um líquido, e é mais efetiva para a separação de moléculas pequenas, como por exemplo, amino ácidos, carboidratos e ácidos graxos. Na de adsorção usa-se uma fase estacionária ou suporte, como uma resina de troca iônica, que possui inúmeros sítios de adesão para a amostra. A força de atração entre a amostra e o suporte pode ser iônica, ponte de hidrogênio, ou interações hidrofóbicas. A técnica de cromatografia de adsorção, representada pela cromatografia de troca iônica, é mais aplicada para a separação de macromoléculas, incluindo proteínas e ácidos nucléicos.

As cromatografias em camada delgada e em papel são consideradas cromatografias de partição (Boyer, 1986). A cromatografia em camada delgada é uma forma de cromatografia em coluna, onde o material fica sobre um vidro ou filme plástico. Em relação à cromatografia de papel, possui maior poder de resolução, é mais rápida e vários sorventes estão disponíveis, como celulose, alumina, sílica e gel (Boyer, 1986; Rocha, 2003). A cromatografia em papel é um exemplo clássico de cromatografia, onde uma amostra líquida flui por uma tira de papel adsorvente vertical, e os componentes depositam-se em locais específicos. No papel, o suporte é a celulose, considerado um polímero com

organização molecular polar, com regiões de altas e baixas densidades de elétrons. Esta cromatografia é uma das técnicas mais simples e que requerem menos instrumentos para realização, porém também apresenta as maiores restrições para realização em termos analíticos (Rocha, 2003).

Na cromatografia de filtração em gel a fase estacionária consiste de partículas inertes que contêm pequenos poros de controlado tamanho, semelhante a uma esponja. Como exemplo, pode-se citar o *sephadex*, polímero de dextrano. As moléculas do soluto possuem variados pesos moleculares que passam pela coluna através de um fluxo contínuo do eluente. O gel aumenta seu volume quando entram em contato com o eluente e impedem a passagem de moléculas de grande tamanho através de seus poros, e assim separam-se primeiro. Na cromatografia de permeação em gel são empregados polímeros que se dissolvem em solventes orgânicos como fase estacionária (Boyer, 1986; Falcon, 2003).

A cromatografia de troca iônica é uma técnica em que moléculas eletricamente carregadas do material que está sendo analisado trocam íons com a fase estacionária (Boyer, 1986).

No sistema de cromatografia a gás a fase móvel é gasosa e a fase estacionária é um líquido, e outra variação utilizada raramente é a cromatografia gás-sólido. Esta técnica, conhecida como cromatografia gás-líquido permite a separação dos componentes de uma mistura gasosa ou de substâncias que podem ser vaporizadas por calor. A mistura vaporizada é forçada por um gás inerte e os componentes fluem em diferentes taxas (Boyer, 1986; Rocha, 2003; Falcon, 2003).

Outra técnica de cromatografia, que hoje tem uso bastante comum, é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), uma variável da técnica de cromatografia de partição. Esta técnica promove a adsorção de líquidos em partículas extremamente pequenas e uniformes para promover alta sensibilidade. Uma bomba é requerida para levar a mistura até a coluna (Skoog e Leary, 1992; Copeland, 1994; Rocha, 2003). A cromatografia líquida tradicional é sempre preferida para purificação de proteína em larga escala, por ser mais rápida, mais barata e ser de análise qualitativa (Boyer, 1986; Skoog e Leary, 1992).

Ainda pode-se citar a cromatografia por afinidade. Esta técnica oferece a alternativa de trabalhar com a especificidade da amostra, ou seja, separação das moléculas através de suas interações biológicas.

### **2.6.1 Cromatografia de troca iônica**

A cromatografia de troca iônica é uma forma de cromatografia de adsorção na qual íons da amostra exibem uma interação eletrostática reversível com a fase estacionária carregada com grupos funcionais iônicos. A fase estacionária é uma resina sintética insolúvel carregada positiva ou negativamente, que é compactada no interior de uma coluna. Esta resina deve possuir características como, estrutura de resistência química, mecânica e térmica, com malha de bom entrecruzamento e

poros de tamanho regular, e alta capacidade de definir o número de grupos funcionais disponíveis para o intercâmbio iônico. A amostra é colocada na coluna e podem conter moléculas com cargas positivas, negativas ou neutras, de acordo com as condições experimentais. As moléculas da amostra que têm carga oposta àquela da resina serão adsorvidas na fase estacionária reversivelmente. A força de adesão depende do tamanho e densidade da carga, quantidade de carga por unidade de volume da molécula, da amostra. Quanto maior a carga ou a densidade da carga mais forte será a adesão. A aplicação de um eluente com força iônica maior terá capacidade de liberar as moléculas da amostra que ficaram adsorvidas na resina, por deslocamento. Pode-se concluir que, na cromatografia de troca iônica as moléculas da amostra são separadas com base na sua afinidade pela carga da fase estacionária (Boyer, 1986; Skoog e Leary, 1992; Copeland, 1994; Rocha, 2003; Falcon, 2003).

O colágeno tipo I extraído de diferentes locais tem sido purificado através da técnica de cromatografia de troca iônica (Nagai e Suzuki, 2002), ou através da associação da cromatografia de troca iônica com outras técnicas (Haralson e Hassel, 1995; Deyl et al., 2003; Sato et al; 2003). Pieper et al., em 1999, utilizou a cromatografia líquida de alta eficiência para purificação de colágeno tipo I obtido de tendão calcâneo comum bovino.

## **2.7 ELETROFORESE**

A eletroforese é o estudo do movimento de moléculas carregadas em um campo elétrico. A técnica é especialmente aplicada para a caracterização e análise de polímeros biológicos. A migração molecular no campo elétrico é influenciada pelo tamanho, forma, carga e natureza química da molécula. Existem várias técnicas eletroforéticas e todas são baseadas no mesmo princípio (Boyer, 1986).

### **2.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS – PAGE)**

Técnicas eletroforéticas em gel podem ser realizadas sob condições desnaturantes ou não. A técnica sob condições desnaturantes, ou seja, com a presença do detergente aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS), é a mais amplamente usada para a caracterização de proteínas (Copeland, 1994). A técnica SDS – PAGE pode determinar a pureza da amostra, o peso molecular, e algumas vezes o ponto isoelétrico. O SDS rompe as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das moléculas de proteína, para produzir cadeias polipeptídicas. O detergente une-se através de ligações não covalentes às proteínas, tornando-as carregadas negativamente, além de desenovelá-las. Essas proteínas tratadas são aplicadas sobre um gel, mais comumente de poliacrilamida, que funciona como uma peneira molecular. As proteínas são submetidas a um campo elétrico que as impulsionam do polo negativo para o polo positivo, no sentido vertical do gel. As proteínas já carregadas negativamente pelo SDS migram para o polo positivo, e aquelas de menor peso molecular fazem um percurso maior que proteínas de maior peso molecular (Boyer, 1986; Copeland, 1994; Almeida e Kurtenbach, 2002).

Após a eletroforese o gel é corado, evidenciando no mesmo as bandas das cadeias polipeptídicas da molécula, de acordo com o seu peso molecular.

### **2.7.2 Western blotting**

A técnica eletroforética *Western blotting* é amplamente usada para análise de proteínas. Ela permite testar a reatividade cruzada de bandas de uma proteína individual no gel de poliacrilamida, com um anticorpo criado contra um específico antígeno. Essa técnica é sempre usada para identificar as bandas de uma proteína específica (Coperland, 1994). No *Western blotting* as proteínas são transferidas eletroforéticamente do gel para uma folha de nitrocelulose, na qual a proteína se liga. A nitrocelulose é saturada, ou seja bloqueada, com uma proteína não antigênica, normalmente a albumina bovina (BSA), para prevenir a adesão de imunoglobinas não específicas na nitrocelulose. A folha de nitrocelulose é tratada com o anticorpo criado e depois com um anticorpo ligado a uma enzima escolhido previamente. As enzimas mais comumente usadas para este propósito são peroxidase e fosfatase alcalina, pois os anticorpos conjugados com estas enzimas são mais viáveis e os testes, mais sensíveis. O anticorpo criado prende-se ao anticorpo escolhido, e devido à presença da enzima pode ser visualizado por um substrato cromogênico, usualmente o substrato enzimático orto-fenilenodiamino (OPD). Assim, a presença da proteína que se quer identificar e seu padrão de migração no gel pode ser determinado (Chu et al, 1988; Coperland, 1994).

## **2.8 BIOCAMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE**

A biocompatibilidade é a habilidade de um material desencadear uma resposta apropriada no hospedeiro, para uma aplicação específica (Williams, 1987). O termo biocompatível é definido como harmonioso com a vida e não possuindo efeitos tóxicos ou prejudiciais às funções biológicas. O biomaterial ideal deve ser aquele que não cause dano aos tecidos; não contenha substâncias tóxicas, causando problemas de natureza sistêmica; não contenha agentes sensibilizantes que induzam respostas alérgicas; e não apresente potencial carcinogênico (Anusavice, 1998).

A primeira qualidade importante do ponto de vista biológico de um material é a biocompatibilidade, já que ela não se relaciona apenas com a toxicidade do material, mas reúne características específicas adequadas para que este local se mantenha sem reações adversas. Um material biocompatível é aquele que pode funcionar em um ambiente biológico sem efeitos prejudiciais conhecidos ou significantes no material ou no sistema vivo (Ten Cate, 1994; PTEI, 2002). E a biofuncionalidade só poderá se manifestar se a biocompatibilidade for adequada. O bom desempenho de um biomaterial está associado a um equilíbrio entre essas duas propriedades (Park, 1984; Williams, 1987; Silver e Doillon, 1989).

Os biomateriais funcionam em contato íntimo com diferentes tecidos humanos, e são utilizados em ortopedia, cardiologia, cirurgia plástica, oftalmologia, farmacologia, odontologia e outras áreas. Estes

materiais precisam enquadrar-se na definição de biomateriais, e sua biocompatibilidade é um parâmetro que deve ser considerado para sua formulação e uso. A Ciência dos Biomateriais tem a necessidade de acompanhar, conhecer e apreciar certas considerações biológicas que estão associadas com o uso e a seleção dos materiais a serem empregados nos tecidos humanos. Suas propriedades mecânicas deixam de ser prioridade se o material causa danos a esses tecidos. Também o material e o seu processo de fabricação ou uso não devem causar danos ao profissional ou ao pessoal auxiliar e do pessoal de laboratório (Phillips, 1993).

A bioatividade é definida como a propriedade do material desenvolver uma direta e forte adesão com os tecidos mineralizados (Osborn e Neweseley, 1980; Hench, 1994). É a habilidade do material de formar hidroxiapatita carbonada na sua superfície, promovendo função e expressão celular nesta superfície (LeGeros, 2002). *In vitro*, a bioatividade tem sido atribuída aos materiais que possuem a habilidade de formar hidroxiapatita carbonada na sua superfície quando expostos ao fluido corporal simulado, tampão fosfato de sódio (SBF) (Hench, 1994).

A formação de hidroxiapatita carbonada nas superfícies dos biomateriais cálcio fosfato, *in vitro* e *in vivo*, relaciona-se com a extensão de dissolução destes biomateriais. Há uma dissolução parcial dos biomateriais CaP e liberação de íons Ca e P sobre o meio. Junto aos íons Ca e P, outros íons (Mg, CO<sub>3</sub>) do fluido biológico incorporam-se nos microcristais da hidroxiapatita, que forma íntima associação com um componente orgânico nas superfícies dos cristais do biomaterial CaP (Chang *et al.*, 2000, LeGeros, 2002). Dorozhkina e Dorozhkin, em 2002, reportaram a bioatividade de HAP e a mineralização de sua superfície usando um fluido simulado do corpo modificado com altas quantidades de íons hidrogenocarbonatos.

### **2.8.1 Avaliação da Biocompatibilidade**

Testes para a avaliação dos aspectos de biocompatibilidade dos materiais são classificados em três categorias, com a finalidade de eliminar qualquer material que possa causar danos aos tecidos (Phillips, 1993).

Os testes de nível I avaliam, por eliminação, os materiais, quanto à sua toxicidade sistêmica aguda e ao seu potencial carcinogênico, alergênico, irritante e citotóxico:

- para avaliação da toxicidade sistêmica aguda utiliza-se da administração oral de certa quantidade do material em um animal de laboratório, se mais de 50% dos animais sobreviverem, o material é considerado aprovado;
- a verificação do potencial citotóxico e irritante pode ser usado tanto *in vitro* (técnica de cultura de células) como *in vivo* (implantação em áreas subcutâneas de ratos ou intramusculares de coelho); os animais são sacrificados em vários intervalos de tempo e os locais dos implantes são examinados a olho nu e microscopicamente, onde os resultados são comparados àqueles de teste-controle (controle negativo: material de baixo potencial irritante; controle positivo: material de alto potencial irritante);

- o potencial alergênico pode ser testado pela administração intradérmica e depois, colocado na pele de animais de laboratório para a observação do aparecimento de eritema e inchaço, indicando uma reação alérgica;
- o potencial carcinogênico do material pode ser testado *in vivo*, observando-se o aparecimento de tumores; ou *in vitro*, observando-se o potencial mutagênico do material.

Os testes de nível II avaliam o material em animais de laboratório em condições que simulam situações clínicas. Depois o material é avaliado através de cortes histológicos microscopicamente e suas reações são observadas (como por exemplo, a intensidade da inflamação) e comparadas com o teste–controle (Phillips, 1993).

Os testes de nível III somente são realizados, se os testes de eliminação (nível I) e uso (nível II) mostrarem a segurança do material, ou seja, mostrarem que o material não causou reações adversas. Estes testes são realizados em humanos e avaliam o desempenho e as reações provocadas pelo material em situações clínicas reais. Do ponto de vista legal e moral, não é permitido fazer experimentos em humanos sem antes ter realizado os testes em animais (Phillips, 1993).

#### **2.8.1.1 Avaliação da citocompatibilidade**

A citocompatibilidade dos materiais é usualmente avaliada através de teste de citotoxicidade *in vitro*. Este método é sensível e seletivo, tornando-se confiável e reproduzível para detectar a morte celular ou outros efeitos negativos do material nas funções celulares (Lin et al., 2005). Nos estudos *in vitro* usa-se cultura de células específicas. Muitos trabalhos têm reportado a utilização de células de linhagem, com características já estudadas e conhecidas, para a cultura (Yang et al., 2002; Silva et al., 2004). Além disso, a facilidade de repique em laboratório é uma vantagem. Entretanto, outros pesquisadores utilizaram células primárias para a cultura, tentando aproximar o máximo possível da realidade biológica do tecido originário (Valério et al., 2004a e 2004b; Andrade et al., 2005; Chen et al., 2005; Lin et al., 2005; Schainberg et al., 2005; Sampaio et al., 2005a e 2005b; Valerio et al., 2005a e 2005b). Estas células, apesar de mais sensíveis fornecem informações mais aproximadas dos estudos *in vivo* (Jones et al., 1976).

Células do tecido ósseo têm sido utilizadas para a observação do comportamento celular específico deste tecido. O isolamento de osteoblastos de calvária de rato tem sido um método utilizado por vários pesquisadores, devido a sua viabilidade financeira e a sua efetividade. Pela alta capacidade proliferativa dessas células, podem ser repicadas em laboratório. A cultura de células ósseas *in vitro* permite caracterizar a secreção de vários produtos, proporcionando parâmetros importantes no estudo da interação célula/biomaterial.

No tecido ósseo a enzima fosfatase alcalina está associada ao processo de mineralização. Ela pode estar presente na matriz sob a forma livre ou envolta em vesículas, e hidrolisa íons fosfato de radicais

orgânicos em presença de pH alcalino. Essa enzima também está associada ao transporte de cálcio na membrana, e ao fornecimento de íons fosfato na mineralização. A grande quantidade de fosfatase alcalina na superfície dos osteoblastos atua quebrando grupos fosfatos, que se ligam às moléculas de proteínas da matriz orgânica,. Isto cria uma nuvem aniônica á sua volta que atrai cálcio livre circundante, fazendo com que cálcio seja precipitado na matriz e iniciando sítios de mineralização (Ten Cate, 1994).

A observação da qualidade e quantidade da secreção da fosfatase alcalina é considerado um parâmetro importante para análise da atividade osteoblástica. Em contato com os diversos materiais pode apresentar um comportamento alterado, dependendo da composição dos mesmos. Sampaio et al., em 2004a e 2004b observaram a produção de fosfatase alcalina na presença de hidroxiapatita; e Valerio, em 2004a e 2004b em hidroxiapatita e material CaP bifásico.

Nas células ósseas ocorre mineralização na fibra colágena juntamente com outras proteínas não colagenosas também secretadas pelos osteoblastos (Ten Cate, 1994). A ação da fosfatase alcalina é necessária para desfosforilar algumas fosfoproteínas nas regiões de conexão. Apesar dos mecanismos exatos ainda não terem sido totalmente elucidados, sabe-se que o cálcio e o fósforo podem precipitar pela regulação membrana-simile dos osteoclastos, mostrando que vesículas com dupla membrana ricas destes dois íons são derivadas do aparelho de Golgi. O metabolismo ósseo pode ser avaliado pela análise da síntese de colágeno, possibilitando o estudo e o controle de suas possíveis alterações. Torna-se viável avaliar a interação entre o tecido ósseo e biomateriais com diferentes características, pela quantificação da síntese de colágeno pelos osteoblastos, que podem ser estimulados ou inibidos por substâncias liberadas pelos biomateriais no meio (Anselme, 2000).

O ensaio de viabilidade celular MTT (dimetiazol difeniltetrazolio de bromo) é baseado na reação de redução realizada pela célula no sal de tetrazolium, o que resulta na formação de um corante formazan que pode ser facilmente detectado e medido em um espectrofotômetro. O sal de tetrazolium é reduzido na mitocôndria, organela que é inativada poucos minutos após a morte celular. Este ensaio é considerado um excelente instrumento para a observação de células viáveis e células mortas. Normalmente, este teste é realizado antes da verificação da fosfatase alcalina, determinando a viabilidade celular no material.

A avaliação da citocompatibilidade de materiais têm sido relatada, associando-se o ensaio de viabilidade celular MTT e a produção de fosfatase alcalina e colágeno por células primárias osteoblásticas (Valério et al., 2004a e 2004b; Andrade et al., 2005; Schainberg et al., 2005; Sampaio et al., 2005a e 2005b; Valerio et al., 2005a e 2005b).

A biocompatibilidade de biomateriais nas diferentes categorias de avaliação e usando-se diversos métodos para esta avaliação tem sido relatada. Testes de citotoxicidade "*in vitro*", usando culturas de células fibrobásticas foram utilizados por Pereira et al., em 2003, avaliando poli (metil metacrilato)

reforçado com partículas de vidro; por Silva et al., em 2004, avaliando membranas de quitosana, um biopolímero natural, reticuladas com glutaraldeído; Taguchi et al., em 2004, avaliando o colágeno reticulado com um derivado do ácido cítrico. Os materiais avaliados mostraram baixa citotoxicidade ou nenhuma reação citotóxica.

Testes “*in vitro*” em cultura de células osteoblásticas foram avaliados por Ito et al., em 2002, na análise de liberação de flúor em cerâmicas de fosfato de cálcio dopadas com Zn, TCPZn e TCPZn/HAP; por Andrade et al., em 2004, usando o colágeno modificado com TEOS; Botelho et al., em 2004, avaliaram a proliferação de células osteoblásticas humanas em hidroxiapatita/silício; Sogo et al., em 2004, compararam a citocompatibilidade e crescimento celular de  $\alpha$ TCPZn e  $\alpha$ TCP; Valerio et al., em 2004a, avaliaram a biocompatibilidade de dentina, esmalte, hidroxiapatita derivada de dente humano e hidroxiapatita comercial; Valério et al., em 2004b, avaliaram a proliferação de osteoblastos e produção de colágeno em vidro bioativo e fosfato de cálcio bifásico; Webster et al., em 2004, avaliaram a habilidade de deposição de cálcio e adesão de células osteoblásticas humanas em hidroxiapatita dopadas com  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $La^{+3}$ ,  $Y^{+3}$ ,  $In^{+3}$ ,  $Bi^{+3}$ ; Sampaio et al., 2005a e 2005b, avaliaram a viabilidade de osteoblastos, produção de fosfatase alcalina e secreção de colágeno, usando hidroxiapatita reforçada com vidros e hidroxiapatita/titânio.

Testes de avaliação da biocompatibilidade “*in vivo*”, em animais foram utilizados por Rocha, em 2000, estudando matrizes de colágeno aniônico em defeitos ósseos; Dalkýz et al., em 2002, avaliando histologicamente os efeitos do osso liofilizado, hidroxiapatita, coral e hidróxido de cálcio; Ito et al., em 2002, avaliando a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas em cerâmicas de fosfato de cálcio dopadas com Zn; Pereira et al., em 2003, avaliando poly (metil metacrilato)/biovidro; Taguchi et al., em 2004, avaliando derivado do ácido cítrico/colágeno; Yoshida et al., em 2005, avaliando a bioatividade de compósito hidroxiapatita/celulose.

As reações biológicas de compósitos de hidroxiapatita/colágeno foram avaliadas “*in vitro*” (Okazaki et al., 2001; Sheu et al., 2001; Lin et al., 2005) e em defeitos ósseos de animais mostrando a bioatividade do material (Callis e Santini, 1985; Porter, 1991; Zardiaccas et al., 1994; Tay et al., 1998; Kikuchi et al., 2001; Ito et al., 2002; Kikuchi et al., 2004a; Kikuchi et al., 2004b). Os resultados indicaram que os materiais avaliados podem ser usados em aplicações biológicas, mostrando biocompatibilidade e atividades bioativas.

Os testes iniciais de biocompatibilidade com a hidroxiapatita dopada com íons divalentes e trivalentes têm mostrado sucesso (Webster et al., 2004) e, especificamente, os materiais dopados com zinco têm mostrado biocompatibilidade e bioatividade, aumentando a proliferação de células osteoblásticas (Ito et al., 2002; Sogo et al., 2004).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

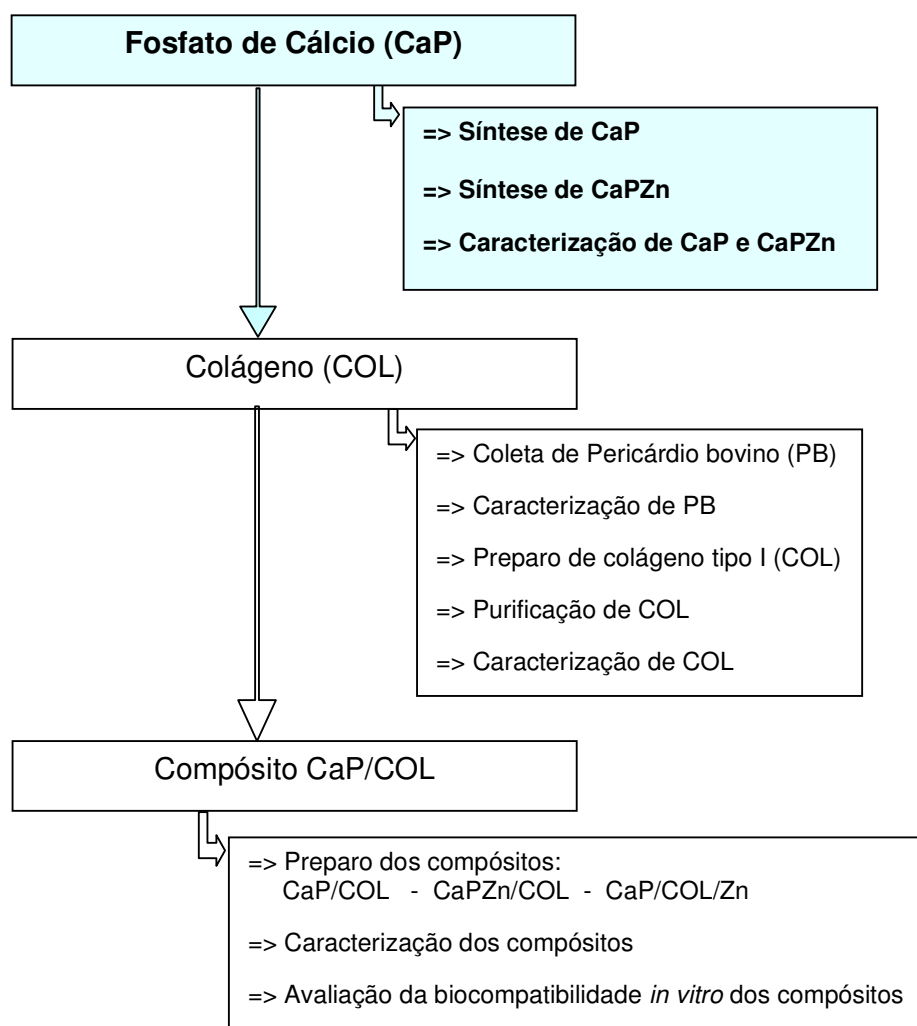
Desenvolver e caracterizar compósitos fosfato de cálcio/colágeno dopados com zinco e avaliar sua biocompatibilidade *in vitro*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- sintetizar fosfatos de cálcio através da precipitação por via úmida, avaliar diferentes parâmetros durante a síntese e caracterizar os fosfatos de cálcio obtidos;
- sintetizar fosfatos de cálcio dopados com zinco e caracterizar os fosfatos de cálcio-zinco;
- extrair, purificar e caracterizar a proteína colágeno tipo I de origem tissular do pericárdio bovino;
- desenvolver compósitos fosfatos de cálcio/colágeno associados ou não ao zinco e caracterizar os compósitos;
- avaliar a citocompatibilidade dos compósitos através de teste de citotoxicidade *in vitro*;
- avaliar a secreção de fosfatase alcalina de células osteoblásticas primárias em presença dos compósitos.

## CAPÍTULO II - FOSFATOS DE CÁLCIO

Para atingir o objetivo proposto neste trabalho, foram realizadas várias etapas esquematizadas através do esquema apresentado na Figura II.1. A primeira delas encontra-se em evidência e corresponde ao Capítulo II.



**Figura II.1** – Esquema das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho, com evidência da etapa referente ao capítulo II.

# 1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

## 1.1 MATERIAIS

### 1.1.1 Materiais e equipamentos utilizados na síntese de CaP:

- ácido ortofosfórico 85% P.A.,  $H_3PO_4$ ,  $d = 1,69 \text{ g/cm}^3$ , Labsynth<sup>®</sup> Produtos para Laboratório LTDA;
- agitador magnético com controle de temperatura, Fisatom<sup>®</sup>, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- água desionizada 18 M $\Omega$ cm, purificada em um sistema Rio's acoplada a um Milli Q-plus/Millipore<sup>®</sup>, do Laboratório de Hidrometalurgia, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – DEMET, Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais - EE-UFGM;
- água destilada obtida do destilador modelo 2103 Biomatic<sup>®</sup>, do Laboratório de Análise de Superfícies e de Materiais – LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- álcool benzílico 99% P.A.,  $C_7H_8O$ , Labsynth<sup>®</sup>;
- álcool etílico P.A.,  $C_2H_6O$ , Labsynth<sup>®</sup>;
- aspirador modelo CA – Fanem<sup>®</sup> LTDA, do Laboratório de Hidrometalurgia, DEMET/EE-UFGM;
- balança eletrônica analítica, modelo Q-500L210C - Quimis<sup>®</sup>, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- balança eletrônica semi-analítica, BEL<sup>®</sup> Equipamentos Analíticos LTDA, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- bomba de alto vácuo, modelo 3NO13H - Dayton<sup>®</sup>, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- capela de exaustão; LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- estufa de secagem e esterilização, modelo Orion 515 – Fanem<sup>®</sup>, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- forno mufla com controle de temperatura, modelo 7000 – EDG<sup>®</sup> Equipamentos, do Laboratório de Biomateriais, DEMET/EE-UFGM;
- fosfato de amônio bibásico P.A.,  $(NH_4)_2 HPO_4$ , Labsynth<sup>®</sup>;
- gral de ágata, do Laboratório de Biomateriais, DEMET/EE-UFGM;
- hidróxido de amônio P.A.,  $NH_4OH$ , Labsynth<sup>®</sup>;
- hidróxido de cálcio 95% P.A.,  $Ca(OH)_2$ , Labsynth<sup>®</sup>;
- nitrato de zinco P.A.,  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , Labsynth<sup>®</sup>;
- peneira com abertura de 38  $\mu\text{m}$ , USS/ASTM 400 – Bertel<sup>®</sup> Indústria Metalúrgica LTDA, LASMAT – DEMET/EE-UFGM;
- peneira com abertura de 75  $\mu\text{m}$ , USS/ASTM 200 – Bertel<sup>®</sup> Indústria Metalúrgica LTDA, LASMAT – DEMET/EE-UFGM;
- pH-metro - Quimis<sup>®</sup>; LASMAT – DEMET/EE-UFGM;
- ultra som - Siemens<sup>®</sup>, do Laboratório de Hidrometalurgia, DEMET/EE-UFGM.

### 1.1.2 Materiais e equipamentos utilizados na caracterização de CaP:

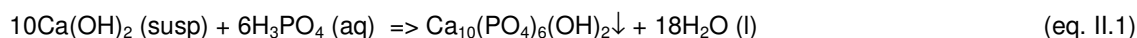
- aparelho de fluorescência de raios-X PW 2400 – Phillips<sup>®</sup>, do Laboratório de Análise por Raios-X , DEMET/EE - UFMG;
- difratômetro, modelo PW1710 - Philips<sup>®</sup>, do Laboratório de Raios-X , DEMET/EE - UFMG;
- espectrofotômetro de absorção atômica, modelo Aanalyst 300 – Perkim-Elmer<sup>®</sup>, do Laboratório de Análises Químicas, DEMET/EE - UFMG;
- espectrofotômetro de infravermelho, modelo Paragon 1000 – Perkim-Elmer<sup>®</sup>, do Laboratório de Materiais Cerâmicos, DEMET/EE – UFMG;
- hidroxiapatita comercial, HAP-91<sup>®</sup>, JHS – Laboratório Químico LTDA;
- lupa estereoscópica modelo Steni SV8 – Zeiss<sup>®</sup>, acoplada com máquina fotográfica, modelo M35W – Zeiss<sup>®</sup>, do Laboratório de Metalografia e Tratamentos Térmicos, DEMET/EE - UFMG;
- microscópio de luz transmitida, modelo CH30 – Olympus<sup>®</sup>, acoplado com sistema de exposição automática para fotomicrografia, modelo PM-104K3 - Olympus<sup>®</sup>, LASMAT – DEMET/EE-UFMG;
- microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM - 6360 LV – JEOL<sup>®</sup>, acoplado com espectrômetro dispersivo por dispersão de raios-X (EDS) modelo Quest – Thermo Noram<sup>®</sup>, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, DEMET/EE – UFMG;
- *software* Origin<sup>®</sup>, versão 6.1, LASMAT – DEMET/EE-UFMG.

## 1.2 SÍNTESE DE FOSFATO DE CÁLCIO

Para a obtenção do material fosfato de cálcio foram realizadas, em laboratório, três rotas de síntese pela precipitação por via úmida.

### 1.2.1 Rota 1 (R1)

Com base na razão ideal para hidroxiapatita pura, Ca/P = 1,67, o material foi precipitado a partir da reação:



Para sintetizar 10 g de fosfato de cálcio calculou-se a quantidade em peso dos reagentes, a partir do número de moles da hidroxiapatita pura e dos reagentes utilizados na reação (Anexo IA). A mistura foi realizada a partir da adição de uma solução B a uma suspensão A que foram preparadas da seguinte forma:

- **suspensão A** – 250 mL de suspensão de Ca(OH)<sub>2</sub> 40 mM [7,38 g de Ca(OH)<sub>2</sub>]; o pó de Ca(OH)<sub>2</sub> foi colocado lentamente em água desionizada à temperatura de 40°C±3°C, e permaneceu sob agitação vigorosa durante 1 h;

- **solução B** – 250 mL de solução de  $H_3PO_4$  17 mM [4,08 mL de  $H_3PO_4$ ].

A solução B foi gotejada, com o auxílio de uma bureta, numa velocidade de adição equivalente a 4 mL/min, à suspensão A. A temperatura de  $40\pm 3^\circ C$  e agitação magnética vigorosa e constante foi mantida durante todo o processo, usando o agitador magnético com controle de temperatura. O pH durante a adição do ácido à suspensão de  $Ca(OH)_2$  foi controlado no pH mínimo =  $7\pm 2$ , usando solução de  $NH_4OH$  1 M. Após 1 h de adição, a mistura permaneceu à temperatura ambiente durante 48 h.

Todo o processo de mistura foi realizado no interior de uma capela de exaustão e água desionizada foi utilizada para o preparo de todas as misturas.

No fluxograma da Figura II.2 pode ser acompanhado o processo de sintetização do fosfato de cálcio em R1.

#### 1.2.1.1 Procedimentos e condições experimentais

Após o tempo de envelhecimento, as misturas obtidas em R1 seguiram os procedimentos descritos a seguir (Figura II.2):

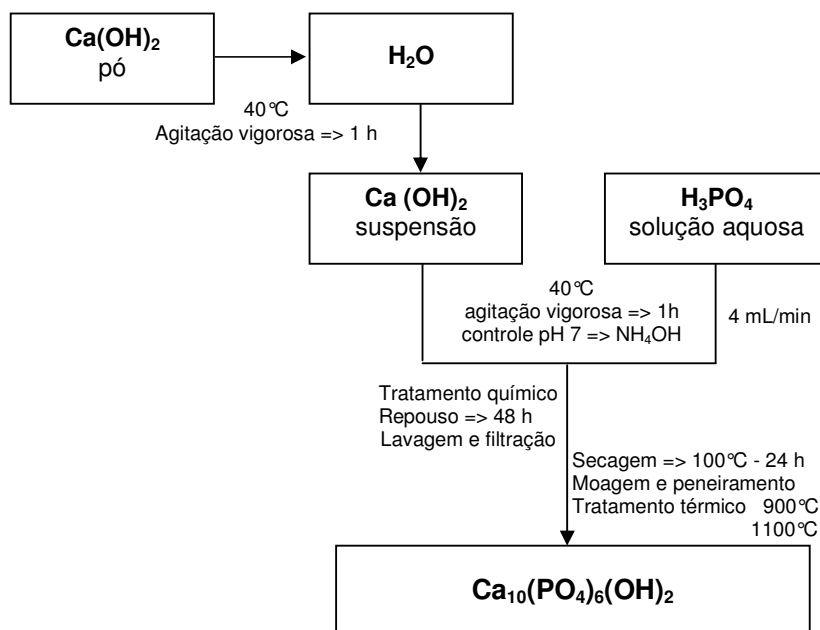
- **filtração e lavagem** - a mistura foi decantada e o sobrenadante foi descartado; a massa obtida foi filtrada em papel filtro no funil de Büchner com o auxílio da bomba de alto vácuo; o mesmo procedimento foi realizado para lavar a massa, usando aproximadamente o mesmo volume de água desionizada, à temperatura ambiente, por três vezes consecutivas;
- **secagem e moagem** - a massa obtida foi seca em estufa à temperatura de  $100^\circ C$  por 24 h; o material foi triturado manualmente em gral de ágata, transformando-o, o máximo possível, em um pó de granulometria bem fina;
- **peneiramento** - os pós sintetizados foram passados em peneira de 200 mesh, e em seguida, em peneira de 400 mesh previamente descontaminadas, por 4 h no equipamento de ultra-som, e secas no aspirador;
- **condições experimentais** - alguns parâmetros foram avaliados durante e após o processo de precipitação; as amostras obtidas podem ser identificadas na Tabela II.1, onde também podem ser observadas suas diferentes condições experimentais:
  - variação do pH mínimo durante o processo de mistura;
  - tratamento químico durante envelhecimento do material com adição da solução de  $H_3PO_4$  diluída;
  - tratamento químico após mistura dos reagentes com adição da solução de  $H_3PO_4$  concentrada;
  - tratamento térmico com processos diferentes de resfriamento.

#### 1.2.1.2 Tratamento químico

A amostra A4 foi submetida a um tratamento químico através da adição de 200 mL de solução diluída de  $H_3PO_4$  1 mM à mistura obtida em R1, logo após sua reação. Agitou-se o material, moderadamente,

por 30 min. A mistura tratada com a solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 mM foi envelhecida durante 48 horas. Depois foram seguidos os procedimentos de filtração, lavagem, secagem, moagem e peneiramento das amostras.

Na amostra A5 foi adicionado, logo após a mistura completa dos dois reagentes, 2 mL da solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrada, sob agitação vigorosa a  $40\pm 3^\circ\text{C}$ , por mais 30 min. O pH foi controlado em  $7\pm 0,2$  durante a adição do ácido à suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M. O processo de mistura foi realizado no interior da capela de exaustão.



**Figura II.2** – Fluxograma da seqüência de procedimentos empregados em R1.

### 1.2.1.3 Tratamento térmico

Os pós sintetizados em R1 foram colocados em cadinhos de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e submetidos a tratamento térmico. Os cadinhos foram levados a um forno mufla com taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}$  por minuto e mantidos por duas horas a  $900^\circ\text{C}$  em todas as amostras, com exceção da amostra A7 que foi submetida à temperatura de  $1.100^\circ\text{C}$  e das amostras A1, A7 e A10 que não foram submetidas ao tratamento térmico (Tabela II.1). Os pós foram resfriados por dois processos:

- resfriamento lento, dentro do forno, com uma taxa de resfriamento de  $10^\circ\text{C}$  até a temperatura ambiente, nas amostras A2, A4 e A6 (Tabela II.1);
- resfriamento brusco, fora do forno, à temperatura ambiente, sobre uma placa inox e vedados com papel alumínio, nas amostras A3, A5, A8 e A10 (Tabela II.1).

Os pós foram acondicionados em frascos plásticos esterilizados e vedados, sendo identificados.

### 1.2.2 Rota 2 (R2)

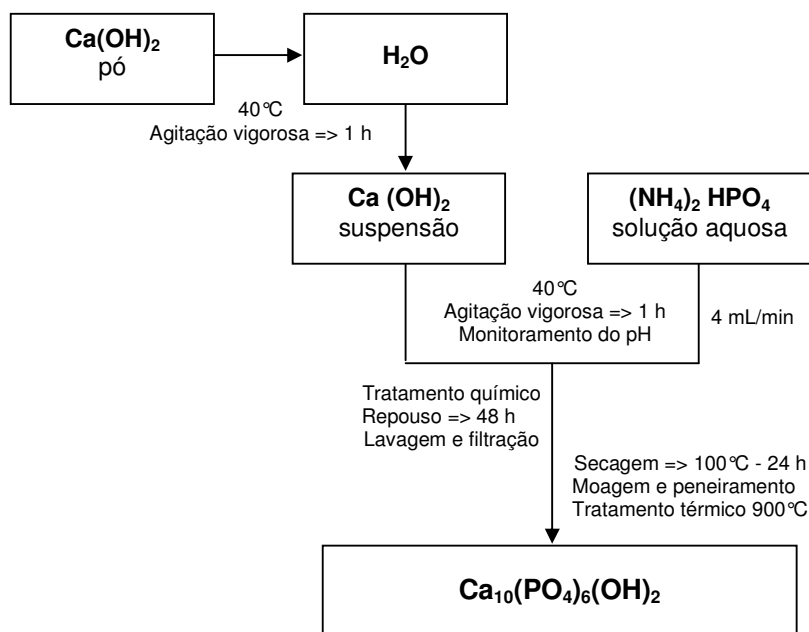
O material foi precipitado a partir da reação a seguir, calculando-se a quantidade em peso dos reagentes (Ca/P = 1,67) para obtenção de 10 g de fosfato de cálcio (Anexo IB):



A suspensão A e solução B foram preparadas da seguinte forma:

- **suspensão A** – 250 mL de suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  40 mM [7,38 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ]; o pó de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  foi colocado lentamente em água desionizada à temperatura de  $40^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ , e permaneceu sob agitação vigorosa durante 1 h;
- **solução B** – 250 mL de solução de  $(\text{NH}_4)_2.\text{HPO}_4$  24 mM [7,89 g de  $(\text{NH}_4)_2.\text{HPO}_4$ ].

A mistura foi realizada seguindo os mesmos procedimentos de R1 e o pH foi monitorado durante toda a mistura. O processo de sintetização em R2 pode ser acompanhado no fluxograma da Figura II.3.



**Figura II.3** – Fluxograma da seqüência de procedimentos empregados em R2.

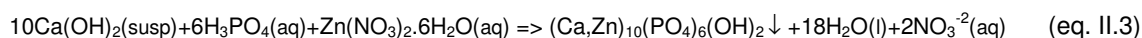
#### 1.2.2.1 Procedimentos e condições experimentais

Após 48 h de envelhecimento, as misturas obtidas em R2 seguiram os mesmos procedimentos descritos para R1. As amostras obtidas em R2 podem ser identificadas na Tabela II.1, onde também podem ser observadas suas condições experimentais:

- tratamento térmico com processos de resfriamento lento e brusco, como nas amostras em R1.

### 1.2.3 Rota 3 (R3)

A razão  $(Ca + Zn)/P = 1,67$  foi usada para calcular a quantidade em peso dos reagentes para a síntese de 10 g de fosfato de cálcio dopado com zinco (Anexo IC). O material foi precipitado por via úmida a partir da reação a seguir, e os procedimentos de seu processo podem ser acompanhados através do fluxograma da Figura II.4:



onde,

(Ca, Zn) significa a substituição parcial no reticulado de íons  $Ca^{+2}$  por íons  $Zn^{+2}$ .

A suspensão A e solução B foram preparadas da seguinte forma:

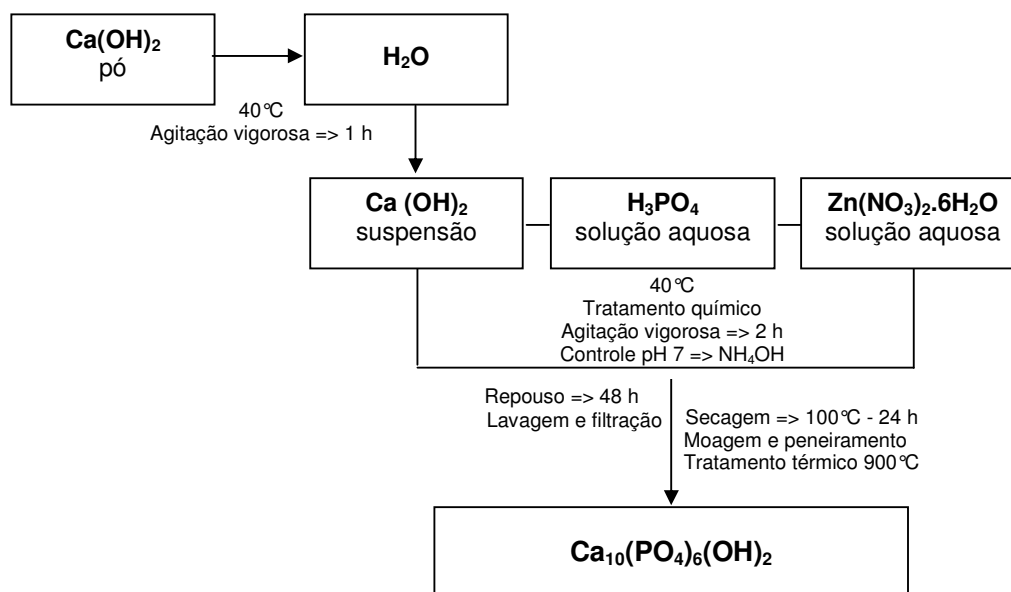
- **suspensão A** – 250 mL de suspensão de  $Ca(OH)_2$  40 mM [7,38 g de  $Ca(OH)_2$ ]; o pó de  $Ca(OH)_2$  foi colocado lentamente em água desionizada à temperatura de  $40^\circ C \pm 3^\circ C$ , e permaneceu sob agitação vigorosa durante 1 h;
- **solução B** – 250 mL de solução de  $H_3PO_4$  17 mM [4,08 mL de  $H_3PO_4$ ].

Para R3 usou-se os mesmos procedimentos realizados na amostra A5 em R1 e, no momento da mistura inicial foi adicionado  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  na concentração de 1% mol [0,03 mg de  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ]. No final da mistura foram adicionados 2 mL da solução de  $H_3PO_4$  concentrado. A temperatura de  $40 \pm 3^\circ C$  foi mantida durante toda a mistura, sob agitação vigorosa e constante por mais 1 h. A mistura permaneceu em repouso à temperatura ambiente.

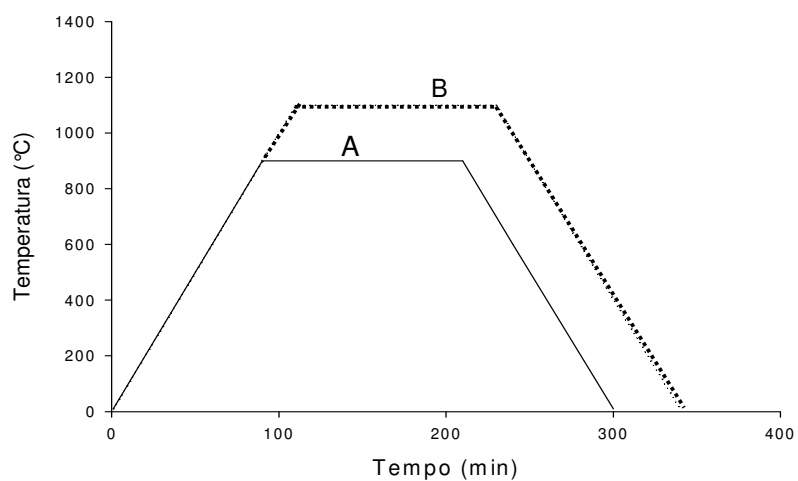
#### 1.2.3.1 Procedimentos e condições experimentais

Após 48 h de envelhecimento, as misturas obtidas em R3 seguiram os mesmos procedimentos descritos para R1 e o processo pode ser acompanhado pelo fluxograma da Figura II.4. As amostras obtidas em R3 podem ser identificadas na Tabela II.1, onde também podem ser observadas suas condições experimentais:

- tratamento químico após mistura dos reagentes com adição da solução de  $H_3PO_4$  concentrada, como na amostra A5 em R1;
- dopagem com  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ;
- tratamento térmico com processos de resfriamento lento e brusco, como nas amostras em R1.



**Figura II.4** – Fluxograma da seqüência de procedimentos empregados em R3.



**Figura II.5** – Perfil da temperatura x tempo usada no tratamento térmico a 900°C (A) das amostras A2 e A4 (R1) e no tratamento térmico a 1100°C (B), da amostra A6 (R1).

**Tabela II.1 – Identificação e condições experimentais das amostras de fosfato de cálcio nas rotas de síntese**

Amostra	Reagentes	Rota	pH mínimo	Tratamento químico	Tratamento térmico (°C)
A1	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	R1	7,0	-	-
A2	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	R1	7,0	-	900
A3	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	R1	7,0	-	900*
A4	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	R1	7,0	$\text{H}_3\text{PO}_4$ 1 mM	900
A5	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	R1	7,0	$\text{H}_3\text{PO}_4$ concentr.	900*
A6	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	R1	7,0	$\text{H}_3\text{PO}_4$ 1 mM	1100
A7	$\text{Ca(OH)}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	R2	9,5	-	-
A8	$\text{Ca(OH)}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	R2	9,5	-	900
A9	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	R3	7,0	-	-
A10	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	R3	7,0	-	900*
A11	$\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	R3	7,0	$\text{H}_3\text{PO}_4$ concentr.	900*

\* Tratamento térmico com resfriamento brusco

### 1.3 Caracterização dos pós de fosfato de cálcio

#### 1.3.1 Fluorescência de raios-X (XRF)

Os reagentes  $\text{Ca(OH)}_2$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e amostras dos pós sintetizados, foram preparados em um leito de ácido bórico P.A. ( $\text{H}_2\text{BO}_3$ ) e levados ao equipamento de fluorescência de raios-X para avaliação qualitativa da presença de seus elementos químicos constituintes.

#### 1.3.2 Microscopia de luz (ML) e Microscopia de luz transmitida (MLT)

Amostras dos pós foram dispersas em solução de 50% de álcool etílico e 50% de água destilada e gotejadas em lâminas de vidro, para análise no microscópio de luz, permitindo a visualização geral da morfologia do material. Depois de secas, as mesmas foram observadas em uma lupa estereoscópica de imagem tridimensional, com aumento máximo de 64X, acoplada com máquina fotográfica.

A distribuição dos tamanhos de partícula foi determinada, utilizando-se álcool benzílico como dispersante. Pequenas quantidades dos pós foram misturados a 1 mL do dispersante. Após decantação, succionou-se a mistura depositada no fundo do recipiente, com o auxílio de uma pipeta. Em uma lâmina de vidro, gotejou-se o material pipetado, e uma lamínula de vidro foi pressionada levemente sobre a gota, espalhando-a na lâmina. A amostra translúcida foi analisada através da iluminação do microscópio de luz transmitida antes da secagem do dispersante.

### 1.3.3 Análise quantitativa de elementos químicos

As concentrações de fósforo (P) e silício (Si) nas amostras foram determinadas por gravimetria; de cálcio (Ca) por oxi-redução com  $\text{KmnO}_4$ ; de sódio (Na), ferro (Fe), estrôncio (Sr) e magnésio (Mg) por espectrometria de absorção atômica, modo chama; e dos cloretos por cromatografia iônica. A análise quantitativa dos elementos constituintes foi realizada e a relação Ca/P de cada uma das amostras foi determinada a partir dos resultados obtidos nesta análise.

### 1.3.4 Espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS)

Amostras representativas do gel, que se formou logo após a mistura, foi coletada com uma seringa descartável, e foi dispersa em solução de 50% de álcool etílico e 50% de água destilada. Os pós sintetizados, antes e após o tratamento térmico, também foram dispersos em solução álcool etílico/água. As amostras foram gotejadas em lamínulas de vidro, identificadas e, depois de secas à temperatura ambiente por aproximadamente 12 h, foram recobertas com uma fina camada de ouro (Au). A análise elementar semi-quantitativa de microrregiões das amostras foi obtida, através do detector de espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS), acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, usando feixe de elétrons de 15 keV. Os resultados foram determinados pela análise de três áreas diferentes de cada amostra.

### 1.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As mesmas amostras usadas para análise de EDS foram recobertas novamente com Au. A superfície das amostras foram observadas com alta resolução e grande profundidade para análise detalhada de sua morfologia e obtenção de imagens com aparência tridimensional, no microscópio eletrônico de varredura, através da incidência de feixe de elétrons de 10 a 15 KeV.

### 1.3.6 Difração de raios-X (XRD)

Os reagentes  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e amostras dos pós sintetizados, antes e depois do tratamento térmico, foram submetidos à difração de raios-X, permitindo identificar as fases cristalográficas presentes no material e estimar a sua quantidade de fase amorfa e cristalina. Os difratogramas obtidos foram comparados com os registros do banco de dados do JCPDS 2001 (Joint Committee on Powder Diffraction Standards – ICDD - International Centre for Diffraction Data). A determinação dos parâmetros de rede  $a = b$  e  $c$  da célula unitária cristalina dos pós sintetizados foi calculada (Anexo II), através dos dados obtidos nesses registros, usando a equação:

$$\text{sen}^2 \theta = \frac{\lambda^2}{4} \left[ \frac{4}{3} \cdot \frac{(h^2 + hk + k^2)}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \right] \quad (\text{eq. II.4})$$

onde, a radiação  $K\alpha\text{Cu}$  tem o valor de 1,54 Å.

### 1.3.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Um grama de brometo de potássio (KBr) foi seco em estufa a 120°C durante 12 h, e logo depois foi triturado em gral de ágata. O pó sintetizado foi disperso em KBr, na proporção de 0,2 g de KBr para 0,002 g da amostra. As amostras misturadas em KBr foram colocadas em um cadinho relativo ao acessório de reflexão difusa do equipamento. Em outro cadinho foi colocado 0,2 g de KBr puro e seco, obtendo-se quatro varreduras para padronização do equipamento. Os espectros FTIR das amostras de HAP dispersas em KBr foram obtidos com 32 varreduras, no intervalo entre 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e unidades de absorvância (abs), no espectrofotômetro de infravermelho. As medidas de absorvância das amostras nas regiões do infravermelho permitiu a determinação qualitativa de suas moléculas, identificando sua estrutura química.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 SÍNTESE DE HAP

O método de escolha para a obtenção de fosfato de cálcio foi o de síntese por precipitação em meio aquoso. Ao contrário da síntese por processos térmicos, este método produz maiores quantidades do material, além de ser um dos processos mais econômicos (Arends et al., 1987; Garcia et al., 2005). Também mostra homogeneidade de partículas e permite controle da concentração dos reagentes (Arends et al., 1987; Peña e Vallet-Regí, 2003). Entre as rotas para sintetizar hidroxiapatita, como hidrólise, precipitação e métodos hidrotermais, a rota por precipitação é a mais simples e apresenta possibilidade de aplicação industrial (Garcia et al., 2005).

Nas rotas utilizadas neste estudo observou-se a repetitividade da precipitação dos fosfatos de cálcio em quantidades de aproximadamente  $10 \pm 1$  g. O processo em R2, na qual se usou o reagente  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , mostrou-se uma técnica aproximadamente 25% mais onerosa que R1, quando foi realizado um levantamento financeiro dos reagentes. Isto se deve ao envolvimento de equipamentos de laboratório simples e reagentes comuns (Arends et al., 1987; Afshar et al., 2003) durante o processamento do material em R1. Analisando R1 e R3, estas apresentaram custos praticamente iguais, pois além do reagente  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ser de baixo custo, foram utilizadas quantidades mínimas para dopar o fosfato de cálcio. Levando-se em consideração apenas os valores dos reagentes  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  no comércio nacional, o material sintetizado neste estudo mostrou-se de custo bem razoável em relação ao fosfato de cálcio comercializado.

O pó de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  é de difícil dispersão, necessitando de uma adição lenta à água, sob agitação vigorosa, para formar a suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . A temperatura de  $40^\circ\text{C}$ , temperatura próxima àquela do corpo, e agitação vigorosa foram utilizadas durante o tempo de mistura, mantendo a temperatura constante em todo o sistema. Desta maneira, as partículas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dispersaram-se em água facilitando sua reação com o  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e promovendo a reação de precipitação do fosfato de cálcio. A turbulência proporcionada pela agitação vigorosa ativa o líquido no sistema de reação; e a temperatura é um importante fator que pode afetar o tamanho dos cristais e a propriedade de sedimentação (Nagai et al., 1982; Afshar et al., 2003; Utech et al., 2004). A uma temperatura mais baixa a suspensão torna-se viscosa, dificultando a uniformidade da reação (Nagai et al., 1982). Vários estudos relataram a síntese de materiais fosfatos de cálcio,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,  $\beta\text{TCP}$  e o material bifásico  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2/\beta\text{TCP}$ , à temperatura ambiente (Cheng et al., 1998; Liou et al., 2003; Peña e Vallet-Regí, 2003; Oliveira, 2004; Webster et al., 2004), enquanto outros utilizaram temperaturas que variaram de  $25$  a  $90^\circ\text{C}$  durante o processo de síntese (Nagai et al., 1982; Okazaki e Takahashi, 1999; Finisic et al., 2001; Afshar et al., 2003; Leventouri et al., 2003; Mavropoulos et al., 2003). Entretanto, os reagentes também variaram. A estabilidade das fases dos fosfatos de cálcio depende

consideravelmente da temperatura de mistura (Finisic et al., 2001) e diferentes fases de fosfato de cálcio podem ser obtidas dependendo do uso para o qual o material será desenvolvido. Trabalhos recentes (Garcia et al., 2005) avaliaram os efeitos da temperatura na síntese de hidroxiapatita pela rota de precipitação, relatando que a temperatura não influenciou a obtenção de hidroxiapatita no processo por precipitação aquosa.

A mistura mostrou-se altamente alcalina no seu estágio inicial. O pH  $13 \pm 0,5$  foi medido e, à medida que a solução ácida,  $H_3PO_4$ , foi acrescentada, a alcalinidade foi gradualmente reduzida para pH mais baixo. No final da reação foi necessária a adição de solução de  $NH_4OH$  para controle e manutenção do pH mínimo desejado, de acordo com a Tabela II.1. A área de superfície específica da partícula está em função do pH da solução, que determina seu tamanho médio e sua forma. No pH  $7 \pm 0,2$ , a área de superfície específica é minimizada, ocorrendo uma redução na espessura e comprimento das partículas, e com o pH abaixo de 7 as partículas apresentam-se mais finas, mas com um maior comprimento (Cheng et al., 1998). O pH influencia a solubilidade dos fosfatos de cálcio, a diminuição do pH aumenta a solubilidade. O pH em níveis abaixo de 9 leva à produção de fases mais solúveis em água (Afshar et al., 2003).

Durante todo o tempo, as misturas em R1, R2 e R3 mostraram-se como uma solução esbranquiçada, e no final da mistura, à medida que solução de  $H_3PO_4$  foi acrescentada, apresentaram-se com uma consistência mais gelatinosa, devido à interação dos íons P e  $Ca^{+2}$  para formação da apatita.

## **2.2 CARACTERIZAÇÃO**

As técnicas utilizadas na caracterização dos pós sintetizados mostraram, pela análise dos dados obtidos, que sua síntese foi bem sucedida. A caracterização das amostras mais significativas será mostrada e discutida, aferindo-se os resultados às outras amostras semelhantes.

Os pós sintetizados em R1, R2 mostraram-se com a aparência de um pó fino, de coloração esbranquiçada (Fig. II.6A), não apresentando diferença aparente diante do pó sintetizado em R3. Esta amostra pode ser comparada com o pó de uma amostra de hidroxiapatita obtida no comércio denominada, neste estudo, de hidroxiapatita comercial, HAc, que apresentou-se como um pó de textura granular mais grossa, e de cor levemente azulada (Fig. II.6B).

### **2.2.1 ML**

O pó sintetizado (Fig. II.6C) e o pó de HAc (Fig. II.6D) foram observados na lupa estereoscópica, mostrando uma grande aglomeração das partículas, explicada pela síntese por via úmida, que tende a aglomerar partículas extremamente pequenas.

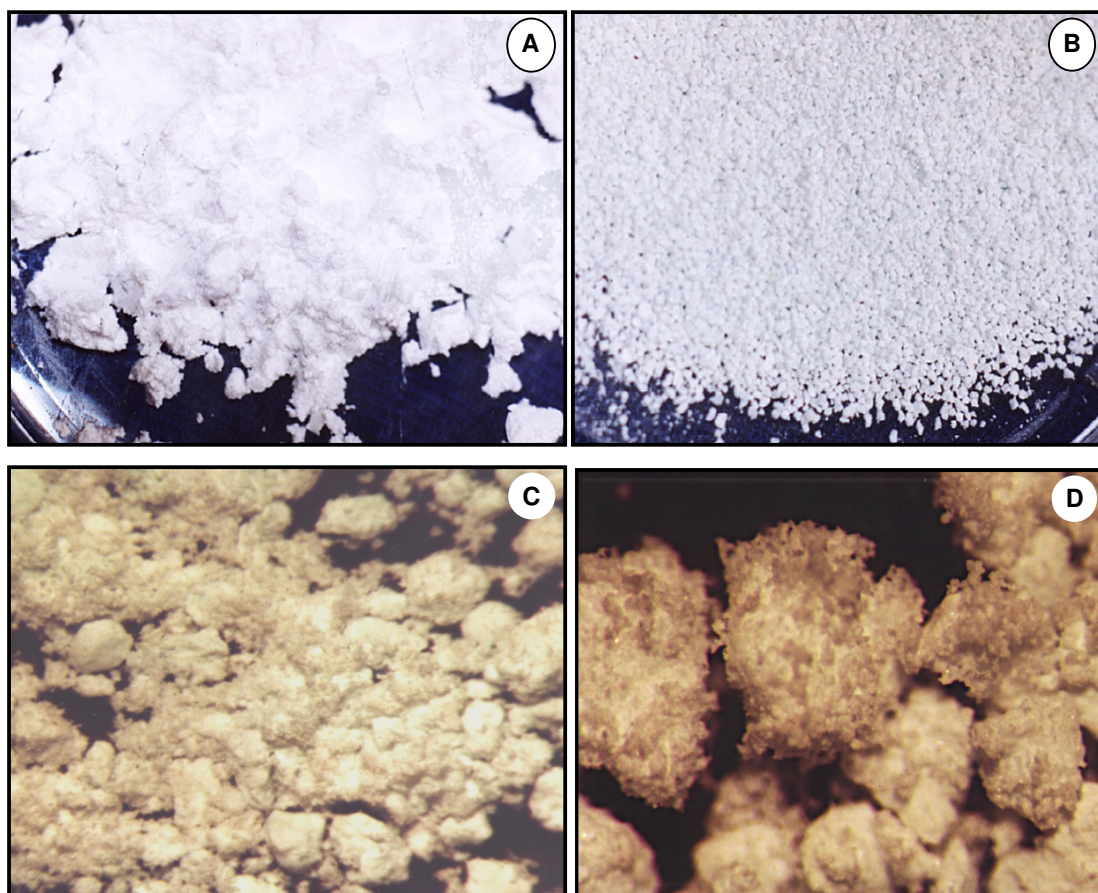
### 2.2.2 MLT

No microscópio de luz transmitida observou-se a morfologia e distribuição das partículas dos pós sintetizados (Fig. II.7A e II.7B) e de HAc (Fig. II.7C) dispersas em álcool benzílico. A passagem dos pós sintetizados por peneira com abertura da malha de 38  $\mu\text{m}$  (malha 400) não proporcionou total homogeneidade das partículas quanto à forma e tamanho (Fig. II.7A e II.7B), devido a agregação das partículas secas em estufa e em seguida trituradas. Após a trituração, as partículas passaram pelo limite máximo de abertura da peneira, deixando passar também partículas de tamanho inferior. Esses resultados também foram relatados por Bet, em 1995, quando analisou partículas de hidroxiapatita passadas em peneiras com abertura de malha menores que  $\mu\text{m}$  (malha 100). As partículas de HAc mostraram-se com morfologia diferente das partículas do pó sintetizado, apresentando-se em forma de pequenos grânulos (Fig. II.7C), provavelmente pelo fato do aglomerado ter sido passado em instrumento de separação das partículas com abertura de forma diferente, ou ter recebido tratamento diferente após sintetização.

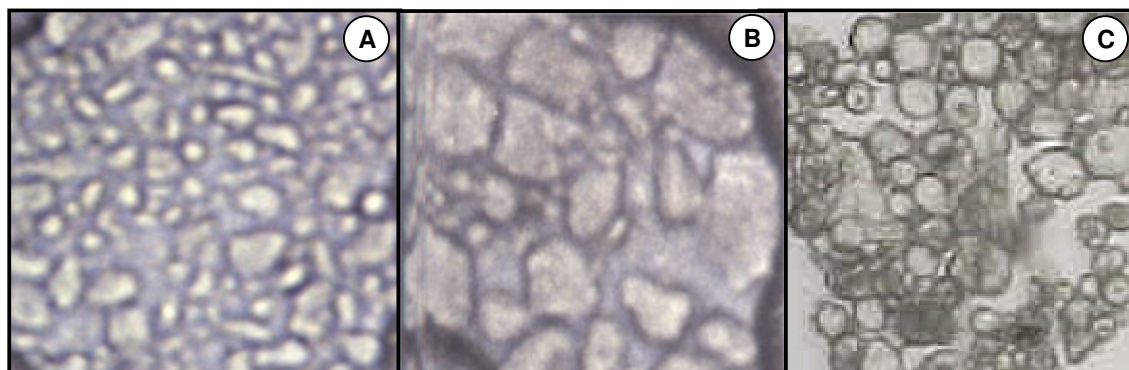
As amostras submetidas às diferentes condições experimentais não mostraram diferenças consideráveis, quando analisadas pela microscopia de luz.

### 2.2.3 XRF

Os resultados da análise por XRF dos pós sintetizados nas diferentes rotas e de seus reagentes podem ser observados na Tabela II.2, que mostra os componentes de presença dominante, média, menor e traços de elementos no material. Como esperado, os principais elementos constituintes do material sintetizado foram Ca e P. Traços de outros elementos presentes na composição dos reagentes e acrescentados no material foram observados. Os resultados obtidos para os pós sintetizados podem ser comparados aos resultados das amostras dos reagentes e da HAc. A pureza de um material cerâmico é determinada pelo fato de não conter, tanto quanto possível, outros elementos, senão Ca, P,  $\text{PO}_4$  e OH (Cheng et al., 1998). Entretanto, análises químicas mostram que as apatitas naturais, esmalte, dentina e osso, contêm impurezas, como íons  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{HPO}_4$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , Si,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$  (LeGeros, 2002), que podem ser substituídos na hidroxiapatita e são bastante estudados. A incorporação destes íons podem causar mudanças na morfologia e nas propriedades dos materiais CaP, alterando sua função normal (LeGeros, 2002). Como exemplos,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{CO}_3^{-2}$  reduzem o tamanho do cristal das apatitas sintéticas e aumentam a sua dissolução;  $\text{F}^-$  proporcionam maior resistência e, quando em excesso, podem causar fraturas do osso (Webster et al., 2004); Si e  $\text{Na}^{+2}$  são considerados elementos importantes na bioatividade do material. O  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ , também presentes na apatita natural, são denominados traços de elementos desta estrutura (LeGeros, 2002), e que, da mesma maneira que os outros íons, podem causar mudanças da apatita. O  $\text{Zn}^{+2}$  é um elemento estimulador essencial da formação óssea, entretanto, em concentrações altas é considerado citotóxico.



**Figura II.6** – Fotografias do pó sintetizado referente à amostra A2 (A) e do pó de HAc (B); fotografias das imagens tridimensionais observadas em lupa estereoscópica dos aglomerados das partículas do pó sintetizado, 16X de aumento (C), e do pó de HAc, aumento de 50X (D).



**Figura II.7** – Fotografias em microscópio de luz transmitida das partículas dispersas em álcool benzílico da amostra A3 após peneiramento em malha de 38  $\mu\text{m}$ , com aumento de 100X (A) e com aumento de 400X (B); e das partículas da amostra de HAc, aumento de 40X (C).

**Tabela II.2 – Resultados da análise química elementar por XRF de amostras dos pós sintetizados e de seus reagentes**

Amostra		Elemento										
		P	Ca	Na	Mg	Si	Sr	Fe	S	Mn	K	Zn
Reagentes	Ca(OH) <sub>2</sub>	*	+	*	-	-	*	*	*		*	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+						*	*			
HAc	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	+	+	*	-	-	*	*	*	*	*	
Pós sintetizados	A1	+	+	*	-	-	*	*	*			
	A2	+	+	*	-	-	*	*	*		*	
	A3	+	+	*	-	-	*	*	*			
	A4	+	+	*	-	-	*	*	*			
	A5	+	+	*	-	-	*	*	*		*	
	A6	+	+	*	-	-		*	*			
	A7	+	+	*			*	*	*			
	A10	+	+					*	*			*
	A11	+	+	*	-	-	*	*	*		*	*

Componentes de presença dominante (+), média ( $\pm$ ), menor (-) e traços de elementos (\*).

## 2.2.4 MEV/EDS

A micrografia de MEV das amostras dos pós sintetizados, antes do tratamento térmico, mostraram a presença de um material aglomerado com superfície granular, tendendo para uma estrutura densa (Fig.II.8A). As imagens mostraram o aspecto típico de apatita (Schumann, 1992).

Durante o tratamento térmico inicia-se o processo de densificação dos fosfatos de cálcio (Cheng et al., 1998). Depois do tratamento térmico houve perda da água de hidratação e de cristalização do material, que transformou em uma estrutura mais densa, menos porosa e conseqüentemente com menor área específica. A micrografia da Figura II.9A mostrou o aspecto do material, após o tratamento térmico à temperatura de 900 °C.

As amostras dos pós sintetizados em R1 e R2 não apresentaram diferenças significativas na morfologia, antes e após o tratamento térmico e depois do tratamento químico, quando observadas no microscópio eletrônico de varredura.

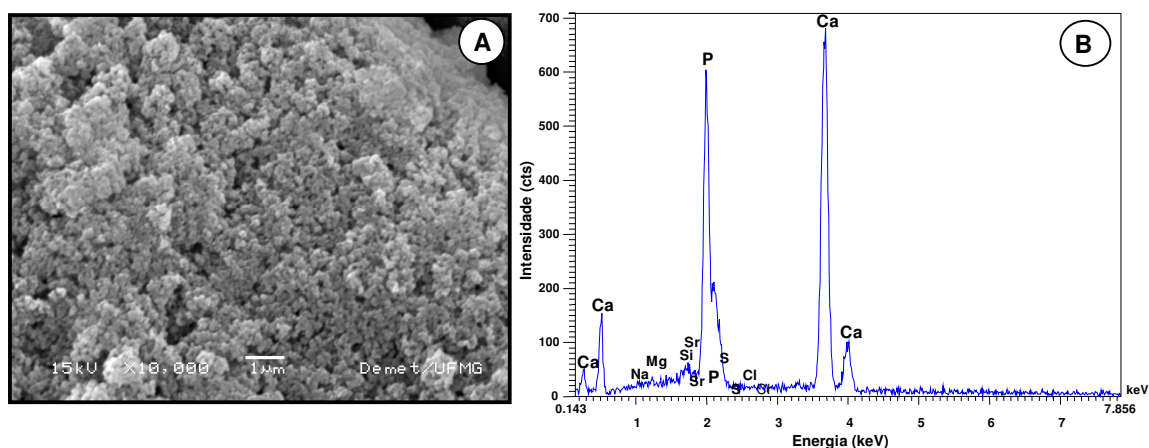
A composição química elementar qualitativa das amostras dos pós sintetizados foi avaliada através da análise por EDS. Os espectros obtidos revelaram que os materiais sintetizados em R1, R2 e R3 apresentaram picos de alta intensidade referentes aos seus principais elementos constituintes, cálcio (Ca) e fósforo (P); e mostrou picos de baixa intensidade referentes ao magnésio (Mg), silício (Si), sódio (Na), estrôncio (Sr), enxofre (S), potássio (K) e cloro (Cl) considerados impurezas do material advindas de seus reagentes (Fig. II.8B). Os mesmos constituintes das amostras antes do tratamento

térmico foram observados após o tratamento térmico, mostrando a mesma composição inicial do material. Os picos referentes ao Ca e ao P antes do tratamento térmico mostraram uma menor intensidade (Fig. II.8B) comparados aos mesmos picos de Ca e P após o tratamento térmico (Fig. II.9B).

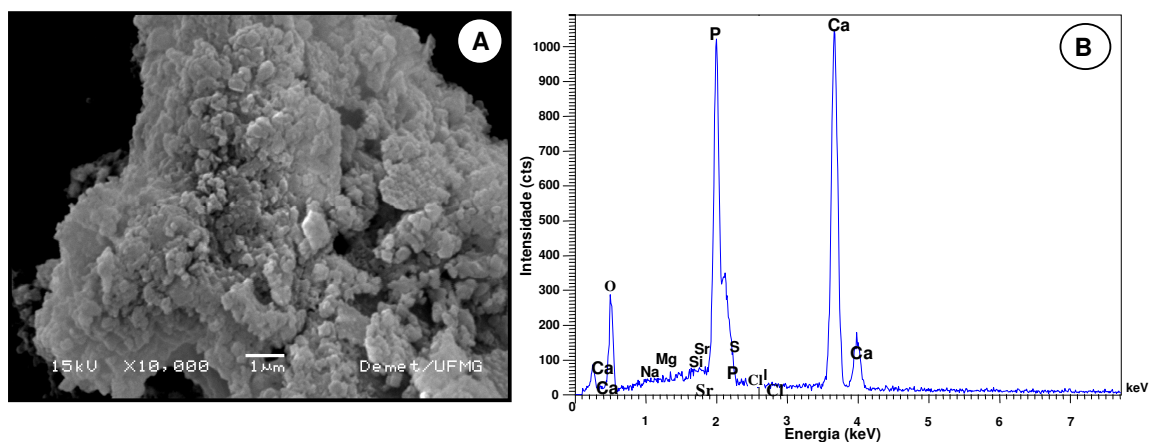
O pó obtido em R3 mostrou estrutura semelhante aos pós obtidos em R1 e R2, entretanto as micrografias de MEV mostraram uma maior porosidade das amostras (Fig. II.10A), que provavelmente pode estar associada á decomposição do nitrato de zinco. No seu espectro de EDS (Fig. II.10B) pode ser observada a presença dos mesmos picos referentes às amostras obtidas nas outras rotas e também a presença de picos de baixa intensidade referentes ao Zn. Não foi observada nenhuma estrutura diferente que pudesse identificar a presença de Zn. Como neste estudo, Webster et al., em 2004, relatou a presença de íons dopantes divalentes e trivalentes, incluindo os íons  $Zn^{+2}$ , na forma de nitrato, em amostras de HAP através da caracterização por EDS. Sogo et al., em 2005, analisaram a estrutura de HAPZn através de EDS acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, e não observaram diferenças significativas entre os grãos de Ca/P e de Zn/Ca. Relataram que não houve a presença de grãos isolados ou concentração de Zn em nenhuma área da amostra.

O espectro representante das amostras dos pós em R1 e R2 pode ser comparado com o espectro encontrado na amostra de HAc. O espectro de EDS dos pós sintetizados (Fig. II.11A) mostrou picos de P e Ca de maior intensidade, bem como maior quantidade de P, quando comparados com os picos dos mesmos elementos apresentados no espectro de HAc (Fig. II.11B).

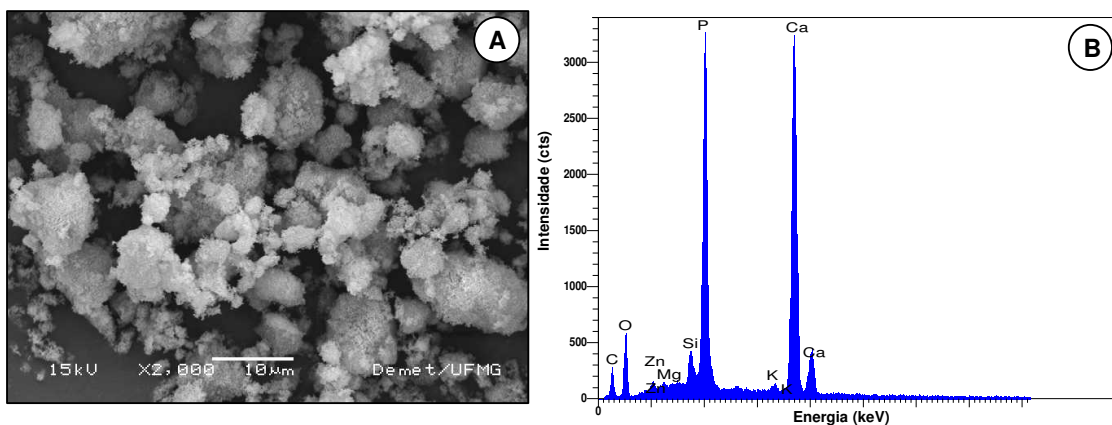
A análise química qualitativa das amostras por EDS dos pós sintetizados confirmou a presença dos mesmos constituintes encontrados na análise por XRF.



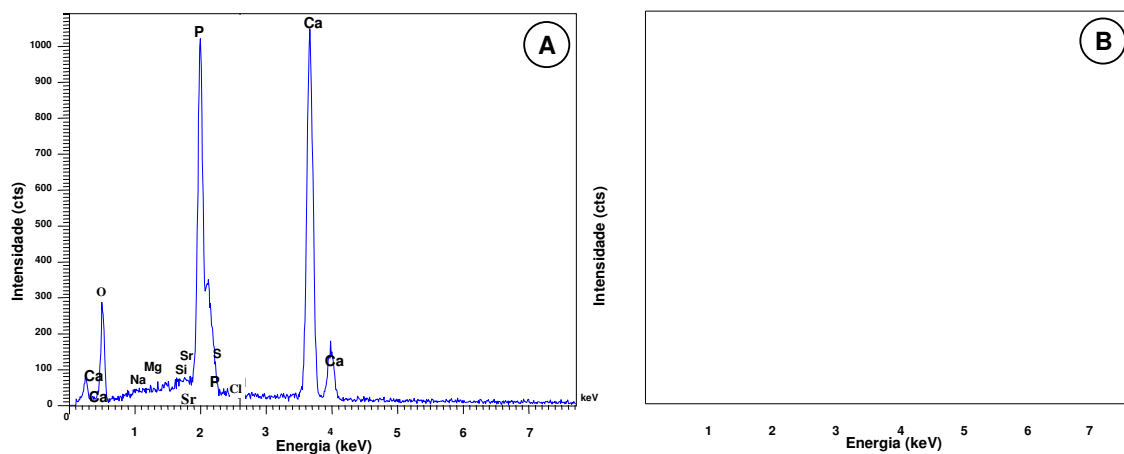
**Figura II.8** – Micrografia de MEV da amostra A1, antes do tratamento térmico, aumento de 10.000X, 15 keV (A); espectro de EDS com picos dos principais constituintes, Ca e P, e dos traços de elementos da amostra (B).



**Figura II.9** – Micrografia de MEV da amostra A2, após tratamento térmico a 900 °C (A); espectro de EDS com picos de maior intensidade de Ca e P, 10.000X, 15 keV (B).



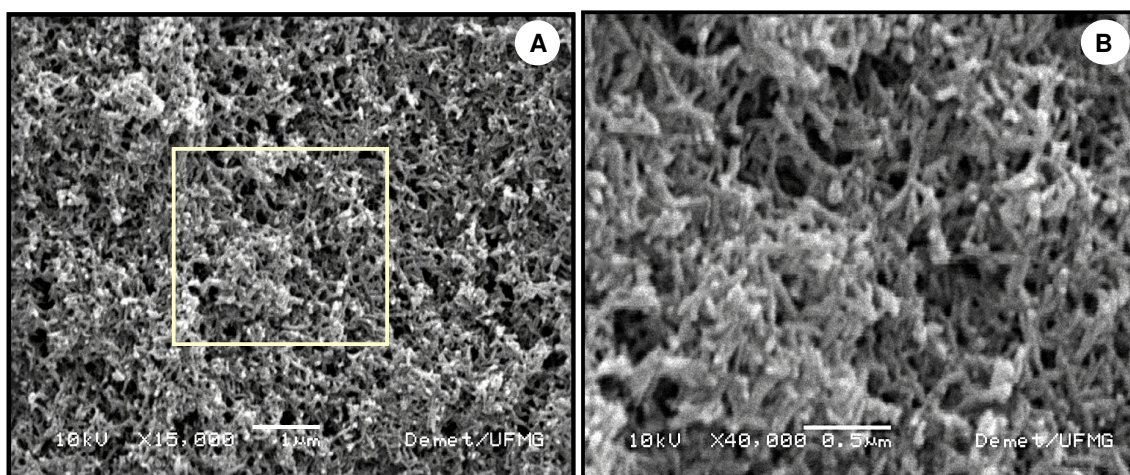
**Figura II.10** – Micrografia de MEV da amostra A10, após tratamento térmico a 900 °C, aumento de 2000X, 15 keV (A); espectro de EDS com picos de maior intensidade de Ca e P, e presença de picos de baixa intensidade de Mg, Si, K e Zn (B).



**Figura II.11** – Espectros de EDS da amostra A2 do pó sintetizado após tratamento térmico (A), e da amostra de HAc (B).

A morfologia e distribuição do tamanho de partículas do material sintetizado em R1 são mostradas na micrografia de MEV da Figura II.12. A coleta do material para MEV foi realizada logo depois que cessou a mistura dos reagentes. Verificou-se que as partículas precipitadas mostraram-se distribuídas uniformemente em toda a extensão do material. Em maior aumento na Figura II.12B, a área demarcada na Figura II.12A mostrou a forma acicular de tamanho nanométrico das partículas. Usualmente, esta morfologia é reportada para a hidroxiapatita precipitada por via úmida, que possui características similares às do tecido ósseo e dentário (Carrodeguas et al., 1999; Afshar et al., 2003; Liou et al., 2003; Mavropoulos et al., 2003).

O tamanho de partículas influencia a solubilidade do material, devido a sua área de superfície. Estudos relataram que o menor tamanho das partículas do pó de hidroxiapatita proporciona maior eficiência na sua solubilidade (Cheng et al., 1998; LeGeros, 2002). Entretanto, Mavropoulos, em 2003, não estabeleceu uma correlação entre a eficiência de dissolução e a área de superfície disponível. Os resultados de seu estudo com hidroxiapatita cálcio-deficiente mostrou que o tamanho dos cristais não influenciou marcadamente o comportamento de dissolução.



**Figura II.12** – Micrografias de MEV das partículas precipitadas no gel obtido da amostra A1 em R1 15.000X, 10 keV (A); em maior aumento, forma acicular de tamanho nanométrico das partículas, 40.000X, 10 keV (B).

### 2.2.5 Análise quantitativa de elementos químicos

Os resultados da análise quantitativa de elementos mostraram grande concentração em peso de Ca, em torno de 38%, e de P, em torno de 16%. Traços de outros elementos foram observados, mostrando uma quantidade em peso que variou de 0,001 a 0,2%. Estes elementos foram os mesmos detectados na análise elementar por XRF e EDS.

A proporção entre o Ca e P presente nas amostras foi calculado através da razão da fração molar do Ca e a fração molar do P ( $F_M \text{ Ca}/F_M \text{ P}$ ). A média obtida para a proporção molar Ca/P das amostras foi 1,73, com uma margem de erro de 4 a 5% (Tabela II.3). A razão Ca/P dos pós sintetizados podem ser comparados à razão Ca/P da hidroxiapatita pura relatada na literatura que varia de 1,5 a 2, sendo considerada ideal a razão Ca/P 1,67 (LeGeros, 1991). Todos os pós sintetizados neste estudo ficaram dentro da faixa de valores aceitos para a razão Ca/P da hidroxiapatita pura.

### 2.2.6 XRD

A cristalografia dos pós sintetizados foi analisada através dos espectros gerados pela difração de raios-X. As informações obtidas foram comparadas a resultados padronizados, disponíveis no banco de dados da JCPDS 2001, para os materiais cristalinos fosfatos de cálcio. As análises mostraram as dimensões da estrutura das moléculas e identificação das fases presentes nos pós sintetizados, que foram identificados como HAP.

Considerando que a unidade de célula da hidroxiapatita é do sistema de cristais hexagonais, calculou-se as dimensões da unidade celular dos cristais de HAP, com base nos valores obtidos nos difratogramas. A unidade de célula tetragonal é caracterizada por dois parâmetros variáveis,  $a$  e  $c$ , e a equação II.4 (Cullity, 1978) foi utilizada para obter suas medidas, baseando-se no ângulo  $2\theta$  dos planos adjacentes  $211$  e  $112$  do conjunto dos índices de Miller,  $h k l$ , do material sintetizado. Os cálculos realizados para obtenção dessas medidas podem ser observados no Anexo II, onde se encontra o exemplo para a amostra A3. Observou-se que os parâmetros da unidade celular do cristal de A3 e A10  $a = b$  variaram de 9,36 a 9,42 Å, e  $c$  foi de 6,87 Å (Tabela II.3). Estas medidas confirmaram resultados bem próximos ao padrão de valores dos parâmetros de rede cristalina da hidroxiapatita pura. As amostras A5 e A11 apresentaram  $a = b$  de 9,45 Å e  $c$  de 7,00 Å, em média (Tabela II.3). Os valores obtidos ficaram em torno de 5% do valor geralmente aceito na literatura para os parâmetros de rede da hidroxiapatita pura, mostrando evidências de que as amostras dos pós sintetizados foram realmente de hidroxiapatita. Webster, em 2004, também calculou os parâmetros da unidade celular do cristal de hidroxiapatita, baseando-se na distância,  $d$ , entre os planos  $200$  e  $002$ .

A análise qualitativa de difração de raios-X, após a secagem a 100°C de HAP, pode ser vista na Figura II.13, onde se observa pouca cristalinidade do material com a presença de grande quantidade de fase amorfa. Os picos analisados foram de hidroxiapatita, de acordo com a ficha 74-0566 catalogada na JCPDS 2001. O difratograma assemelha-se bastante aos difratogramas antes do tratamento térmico da hidroxiapatita relatados na literatura (Peters et al., 2000; Oliveira, 2004). Todas as amostras dos pós mostraram este padrão de difratograma indiferente do método de síntese usado e as variáveis durante o processo. Na figura II.14 as amostras de R1 e R2 podem ser comparadas aos espectros de hidroxiapatita pura antes do tratamento térmico. Após a secagem a

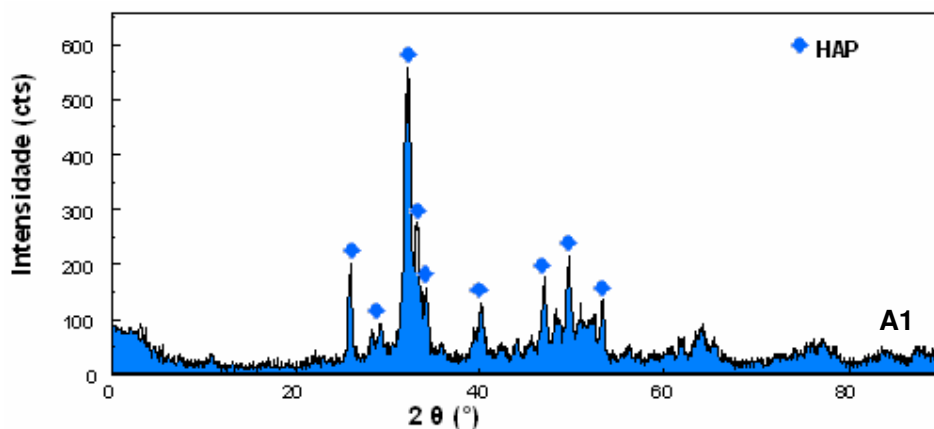
100°C a amostra dopada com zinco em R3 mostrou o mesmo padrão que os difratogramas das amostras não dopadas (Figura II.15).

**Tabela II.3 – Parâmetros estruturais de amostras dos pós sintetizados**

Amostra	Parâmetros da unidade de célula (Å)		Razão molar Ca/P
	$a = b$	$c$	
*hidroxiapatita pura	9,424	6,879	1,67
**hidroxiapatita cálcio-deficiente	9,420	6,880	1,64
HAc	9,436	6,882	1,16
A1	9,364	6,875	1,71
A2	9,418	6,875	1,71
A3	9,428	6,875	1,73
A5	9,449	6,980	1,64
A9	9,394	6,875	1,72
A10	9,432	6,876	1,72
A11	9,459	7,034	1,64

\*Jarcho, 1981; JCPDS, 2001; LeGeros, 2002

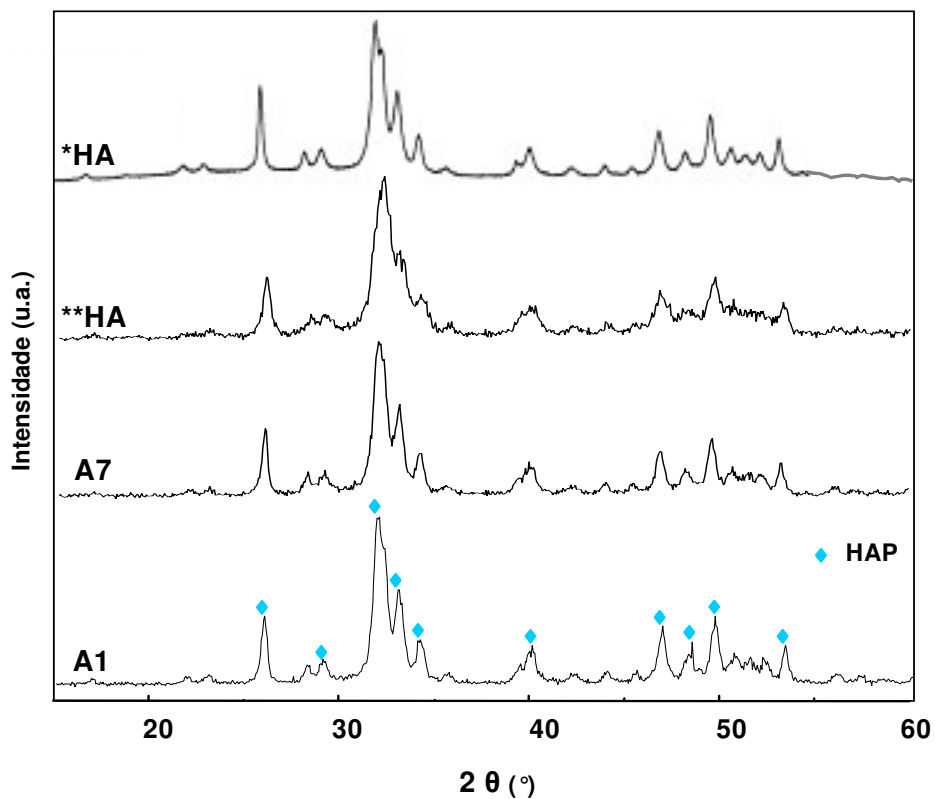
\*\*Mavropoulos et al., 2003



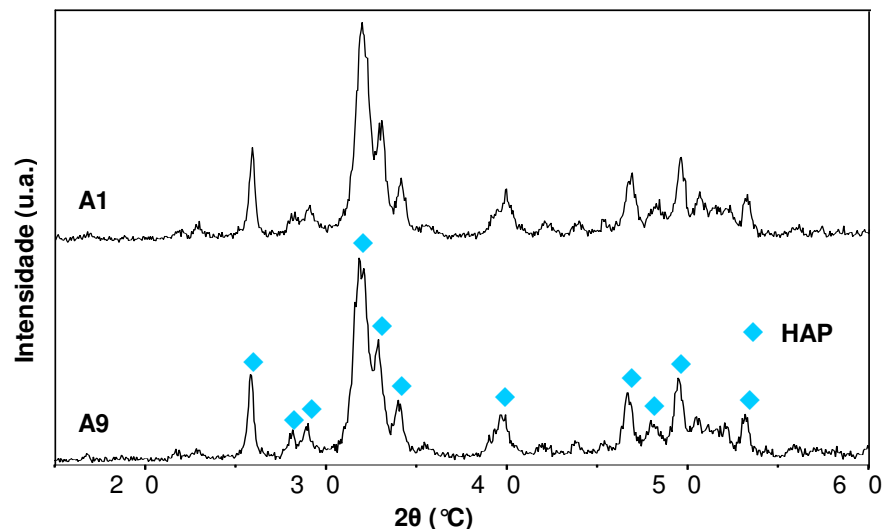
**Figura II.13** – Difratograma da amostra A1 de HAP, após secagem a 100°C, com grande quantidade de fase amorfa.

A cristalinidade de um material está relacionada à maior intensidade e menor largura dos picos de difração de raios-X. Nos difratogramas das amostras A1 e A3 de HAP, pode-se observar o aumento da cristalinidade após o tratamento térmico (Fig. II.16). As amostras depois da secagem a 100°C apresentaram-se nos espectros com picos mais largos, que indicam uma maior quantidade de material amorfo. Os picos tornaram-se mais estreitos à medida que a temperatura aumentou e

caracterizaram-se como materiais com alto grau de cristalinidade, com picos de maior intensidade. Estas características foram observadas nos estudos de Kieswetter, em 1994 e Peters et al., em 2000.

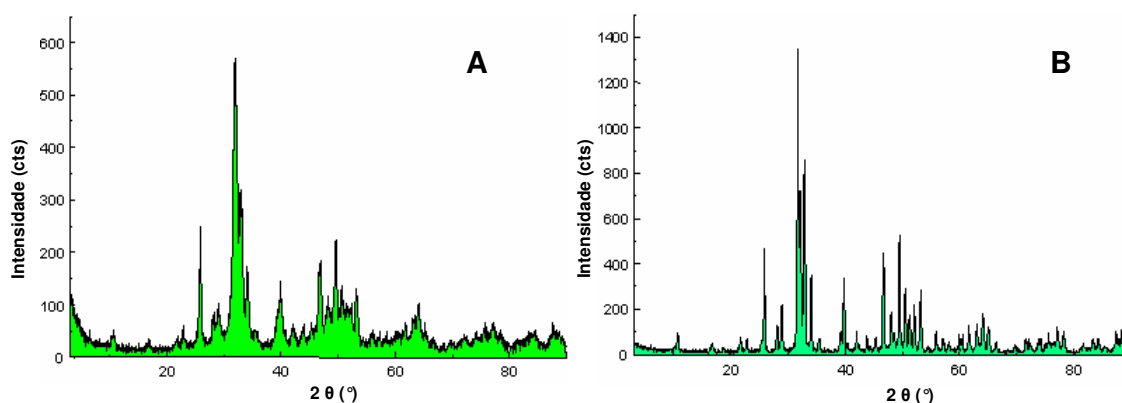


**Figura II.14** – Difratomogramas de HAP após secagem a 100°C na R1 (A1), na R2 (A7), e de hidroxiapatita pura relatada nos estudos de Peters et al., 2000 (\*HA) e Oliveira, 2004 (\*\*HA).



**Figura II.15** – Difratomogramas de HAP dopada com Zn (HAPZn), após secagem a 100°C, na amostra A9 em R3; e de HAP não dopada (HAP) na amostra A1 em R1.

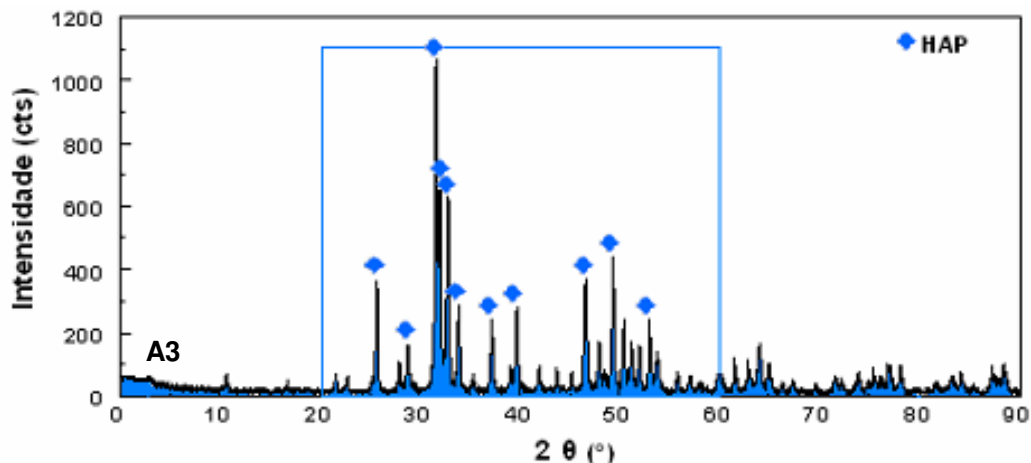
As quantidades de fase cristalina e fase amorfa das amostras foram estimadas pelos espectros de XRD, utilizando o programa *Peak Fitting Module*, do *software Origin*. Inicialmente, a área total do difratograma, amorfa e cristalina, foi calculada. Calculou-se também o valor referente à área amorfa, traçando uma linha na base dos picos formados em toda a extensão do difratograma. A área cristalina foi obtida diminuindo a área amorfa da área total do difratograma. Nas amostras A1 (R1), A7 (R2) e A9 (R3) a área amorfa antes do tratamento térmico correspondeu aproximadamente a 60% e a área cristalina a 40% em relação à área total do difratograma (Fig. II.16A). Depois do tratamento térmico a 900 °C a área total do difratograma das amostras correspondeu aproximadamente a 25% e 75% para a fase amorfa e cristalina, respectivamente (Fig. II.16B). Entre todas as amostras, A6, A5 e A10 apresentaram maior cristalinidade.



**Figura II.16** – Difratogramas de A1 após secagem a 100 °C, com picos largos e aproximadamente 60% de fase amorfa (A); e de A3 após o tratamento térmico a 900 °C com picos mais estreitos e de maior intensidade com aproximadamente 75% de fase cristalina (B).

Na Figura II.17 pode ser observado o difratograma que, de um modo geral, foi característico para as amostras de HAP após o tratamento térmico.

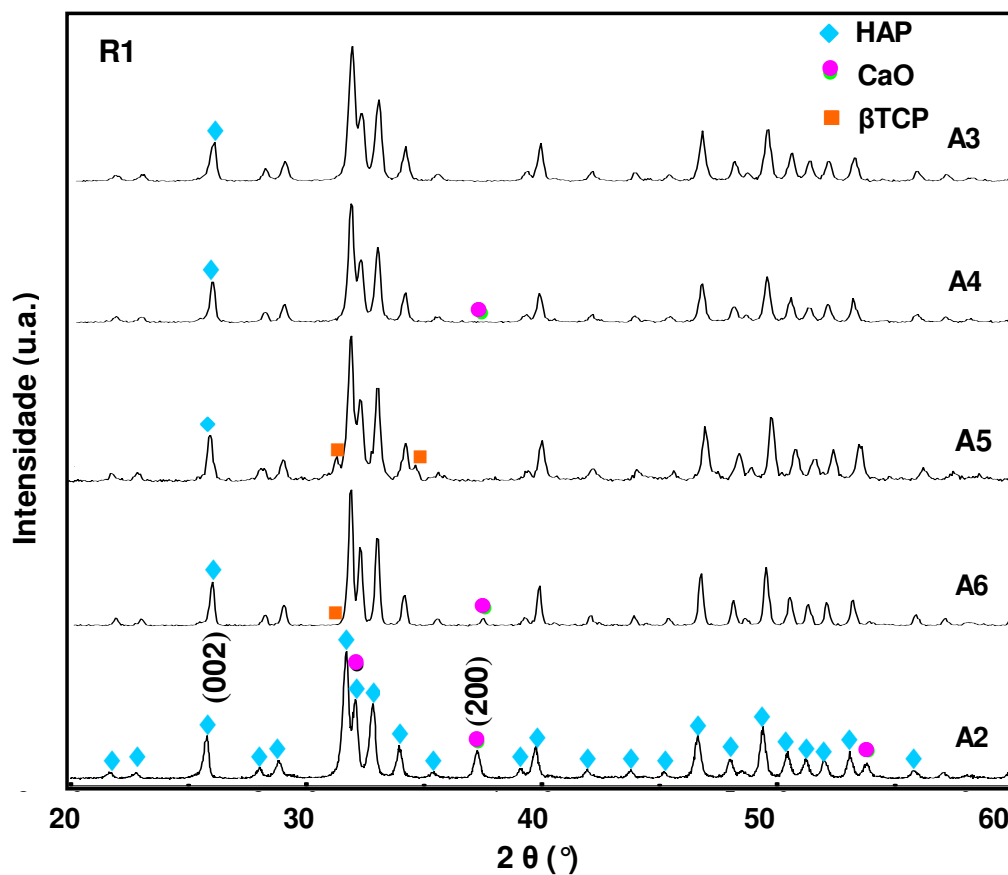
O processo aquoso usado na preparação de HAP propiciou uma reação, onde os íons  $\text{PO}_4^{3-}$  da solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  precipitaram, lentamente, íons  $\text{Ca}^{+2}$  da suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . O ácido foi gotejado dentro da solução alcalina, assim os íons hidroxilas presentes em  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  foram exauridos pela solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Murry et al., 1995; Osaka et al., 1995). O resultado foi o aparecimento da fase principal do material,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , observado depois da secagem a 100 °C. Após o tratamento térmico, além de hidroxiapatita, a fase CaO tornou-se presente no material. Assume-se que uma quantidade extra de  $\text{Ca}^{+2}$  permaneceu na mistura e, em seguida, reagiu com o oxigênio (O) do meio ambiente, devido à absorção de vapor de água do ar. Apesar dessa nova fase ser biocompatível (Monma et al., 1986) e, provavelmente, este óxido proporcionar maior resistência ao material, alguns parâmetros foram estudados para a obtenção de HAP pura como o tratamento químico, e diferentes modos de resfriamento após o tratamento térmico.



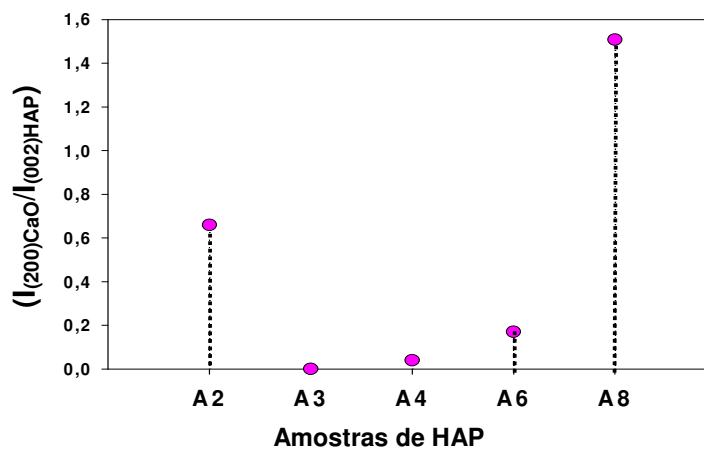
**Figura II.17** – Difratoograma da amostra A3 de HAP, após tratamento térmico a 900°C, com grande quantidade de fase cristalina.

As amostras A2, A4 e A6 obtidas pelo método de síntetização R1 mostraram hidroxiapatita como fase majoritária, acrescida de pequenas quantidades de óxido de cálcio, CaO. Na Figura II.18 observou-se que a amostra A2 apresentou maior quantidade de CaO, quando comparada às amostras A3, A4, A5 e A6. Notou-se que na amostra A6, onde se associou a temperatura 1.100°C ao tratamento químico houve uma diminuição da fase CaO e o aparecimento da fase  $\beta$ TCP. O tratamento químico com solução diluída de  $H_3PO_4$  aplicado a amostra A4 mostrou diminuição da fase CaO. Na amostra A3, a fase CaO desapareceu da composição de HAP. Nesta amostra o pH foi mantido em  $7 \pm 0,2$ , e no tratamento térmico a 900°C foi realizado o resfriamento brusco. O meio de mistura menos alcalino e a alta velocidade de resfriamento, provavelmente, evitaram a reação de  $Ca^{+2}$  extras nestas amostras. Em A5 onde foi usado o tratamento químico com a solução de  $H_3PO_4$  concentrado não foi observada a fase CaO, mas apareceu a fase  $\beta$ TCP. No método de síntetização R2 os pós de HAP, mostraram a presença de HAP e maior quantidade da fase CaO comparada a R1. Houve diminuição da fase CaO na amostra A8, quando comparada com a amostra A7, onde o parâmetro tratamento térmico com resfriamento brusco foi variado.

A intensidade do plano (200) do cristal de CaO e do plano (002) do cristal de HAP na amostra A2 (Fig. II.19) foram usados como um direto indicador da pureza do material precipitado, como nos estudos de Afshar et al., em 2003. A razão da intensidade relativa dos picos de HAP e CaO foi calculada através de padrões obtidos nos difratogramas. Esta razão foi de 0,659, 0,170, 0,040 e 0,00 nas amostras A2, A6, A4 e A3 respectivamente, em R1; e de 1,508 na amostras A8 em R2 (Fig. II.19).

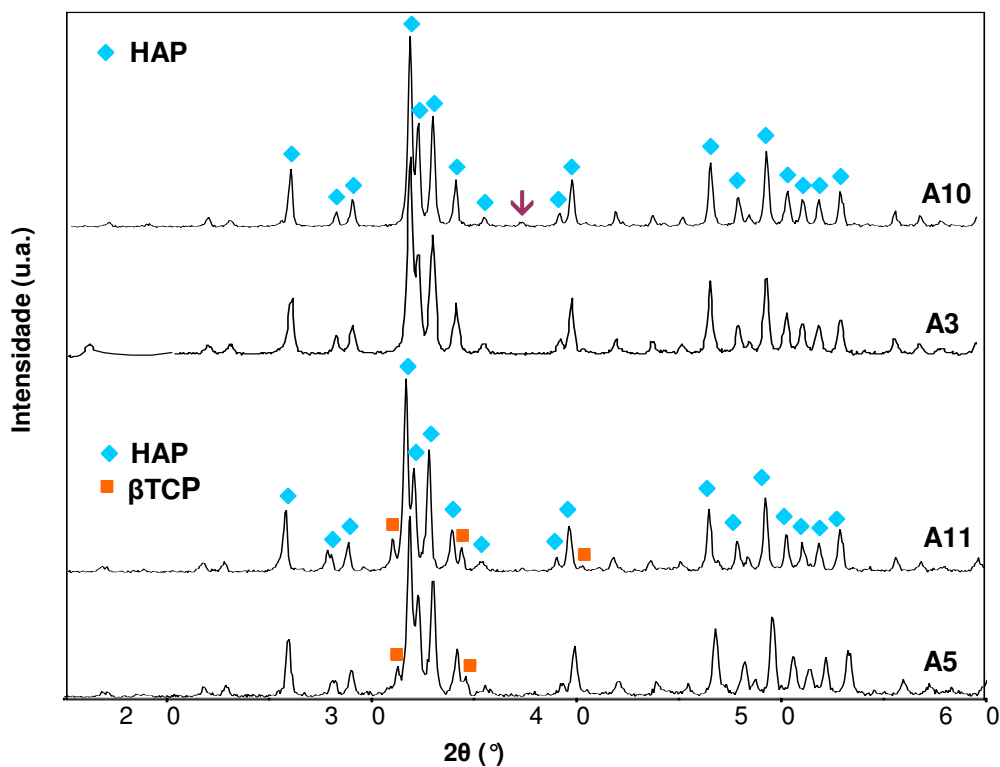


**Figura II.18** – Difrátograma padrão de HAP obtida através de R1 com presença da fase  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e da fase CaO (A2); diminuição gradativa de CaO nas amostras A6, A5 e A4; e desaparecimento de CaO após o tratamento térmico com resfriamento brusco (A3).



**Figura II.19** – Representação gráfica da intensidade relativa dos planos dos cristais de HAP (002) e dos planos dos cristais de CaO (200) em difratogramas de amostras das rotas R1 e R2.

Os difratogramas de A3 (HAP) e A10 (HAPZn), e os difratogramas de A5 (HAP $\beta$ TCP) e A11 (HAP $\beta$ TCPZn) podem ser observados na Figura II.20. Diante dos resultados supõe-se que os íons  $\text{Ca}^{+2}$  foram substituídos por íons  $\text{Zn}^{+2}$  na estrutura cristalina de HAP, já que não foi observada a formação de uma nova fase detectável pelo método de caracterização usado. O Zn parece ter incorporado tanto à amostra A10 quanto à amostra A11. Isto está de acordo com os relatos de Ito et al., em 2002, Sogo et al., em 2004, Webster et al., em 2004, Sogo et al., em 2005. Entretanto, Miao et al., em 2004, relataram a presença de grãos isolados de Zn na superfície de filmes de hidroxiapatita/flúor dopados com Zn, onde os picos dos difratogramas de HAZn mostrou menor intensidade e apresentaram-se mais largos que os de HA.



**Figura II.20** – Difratogramas com principais picos de A3 (HAP) e A5 (HAP $\beta$ TCP) e de CaP dopadas com Zn, A10 (HAPZn) e A11 (HAP $\beta$ TCPZn); presença de óxido (seta).

O Zn pode inibir o crescimento dos cristais da apatita (Yamaguchi et al., 1987 e Moonga e Dempster, 1995, Ito et al., 2000; Costa, 2004), quando usado em concentrações muito altas. A concentração de 1% em peso de Zn usada na síntese dos pós de CaP, no nosso estudo, parece ter interferido muito pouco no crescimento dos cristais. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Ito et al., em 2002, que sintetizaram TCPZn e o compósito cerâmico HA/TCPZn, e Wei e Akinc, em 2005, que sintetizaram  $\beta$ TCPZnSi. Em 2004, Sogo et al., relataram que a síntese de  $\alpha$ TCP dopado com Zn em concentrações menores que 0,26% em peso, preferencialmente menores que 0,11%, não apresentou nenhuma dificuldade e que o Zn foi incorporado ao  $\alpha$ TCP. Quantidades até 1,26% foram suficientes

para proporcionar uma alta solubilidade ao material e quantidades maiores, 3,49 a 8,11%, levaram a um retardamento do crescimento de cristais de apatita.

Observou-se que em A11 não houve grande quantidade de fase  $\beta$ TCP presente, e que esta fase aumentou levemente em relação a A5 (Fig. II.20). Sogo et al., em 2005, reportaram que o conteúdo de fase  $\beta$ TCP aumentou na estrutura de HA, à medida que o conteúdo de Zn foi aumentado. Assume-se que a concentração de Zn usada em A11, praticamente, manteve a fase  $\beta$ TCP já presente em A5 e que, talvez, o aumento desta concentração pode levar à formação de maior quantidade desta fase nos materiais. Assim materiais CaP com maior ou menor dissolução podem ser formados, considerando-se que este material é mais solúvel e reabsorvível que a HA estequiométrica.

Na amostra de A3 (Fig. II.20), além da fase majoritária, HAP, notou-se a presença de pico de leve intensidade (seta) que pode estar relacionado com a presença de óxido de cálcio na amostra, CaO, já que em outras amostras de HAP foram notados a presença destes mesmos picos. A possibilidade do Zn não ter sido incorporado na HAP e precipitado em forma de óxido de zinco, ZnO, não pode ser descartada, como também assumiu Sogo et al., em 2005.

Costa et al., em 2004 relataram que a hidroxiapatita cálcio-deficiente contendo Zn decompôs em  $\text{Ca}_{19}\text{Zn}_2(\text{PO}_4)_{14}$ . A concentração de Zn e métodos de sintetização usados podem ter contribuído para a não comprovação deste fato pelo nosso estudo.

### 2.2.7 FTIR

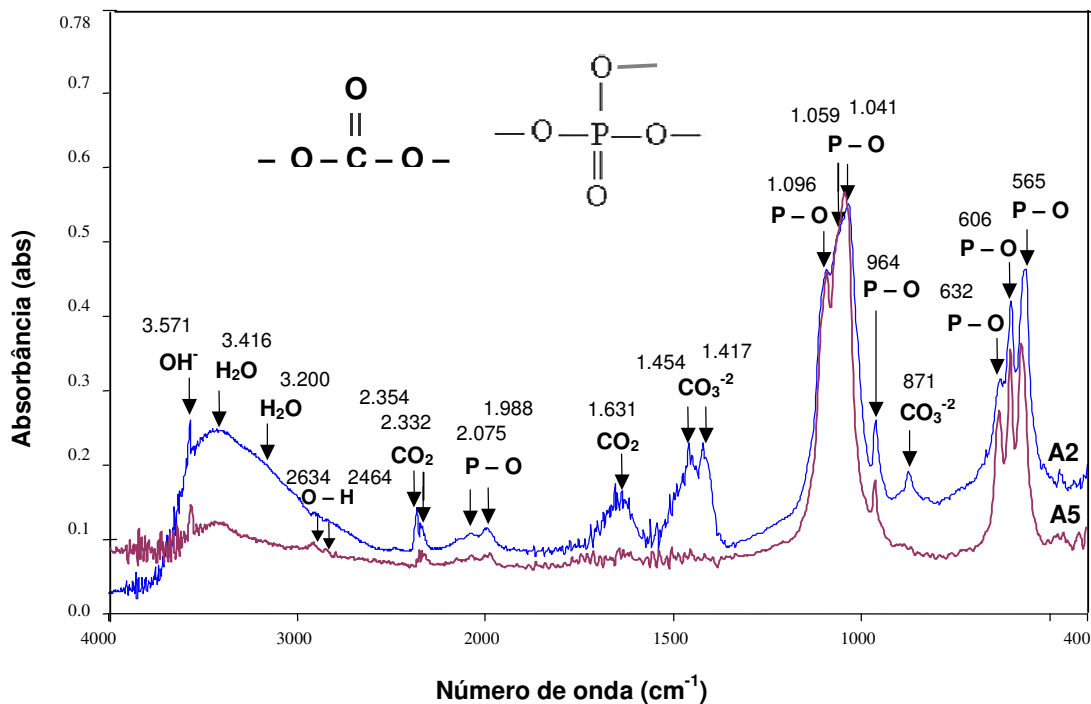
A estrutura molecular do pó sintetizado apresentou excitações vibracionais resultantes das ligações interatômicas fortes (ligações covalentes) dos grupos funcionais específicos presentes no material. O gráfico resultante da energia absorvida pela amostra em razão do número de onda em que esta energia foi absorvida é representado pelo espectro de FTIR. O perfil dos espectros de FTIR de CaP mostraram concordância com espectros encontrados na literatura (Tabela II.4).

Na Figura II.21 pode-se observar os espectros de FTIR de A2 e A5. As bandas referentes aos íons  $\text{PO}_4^{-3}$  apareceram no espectro em níveis variados de frequência, nos modos de vibrações de estiramento e de dobramento. As bandas no modo de vibração de estiramento ( $\nu_3$ ) foram evidenciadas em  $1096\text{ cm}^{-1}$ ,  $1059\text{ cm}^{-1}$  e  $1041\text{ cm}^{-1}$  como íons  $\text{PO}_4^{-3}$ , em  $964\text{ cm}^{-1}$  como  $\text{PO}_4^{-3}$ , e em  $632\text{ cm}^{-1}$  como  $\text{PO}_4^{-3}$  lábil, ou seja, com presença de OH livre. As bandas evidenciadas em  $606$  e  $565\text{ cm}^{-1}$  relacionam-se aos íons  $\text{PO}_4^{-3}$ , no modo de vibração de dobramento ( $\nu_4$ ). Na frequência  $2077\text{ cm}^{-1}$  e  $1989\text{ cm}^{-1}$  caracterizaram-se bandas secundárias de íons  $\text{PO}_4^{-3}$ , e a banda referente à OH da ligação P – OH apresentou-se em  $871\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabela II.4 – Bandas principais no infravermelho para hidroxiapatita\* e HAP com seus respectivos grupos funcionais**

Frequência (cm <sup>-1</sup> ) (hidroxiapatita*)	Frequência (cm <sup>-1</sup> ) (HAP)	Grupo funcional
3569	3571	íon OH <sup>-</sup> estrutural
3400 – 3200	3416 – 3200	Molécula de H <sub>2</sub> O adsorvida ou estrutural
1400 – 1445	1417 e 1454	$\nu_3$ CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>
837	–	$\nu_2$ CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> (tipo A - ligação O – H)
873	871	$\nu_2$ CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> (tipo B - ligação P – OH)
2368 – 2.337	2354 e 2332	CO <sub>2</sub>
1550	1631	CO <sub>2</sub>
1116 – 1033	1096, 1059 e 1041	$\nu_3$ PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>
950 – 963	964	$\nu_1$ PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>
605 – 566	606 – 565	$\nu_2$ PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>
632	632	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> lábil

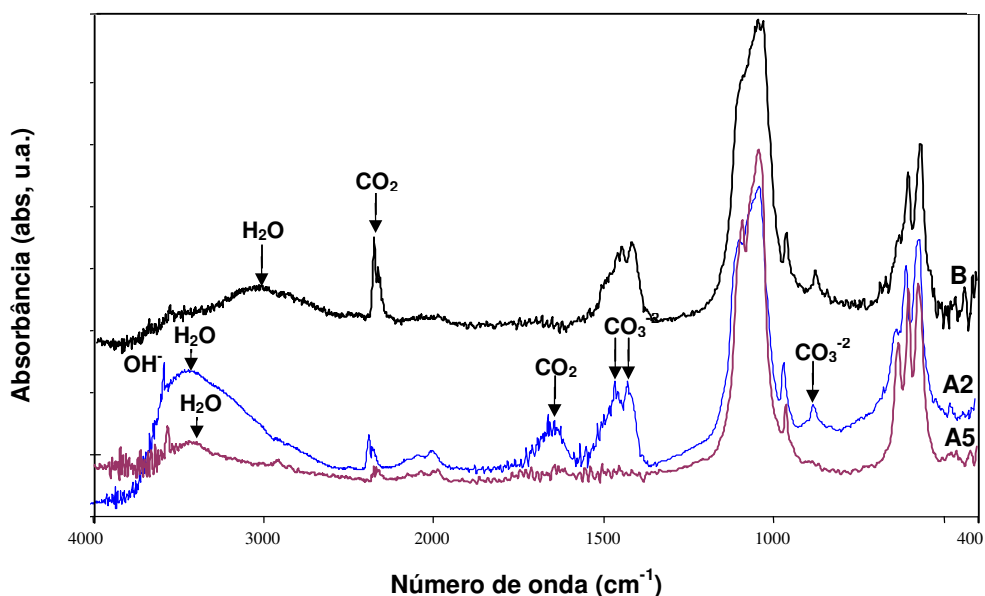
\* Cheng et al., 1998; Ogawa e Plepis, 2001; Di Renzo et al., 2001; Afshar et al., 2003; Chang et al., 2003; Oliveira et al., 2004



**Figura II.21** – Espectro de FTIR com as bandas de absorção no infravermelho referentes às ligações químicas dos grupamentos funcionais da composição da amostra A2 (HAP) e A5 (HAPβTCP).

A presença de banda estreita em  $3571\text{ cm}^{-1}$  foi observada na região correspondente às vibrações de estiramento de íons  $\text{OH}^-$  estruturais, como também na região correspondente à banda larga que inicia em  $3416\text{ cm}^{-1}$  e centraliza perto de  $3200\text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente. Esta banda é intensificada à medida que o pH é reduzido durante a síntese, indicando presença de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  estruturais ou adsorvidas na amostra. Quanto mais baixo o pH na preparação do material, mais água ele contém na sua estrutura (Cheng et al., 1998). Na Figura II.22, os espectros de FTIR de A2 e A5 sintetizadas em  $\text{pH } 7 \pm 0,2$  podem ser comparados ao espectro de HA (B) sintetizada em  $\text{pH } 10 \pm 1$  (Oliveira, 2004), mostrando maior quantidade de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  nas suas partículas.

Os íons  $\text{CO}_3^{2-}$  são caracterizados pelos modos de vibração de estiramento da ligação C – O nos espectros de FTIR. A inclusão de íons carbonato,  $\text{CO}_3^{2-}$ , nos cristais de hidroxiapatita podem acontecer pela substituição de íons  $\text{OH}^-$  e íons  $\text{PO}_4^{3-}$  durante o processo de precipitação da hidroxiapatita. O espectro de HAP mostra a presença de  $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$  com substituição de íons carbonato por íons hidroxila em  $1417\text{ cm}^{-1}$  e por íons fosfatos em  $1454\text{ cm}^{-1}$  (Fig. II.22A1), em concordância com Cheng et al., em 1998, que relata a presença de bandas de diferentes números de ondas de  $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$  substituindo  $\text{OH}^-$  (tipo A) e substituindo  $\text{PO}_4^{3-}$  (tipo B). Entretanto, a distinção entre estes dois tipos de  $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$  é questionável na literatura.



**Figura II.22** – Espectros de FTIR de A2 e A5 sintetizadas em  $\text{pH } 7 \pm 0,2$  com presença de maior quantidade das moléculas de água; e hidroxiapatita (Oliveira, 2004) sintetizada em  $\text{pH } 10 \pm 1$  (B).

Os íons  $\text{CO}_2$  são mais absorvidos pela banda de  $\text{CO}_3^{2-}$  em  $1417\text{ cm}^{-1}$ , devido à sua reação com a superfície dos íons  $\text{OH}^-$  formando  $\text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ , onde há a presença de íons  $\text{HCO}_3^{2-}$ . A banda de  $\text{CO}_3^{2-}$  em  $1454\text{ cm}^{-1}$  não é influenciada pela absorção de  $\text{CO}_2$ , pois é impossível a reação de  $\text{CO}_2$  com a superfície dos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  (Cheng et al., 1998). Assim, provavelmente, o  $\text{CO}_2$  incorporado dentro de

HAP existe somente como  $\nu_2\text{CO}_3^{-2}$ , devido à presença da banda em  $871\text{ cm}^{-1}$  (Renzo et al., 2001), que caracteriza o modo de vibração de estiramento de íons  $\text{CO}_3^{-2}$  e não pelo modo de vibração de íons  $\text{HCO}_3^{-2}$ . Há relatos na literatura (Cheng et al., 1998) que os íons  $\text{HCO}_3^{-2}$  são mais solúveis em água que os íons  $\text{CO}_3^{-2}$ .

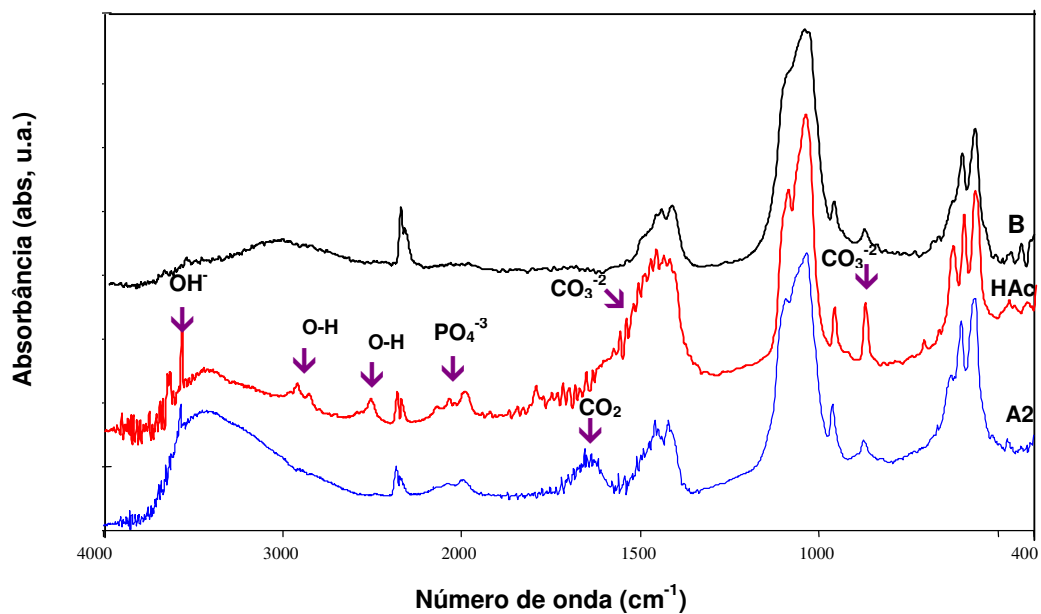
O pH influencia a quantidade de íons  $\text{CO}_3^{-2}$  incorporados na hidroxiapatita sintetizada. Com a solução de pH mais alto, os íons  $\text{CO}_3^{-2}$  são substituídos por íons  $\text{OH}^-$  e não por íons  $\text{PO}_4^{-3}$ . A incorporação de  $\text{CO}_2$  na estrutura de hidroxiapatita, portanto é marcadamente influenciada pela solução de pH durante sua preparação (Cheng et al., 1998). Nos espectros da Figura II.22 comparou-se a incorporação de  $\text{CO}_2$  em A2, A5 e HA da literatura (Oliveira, 2004) sintetizada com  $\text{pH } 10 \pm 1$  (B).

O uso de atmosfera controlada durante o processo de precipitação reduz significativamente o conteúdo de carbonato no material (Cheng et al., 1998; Afshar et al., 2003). Neste estudo, todas as amostras dos materiais CaP foram sintetizadas na presença de ar do meio ambiente, o que explica a presença de  $\text{CO}_2$ .

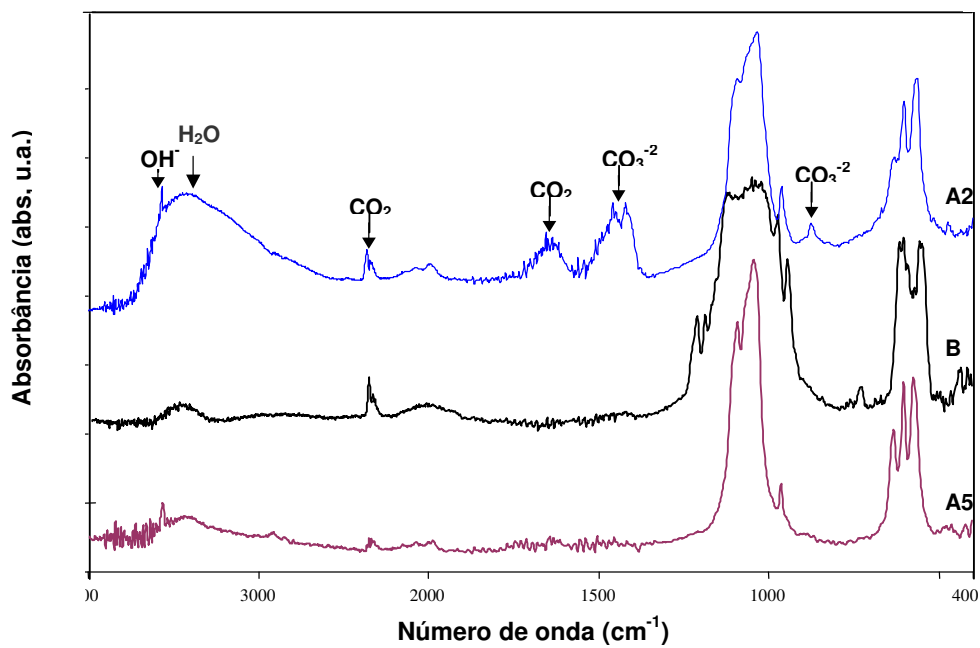
Na Figura II.23 a amostra A2 mostrou-se como uma hidroxiapatita carbonada, mesma constituição do material natural de ossos e dentes (Jones, 2001; LeGeros, 2002). Seu espectro de FTIR pode ser comparado ao de HAc e ao de HA da literatura (B), que também caracterizaram-se como hidroxiapatita carbonada. As setas indicam os grupamentos funcionais onde foram notadas diferenças entre os materiais, o que pode indicar mudanças nas suas características.

Na Figura II.24 pode ser observado o espectro de FTIR do material bifásico sintetizado neste estudo, A5 (HAP $\beta$ TCP), que pode ser comparado com um material CaP bifásico da literatura (B) (Oliveira, 2004), e com A2 (HAP). Os íons  $\text{CO}_3^{-2}$  presentes em HAP não se apresentaram no espectro de HAP $\beta$ TCP, provavelmente devido ao tratamento químico com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrado. Os íons  $\text{CO}_3^{-2}$  foram substituídos por  $\text{PO}_4^{-3}$ .

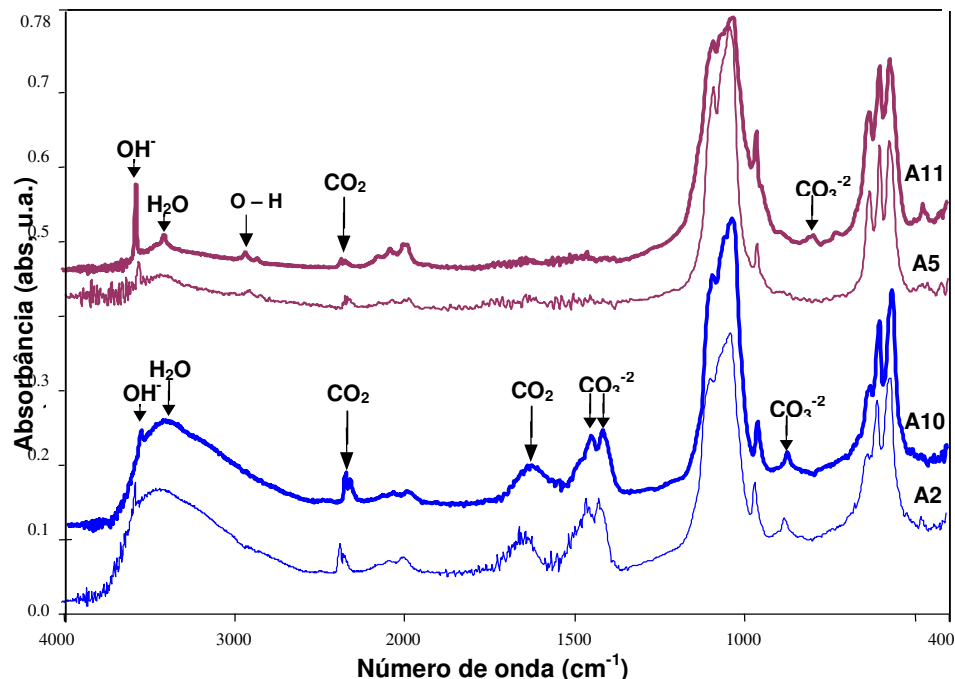
Os materiais CaP dopados com Zn podem ser analisados e comparados a materiais CaP não dopados com Zn na Figura II.25. Os espectros de FTIR entre estas amostras não mostraram diferenças significativas quando comparadas. Observou-se pequenas diferenças entre os espectros de FTIR da Figura II.25, como uma diminuição de íons  $\text{OH}^-$  em A10 (HAPZn) quando comparado com A2 (HAP), e um aumento destes íons em A11 (HAP $\beta$ TCPZn) em relação a A5 (HAP $\beta$ TCP). Estas diferenças parecem não ter tido significância, já que a ausência de novas bandas absorvidas indicou que não aconteceram novas ligações no material dopado com Zn. Isto sugeriu, mais uma vez, a total incorporação dos íons  $\text{Zn}^{+2}$  nos materiais CaP.



**Figura II.23** – Espectros de FTIR da amostra A2 de (HAP), HAc, e HA da literatura (Oliveira, 2004) (B).



**Figura II.24** – Espectros de FTIR de A2 (HAP), HAβTCP da literatura (B) (Oliveira, 2004) e A5 (HAPβTCP).



**Figura II.25** – Espectros de FTIR de A2 (HAP) e A10 (HAPZn), A5 (HAP $\beta$ TCP) e A11 (HAP $\beta$ TCPZn).

Neste estudo observou-se a presença do Zn na estrutura de CaP, como nos recentes estudos relatados na literatura a respeito desse processo (Ito et al., 2000; Ito et al., 2002; Costa et al., 2004; Miao et al., 2004; Sogo et al., 2004; Webster et al., 2004; LeGeros et al., 2005; Sogo et al., 2005; Wei e Akink, 2005). Entretanto, não foi determinado o mecanismo pelo qual o Zn é incorporado a esta estrutura. Pesquisas serão necessárias para o entendimento deste mecanismo, bem como para determinar as concentrações de Zn ideais nos materiais CaP para serem considerados estimuladores da proliferação de células osteoblásticas. Para tal torna-se necessário repetir os métodos já usados e experimentar outros métodos de caracterização.

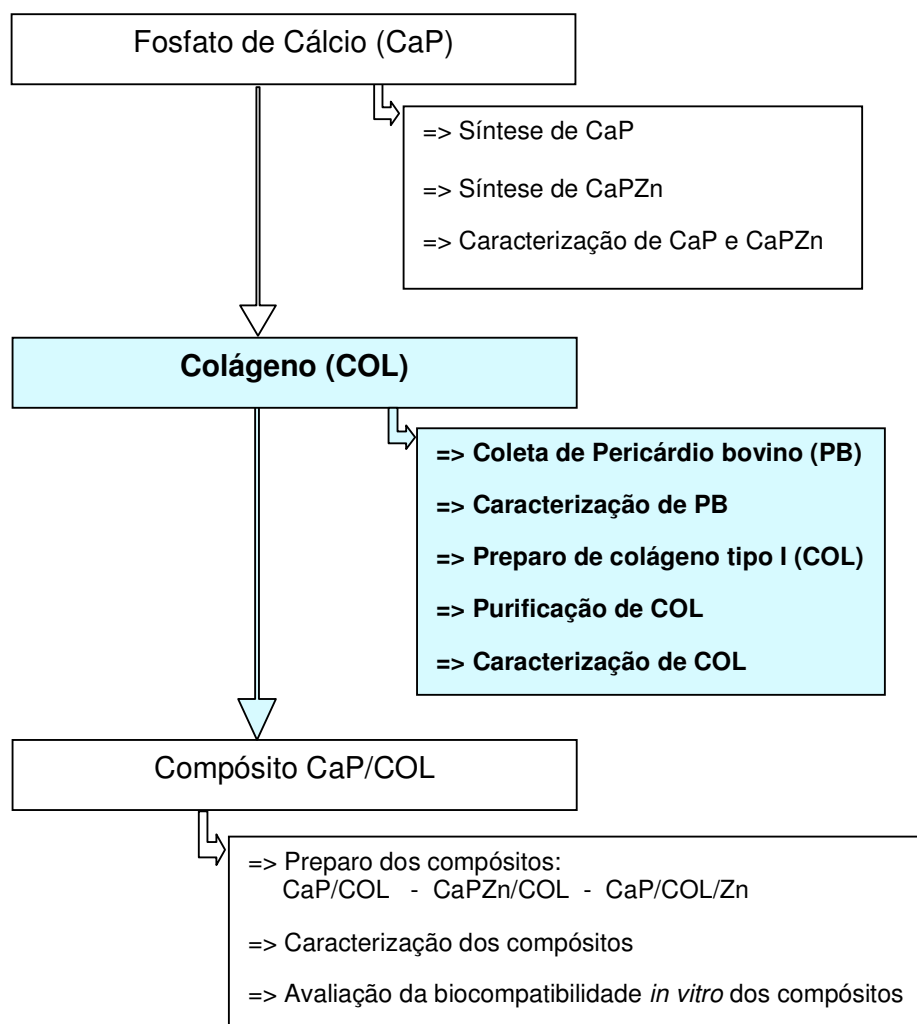
Diante da análise dos resultados dos pós sintetizados pode-se dizer que foram obtidos os materiais HAP e HAP $\beta$ TCP dopados e não dopados com íons Zn<sup>+2</sup>. Sintetizou-se hidroxiapatita pura com uma estrutura cristalina, quando se usou o tratamento térmico com resfriamento lento; e o material bifásico (HAP $\beta$ TCP) quando, além do tratamento térmico com resfriamento lento, acrescentou-se a variável tratamento químico com ácido ortofosfórico concentrado. HAP apresentou razão Ca/P próxima a 1,67, mostrando-se maior que a da hidroxiapatita comercial (Hac) analisada neste estudo, considerada hidroxiapatita pura. Considerando-se que a razão molar Ca/P diminui em função da diminuição da concentração de Ca e P na amostra e que sua dissolução aumenta com a diminuição da razão Ca/P, supõe-se que a capacidade de dissolução dos pós de HAP é menor em relação à HAC, hidroxiapatita cálcio-deficiente encontrada na literatura e HAP $\beta$ TCP; e, entre as amostras dos pós sintetizados não dopados com zinco, supõe-se que a capacidade de dissolução dos materiais mostrou a seguinte

ordem crescente: A5 > A2 > A3 (Tabela II.3). Quanto à capacidade de dissolução dos materiais dopados com zinco em relação aos não dopados, A11 mostrou-se igual a A5 e foi maior comparada a A3; e entre os materiais dopados com  $Zn^{+2}$ , A11 foi maior que A10 (Tabela II.3). Assim, pode-se dizer que a presença da fase  $\beta$ TCP e a presença de Zn tornaram os materiais mais propensos a uma maior solubilidade em relação à hidroxiapatita pura sintetizada neste estudo.

Os materiais fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por processos simples que, associando variáveis de síntese, resultam em diferentes materiais, com propriedades específicas para sua aplicação como um biomaterial, ou associado a outros materiais que possam melhorar suas propriedades.

## CAPÍTULO III

A segunda etapa deste trabalho encontra-se em evidência no fluxograma apresentado na Figura III.1 e corresponde ao Capítulo III.



**Figura III.1** – Fluxograma das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho, com evidência da segunda etapa.

# 1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

## 1.1 MATERIAIS

### 1.1.1 Materiais usados na obtenção de colágeno:

Todos os solventes, reagentes, materiais, ferramentas e equipamentos utilizados na obtenção do colágeno foram especificados neste item, denominado Materiais.

- acetona P. A., Vetec<sup>®</sup> Química Fina LTDA;
- ácido acético glacial 100%, CH<sub>3</sub>COOH - Merck<sup>®</sup> Indústrias Químicas LTDA;
- ácido clorídrico P.A. 36,5 – 38%, HCl - Vetec<sup>®</sup>;
- ácido sulfúrico 95 – 99%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Vetec<sup>®</sup>;
- adjuvante completo de Freund, lote 102 K8930 - Sigma<sup>®</sup>;
- adjuvante incompleto de Freund, lote 62 K8928 - Sigma<sup>®</sup>;
- agitador de baixa velocidade – modelo M71735, Roto Mix<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento (DPD) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED);
- agitador de tubos – Minishaker MS1, IKA<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- agitador de tubos AP 56 - Phoenix<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- agitador giratório - Glas-Col<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- agitador magnético e aquecedor – CERAMAG Midi, IKA<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- água destilada, destilador da Área Multifins, do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento (DPD) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED);
- albumina bovina (BSA) – pureza 98%, pH 7,0 – ICN Biomedicals<sup>®</sup>;
- álcool ISO-propílico P.A., C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O – Vetec<sup>®</sup>;
- anti-IGg de camundongo conjugado com peroxidase, anticorpo desenvolvido em coelho, lote 034H8814 - Sigma<sup>®</sup>;
- balança analítica – Modelo AB204, Mettler Toledo, da Área Multifins, DPD – FUNED;
- balança analítica – Modelo PM4000, Mettler, da Área Multifins, DPD – FUNED;
- capela de exaustão - Polyscience<sup>®</sup>, do Laboratório de Biologia Molecular III, DPD – FUNED;
- carbonato de sódio, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - Sigma<sup>®</sup>;
- centrífuga de eppendorf – modelo 5415C, Centrifuge, do Laboratório de Biologia Molecular III, DPD – FUNED;
- centrífuga J2 – MC, Beckman, da Área Multifins, DPD – FUNED;

- cloreto de potássio, KCl - Sigma<sup>®</sup>;
- cloreto de sódio, NaCl P.A. - Vetec<sup>®</sup>;
- colágeno tipo I de pele de bezerro, solúvel em ácido, lote 101K7025 - Sigma<sup>®</sup>;
- condutivímetro CD-20 - Digimed<sup>®</sup>, da Área Multifins, DPD – FUNED;
- conjugado IgG de camundongo anti-IgG de coelho ligado à peroxidase, produto n° A-2028, lote 034H8814 - Sigma<sup>®</sup>;
- dicromato de potássio, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> – Isofar<sup>®</sup> P.A. (A.C.S.) Indústria e Comércio de Produtos Químicos LTDA;
- dimetilaminobenzaldeído, DAB;
- eppendorfs; peneira de plástico de malha fina; pinça de Teflon; pinças e tesouras cirúrgicas; pipetas Pasteur; placas de vidro; tubos Falcon; tubos plásticos para coletor;
- formaldeído, HCHO - Labsynth<sup>®</sup>;
- freezer – modelo 260, CCE<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- freezer biológico - Bio-Freezer<sup>®</sup>, Modelo 8523, Forma Scientific<sup>®</sup>, da Área Multifins, DPD – FUNED;
- funil de Büchner e funil de vidro sinterizado Pirex<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- glicerina bi-destilada U.S.P., C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>(OH)<sub>3</sub> - LabSynth<sup>®</sup> Produtos para Laboratório LTDA;
- glicina P.A., H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>COOH -
- hidróxido de sódio P.A., NaOH - Vetec<sup>®</sup>;
- indicador universal de pH 0-14 em tiras – Merck<sup>®</sup>;
- liofilizador - Edwards<sup>®</sup> do Laboratório de Enterotoxinas, DPD – FUNED;
- medidor de pH DMPH-2 - Digimed<sup>®</sup>, da Área Multifins, DPD – FUNED;
- membrana de nitrocelulose - Sigma<sup>®</sup>
- metanol absoluto - Sigma<sup>®</sup>;
- minipipetas e ponteiras para minipipetas - Finpipette Digital<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- miniprocessador de alimentos – HC 21 Black & Decker<sup>®</sup>;
- nitrato de prata 99,97%, AgNO<sub>3</sub> - Sigma<sup>®</sup>;
- nitrogênio líquido;
- padrão de proteínas de alto peso molecular SDS-7B, lote 125 H9408 - Sigma<sup>®</sup>;
- papel celofane;
- pepsina 1:10.000 – Vetec<sup>®</sup>;
- pericárdio bovino coletado no abatedouro FRICON, Contagem – MG;
- peróxido de hidrogênio P.A., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Vetec<sup>®</sup>;
- persulfato de amônio, PSA, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, Vetec<sup>®</sup>;
- refrigerador – modelo R310, Eletrolux<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;

- resina DEAE-*sepharose* (dietilaminoetil ligado a *sepharose*) CL-6B – Pharmacia Biotech®;
- ringer lactato de sódio, Ringer lactato - Laboratório Sanobiol® LTDA;
- sacos para diálise de membrana de celulose, diâmetro 27 mm, capacidade 175 mL/t - Sigma®
- sistema de cromatografia líquida de baixa pressão - Pharmacia®, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- *software Gel – Pro Analyser*® versão 4.0 para Windows 95/NT, Media Cybernetics, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- *software Sigma Plot*® versão 4.0 para Windows, SPSS, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- solução salina tamponada com fosfato, PBS;
- substrato enzimático orto-fenilenodiamino, OPD;
- tartarato de sódio P.A. - Labsynth®;
- TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, - Sigma®;
- tris (hidroximetil) amino metano, Tris Base, 99,9%, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, - Sigma®;
- triturador Ultra-Turrax T25 - Janke & Kunkel IKA®, acoplado com lâmina UT – Dispersing Tool T25 IKA®, do Laboratório de Biologia Molecular III, DPD – FUNED.
- TSE,
- tween 20, polioxietilensorbitano ou monolaurato - Labsynth®;
- uréia P.A., H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub>, ACS ( de acordo com American Chemistry Society) F. Maia® Indústria e Comércio LTDA.

### 1.1.2 Materiais e equipamentos utilizados na caracterização do colágeno:

- aparelho de fluorescência de raios-X PW 2400 – Phillips®, do Laboratório de Análise por Raios-X , DEMET/EE - UFMG;
- difratômetro, modelo PW1710 - Philips®, do Laboratório de Raios-X , DEMET/EE - UFMG;
- equipamento para eletroforese – Modelo 1000/500 – Bio-Rad®, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED.
- equipamento para Western Blot – Sistema Mini Bio-Rad®, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, DPD – FUNED;
- espectrofotômetro de absorção atômica, modelo Aanalyst 300 – Perkim-Elmer®, do Laboratório de Análises Químicas, DEMET/EE - UFMG;
- espectrofotômetro de infravermelho, modelo Paragon 1000 – Perkim-Elmer®, do Laboratório de Materiais Cerâmicos, DEMET/EE – UFMG;
- espectrofotômetro de UV/visível, modelo Ultrospec 1000 - Pharmacia Biotech®, da Área Multifins, DPD – FUNED;
- lupa estereoscópica modelo Steni SV8 – Zeiss®, acoplada com máquina fotográfica, modelo M35W – Zeiss®, do Laboratório de Metalografia e Tratamentos Térmicos, DEMET/EE - UFMG;

- microscópio biológico, modelo CH30 – Olympus®, acoplado com sistema de exposição automática para fotomicrografia, modelo PM-104K3 - Olympus®, LASMAT – DEMET/EE-UFMG;
- microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM - 6360 LV – JEOL®, acoplado com espectrômetro de energia de raios-X (EDS) modelo Quest – Thermo Noram®, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, DEMET/EE – UFMG.

## **1.2 COLETA DE PERICÁRDIO BOVINO (PB)**

O colágeno foi extraído do saco pericárdico bovino. O PB intacto foi coletado manualmente, de animais machos em idade de abate, 18 a 24 meses, em abatedouro, sob condições higiênicas. O saco pericárdico foi separado na altura dos vasos da base do coração e foi lavado abundantemente em água corrente antes de ser dissecado. Em seguida, os tecidos adjacentes ao tecido conjuntivo denso do pericárdio como, tecido adiposo, conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos, foram removidos com a utilização das mãos, pinças e tesoura cirúrgica. O PB foi lavado com solução de Ringer lactato por duas vezes. O tecido foi cortado em retalhos, aproximadamente quatro a cinco centímetros de largura por 15 centímetros de comprimento, com uma tesoura cirúrgica, no sentido longitudinal para preservar a arquitetura natural de suas fibras. Depois de retirado o excesso da solução de Ringer lactato, através de lavagens com água destilada, os retalhos foram acondicionados em frascos de vidro esterilizados e vedados, contendo glicerina bidestilada em quantidade suficiente para mantê-los submersos. O tecido permaneceu na glicerina à temperatura ambiente até a data de análise, não ultrapassando três meses. Durante todo o procedimento de manuseio do PB usou-se luvas, máscara e óculos de proteção.

## **1.3 CARACTERIZAÇÃO DE PB**

### **1.3.1 MEV/EDS**

Retalhos de PB medindo aproximadamente 1 X 1 mm foram imersos em água desionizada por 30 min, sob leve agitação e, em seguida, tratados com concentrações crescentes de soluções de acetona:

- acetona 50% por 15 min;
- acetona 70% com duas trocas por 15 min cada uma;
- acetona 95% com duas trocas por 15 min cada uma;
- acetona 100% com três trocas por 15 min cada uma.

As amostras de PB desidratado foram recobertas com uma fina camada de Au e analisadas no microscópio eletrônico de varredura acoplado com equipamento de EDS, através da incidência de um feixe de elétrons primários de 15 keV.

### 1.3.2 FTIR

Amostras de PB desidratado, cortadas em fragmentos de  $0,5 \text{ cm}^2$ , foram secas em estufa a  $60^\circ\text{C}$  durante 60 min. As amostras foram trituradas em gral de ágata, manualmente, e 0,002 g da amostra de PB triturado foram misturadas em 0,2 g de brometo de potássio (KBr). As amostras de PB dispersa em KBr foram colocadas diretamente no porta-amostra do espectrofotômetro de infravermelho e os espectros de FTIR foram obtidos com 32 varreduras, no intervalo entre  $400$  à  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  e unidades de absorvância (abs). O procedimento foi realizado em duplicata.

### 1.4 PREPARAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I (COL)

O excesso de glicerina do PB foi removido, inicialmente pressionando cada tira de PB entre os dedos com luvas, puxando-os no sentido de baixo para cima, e depois lavando-as abundantemente com água destilada. Em seguida, o PB foi picotado em pedaços de aproximadamente  $1 \times 1 \text{ cm}$  com tesoura cirúrgica. O material foi mantido totalmente imerso em 300 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, em um frasco plástico vedado, em refrigerador à temperatura de  $4^\circ\text{C}$  por 48 h. Misturas ocasionais foram realizadas durante este tempo. A solução de NaOH foi retirada usando um funil de Büchner forrado com filtro de papel com o auxílio de vácuo fraco. O resíduo foi lavado e filtrado com água destilada três vezes consecutivas e vertido em um becker, que foi imerso em recipiente com gelo. O material foi processado no triturador Ultra-Turrax, transformando-se em uma pasta com a medida de  $\text{pH} = 12$ .

Pepsina, 21,45 g, foi solubilizada em 300 mL de ácido clorídrico (HCl) 10 mM. A solução foi vertida sobre 429 g de PB, misturando manualmente com uma espátula de plástico. A proporção pepsina:PB usada foi 1:20 (peso seco:peso úmido em g). A mistura inicial apresentou  $\text{pH} 9,0$  e foi ajustado para  $\text{pH} 2,0$ , gotejando solução de HCl concentrado, sob agitação magnética. A mistura foi mantida durante a noite a  $4^\circ\text{C}$ , e a seguir foi centrifugado a  $10.000 \times g$  por 20 min a  $4^\circ\text{C}$  ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante foi coletado e armazenado em recipiente plástico escuro a  $4^\circ\text{C}$ . Por mais duas vezes, o mesmo resíduo de PB foi novamente submetido à digestão péptica e centrifugado como já descrito no procedimento anterior. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a  $4^\circ\text{C}$ .

Os sobrenadantes foram misturados e no volume total (2,08 L) foram adicionados uréia ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ ) e cloreto de sódio (NaCl) para atingir concentração aproximada de 2 M (249,85 g) e 50 mM (6,08 g) respectivamente. O  $\text{pH}$  foi ajustado para 8,2 com Tris 1 M, sob agitação magnética. A mistura foi mantida a  $4^\circ\text{C}$  e denominada colágeno bruto (COL bruto). Alíquotas da amostra, 15 mL, foram congeladas à temperatura de  $-18$  a  $-20^\circ\text{C}$  em freezer biológico.

## 1.5 PURIFICAÇÃO DE COL

O COL bruto foi purificado pela cromatografia líquida de troca iônica.

### 1.5.1 Primeiro estágio

Vários procedimentos foram realizados para a padronização de um método para purificação do COL bruto.

#### 1.5.1.1 Caracterização do COL bruto

Amostras de COL bruto foram diluídas em água destilada nas razões: 1:2, 1:10, 1:50 e 1:100. A proteína foi submetida à leitura da absorbância no comprimento de onda de 260 a 280 nm e caracterizada pelo método do gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Diferentes composições de solução tampão (tampão de amostra) específicas para uso nas amostras a serem caracterizadas por este método foram testadas:

- tampão de amostra 2X concentrado sem redução;
- tampão de amostra 2X concentrado com redução, contendo mercaptoetanol.

#### 1.5.1.2 Seleção da matriz para a coluna de cromatografia

A resina DEAE-*sepharose* (dietilaminoetil-*sepharose*) CL-6B (DEAE) foi selecionada para preenchimento da coluna de cromatografia, de acordo com trabalhos de purificação encontrados na literatura. O volume da coluna foi determinado pelo emprego da fórmula de cálculo do volume de um cilindro:

$$V = \pi R^2 h \quad (\text{eq. III.1})$$

onde,

V = volume,

$R^2$  = raio interno da coluna ao quadrado,

h = altura da coluna.

#### 1.5.1.3 Determinação do pH

O pH adequado a ser usado na cromatografia de troca iônica foi determinado, experimentando quatro diferentes pH: 6,8; 7,4; 8,2; e 10,0. A solução tampão (ST) foi preparada com Tris-HCl 40 mM e foram adicionados  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$  e NaCl para atingir concentração aproximada de 2 M e 50 mM respectivamente. O pH de quatro diferentes ST foi controlado gotejando solução de HCl 1 M, sob agitação magnética. Para o controle do pH da DEAE, quatro volumes desta resina, 25 mL cada,

dessa resina foram totalmente imersos em ST com os diferentes pH, durante a noite a 4°C. Amostras de COL bruto foram dialisadas contra ST com os pH já citados durante 24 h, com três trocas da solução. Assim, quatro volumes de resina DEAE e quatro amostras de COL bruto foram obtidas e equilibradas nos diferentes pH: 6,8, 7,4, 8,2 e 10,0.

#### **1.5.1.4 Procedimentos de purificação**

A resina DEAE pH 6,8 foi centrifugada a 1000xg durante 15 min a 4°C e foi lavada e filtrada por quatro vezes com 100 mL de ST a cada lavagem, no filtro do funil de vidro sinterizado, sob vácuo leve. Em um tubo Falcon, 5 mL da amostra de COL bruto pH 6,8 foram misturados com 20 mL de resina DEAE pH 6,8, no agitador rotatório por 40 min. A mistura foi centrifugada 500xg por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e reservado à mesma temperatura. Prosseguiu-se com lavagens da DEAE com 100 mL de ST pH 6,8 por quatro vezes, e depois com uma lavagem da DEAE com 30 mL de ST pH 6,8 acrescida de NaCl 1 M, no filtro do funil de vidro sinterizado. Todas as lavagens foram coletadas separadamente e armazenadas a 4°C e submetidas a leituras da absorbância no comprimento de onda de 226 nm, no espectrofotômetro. Posteriormente essas amostras foram caracterizadas por SDS-PAGE.

Os mesmos procedimentos foram aplicados aos materiais com os pH 7,4; 8,2; e 10,0.

#### **1.5.1.5 Definição da concentração da solução eluente**

A DEAE foi equilibrada no pH 10,0, e 10 mL desta resina foi centrifugada a 1000xg por 15 min a 4°C, com 5 mL de COL bruto pH 10,0. A resina com COL foi colocada no funil de Büchner forrado com filtro de papel e foi lavado sucessivamente com soluções de concentrações diferentes de NaCl: 0,10 M, 0,15 M, 0,25 M, 0,50 M, 0,75 M e 1,0 M. As soluções foram coletadas separadamente e submetidas a leitura no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 226 nm e caracterizadas por SDS-PAGE.

### **1.5.2 Segundo estágio**

De acordo com os resultados dos experimentos determinados no primeiro estágio, foi realizada a purificação do COL bruto no sistema de cromatografia líquida de baixa pressão.

#### **1.5.2.1 Preparação da solução tampão (ST) e da solução eluente (SE)**

HCl concentrado foi usado para obter-se o pH 10,0 de 2 L de uma solução de Tris 40 mM. A esta solução acrescentou-se NaCl 50 mM (58,50 g) e uréia 2 M (249,85 g), sob agitação magnética, até a mistura apresentar-se transparente. A força iônica desta solução, em torno de 4,75 mS/cm, foi medida no condutivímetro usando-se a solução de cloreto de potássio (KCl) 0,01 M, que apresenta a

condutividade de 1.413  $\mu\text{S}/\text{cm}$  como padrão à temperatura de 26°C. A ST foi mantida a 4°C. A solução para realizar a eluição da proteína adsorvida na resina foi preparada com 2 L de ST pH 10,0 acrescida de NaCl 0,25 M (29,25 g).

#### **1.5.2.2 “Empacotamento” da coluna para cromatografia de troca iônica**

O volume de 50 mL de DEAE foi preparado com sua total imersão em ST pH 10,0 durante a noite a 4°C. A coluna foi preenchida, aos poucos, com DEAE, usando-se 400 mL de ST pH 10,0 através da tubulação do sistema de cromatografia, até sua total compactação. Após o “empacotamento”, a coluna foi mantida a 4°C.

#### **1.5.2.3 Procedimentos de purificação**

A coluna foi mantida à temperatura ambiente e, depois, com o fluxo de 2 mL/min no sistema de cromatografia, foi equilibrada com 500 mL de ST pH 10,0. A parte superior da coluna foi aberta e 3 mL da amostra de COL bruto pH 10,0 foram misturados, vagarosamente, com a resina, usando uma espátula de plástico. DEAE + COL bruto foi homogeneizada em um agitador giratório, com velocidade 20, por 40 min. De volta ao sistema de cromatografia a resina foi lavada com 400 mL de ST, usando o mesmo fluxo anterior. O COL adsorvido na DEAE foi eluído com 200 mL de SE, com fluxo de 2 mL/min. Após eluição da amostra a resina foi lavada com 100 mL de solução de NaCl 2 M, seguida da lavagem com 400 mL de solução de álcool ISO-propílico 30% e com 200 mL de água destilada, usando fluxo de 5 mL/min para cada uma das soluções.

As amostras foram coletadas separadamente, submetidas à leitura no espectrofotômetro a 226 nm, e mantidas a 4°C para serem caracterizadas por SDS-PAGE.

#### **1.5.2.4 Diálise e concentração das amostras**

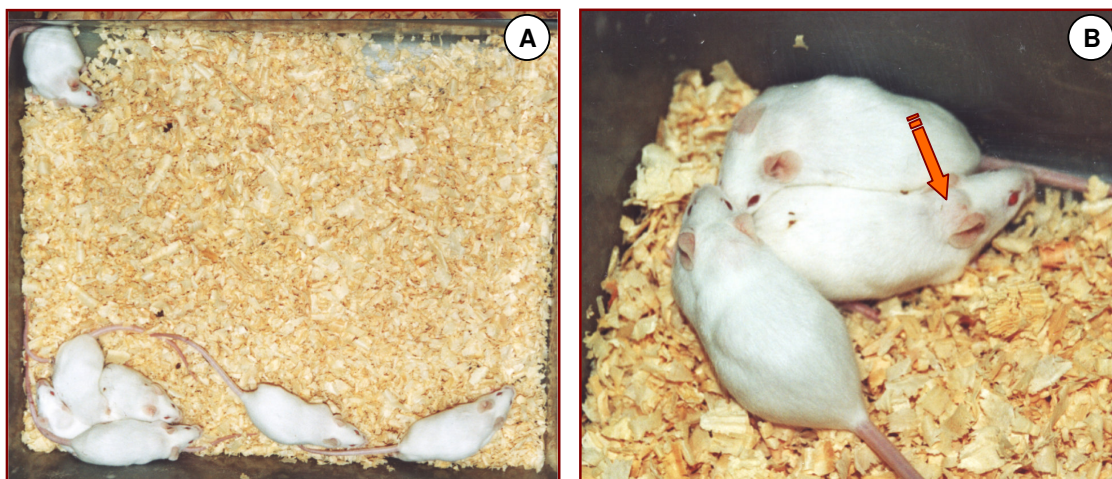
Após a identificação das frações coletadas que continham o COL, as amostras foram dialisadas contra solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,001 M, em sacos para diálise de membranas de celulose, por 16 h, à temperatura de 4°C, sob agitação magnética lenta. A solução de diálise foi renovada neste intervalo de tempo por três vezes.

As amostras dialisadas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  em freezer biológico até o momento de serem concentradas no aparelho liofilizador, onde permaneceram por 36 h.

## 1.6 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Uma amostra de 1 mg de colágeno bovino tipo I comercial (ColC) foi preparada com sua diluição em 1 mL de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 0,1 M à temperatura ambiente por três horas. Com o acréscimo da solução de tris-HCl 1,0 M conseguiu-se o pH 8,0 da amostra de ColC, observado com indicador universal de pH em forma de tiras. Uma emulsão foi preparada adicionando-se, através de vigorosa mistura, 1,1 mL de adjuvante completo de Freund em 1,0 mL de ColC pH 8,0.

No dorso de sete fêmeas de camundongos com peso de 18 a 22 g (Fig. III.2A) foi inoculado, por via subcutânea (Fig. III.2B), aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  da emulsão, no intervalo de quatro semanas. Na primeira dose da inoculação usou-se adjuvante completo de Freund, e nas três doses seguintes o adjuvante incompleto de Freund. Os animais foram sangrados depois de uma semana após a última inoculação. O sangue coletado permaneceu 60 min à temperatura ambiente e, após esse período, foi armazenado, durante a noite, a 4°C. Os soros foram coletados e centrifugados 100xg por 15 min, em centrífuga para eppendorf, a 4°C, e foram novamente coletados. Em seguida, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram separadas e armazenadas a -20°C.



**Figura III.2** – Fotografias das fêmeas de camundongos (A) usadas para inoculação subcutânea de ColC no seu dorso (B - seta), durante quatro semanas

## 1.7 CARACTERIZAÇÃO DE COL

### 1.7.1 MLT

Amostras dos colágenos foram colocadas sobre uma placa de vidro, cobertas por uma lâminula de vidro e analisadas por MLT.

### 1.7.2 Dosagem de proteína

Inicialmente, obteve-se uma estimativa da quantidade de proteína da amostra de COL bruto através da leitura de absorvância no espectrofotômetro UV/visível. O cálculo aproximado da concentração de proteína (mg/mL) foi estabelecido pela equação (Coperland, 1994):

$$(1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260}) \quad (\text{eq. III.2})$$

onde,

$A_{280}$  é a leitura da absorvância da amostra no comprimento de onda de 280 nm;

$A_{260}$  é a leitura da absorvância da amostra no comprimento de onda de 260 nm.

Nos procedimentos do primeiro e segundo estágios de purificação do COL bruto, as amostras coletadas foram submetidas à dosagem de proteínas pela medida espectrofotométrica da absorvância a 226 nm (Haralson e Hassel, 1995) em cuba de quartzo com capacidade de 1 cm<sup>3</sup>. As leituras da ST e SE foram usadas como “branco”.

As amostras de ColC e o COL bruto após purificado e liofilizado (COL) foram diluídas em solução de CH<sub>3</sub>COOH 0,01 M na proporção de 1 mg de proteína/1 mL de ácido. A quantificação de proteína nas amostras foi determinada por meio de dois métodos:

- método de Lowry (Lowry et al., 1951) - amostras de ColC e COL foram usadas na concentração de 40 µg/mL e a albumina bovina foi usada como padrão. Cada uma das amostras foi analisada em duplicata.
- método do coeficiente de extinção – amostras de ColC e COL foram submetidas à leitura no espectrofotômetro usando comprimento de onda de 276 nm (ExPaSy, 2004). A razão entre a medida obtida e o coeficiente de extinção do colágeno tipo I bovino encontrado na literatura (ExPaSy, 2004) foi realizada para quantificar a proteína nas amostras.

### 1.7.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

As amostras de COL bruto foram caracterizadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida, 5 cm x 8,5 cm x 0,5 mm, com a presença de dodecilsulfato de sódio (SDS). As concentrações empregadas para os géis de separação foram de 7,5% e 12%, sendo preparados, de acordo com sua concentração, com volumes distintos de solução estoque de poliacrilamida 30% (29,2g de acrilamida e 0,8g de metil acrilamida em 100 mL), Tris-HCl 1 M pH 8,8, SDS 10% e água destilada. A concentração usada para o gel de empilhamento foi de 4%, sendo preparado com solução estoque de acrilamida, Tris-HCl 1 M, pH 6,8, SDS 10% e água destilada. A reação de polimerização dos géis foi iniciada adicionando-se persulfato de amônio (PSA) e N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) nas concentrações finais de 0,1% (p/v) e 0,1% (v/v), respectivamente.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra sem redução, concentrado duas vezes, com SDS 2%, e foram homogeneizadas e aquecidas em banho-maria durante 3 min.

Os padrões de proteína usados foram:

- padrão de alto peso molecular contendo uma mistura de:  $\alpha$ -macroglobulina (193000 Da),  $\beta$ -galactosidase (112000 Da), frutose-6-fosfato quinase (86000 Da), piruvato quinase (70000 Da), fumarase (57000 Da), desidrogenase láctica (39500 Da) e tirosefosfato isomerase (36000 Da);
- conjugado IgG de coelho - anti-IgG de carneiro (135000 Da);

Os volumes de 3  $\mu$ L do padrão de proteína e de 10 a 30  $\mu$ L ( das amostras de COL foram aplicados no gel. O gel de poliacrilamida foi imerso em solução tampão de corrida para eletroforese (Tris/glicina 0,125 M contendo SDS 0,1%) e foi submetido a 200 V constante de corrente elétrica por aproximadamente 40 min, no equipamento para eletroforese.

O método de coloração pela prata foi usado para visualização e identificação das bandas de proteína no gel. Após a eletroforese, o gel foi fixado em uma solução de metanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água destilada 50% (v/v) por 5 min. Após este período, o gel foi lavado em água destilada por 5 min. Adicionou-se uma solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), contendo 100 mg/100 mL de água destilada e 28  $\mu$ L de  $HNO_3$ , durante 5 min. O gel foi lavado novamente como já citado acima, e em seguida, foi acrescentada uma solução de nitrato de prata ( $AgNO_3$ ), contendo 200 mg/ 100 mL de água destilada, que agiu no gel por 20 min na ausência de luz. Lavou-se, rapidamente, o gel com água destilada e uma solução de 3g de carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ) em 100 mL de água destilada, e 50  $\mu$ L de formaldeído (HCHO), foi acrescentada ao gel até o aparecimento de cor. A reação foi interrompida com a solução fixadora contendo ácido acético ( $CH_3COOH$ ) 1%.

O gel foi lavado com água destilada, e sua secagem foi realizada colocando-o entre duas folhas de papel celofane, sob pressão, em uma placa de vidro, por aproximadamente três dias.

As amostras de COL e as amostras COL após a liofilização foram caracterizadas, usando o mesmo processo já descrito de SDS-PAGE. As concentrações do gel foram de 12% (p/v) para separação e 4% (p/v) para empilhamento. O ColC, 1 g, foi diluído em 1 mL de  $CH_3COOH$  1% (p/v) e foi usado como controle de pureza. Usou-se também um padrão de proteínas de alto peso molecular.

#### **1.7.4 Western Blotting**

Dois géis idênticos foram preparados por SDS-PAGE com as amostras de COL. Um dos géis foi revelado pelo método de coloração pela prata e o outro foi usado para verificar a reatividade imunológica do soro de camundongo imunizado através da técnica *Western blotting*. O gel e uma folha de nitrocelulose com, aproximadamente, as mesmas dimensões do gel foram imersos em solução tampão de transferência pH 8,3, contendo 14,42 g/L de glicina, 3,03 g/L de Tris, 200 mL de metanol e água destilada, por 30 min.

No prendedor apropriado, “cassete”, do equipamento para *Western blotting*, montou-se um “sanduíche”, colocando-se alternadamente pedaços de espuma, filtro de papel, o gel, a folha de nitrocelulose, e novamente, filtro de papel e espuma. Depois de colocada a folha de nitrocelulose passou-se os dedos levemente sobre ela para fazer o seu contato com o gel e, ao mesmo tempo, retirar bolhas de ar que possam ter acumulado entre eles. Usou-se luvas durante todo o procedimento. O “sanduíche” foi montado em um recipiente com volume de tampão de transferência suficiente para mantê-lo submerso. O “cassete” foi fechado, com cuidado, para não ocorrer deslocamento das camadas do “sanduíche”, e foi montado adequadamente na cuba do equipamento de eletroforese. No interior da cuba foi adaptado um recipiente com gelo para evitar aquecimento excessivo. A cuba foi preenchida com solução tampão de transferência e o sistema foi ligado à fonte de 100 V de tensão elétrica por 60 min. Assim, procedeu-se a transferência das bandas de proteína do gel para a folha de nitrocelulose.

Com o término da transferência, a folha de nitrocelulose foi bloqueada em solução de PBS 0,1 M e Tween-20 1% (v/v) durante 60 min. Em seguida, lavou-se três vezes consecutivas, por 5 min cada, com solução de PBS Tween-20 0,05% (v/v). Uma solução com 60 µL de soro de camundongo imunizado e 12 mL de PBS Tween-20 0,05% foi usada por 60 min. Lavou-se três vezes por 5 min cada lavagem e prosseguiu-se com o uso de uma solução de 3,8 µL de conjugado IgG de camundongo - anti-IgG de coelho e 15 mL de PBS Tween-20 0,1% durante 60 min. Depois foram realizadas mais três lavagens consecutivas, 5 min cada, com solução de PBS Tween-20 0,05%. A quantidade de 10 mg de dimetilaminobenzaldeído (DAB) foi pesado, dissolvido em 1 mL de Tris 1 M pH 8,0 e acrescentado a 19 mL de água destilada. Esta solução foi filtrada em papel filtro e nela foi adicionada 5 µL de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em um agitador de baixa velocidade esperou-se o aparecimento de cor. A reação foi interrompida lavando-se a folha de nitrocelulose com água destilada, que em seguida foi seca à temperatura ambiente.

### **1.7.5 Determinação do peso molecular**

Os pesos moleculares dos componentes presentes na proteína foram calculados a partir da caracterização no gel de poliácridamida do padrão de alto peso molecular e da amostra de COL, utilizando o *software Gel – Pro Analyser*.

### **1.7.6 EDS**

Amostras de ColC, COL bruto e COL liofilizado foram recobertos com uma fina camada de Au e a análise elementar semiquantitativa das amostras foi obtida, através do aparelho de espectroscopia dispersiva por dispersão de energia de raios-X (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, usando feixe de elétrons primários de 15 KeV.

### **1.7.7 MEV**

As mesmas amostras usadas para análise de EDS foram recobertas novamente com Au para análise de sua estrutura e obtenção de fotomicrografias, no microscópio eletrônico de varredura, através da incidência de um feixe de elétrons primários de 10 KeV.

### **1.7.8 FTIR**

Amostras liofilizadas (0,002 g) de ColC, COL bruto e COL foram maceradas em 0,2 g de KBr. Os espectros FTIR das amostras de colágeno em KBr foram obtidos com 32 varreduras, no intervalo entre 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e unidades de absorvância (abs), no espectrofotômetro de infravermelho.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 PERICÁRDIO BOVINO (PB)

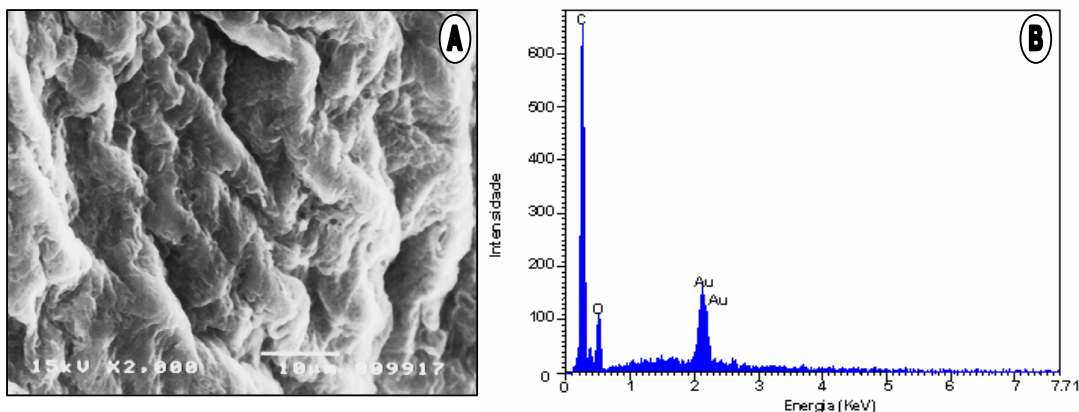
Na manipulação do PB, foram tomadas precauções especiais de proteção, pela possibilidade de ser uma fonte potencial de infecção. O Brasil foi classificado, em 2003, por missão Européia de especialistas em encefalopatia espongiforme bovina (EEB), como um país altamente improvável (risco 1) de apresentar a ocorrência dessa doença, também conhecida como “doença da vaca louca” (Pituco e Stefano, 2004). Entretanto, a ocorrência desta doença e de outras doenças infecciosas transmissíveis ao homem não devem ser descartadas. Alguns outros cuidados, como a armazenagem do PB em glicerina bidestilada e temperatura de 4°C para realização dos procedimentos, foram essenciais para evitar crescimento bacteriano ou microbacteriano e para manter a forma nativa do colágeno neste tecido.

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO DE PB

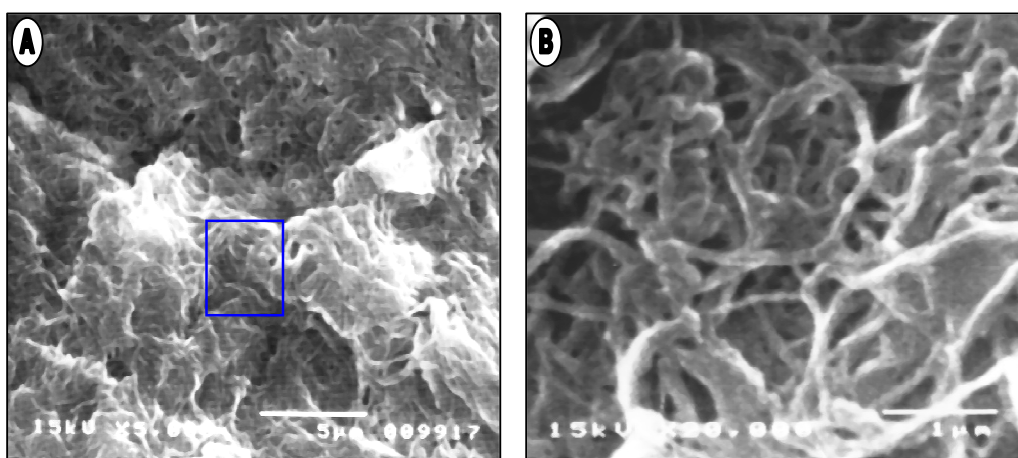
#### 2.2.1 MEV/EDS

As características analisadas nas micrografias de MEV do PB, após desidratação e recobrimento com Au, estão de acordo com relatos de outros autores (Zioupos et al., 1992; Langdon et al. 1999; Brendolan et al., 2004; Vulcani, 2004), que também observaram o PB como uma estrutura fibrilar densa, no microscópio eletrônico de varredura. As fibras apresentaram-se com determinado paralelismo e mostraram ondulações no seu sentido longitudinal (Fig. III.3A). A orientação dominante, porém não muito organizada, das fibras do PB seguem a direção circunferencial do saco pericárdico (Fig. III.3A e Fig. III.4A). O PB apresentou-se como uma estrutura anisotrópica, e o aspecto enovelado de suas fibras é característico da estrutura de um polímero (Fig. III.3B), sugerindo a presença de colágeno.

Os espectros de EDS (Fig. III.3B) apresentaram a presença dos elementos Carbono (C) e Oxigênio (O) na estrutura do PB. Observou-se grande intensidade do pico correspondente ao C presente na amostra, de um modo geral, característica marcante dos materiais orgânicos. Os picos de baixa intensidade correspondentes ao Au mostraram a presença de traços do recobrimento metálico aplicado na amostra para torná-la condutora de elétrons.



**Figura III.3** – Micrografia de MEV da estrutura densa de PB desidratado, com ondulações paralelas de suas fibras no sentido longitudinal; aumento de 2000X, 15 KeV (A); espectro de EDS com análise semiquantitativa dos elementos (C e O) constituintes do PB desidratado (B).

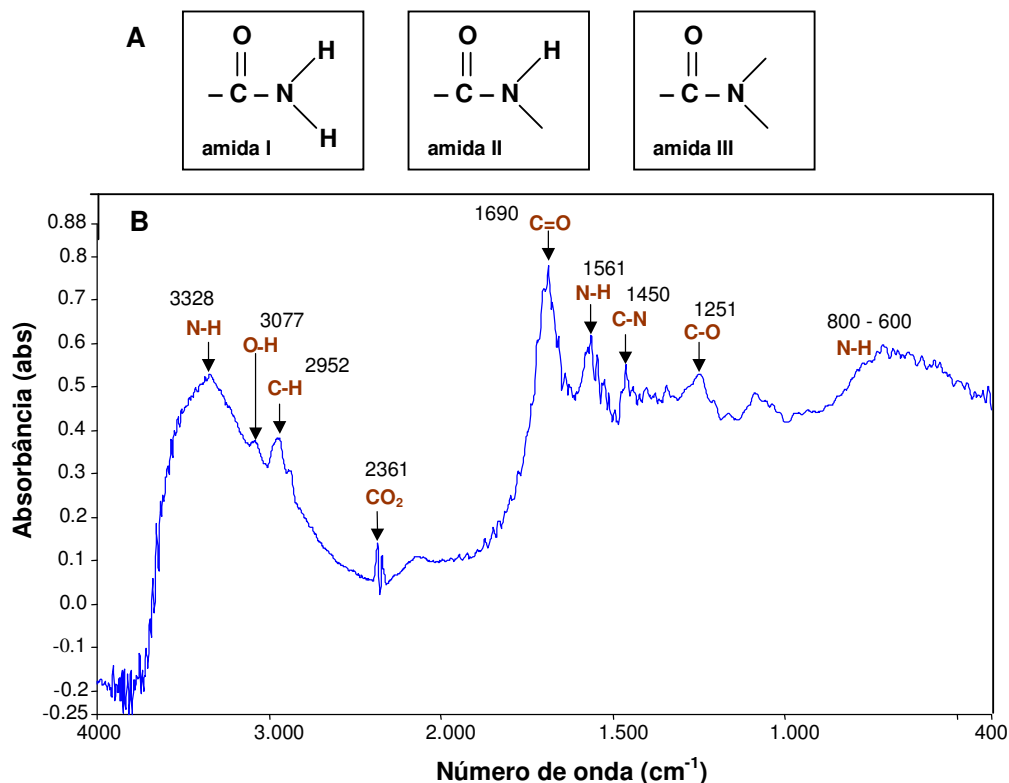


**Figura III.4** – Micrografias de MEV da estrutura anisotrópica de PB com suas fibras seguindo uma orientação dominante, não muito organizada, aumento de 5000X, 15 KeV (A); aspecto enovelado das fibras, em maior aumento, da área demarcada em (A), aumento de 20000X, 15 KeV (B).

## 2.2.2 FTIR

O espectro de FTIR obtido para a amostra de PB está representado na Figura III.5. Observou-se picos típicos de absorção na região da amida I em  $1690\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento da carbonila, ligação C = O, e amida II em  $1561\text{ cm}^{-1}$  devido às vibrações da ligação N – H e ao estiramento C – N. Picos correspondentes a anéis pirrolidínicos apareceram em  $1450\text{ cm}^{-1}$  e em  $3077\text{ cm}^{-1}$  devido às ligações C – H. Também observou-se o pico correspondente à absorção na região da amida III em  $1251\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento da ligação C – N e à vibração da ligação N – H. No comprimento de onda de  $2952\text{ cm}^{-1}$  foram observados picos correspondentes a íons  $\text{OH}^-$  das moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  estrutural e em  $3328\text{ cm}^{-1}$  correspondentes à presença da banda do grupamento –NH da amida

secundária. O  $\text{CO}_2$ , provavelmente formado devido à absorção de água do meio ambiente apresentou-se no comprimento de onda de  $2361\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura III.5** – Representação gráfica da estrutura química das amidas I, II e III (A); espectro de FTIR para PB desidratado com picos característicos das amidas nas proteínas (B).

A Tabela III.1 mostra, resumidamente, as principais bandas e suas respectivas ligações vibracionais dos grupos funcionais para proteínas encontradas na literatura. Observou-se a proximidade da frequência das bandas encontradas no espectro de FTIR do PB com as frequências encontradas na literatura para proteínas, de um modo geral. No espectro do PB observou-se a região entre 800 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , que apresenta uma vibração de intensidade moderada, típica de proteínas, corresponde à deformação angular fora do plano da ligação N-H, que também é observado no trabalho de Payne e Veis, 1988; Ogawa e Plepis, 2001

### 2.3 OBTENÇÃO DE COLÁGENO TIPO I (COL)

A solução de NaOH solubiliza proteínas não colagenosas e exclui os efeitos de enzimas endógenas no colágeno (Nagai e Suzuki, 2002; Sato et al., 2003). Intimamente, junto ao tecido conjuntivo denso do pericárdio, foram encontrados outros tecidos, principalmente o adiposo. Para eliminar as proteínas

não interessadas, como por exemplo, lipídeos, e a ação das enzimas presentes no colágeno, foi necessário triturar o tecido para a ação eficiente da solução de NaOH.

**Tabela III.1 – Bandas principais de infravermelho para proteínas e para PB desidratado e seus respectivos grupos funcionais**

Frequência (cm <sup>-1</sup> ) (Proteínas)	Frequência (cm <sup>-1</sup> ) (PB)	Grupo funcional
3300	3328	N – H da amida II
	2952	OH <sup>-</sup> de H <sub>2</sub> O estrutural
3063 e 1450	3077 e 1458	C – H do anel pirrolidínico
2336 – 2370	2361	CO <sub>2</sub> da atmosfera
1600 – 1700	1690	C = O da amida I
1500 – 1559	1561	N – H da amida II
1400 – 1260		Presença de colágeno tipo I em tecido biológico
1242 – 1235	1241	N – H da amida I e II; C – N da amida III
600 - 800	600 - 800	Vibração média típica de proteínas

**Fonte:** Payne e Veis, 1988; Mantsch e Chapman, 1996; Liu et al., 1999; Ogawa e Plepis, 2001; Paula et al., 2002; Brendolan et al., 2004.

O colágeno tipo I é constituído de polipeptídeos em cadeias de tropocolágeno, unidade estrutural fundamental, com uma repetida seqüência dos resíduos de aminoácidos. Essas cadeias formam uma estrutura tridimensional, com fórmula molecular  $(\alpha 1)_2 \alpha 2$ , arranjadas na sua maior parte em forma de uma triple hélice, exceto os peptídeos nas extremidades da proteína, denominados telopeptídeos (Viidick e Vuust, 1980; Yannas, 1996; Kumudinie e Premachandra, 1999; Bode, 2000). A pepsina quebra as moléculas de colágeno na região dos telopeptídeos, que contém reticulação intermolecular (Bet, 1995; Bode, 2000), tornando o colágeno mais biocompatível. A forma de pasta do PB facilitou a ação da pepsina no tecido. A digestão enzimática solubilizou o resíduo de PB, resultando em uma solução turva e com alta viscosidade. Assim, houve a liberação do colágeno de sua fonte natural, obtendo-se, após a centrifugação, o extrato bruto do material. Neste foi adicionada solução de uréia (Nagai e Suzuki, 2002; Deyl et al., 2003; Sato et al., 2003), tornando as cadeias das fibras mais lineares, e NaCl (Sato et al., 2003) para equilibrar a solução e não desnaturar a proteína. Frequentemente, são incluídos diversos aditivos no extrato bruto, com o intuito de evitar a degradação química ou enzimática da proteína de interesse (Almeida e Kurtenbach, 2002). O pH do COL bruto foi ajustado para 7,0 com o objetivo de desativar a pepsina.

A estimativa da concentração de proteína no COL bruto foi de 4,59 mg/mL.

## 2.4 PURIFICAÇÃO DE COL BRUTO E CARACTERIZAÇÃO POR SDS-PAGE

A purificação de uma proteína depende das características do material de onde se deseja purificar a proteína, as propriedades da própria proteína e dos contaminantes presentes no extrato bruto. Também depende de sua finalidade de uso, seja em humanos, ou para diagnóstico, ou para uso veterinário ou para processos analíticos na pesquisa. Existe a necessidade da purificação da proteína, já que a célula contém muitas proteínas diferentes, apresentando uma faixa bem ampla de atividade biológica (Almeida e Kurtenbach, 2002). Neste trabalho a utilização do colágeno para o desenvolvimento de um biomaterial exigiu determinado grau de pureza, pois a pretensão para a sua aplicação final foi, justamente, a interação com o tecido biológico, com participação direta na atividade celular, promovendo a reparação de tecidos ósseos.

O planejamento de uma estratégia a ser utilizada, torna-se necessário antes de dar prosseguimento à purificação da proteína a partir do extrato bruto definido. Deve-se considerar, além da estabilidade da proteína, a aplicação final do produto, como já citado, a eficiência do processo, a viabilidade econômica e a facilidade de produção (Ho et al., 2000). As cromatografias em coluna de gel, filtração ou adsorção são os sistemas mais usados para a identificação de proteínas (Deutscher, 1990). Na cromatografia de troca iônica, as matrizes (resinas) das colunas de adsorção possuem grupamentos químicos ionizados (carregados positivamente ou negativamente) responsáveis pela interação com a proteína. Este tipo de cromatografia é classificado como um processo de baixo custo, levando-se em consideração os valores aproximados da coluna e dos acessórios empregados na técnica, perdendo apenas para a cromatografia gel filtração (Almeida e Kurtenbach, 2002). Dessa maneira, de acordo com as características físico-químicas do colágeno a cromatografia de troca iônica foi escolhida para purificação do COL bruto, usando 50 mL da resina DEAE, que possui grupamento químico carregado positivamente, para preenchimento da coluna de cromatografia.

A otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, pois mesmo conhecendo as propriedades da proteína, é imprevisível seu comportamento no decorrer do processo de purificação. Mudanças na estrutura da proteína com alterações de suas características físico-químicas e modificação ou perda de sua atividade biológica podem ocorrer. Até mesmo a exposição a temperaturas moderadas, como 37°C, pode causar lenta e gradativa desnaturação de algumas proteínas (Almeida e Kurtenbach, 2002). Portanto, a maioria dos procedimentos de obtenção e purificação do COL bruto foram realizados à temperatura de 4°C. Na primeira fase de trabalho foram realizadas várias experimentações para, a seguir, definir um protocolo.

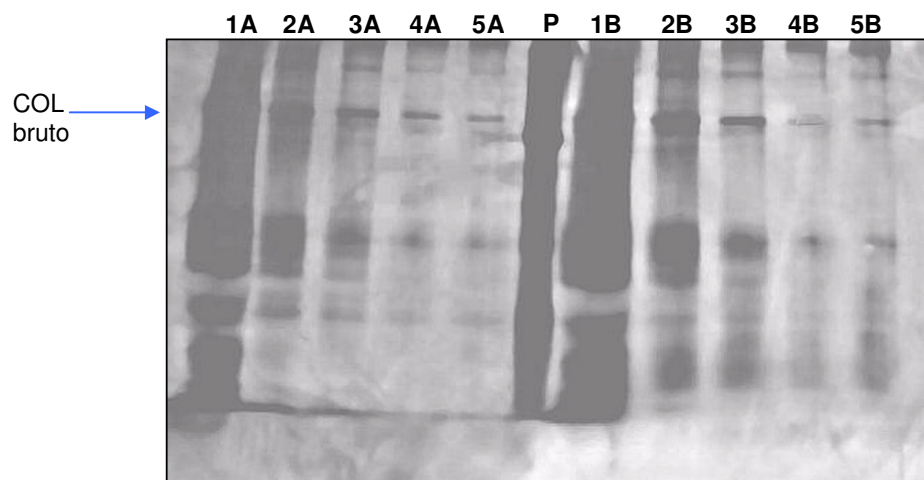
Para a caracterização da amostra no gel de poliacrilamida, às vezes, é necessária a sua diluição. As diluições da amostra de COL bruto podem ser visualizadas através do SDS-PAGE mostrado na Figura III.6. A diluição intermediária 1:50 (v/v) foi a que melhor identificou as bandas presentes na amostra (Fig. III.6, canaleta 3A). Também, às vezes, é necessário o uso de agentes redutores para

minimizar as condições oxidantes do meio (Deutscher, 1990). Um exemplo de agente redutor bastante usado é o  $\beta$ -mercaptoetanol que desnatura a proteína, dando-lhe a forma primária através da quebra das ligações de sulfeto e facilitando a sua corrida no gel. Entretanto, o tampão de amostra concentrado duas vezes sem redução, ou seja, sem a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (Fig. III.6, canaleta 3A), foi suficiente para proporcionar a corrida da proteína no gel, que já possuía uma forma mais linear, provavelmente proporcionada pela presença da solução de uréia, como também pelo tratamento com SDS durante a eletroforese.

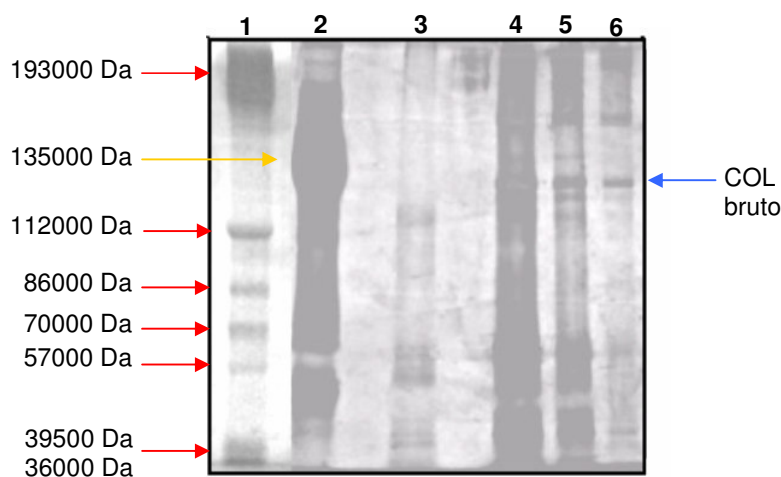
Em ambas as técnicas de eletroforese, a proteína é evidenciada por coloração com o corante Azul de Coomassie, ou pela impregnação pela prata (Almeida e Kurtenbach, 2002). A técnica de coloração por Coomassie é considerada menos complicada que a impregnação pela prata, entretanto, esta última possui maior sensibilidade, de 100 a 150X maior que a coloração por Coomassie, e é mais usada para detecção de contaminantes da amostra (Copeland, 1993).

Na literatura, as massas moleculares das cadeias  $\alpha 1(I)$  e  $\alpha 2(I)$  possuem valores entre 112000 Da e 95500 Da respectivamente (Bet, 1995; Lacerda et al., 1998; Paula et al., 2002; Tonhi e Plepis, 2002; Deyl et al., 2003; Sato et al., 2003). As bandas mais fortes do COL bruto foram visualizadas no gel entre os pesos moleculares de proteínas padrões, 135000 Da da IGG de coelho com anti-IGG de carneiro e 112000 Da da  $\beta$ -galactosidase (Fig. III.7). Estas bandas ficaram próximas àqueles valores descritos na literatura para as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  típicas do colágeno tipo I. Também foram observadas bandas mais fracas para componentes de massas moleculares inferiores a 112000 Da, que se referem a contaminantes de baixa massa molecular (Fig. III.7); e uma banda mais forte acima de 135000 Da, que, de acordo com resultados encontrados por Lacerda et al., em 1998, provavelmente são cadeias do tipo  $\beta$ , ou seja, duas cadeias  $\alpha$  unidas (Fig. III.7).

Para determinar o pH ideal a ser usado na purificação do COL bruto foi usada uma faixa que variou do pH 6,8 até pH 10,0. O pH 6,8 foi escolhido por estar acima do pI do procolágeno bovino tipo I, pI 6,36, (ExPaSy, 2004), carregando a amostra negativamente. O pH fisiológico, pH 7,4, também foi escolhido por ser considerado um bom ponto para otimização de estudos (Copeland, 1994). O colágeno tipo I foi purificado através do uso de pH 8,2 nos protocolos de Haralson e Hassel, em 1995, e relatados nos estudos de Sato et al., em 2003. Assim este pH também foi usado no trabalho para estabelecer uma comparação. E experimentou-se o pH 10,0, que se encontra acima do ponto isoelétrico (pI) das cadeias que formam a triple hélice do colágeno bovino tipo I, pI de  $\alpha 1(I)$  = 9,25 e pI de  $\alpha 2(I)$  = 9,23 (ExPaSy, 2004).



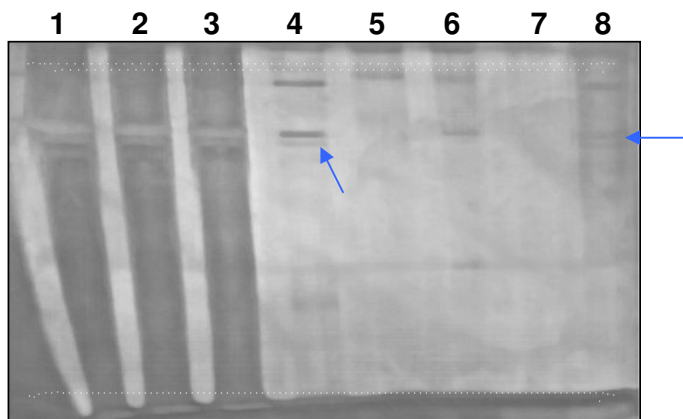
**Figura III.6** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 7,5%: amostras de COL bruto diluídas (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 sem redução (A) e com redução (B); padrão de alto peso molecular (P); diluição 1/2 (1); diluição 1/10 (2); diluição 1/50 (3); diluição 1/100 (4); diluição 1/200 (5).



**Figura III.7** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 7,5%: padrão de proteínas de alto peso molecular (1); banda mais forte de IGG de coelho com anti-IGG de carneiro (135000 Da) (2); pepsina (34700 Da) (3); COL bruto, diluição 1/2 (4); COL bruto, diluição 1/10 (5); COL bruto, diluição 1/50 (6).

Os resultados obtidos na metodologia da seção 1.5.1.5 são mostrados no gel da Figura III.8, onde se observam nas canaletas 1, 2, 3, e 4, os sobrenadantes coletados após a centrifugação da DEAE com as amostras de COL bruto pH 6,8, 7,4, 8,2 e 10,0, respectivamente. Nas canaletas 5, 6, 7 e 8 podem ser observadas as lavagens da DEAE pH 6,8, 7,4, 8,2 e 10,0, respectivamente, com solução de NaCl 0,1 M. Notou-se que o pH 10,0 mostrou um melhor comportamento, pois parte da proteína foi adsorvida na DEAE (Fig. III.8, canaleta 4), enquanto que com os outros pH a proteína apresentou-se

no sobrenadante, não adsorvendo na DEAE (Fig. III.8, canaletas 1, 2 e 3). A solução de NaCl usada na DEAE pH 10,0 conseguiu eluir a proteína ali adsorvida, e as bandas características de colágeno tipo I foram visualizadas no gel de poliacrilamida (Fig. III.8, canaleta 8).

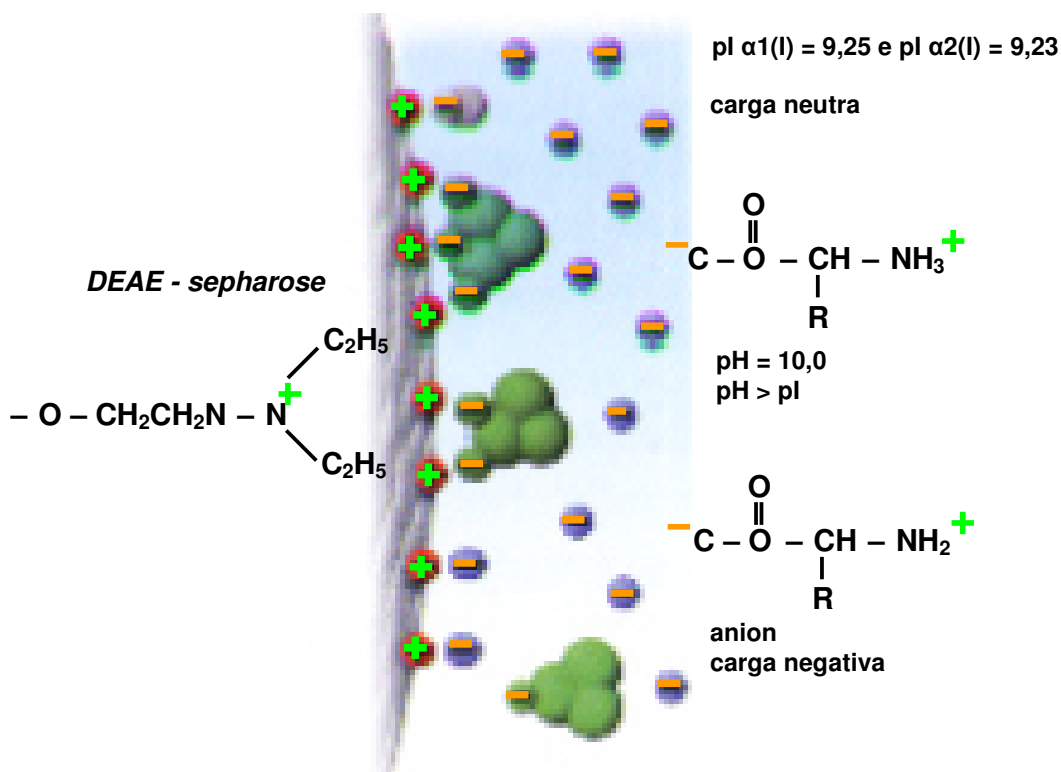


**Figura III.8** – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 12%: aplicações dos sobrenadantes coletados após a centrifugação da DEAE com as amostras de COL bruto pH 6,8 (1), 7,4 (2), 8,2 (3) e 10,0 (4); aplicações de proteína eluída da DEAE pH 6,8 (5), 7,4 (6), 8,2 (7) e 10,0 (8), usando solução de NaCl 0,1 M.

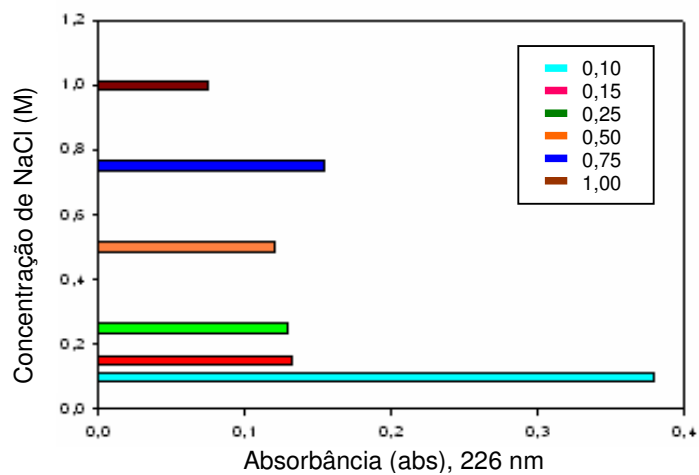
No  $pI$  a molécula possui carga neutra. Neste ponto acontece a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno, fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja igual a zero (Piez, 1982). Quando o valor do pH encontra-se acima do valor do  $pI$ , as moléculas apresentam-se carregadas negativamente, e com o valor do pH abaixo do valor do  $pI$  apresentam-se carregadas positivamente (Fig. III.9). Assim, pode-se dizer que o pH está diretamente relacionado com o  $pI$ , e o controle deste pH torna-se necessário para o funcionamento eficiente da cromatografia de troca iônica.

O pH 10 da amostra de COL bruto mostrou melhor resultado, provavelmente, devido ao fato de ter valor acima do  $pI$  das cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  do colágeno bovino tipo I, tornando a amostra carregada negativamente. Assim, quando as moléculas da amostra interagiram com a DEAE pH 10,0 carregada positivamente, elas adsorveram na resina através de força iônica (Fig. III.9).

Na cromatografia de troca iônica, são usados sais para a eluição das proteínas retidas na coluna, gradualmente e seletivamente. Através da passagem de soluções com concentrações diferentes há uma competição pela ligação da proteína com os grupamentos químicos da resina (Almeida e Kurtenbach, 2002). Os resultados obtidos das leituras de absorbância das soluções de eluição do COL na DEAE com concentrações diferentes de sal, NaCl 0,10 M; 0,15 M; 0,25 M; 0,50 M; 0,75 M e 1,00 M, foram 0,378; 0,132; 0,129; 0,120; 0,154; 0,074; respectivamente, e podem ser observados no gráfico da Figura III.10.



**Figura III.9** - Esquema do grupamento químico da DEAE, carregada positivamente e de aminoácidos que formam a molécula de colágeno, carregada negativamente pelo controle do pH com valor acima do pI das cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  do colágeno bovino tipo I; interação das moléculas da amostra de COL bruto pH 10,0 com a DEAE pH 10,0 através de interação eletrostática.



**Figura III.10** – Gráfico da leitura de absorbância, no comprimento de onda de 226 nm, das soluções de lavagem da DEAE + COL bruto, com concentrações diferentes de NaCl.

Após a lavagem de mesmos volumes de DEAE contendo COL bruto, dentre as diferentes concentrações de NaCl usadas, a SE contendo NaCl 0,10 M foi suficiente para eluir a proteína adsorvida na resina. Desta maneira, a SE de menor concentração de sal, teve força iônica suficiente para romper apenas as ligações formadas entre os grupamentos da DEAE e o COL, eluindo a proteína de interesse, o COL. Isto determinou o uso de NaCl 0,10 M para eluição da proteína, contribuindo também para uma menor contaminação da amostra com o sal. Entretanto, uma pequena quantidade de NaCl na amostra purificada é interessante para a preservação da proteína.

As ligações de amidas dos peptídeos mostram atividade óptica no comprimento de onda de 250 a 190 nm no espectrofotômetro UV/visível (Copeland, 1994). A leitura da absorbância no comprimento de onda de 226 nm é indicada para identificar a presença de colágeno tipo I e tipo III nos protocolos de obtenção e purificação desta proteína (Haralson e Hassel, 1995). A leitura da absorbância a 226 nm foi um indicativo direto da presença de colágeno nas amostras.

Considerando os resultados obtidos anteriormente, foi possível definir o protocolo final para a purificação de 3 mL de COL bruto por meio de cromatografia de troca iônica, observando os passos citados a seguir:

**A** preparar, inicialmente, as soluções:

- 1 L de solução tampão (ST) com Tris base 0,04 M (4,85 g) e gotejar HCl concentrado, sob agitação magnética, até obter pH 10,0; acrescentar à solução NaCl 0,05 M (2,93 g) e uréia 2 M (120,12 g), sob agitação magnética, até a mistura apresentar-se transparente; medir a condutividade da ST, que deve ficar em torno de 4,75 mS/cm;
- 300 mL de solução eluente (SE), usando 300 mL de ST acrescida de NaCl 0,10 M (1,76 g); medir a condutividade da SE, que deve ficar em torno de 24,8 mS/cm;
- 300 mL de solução para limpeza (SL) da coluna com NaCl 1M (17,55 g);
- 400 mL de solução para regeneração da coluna (SR) com etanol 70% ou álcool isopropílico 30%;
- manter as soluções em geladeira (4°C);

**B** seguir os passos de **C** a **H** apenas na primeira purificação, após esta passar direto ao passo **I**;

**C** calcular o volume da coluna para cromatografia de troca iônica ( $V = \pi R^2 h$ );

**D** preparar a resina para preenchimento da coluna de cromatografia, misturando, no presente estudo, 50 mL de resina DEAE sepharose CL 6B (DEAE) com ST até sua total imersão e mantê-la a 4°C, durante a noite;

**E** retirar DEAE da geladeira e manter à temperatura ambiente antes do uso;

**F** ligar o sistema de cromatografia líquida de baixa pressão e passar água destilada pela tubulação para verificar vazamento;

**G** preencher, aos poucos, a coluna com DEAE imersa em ST;

**H** passar 8X o volume da coluna de ST pH 10 através da tubulação do aparelho de cromatografia até a total compactação da DEAE na coluna;

**I** equilibrar a coluna totalmente preenchida com a DEAE com 10X o volume da coluna de ST pH 10, usando fluxo de 5 mL/min;

➤ coletar em um recipiente para descarte (lixo);

**J** abrir parte superior da coluna e colocar 3 mL de COL bruto pH 10,0, misturando-o, vagarosamente, com a DEAE, usando espátula de plástico;

**K** selar as bordas da coluna com para-filme e homogeneizar o COL bruto e DEAE no agitador giratório, com velocidade 20, por 40 min;

**L** lavar coluna com 8X o volume da coluna de ST pH 10, usando fluxo de 3 mL/min;

➤ coletar no lixo e reservar;

**M** eluir a proteína adsorvida na DEAE com 4X o volume de coluna de SE pH 10, usando fluxo de 3 mL/min;

➤ coletar frações de 3 mL de solução em tubos de plástico adaptados no coletor do sistema de cromatografia;

**N** lavar DEAE com 4X o volume da coluna de SL, usando fluxo de 5 mL/min;

➤ coletar no lixo;

**O** lavar DEAE com 8X o volume da coluna de SR, usando fluxo de 5 mL/min;

➤ coletar no lixo;

**P** lavar DEAE com 4X o volume da coluna de água destilada, usando fluxo de 5 mL/min;

➤ coletar no lixo;

**Q** manter a coluna à temperatura de 4°C para novo uso.

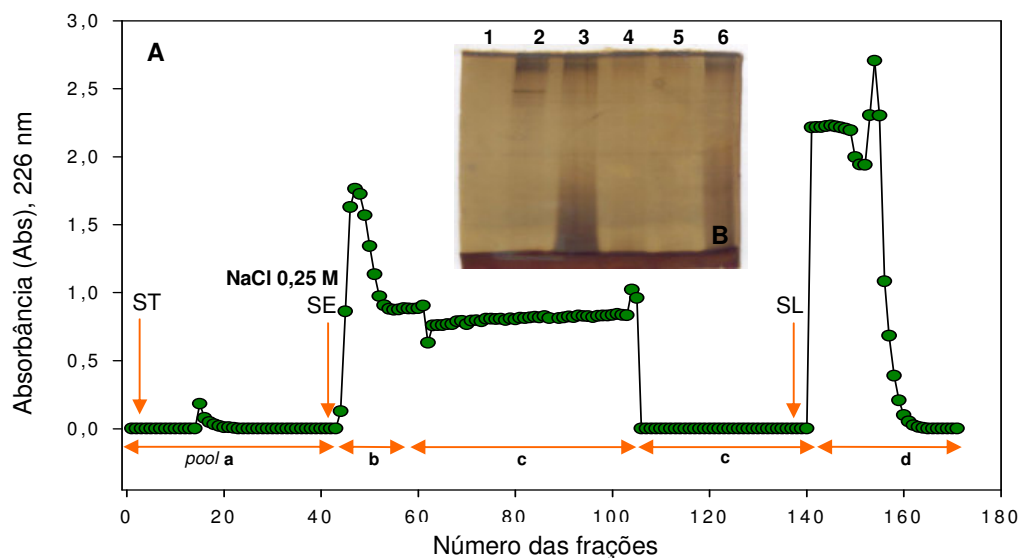
A cada vez que a amostra de COL bruto foi purificada, procedeu-se a sua caracterização através de eletroforese. Os resultados obtidos, após a aplicação do protocolo de purificação, podem ser analisados nos cromatogramas apresentados a seguir, que sempre apresentaram o mesmo padrão. Os cromatogramas foram traçados através do *software Sigma Plot*, utilizando as leituras de absorbância a 226 nm, obtidas das soluções coletadas durante o processo de purificação.

Resultados da purificação do COL bruto com SE NaCl 0,25 M, SE NaCl 0,15 M e SE NaCl 0,10 M, e sua caracterização através de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, encontram-se nos cromatogramas e géis das Figuras III.11, III.12, III.13, respectivamente.

A Figura III.11 representa graficamente todo o processo de eluição. Usou-se NaCl 0,25 M para eluição de COL, desde a lavagem da resina após sua mistura com COL bruto, até a lavagem de limpeza com NaCl 1 M. Depois da aplicação de ST, de SE, e de SL, foram coletadas frações de 3 mL das soluções. O *pool* destas frações foi caracterizado por SDS-PAGE.

O tampão de lavagem inicial da resina + COL bruto remove os restos celulares e proteínas que não foram adsorvidos na resina (Almeida e Kurtenbach, 2002). A aplicação no gel do *pool* de frações coletadas na lavagem da DEAE com ST (Fig. III.11A *pool* a) mostrou que nas frações iniciais não houve praticamente nenhuma eluição de proteína e contaminantes (Fig. III.11B canaleta 1), sugerindo que todo o conteúdo da solução de COL bruto ficou adsorvido na resina. Com a aplicação da SE, a força iônica da solução de NaCl 0,25 M foi capaz de romper a ligação da DEAE com o COL, e esta

proteína foi eluída, formando o primeiro pico significativo visualizado no cromatograma (Fig. III.11A). No gel observou-se que as bandas referentes ao COL foram eluídas nas primeiras frações deste pico (Fig. III.11B canaleta 2). O segundo pico relevante observado no cromatograma formou-se após a aplicação de SL (Fig. III.11A). Uma concentração maior de sal, NaCl 1 M, foi necessária para eliminação dos contaminantes que permaneceram adsorvidos na resina, como foi visualizado no gel (Fig. III.11B canaletas 3 e 6). Amostras dos *pools* c (Fig. III.11A) podem ser observadas nas aplicações das canaletas 4 e 5 do gel (Fig. III.11B). As frações destes *pools* mantiveram a absorvância em torno de 0,9 a 0,8 até que zerou depois de determinado tempo (Fig. III.11A).

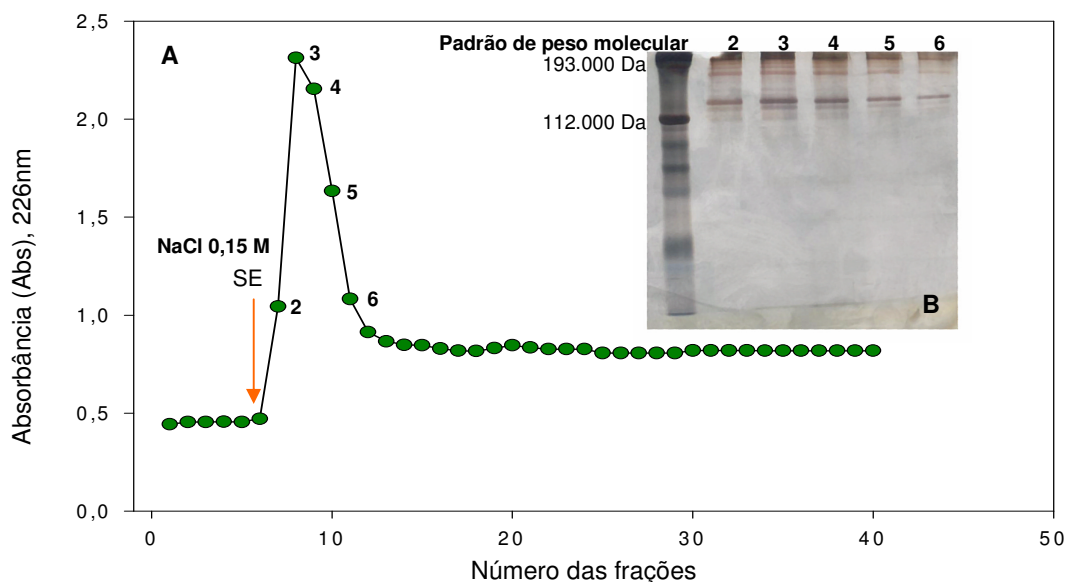


**Figura III.11** - Cromatograma das leituras de absorvância no comprimento de onda de 226 nm das frações coletadas (●) durante o processo de purificação; aplicação da ST, da SE NaCl 0,25 M, e da SL (setas verticais); *pools* (a, b, c, d) das frações coletadas após aplicação de ST, SE e SL (setas horizontais) (A); gel de eletroforese com aplicação dos *pools* a, b, d, c, c, d nas canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6 respectivamente (B).

Após a limpeza da coluna com SL, foi usada a solução de álcool ISO-propílico para remover possíveis proteínas hidrofóbicas, lipoproteínas e lipídeos fortemente aderidos na resina. Logo depois, a resina foi lavada, de três a quatro vezes o seu volume, com água desionizada. Com este procedimento de limpeza, indicado pela Pharmacia, s.d., a resina foi limpa e regenerada para um novo uso, evitando o seu entupimento e contaminação para futuras purificações.

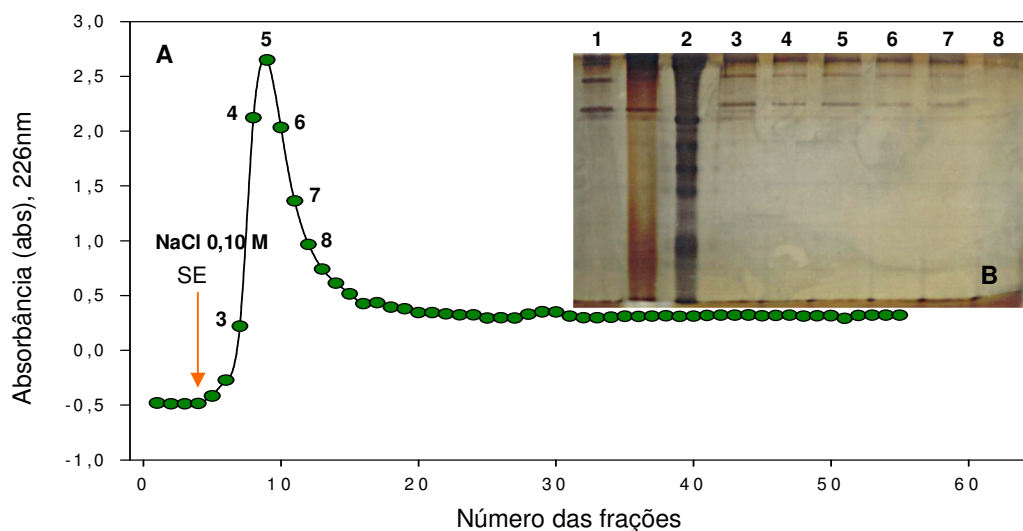
Na Figura III.12 observa-se o pico formado após a aplicação da SE NaCl 0,15 M e a caracterização de suas frações através do gel de poliacrilamida. A concentração menor de sal na SE proporcionou a formação de um pico mais definido (Fig. III.12A). As amostras de cada uma das frações deste pico foram aplicadas nas canaletas do gel de mesmo número, que mostrou bandas mais fortes de COL nas frações iniciais do pico (Fig. III.12B). Uma diminuição da concentração de SE formou um pico

onde se observou que suas frações mostraram a presença de bandas características de COL tipo I (Haralson e Hassel, 1995; Nagai e Suzuki, 2002; Deyl et al., 2003; Sato et al., 2003). As bandas de COL localizaram-se entre bandas do padrão de proteína com pesos moleculares próximos aos pesos moleculares das bandas de COL relatados na literatura (Bet, 1995; Lacerda et al., 1998; Paula et al., 2002; Tonhi e Plepis, 2002).



**Figura III.12** - Cromatograma das leituras de absorvância no comprimento de onda de 226 nm das frações coletadas (●) durante a aplicação da SE NaCl 0,15 M (seta) (A); gel com aplicação nas canaletas 2, 3, 4, 5 e 6 das frações coletadas 2, 3, 4, 5 e 6 correspondentes ao pico formado na eluição da proteína (B).

O uso da SE NaCl 0,10 M definiu ainda mais o pico formado na eluição do COL (Fig. III.13A). As leituras da absorvância a 226 nm das frações finais após a formação do pico permaneceram em torno de 0,2 a 0,3. Estas leituras mostraram-se mais próximas de zero do que aquelas encontradas com o uso de SE NaCl 0,25 M e SE NaCl 0,15 M. A caracterização em gel das frações coletadas (Fig. III.13B) mostrou o mesmo resultado observado com o uso de SE NaCl 0,15 M (Fig. III.12B). No gel observou-se a semelhança das bandas do COL eluído neste estudo (Fig. III.12B, canaletas de 2 a 6 e Fig. III.13B canaletas de 3 a 7) com as do ColC usado como padrão de pureza (Fig. III.13B, canaleta 1), e com a caracterização por SDS-PAGE de colágeno tipo I encontrado na literatura (Mukherjee e Sen, 1991; Nagai e Suzuki, 2002; Paula et al., 2002; Sato et al., 2003; Vulcani, 2004). O cromatograma obtido para o COL seguiu o mesmo padrão de outros cromatogramas para as cadeias  $\alpha$  do colágeno tipo I encontrados na literatura (Haralson e Hassel, 1995; Nagai e Suzuki, 2002).



**Figura III.13** - Cromatograma das leituras de absorvância no comprimento de onda de 226 nm das frações coletadas (●) durante a aplicação da SE NaCl 0,10 M (seta) (A); gel com aplicação nas canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 do padrão de pureza (1), do padrão de peso molecular (2), e das frações coletadas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondentes ao pico formado na eluição da proteína (B).

A fase final da purificação de COL incluiu a diálise e liofilização para retirar os contaminantes que ainda estavam presentes na amostra. Após o procedimento de purificação do COL bruto, formou-se um *pool* das frações que continham COL, identificadas na caracterização por SDS-PAGE. O *pool* foi submetido à diálise em membranas com porosidade inferior ao tamanho da proteína. O objetivo da diálise foi excluir sais ou outras moléculas não voláteis da solução protéica (Almeida e Kurtenbach, 2002). A permeabilidade das membranas de diálise faz com que moléculas pequenas do material contido no seu interior passem através dos poros para a solução tampão em que foram imersos. Com o tempo, acontece um equilíbrio entre as soluções interna e externa (Copeland, 1994).

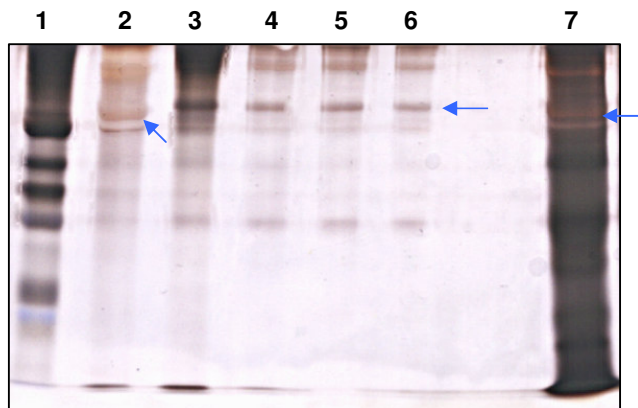
A liofilização da solução de COL dialisado permitiu a retirada de contaminantes voláteis (Almeida e Kurtenbach, 2002). O método consistiu no congelamento da solução de proteína para que depois o solvente pudesse ser sublimado pela aplicação de vácuo (Copeland, 1994).

## 2.5 CONCENTRAÇÃO DE COL

O COL após liofilização apresentou a concentração de 0,23 g/mL, obtida pelo método de Lowry e variou de 0,90 a 0,33 mg/mL considerando os coeficientes de extinção da cadeia  $\alpha 2$  (I) e de 0,58 a 0,24 mg/mL considerando os coeficientes de extinção da cadeia  $\alpha 1$  (I) do colágeno tipo I bovino encontrado na literatura. Considerou-se a menor concentração encontrada pelo coeficiente de extinção, 0,23 mg/mL, que coincidiu com a concentração encontrada pelo método de Lowry. A

concentração encontrada para o ColC, pelo método de Lowry, foi de 0,50 mg/mL, quando usada a proporção indicada pelo fabricante para sua solubilização, 1mg/1 mL de CH<sub>3</sub>COOH 0,1 N.

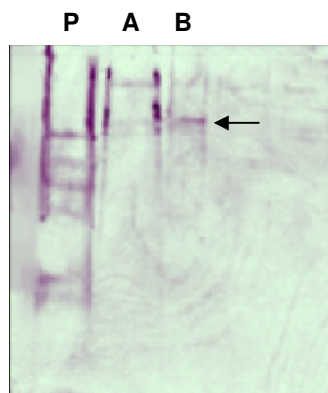
O COL e o ColC foram aplicados para caracterização por SDS-PAGE na concentração de 0,5 mg/mL. Na Figura III.14 observou-se a presença de bandas de alto peso molecular e a maior clarificação do COL, quando comparado com o COL bruto (aplicação da canaleta 7). O COL liofilizado (aplicação da canaleta 3) mostrou uma maior concentração de proteína, quando comparado com aplicações de frações isoladas (aplicações da canaleta 4, 5, 6). O COL (aplicações da canaleta 3, 4, 5, 6) mostrou aspecto similar ao colágeno bovino tipo I comercializado, o ColC (aplicação da canaleta 2). A localização das bandas do COL mostrou-se próxima àquela localização das bandas de colágeno tipo I encontrada na literatura, quando observado os pesos moleculares das bandas do padrão de proteínas (aplicação da canaleta 1).



**Figura III.14** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% de COL: padrão de alto peso molecular (1); colágeno bovino tipo I comercial, ColC (2); COL puro liofilizado (3); frações de COL durante a purificação (4, 5, 6); extrato de COL bruto (7).

## 2.6 WESTERN BLOTTING

Na figura III.15 observou-se a transferência das bandas de COL para a folha de nitrocelulose, que ficou corada nos locais correspondentes à presença das bandas no gel. Este cromógeno usado reagiu com a peroxidase do conjugado produzido em coelho anti-IgG de camundongo, que por sua vez ligou-se ao anti-colágeno tipo I produzido pelo camundongo, caracterizando COL (Fig. III.15B) como colágeno tipo I, semelhante ao colágeno bovino tipo I encontrado no comércio, ColC (Fig. III.15A). A técnica *Western blotting* é amplamente usada para análise de proteínas. As proteínas imobilizadas em membrana de nitrocelulose podem ser detectadas através do uso de enzimas ligadas a anticorpos, que são visualizadas por substrato cromogênico (Chu et al, 1988; Copeland, 1994).



**Figura III.15** – *Western blotting* de Colc (A), e COL (B); padrão de peso molecular (P).

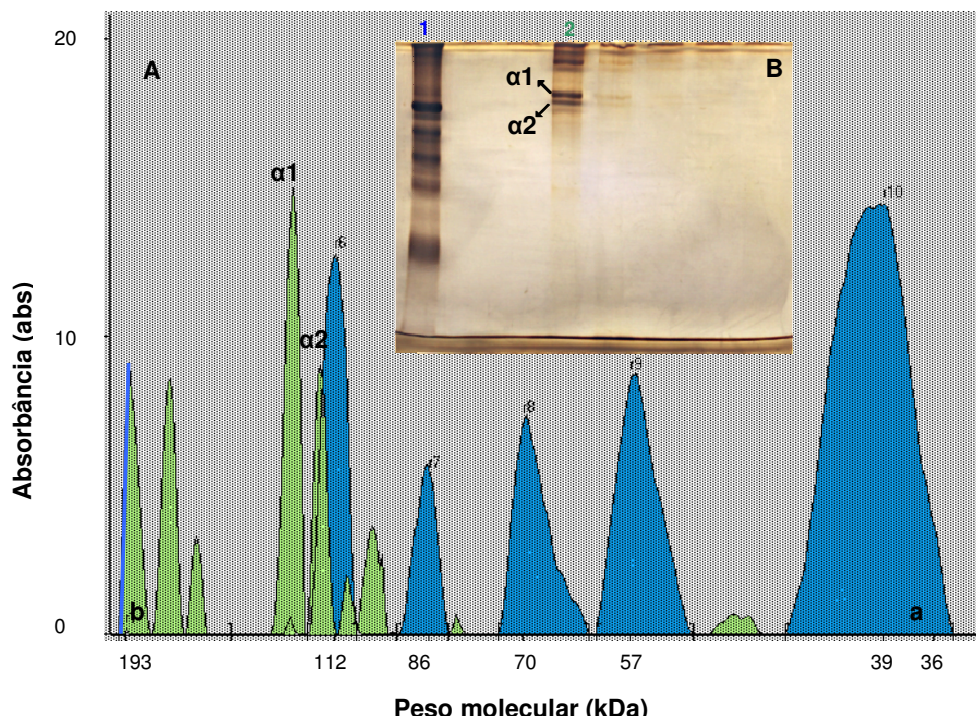
## 2.7 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

As massas moleculares das bandas de COL foram calculadas com base na curva de calibração do padrão de peso molecular, utilizando o *software Gel – Pro Analyser*. A Figura III.16A representa a curva do padrão de peso molecular ( $\Delta$ ) e a curva do peso molecular das bandas de COL ( $\Delta$ ) traçadas a partir da caracterização no gel de poliacrilamida do padrão de alto peso molecular (Fig. III.15B, canaleta 1) e da amostra de COL (Fig. III.16B, canaleta 2). Observou-se que a massa molecular das bandas de COL localizou-se na área de maior valor de peso molecular da curva padrão.

Algumas bandas localizaram-se na área de 193000 Da da curva padrão, e apresentaram pesos moleculares de 191720, 173560 e 161340 kDa. Duas bandas de maior intensidade, provavelmente correspondentes às cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  do colágeno tipo I, apresentaram-se com pesos moleculares de 125380 e 117330 Da, respectivamente. Outra banda de intensidade significativa foi observada com uma massa molecular estimada de 173560 Da, provavelmente referente às cadeias do tipo  $\beta$ , duas cadeias  $\alpha$  unidas (Bet, 1995; Lacerda et al, 1998; Pari e Venkateswaran, 2003). Mais duas bandas foram detectadas, mas de menor intensidade, uma com peso molecular de 108850 Da e outra com 55279 Da.

Os pesos moleculares relatados na literatura para as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  do colágeno tipo I obtido por tratamento alcalino com o auxílio do DMSO, são de menor valor que os pesos moleculares encontrados neste estudo (Tabela III.2). Na técnica de extração do colágeno com auxílio de solvente orgânico em meio alcalino ocorre a hidrólise seletiva de grupos carboxídeos dos resíduos de asparagina e glutamina. Há uma diminuição da intensidade das interações eletrostáticas, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, isto facilita a solubilização do colágeno derivando pesos moleculares menores (Goissis et al., 1996). O método de solubilização enzimática envolve a remoção de telopeptídeos, aumentando a fração de colágeno solúvel. Isto pode explicar o maior peso molecular encontrado para COL. Pode não ter ocorrido uma extensiva degradação ou solubilização da matriz nas condições usadas, o que também é sugerido por Lacerda et al, 1998. Outra explicação é que

mesmo sendo colágeno tipo I, estas proteínas podem apresentar pequenas diferenças em sua estrutura, de um tecido para outro do mesmo animal, ou entre mesmos tecidos de animais diferentes. Conseqüentemente isto acarretará em pesos moleculares diferentes. A caracterização da proteína em géis de poliacrilamida de concentrações diferentes também contribuem para a diferenciação do peso molecular, devido ao tamanho da abertura da malha do gel utilizado.



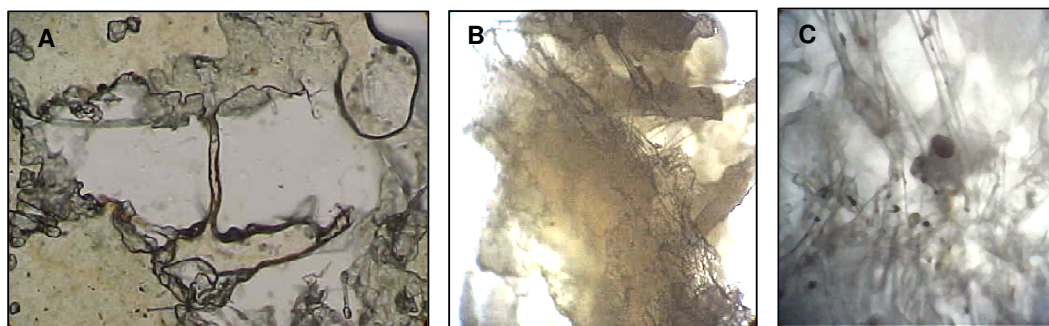
**Figura III.16** – Representação gráfica da curva do padrão de peso molecular (a) e da curva do peso molecular das bandas de COL (b) (A), calculadas a partir da caracterização no gel de poliacrilamida do padrão de alto peso molecular (canaleta 1) e da amostra de COL (canaleta 2) (B); bandas com pesos moleculares de 125380 e 117330 Da de COL correspondentes às cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  típicas do colágeno tipo I.

**Tabela III.2** – Pesos moleculares das cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  típicas do colágeno tipo I determinados por diferentes métodos de solubilização.

Método de solubilização	Matéria prima	Peso molecular (Da)		Referência Bibliográfica
		cadeia $\alpha 1$	cadeia $\alpha 2$	
Enzimático (pepsina)	PB	125380	117330	Presente estudo
DMSO em meio alcalino	Serosa bovina	98000	95500	Bet, 1995
DMSO em meio alcalino	Serosa suína	104000	98000	Lacerda et al, 1998
DMSO em meio alcalino	Serosa suína	100500	98100	Paula et al., 2002
DMSO em meio alcalino	Serosa suína	112000	106000	Tonhi e Plepis, 2002

## 2.8 MLT

Na microscopia de luz transmitida as amostras de ColC mostrou-se como uma membrana densa, onde observou-se a presença de algumas fibras (Fig. III.17A). O COL apresentou-se como uma estrutura fibrilar menos densa (Fig. III.17B) e, com um maior aumento, suas fibras mostraram-se translúcidas (Fig. III.17C).



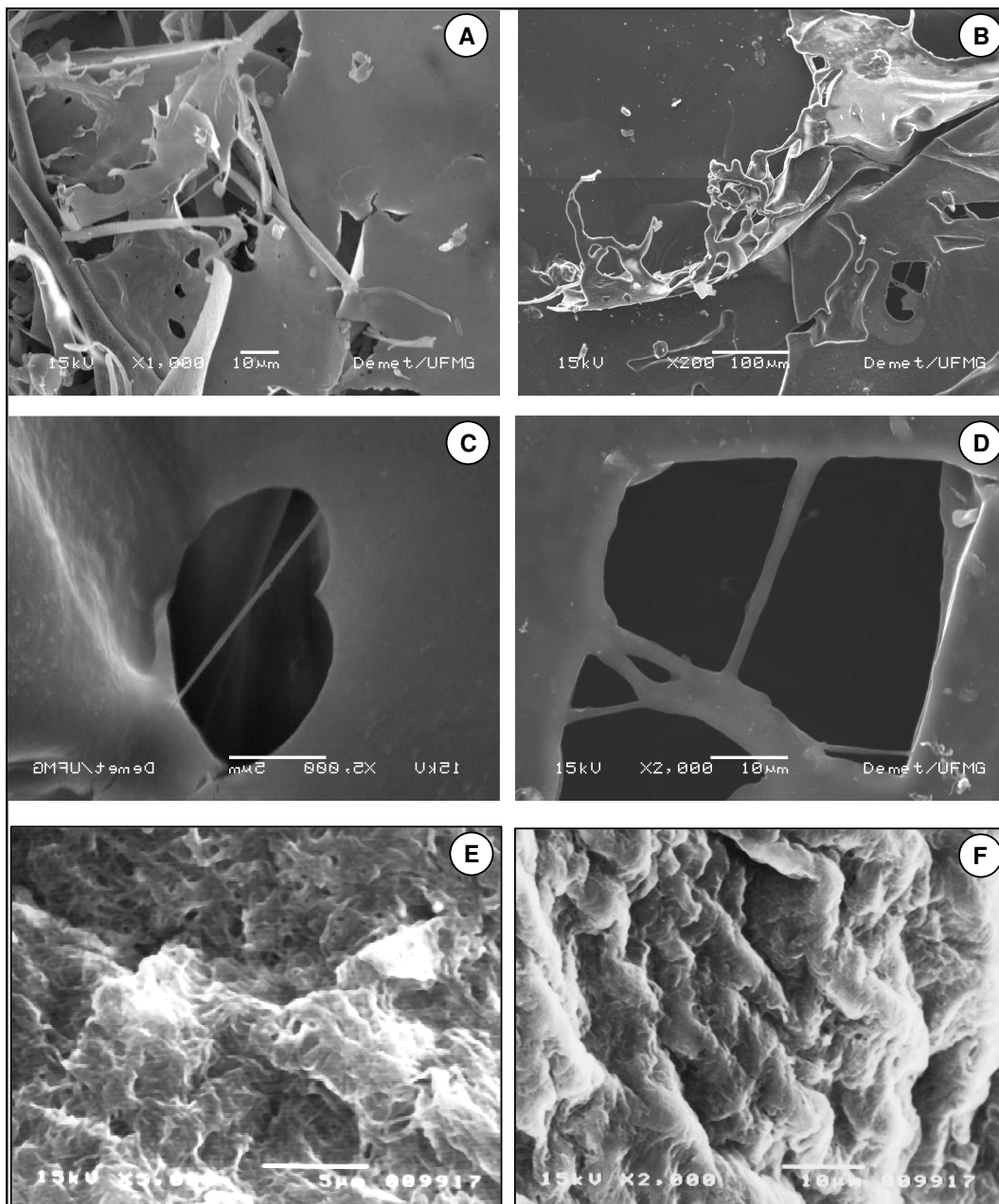
**Figura III.17** – Fotografias de MLT das amostras de ColC, com aumento de 100X (A); e das amostras liofilizadas de COL, com aumento de 100X (B), e de 400X (C).

## 2.9 MEV/EDS

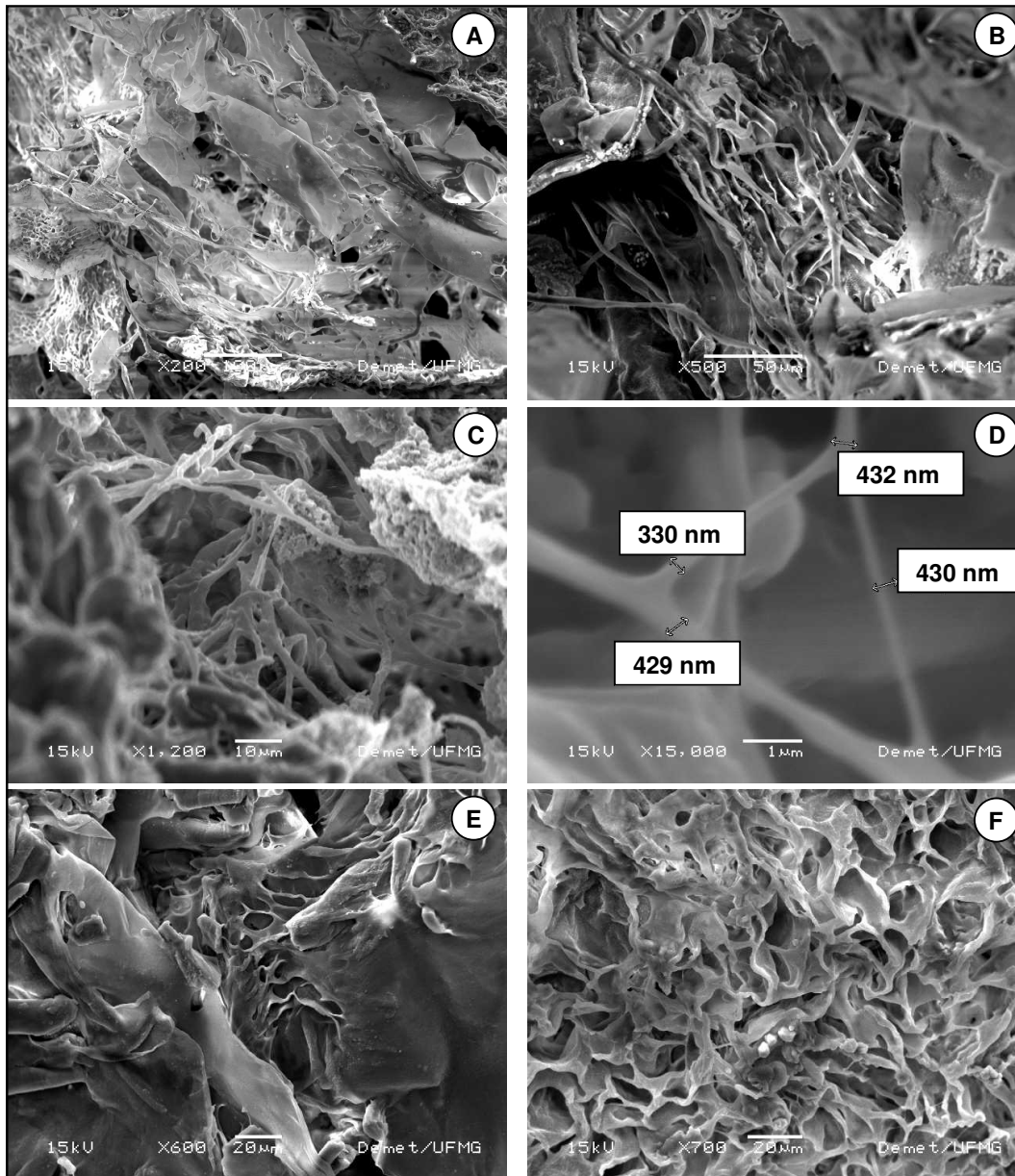
As micrografias de MEV sugerem a semelhança da estrutura observada no COL (Fig. III.18A e 18C), quando comparada com a estrutura do ColC (Fig. III.18B e 18D). As micrografias de PB, que se caracterizaram pela orientação paralela de suas fibrilas entrecruzadas (Fig. III.18E e 18F) sugerem uma completa remodelação do arranjo das fibras colágenas na estrutura de COL.

O aspecto fibrilar observado no PB transformou-se em uma estrutura amorfa (Fig. III. 19A), onde se observou uma estrutura composta de fitas (Fig. III.19B). Em determinadas áreas observou-se a presença de nanofibras desorganizadas (Fig. III.19C e D), e áreas que sugeriram uma estrutura de aspecto esponjoso (Fig. III.19E) com poros irregularmente distribuídos e interconectados (Fig. III.19F).

Em vários estudos de preparação e caracterização por MEV de colágeno tipo I concluiu-se que o padrão fibrilar característico do material nativo dá lugar a uma estrutura do tipo lamelar, provavelmente como resultado de um novo padrão de balanço de forças hidrofílicas e hidrofóbicas no interior da matriz (Bet, 1995; Lacerda et al., 1998; Goissis et al., 1999a; Pieper et al., 1999; Rocha, 2000; Vulcani, 2004). Os resultados presentes neste estudo também suportaram esta conclusão.



**Figura III.18** – Micrografias de MEV da estrutura de COL (A) com aumento de 1000X, e (C) com aumento de 5000X; e de ColC (B) com aumento de 200X, e (D) com aumento de 2000X; da estrutura de PB com aumento de 5000X (E), e com aumento de 2000X (F); 15 keV.



**Figura III.19** – Micrografias de MEV da estrutura amorfa de COL, aumento de 200X (A), com aparência de fitas desorganizadas, aumento de 500X (B); de áreas com presença de nanofibras (C e D), aumento de 1.200X e 15.000X, e de áreas com estrutura de aspecto esponjoso (E e F), aumento de 600X e 700X; 15 keV.

Os espectros de EDS de COL mostraram a presença de picos de alta intensidade sugerindo alto conteúdo de carbono (C), picos de menor intensidade correspondentes à presença de pequenas quantidades de Na e Cl, e picos de baixa intensidade correspondentes a traços de elementos na constituição das amostras, como no estudo de Andrade et al., em 2004. Na Figura III.20A pode ser analisado o EDS padrão para as amostras de COL, comparado com o EDS de ColC, (Fig. 20B) e com o da matéria prima PB (Fig. 20C).

A presença de NaCl no colágeno proporciona equilíbrio de sua estrutura, contribuindo para que não haja a desnaturação da proteína. Entretanto, a presença de quantidades maiores de NaCl, bem como de outros elementos, na constituição do colágeno contribui para a contaminação do material. A caracterização por MEV/EDS foi determinante para observação da pureza do COL. Micrografias de MEV mostraram a contaminação por NaCl das amostras de COL liofilizadas, antes de serem submetidas ao procedimento de diálise (Fig. III.21A e 21B), e após a diálise (Fig. III.21E). Os respectivos espectros de EDS podem ser analisados antes (Fig. III.21C e 21D) e após a diálise (Fig. III.21F).

## 2.10 FTIR

O espectro de FTIR da amostra de COL bruto (Fig. III.22A) pode ser comparado com o espectro de PB quimicamente tratado com soluções de acetona (Fig. III.22B). Após a digestão enzimática não se observou a absorção de novas bandas na análise do espectro, quando comparado com o espectro da estrutura nativa de PB. As bandas de COL bruto mostraram-se mais definidas que o PB, principalmente na região de  $1653\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação C = O referente ao estiramento da carbonila da amida II; em  $1535\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação N – H das amidas I; e em  $1458\text{ cm}^{-1}$  devido à combinação das ligações N – H e C – N atribuídas à presença de absorção da amida II; e na região entre  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $600\text{ cm}^{-1}$  e  $1126\text{ cm}^{-1}$  que apresenta uma vibração de intensidade moderada, típica de proteínas, correspondente à deformação angular fora do plano da ligação N–H da amida II (Pavia et al., 1996; Payne e Veis, 1988; Ogawa e Plepis, 2001).

Na Figura III.23 podem se visualizados os espectros de FTIR de COL (a) e de COL bruto (b), após sua purificação e liofilização. Observou-se que a absorção das bandas de COL foi mais intensa nas regiões referentes às ligações N – H do grupo  $-\text{NH}_2$  da amina primária, em  $3357$  e  $3328\text{ cm}^{-1}$ ; C = O em  $1664\text{ cm}^{-1}$ ; N – H em  $1609\text{ cm}^{-1}$ ; e C – N e N – H em  $1454\text{ cm}^{-1}$  e  $1413\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. No espectro de FTIR de COL também se observou bandas absorvidas nas frequências correspondentes a anéis pirrolidínicos de prolina e hidroxiprolina, características que, associadas à absorção das bandas das amidas, sugeriram a presença de colágeno, como relatado por Liu et al., 1999, Ogawa e Plepis, 2001, Paula et al., 2002.

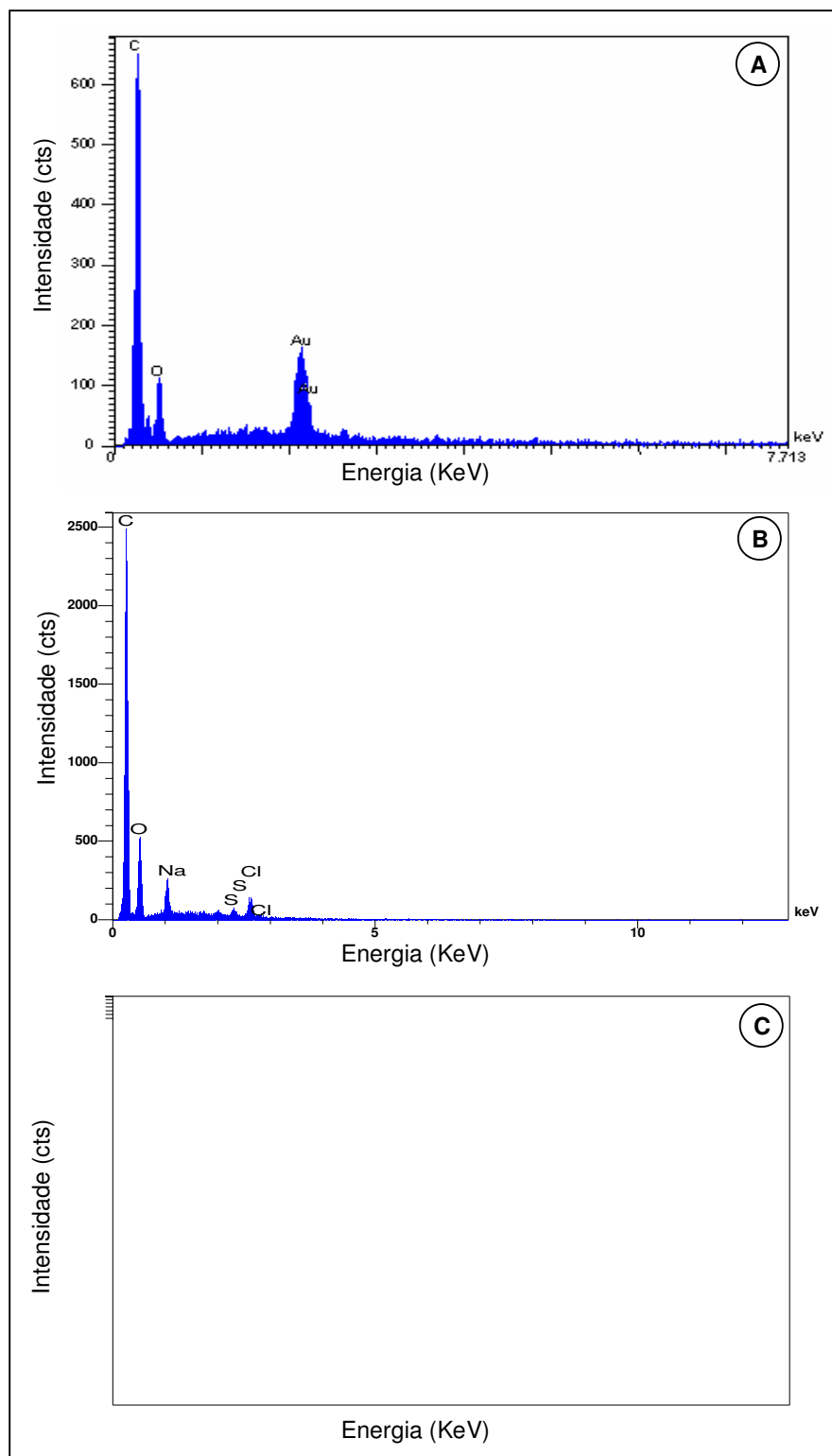
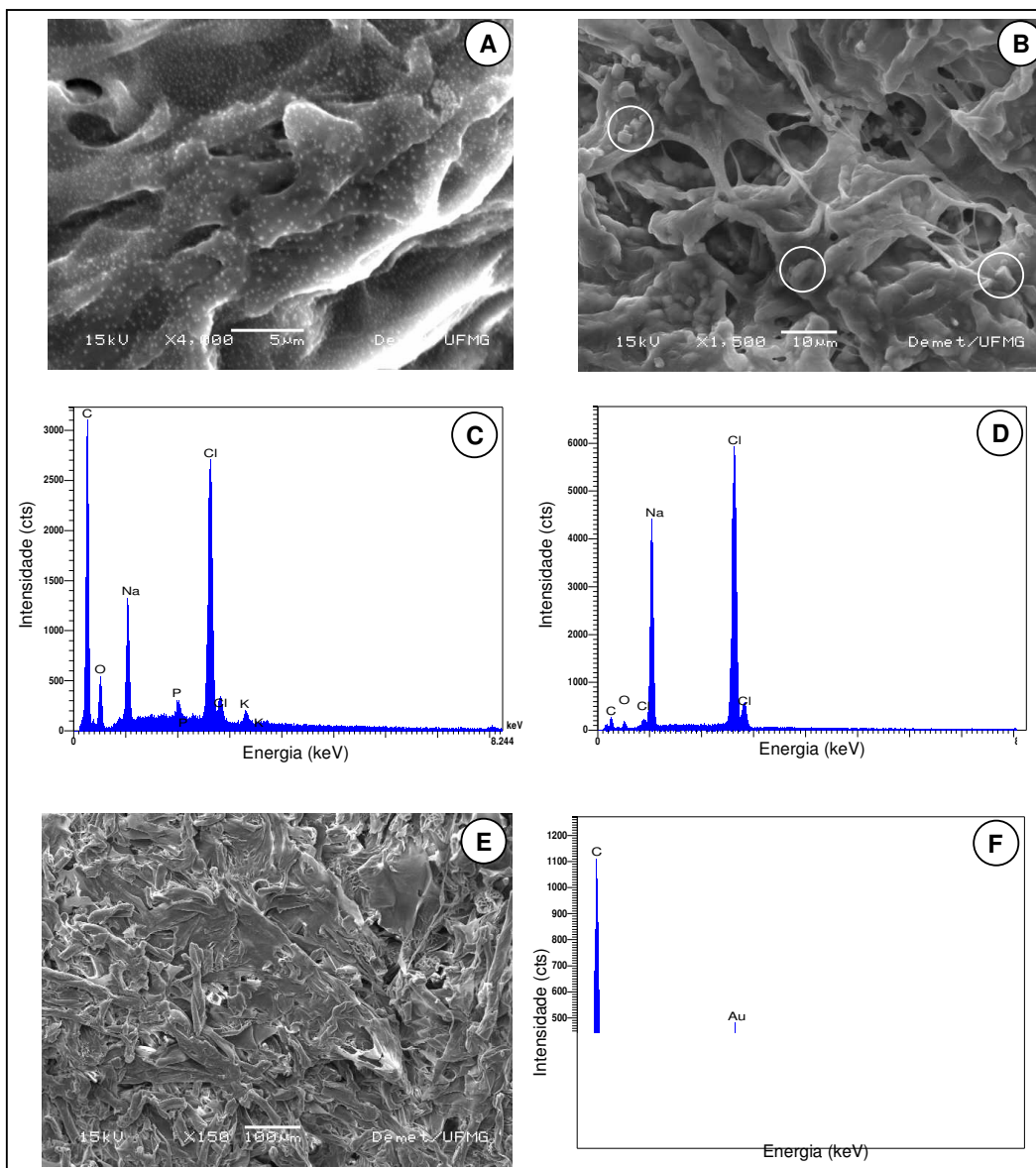
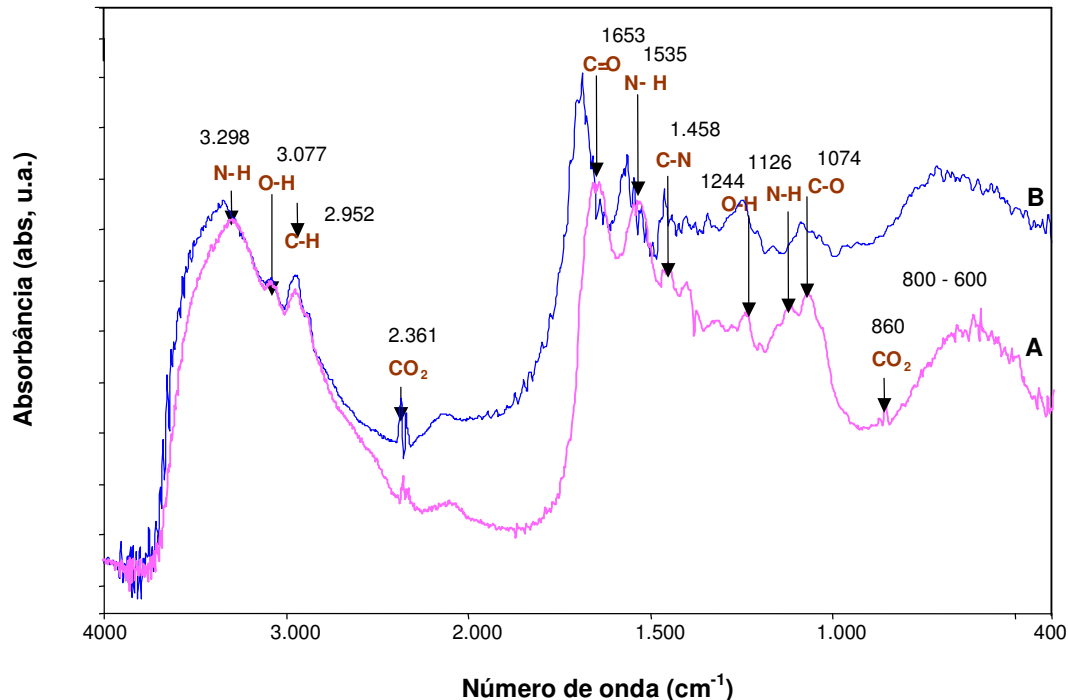


Figura III.20 – Espectros de EDS de PB desidratado (A), COL (B) e CoIC (C).



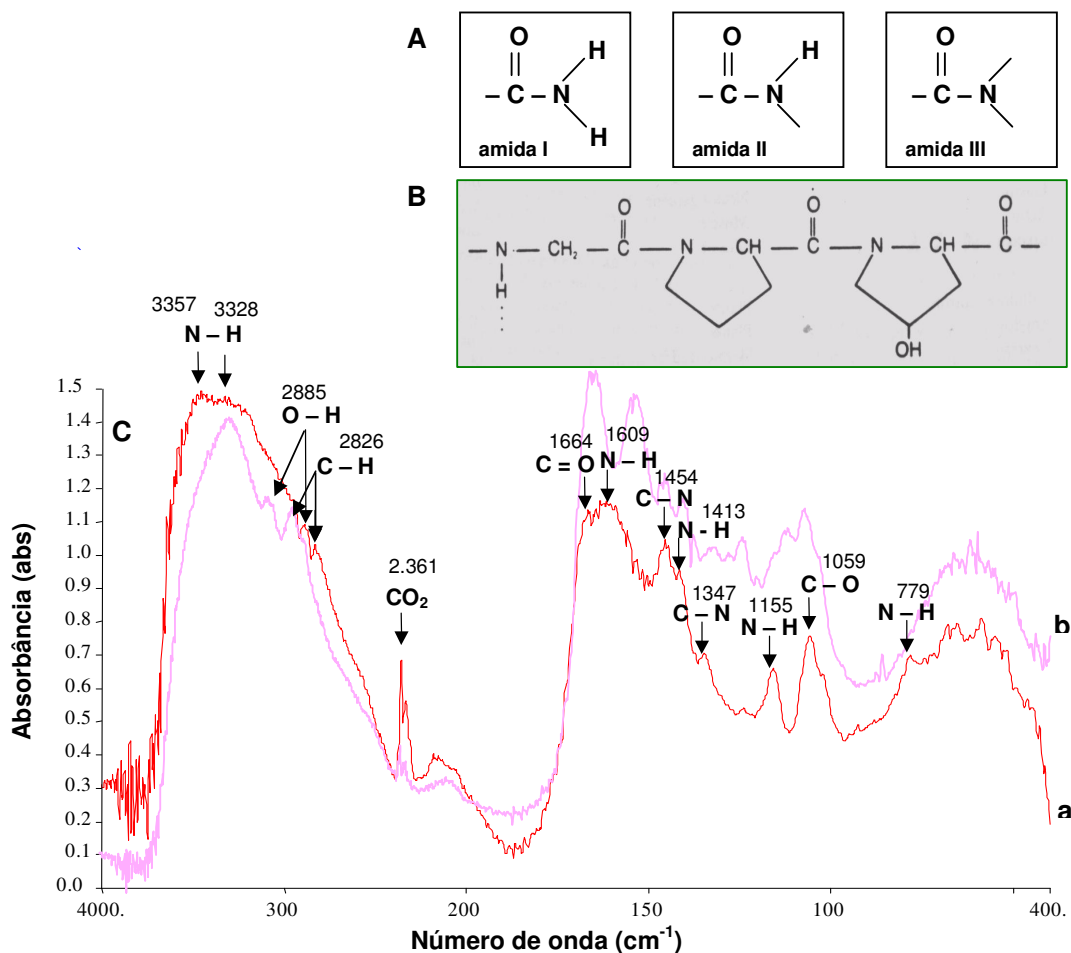
**Figura III.21** - Micrografias de MEV das amostras de COL liofilizadas, antes do procedimento de diálise (A e B), e após a diálise (E); espectros de EDS de COL antes (C e D) e após a diálise (F); cristais de sal na superfície do COL (B - círculos) detectados no EDS como Na e Cl (D).



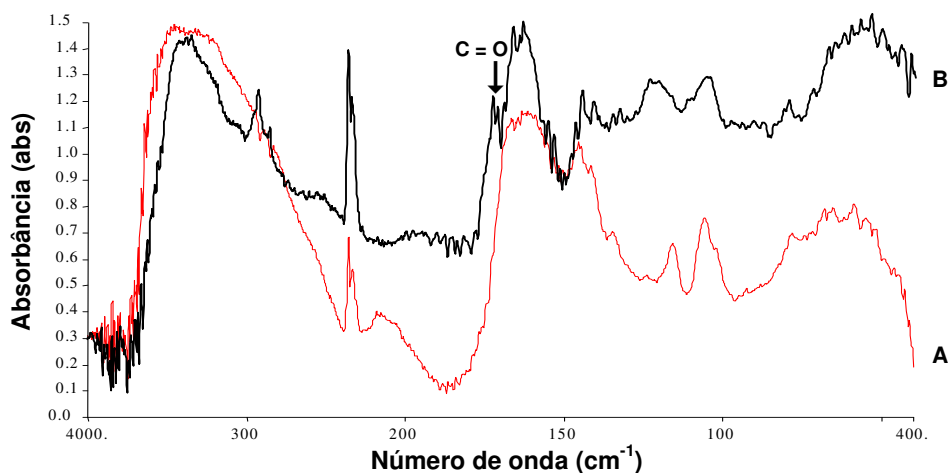
**Figura III.22** – Espectro de FTIR de COL bruto (A) e PB (B).

As bandas analisadas nos espectros de COL evidenciaram a presença das amidas I, II e III, importantes grupos funcionais nos organismos vivos, que ligam os aminoácidos entre si para formar as proteínas (Solomons, 1982) (Fig. III.23A). Na Figura III.23B pode ser observada a representação gráfica da estrutura química da seqüência de aminoácidos que formam a cadeia  $\alpha$  da molécula de colágeno tipo I: glicina, prolina e hidroxiprolina (Viidik e Vuust, 1980; Ten Cate, 1994; Yannas, 1996; Dornelles, 2003) com a presença de ligações amídicas entre elas. Os resultados deste estudo sugeriram a eliminação de contaminantes desde a obtenção de COL bruto do pericárdio bovino até a obtenção de uma proteína pura com evidências das bandas de absorção características do colágeno tipo I (Fig. III.23C).

O espectro de FTIR do COL pode ser comparado ao espectro do colágeno comercial, ColC, utilizado neste estudo como padrão de pureza (Fig. III.24). Os espectros mostraram-se similares, a não ser pela absorção de mais algumas bandas no espectro de ColC, não observadas no COL, correspondentes à ligação C = O do grupo funcional  $-\text{COOH}$  em  $1725\text{ cm}^{-1}$ ,  $1711\text{ cm}^{-1}$  e  $1691\text{ cm}^{-1}$ , de acordo com Mantsch e Chapman, em 1996.



**Figura III.23** – Representação gráfica da estrutura química de amidas (A) e da seqüência de aminoácidos que formam a cadeia  $\alpha$  da molécula de colágeno tipo I: glicina, prolina e hidroxiprolina (B); espectro de FTIR de COL com as ligações químicas referentes aos grupos funcionais presentes e identificação de suas respectivas bandas de absorção (a), espectro de FTIR de COL bruto (b)

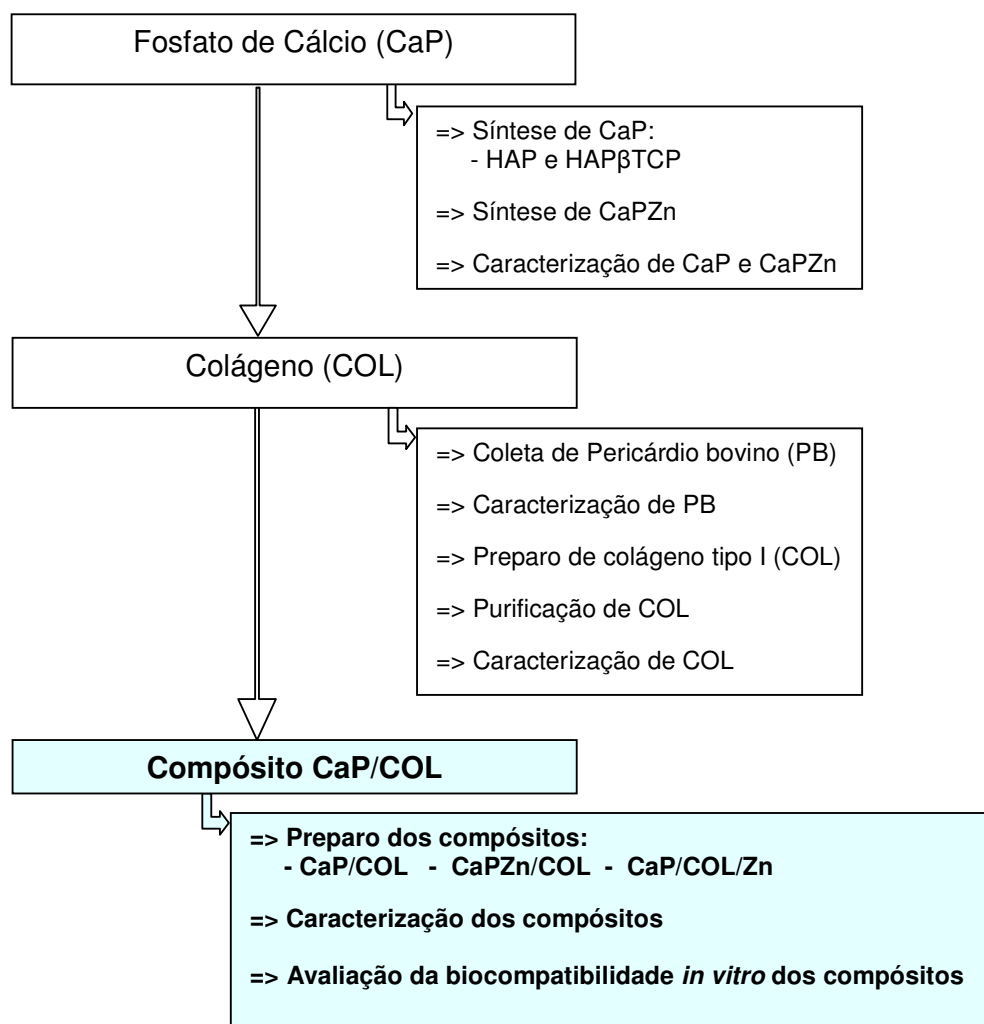


**Figura III.24** – Espectro de FTIR de COL (A) e de COLC (B).

O colágeno obtido neste estudo foi caracterizado como colágeno bovino tipo I puro pelos vários métodos de caracterização utilizados. Esta proteína foi obtida de pericárdio bovino, matéria prima economicamente acessível, através de um método simples adequado para sua purificação, que poderá ser aplicado à sua produção em grande escala. Após a obtenção do COL sentiu-se a necessidade de aprimoramentos em alguns estágios do seu processamento, como por exemplo, a obtenção de melhor rendimento final, bem como a utilização de novas técnicas de caracterização, como métodos para a determinação de sua concentração. Desta maneira, este material poderá adequar às suas expectativas de uso na área da engenharia de tecidos, principalmente associado a outros biomateriais.

## CAPÍTULO IV – COMPÓSITOS FOSFATOS DE CÁLCIO/COLÁGENO

A terceira etapa deste trabalho encontra-se em evidência no fluxograma apresentado na Figura IV.1 e corresponde ao Capítulo IV.



**Figura IV.1** – Esquema das etapas realizadas no desenvolvimento do trabalho, com evidência da etapa referente ao capítulo IV.

# 1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

## 1.1 MATERIAIS

### 1.1.1 Materiais e equipamentos usados na síntese e na avaliação da biocompatibilidade dos compósitos:

- ácido acético glacial 100%, CH<sub>3</sub>COOH, Merck®;
- agitador magnético com controle de temperatura, Fisatom®, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- BCIP-NBT - 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina - Nitroblue tetrazólio clorídrico;
- balança eletrônica analítica, modelo Q-500L210C - Quimis®, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- barras magnéticas, beckers, lâminas e lamínulas de vidro, frascos plásticos esterilizados, LASMAT, DEMET/EE-UFGM;
- CaP (amostras A3 e A5 - síntese R1 - capítulo II);
- CaPZn (amostra A10 e A11 - síntese R3 - capítulo II);
- células osteoblásticas primárias de calvária de ratos Wistar neonatos, do Laboratório de Imunologia e Bioquímica, Departamento de Imunologia e Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFGM;
- COL (colágeno bovino tipo I puro liofilizado - capítulo III);
- colagenase - Boehringer®;
- filtro 0,45 µm Millex – HV, Millipore®;
- iodeto de propídeo – American Bionalytical®;
- kit para evidenciação de fosfatase alcalina - Gibco®;
- meio de cultura RPMI-1640 - Sigma®;
- MTT – (3-[4,5-dimetiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazólio brometo - Sigma®;
- nitrato de zinco P.A., Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Labsynth®.
- pipetas de vidro e pipetadores automáticos, do Laboratório de Imunologia e Bioquímica – ICB/UFGM;
- pipetas e ponteiros descartáveis de 10, 200 e 1000 µL;
- placas de cultura celular de 24 poços, Nunc®;
- placas de Petri de polipropileno, estéreis e descartáveis - J. Prolab®;
- PBS - solução salina tamponada com fosfato;
- tripsina/EDTA;
- tubos Falcon de 500, 1500 e 2000 µL.

### 1.1.2 Ferramentas e equipamentos utilizados na caracterização dos compósitos e na avaliação da biocompatibilidade:

- capela de fluxo laminar com lâmpada germicida (ultravioleta), modelo VLFS12 - Veco<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, CPD – FUNED;
- capela de fluxo laminar, modelo Bio Safe Plus classe IIA - Veco<sup>®</sup>, do Laboratório de Imunologia e Bioquímica – ICB/UFMG;
- difratômetro, modelo PW1710 - Philips<sup>®</sup>, do Laboratório de Raios-X , DEMET/EE - UFMG;
- espectrofotômetro - Laboratório de Imunologia e Bioquímica – ICB/UFMG;
- espectrofotômetro de infravermelho, modelo Paragon 1000 – Perkim-Elmer<sup>®</sup>, do Laboratório de Materiais Cerâmicos, DEMET/EE – UFMG;
- estufa de CO<sub>2</sub> Queue<sup>®</sup>, - Laboratório de Imunologia e Bioquímica – ICB/UFMG;
- leitor de ELISA, modelo Elx800 - Bio-Tek<sup>®</sup>, Laboratório de Imunologia e Bioquímica ICB/UFMG;
- liofilizador - da Área Multifins, CPD – FUNED;
- microscópio de luz transmitida, modelo CH30 – Olympus<sup>®</sup>, acoplado com sistema de exposição automática para fotomicrografia, modelo PM-104K3 - Olympus<sup>®</sup>, LASMAT – DEMET/EE-UFMG;
- microscópio de luz transmitida, modelo MLT - Nikon<sup>®</sup>, Laboratório de Imunologia e Bioquímica – ICB/UFMG;
- microscópio de luz transmitida, modelo SC 35 tipo 12 - IX70 - Olympus<sup>®</sup>, acoplado com sistema de fotografia Olympus<sup>®</sup>, do Laboratório de Cultura celular, ICB/UFMG;
- microscópio eletrônico de varredura, modelo JSM - 6360 LV – JEOL<sup>®</sup>, acoplado com espectrômetro dispersivo por dispersão de energia de raios-X (EDS) modelo Quest – Thermo Noram<sup>®</sup>, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, DEMET/EE – UFMG;
- *software* Prism<sup>®</sup>, versão 3.0, Laboratório de Imunologia e Bioquímica – ICB/UFMG.

## 1.2 DESENVOLVIMENTO DOS COMPÓSITOS

Para a obtenção dos compósitos foram preparadas misturas com diferentes materiais constituintes, utilizando as mesmas condições experimentais (Tabela IV.1). Os compósitos foram preparados utilizando os pós de CaP sintetizados em A3 e A5 (R1), A10 e A11 (R3), e COL liofilizado diluído em ácido acético 0,1 N na concentração de 0,5 mg/mL. Para o preparo dos compósitos foram experimentadas porcentagens em peso de CaP/COL.

### 1.2.1 Compósito HAP/COL (C1)

Os compósitos C1 foram preparados nas proporções de HAP:COL: 60%:40%, 70%:30%, 75%:25%, 80%:20% e 90%:10%. Um exemplo de preparação, a relação 80%:20%, é descrita a seguir:

• a amostra foi preparada a partir da lenta adição de 66 mg de HAP em 16,5 mg de COL diluídas em 33 ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1 N; a mistura foi mantida sob agitação lenta à temperatura de  $37\pm 3^\circ\text{C}$ ; após 12 h a mistura foi vertida em uma placa de Petri esterilizada e descartável; as misturas foram congeladas em freezer biológico a  $-80^\circ\text{C}$  por 15 h e, em seguida, foram liofilizadas; após liofilização, os compósitos foram armazenados a  $4^\circ\text{C}$  em recipiente vedado.

As amostras preparadas com as outras relações seguiram os mesmos procedimentos descritos acima, e a melhor relação obtida nesta amostra foi utilizada para o preparo dos compósitos C2, C3, C4 e C5.

**Tabela IV.1 – Identificação e composição das amostras dos compósitos CaP/COL**

<b>Amostra</b>	<b>Materiais Constituintes</b>
C1	HAP + COL
C2	HAPZn + COL
C3	HAP $\beta$ TCP + COL
C4	HAP $\beta$ TCPZn + COL
C5	HAP + COL + $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

### 1.2.2 Compósitos HAPZn/COL (C2), HAP $\beta$ TCP/COL (C3), HAP $\beta$ TCPZn/COL (C4)

No preparo dos compósitos C2, C3 e C4 foi usada a mesma razão de HAP:COL usada em C1. A seguir, a mistura foi submetida aos mesmos procedimentos experimentais do compósito C1.

### 1.2.3 Compósito HAP/COL/ $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (C5)

A amostra C5 foi preparada usando os mesmos procedimentos de mistura e a mesma relação HAP:COL usada em C1. No momento da mistura, adicionou-se 0,3 mg de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  correspondente à concentração de 0,15% mol (Anexo 1D). A mistura dopada com zinco foi submetida aos mesmos procedimentos experimentais da amostra C1.

## 1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS

A caracterização dos compósitos foi realizada por ML, MEV/EDS, XRD e FTIR usando as mesmas técnicas e equipamentos já descritos nos capítulos anteriores.

### **1.3.1 EDS**

A análise elementar qualitativa de amostras dos compósitos foi realizada através do detector de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS), acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, pela técnica de elétrons primários e secundários.

### **1.3.2 MEV**

As amostras dos compósitos foram recobertas com Au para análise de sua estrutura e obtenção de micrografias, no microscópio eletrônico de varredura.

### **1.3.3 XRD**

Os compósitos sintetizados foram submetidos à difração de raios-X para identificação e análise das fases cristalográficas presentes no material.

### **1.3.4 FTIR**

Amostras dos compósitos foram maceradas em gral de ágata juntamente com KBr seco para análise no espectrofotômetro de infravermelho. Os espectros foram normalizados para absorbância = 1,0.

## **1.4 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DOS COMPÓSITOS**

### **1.4.1 Preparo das amostras**

Amostras dos compósitos C1, C2, C3, C4 e C5 foram usadas nos testes de citotoxicidade. As amostras foram colocadas em poços de placas para cultura celular e submetidas à esterilização em capela de fluxo laminar com lâmpada germicida (luz ultravioleta) por 2 h. Em seguida, as placas foram fechadas e acondicionadas em invólucros plásticos vedados com fita aderente. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento de uso.

### **1.4.2 Cultura de osteoblastos**

Os osteoblastos foram isolados de calvária de rato Wistar neonatos até 5 dias pelo uso de um sucessivo método de digestão enzimática. Os ossos parietais dos ratos foram removidos e colocados em tampão salina estéril, sem cálcio e sem magnésio. O tecido foi cortado em pequenos pedaços e digeridos por 5 min com tripsina/EDTA 1% (p/v), seguidos por 4 incubações seqüenciais com colagenase 2% por 37°C por 45 min cada. O sobrenadante resultante da primeira digestão foi descartado por conter alta concentração de fibroblastos. Os outros sobrenadantes com alta proporção

de pré-osteoblastos e osteoblastos foram centrifugados por 1000xg por 5 min, e cada precipitado foi ressuspenso em 5 mL do meio de cultura, RPMI suplementado com soro bovino fetal 10%, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As células foram colocadas em frascos de cultura de células de 25 mL e foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% sob temperatura de 37°C e 100<sup>-10</sup> de umidade para crescimento. Após confluência as células foram usadas para os experimentos na passagem 2.

#### **1.4.3 Viabilidade celular**

Os osteoblastos foram plaqueados na densidade de  $1 \times 10^5$  em placas de cultura de 24 poços e os compósitos, como preparados, foram colocados em contato com as células. Três triplicatas de cada compósito e a morfologia das células foram observadas durante todo o tempo do experimento pela microscopia de luz transmitida. A cultura de osteoblastos sem a presença dos compósitos foi usada como controle (Ct). As células em contato com os compósitos foram observadas antes e após 24, 48 e 72 horas de contato com os materiais. Após 72 h a viabilidade e proliferação dos osteoblastos foram medidos pelo ensaio de MTT, baseado na redução do sal tetrazólico para cristais de formazan. O MTT possui uma tonalidade amarela e é solúvel em água. Este componente pode ser transformado pela enzima desidrogenase da mitocôndria em um sal insolúvel em água e de cor púrpura. Somente células viáveis podem metabolizar MTT. Este sal é absorvido em um determinado comprimento de onda, sendo proporcional à quantidade de células viáveis. Em cada poço foi adicionado 170 µL de MTT, 5 mg/mL. Após 2 h foi analisada a morfologia da célula no microscópio de luz transmitida. Os cristais de formazan formados foram solubilizados com 210 µL de SDS 10% HCl e incubados por 18 h. Em seguida, foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm.

#### **1.4.4 Ensaio de apoptose**

No intervalo de observação das células no microscópio foram visualizadas células mortas, sendo realizado o ensaio de apoptose após 72 h. A cultura foi tratada com iodeto de propídeo, 50 µg/mL. Cinco minutos foram aguardados e os poços foram lavados com PBS. Os osteoblastos foram observados no microscópio de luz transmitida, e em seguida, a luz foi substituída por luz ultravioleta, sendo possível observar e contar, em um campo pré-determinado, as células com núcleos apoptóticos corados pelo iodeto de propídeo.

#### **1.4.5 Produção de fosfatase alcalina**

Osteoblastos foram novamente plaqueados na densidade de  $1 \times 10^5$  em placas de cultura de 24 poços e quantidades menores dos compósitos, como preparados, foram colocados em contato com as células. Triplicatas de cada compósito foram realizadas para três experimentos individuais e a morfologia das células foram observadas durante todo o tempo dos experimentos pela microscopia de luz transmitida, obtendo-se fotografias. A cultura de osteoblastos sem a presença dos compósitos foi

usada como controle (Ct). A produção de fosfatase alcalina foi avaliada pelo ensaio BCIP-NBT, que baseia na propriedade cromogênica destas duas substâncias. O 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina (BCIP) e o Nitroblue tetrazólio clorídrico (NBT) são usados conjuntamente na proporção de 1:1 molar, sob condições alcalinas para sensibilidade ótima. A reação de cor é iniciada pela clivagem do grupo fosfato do BCIP pela fosfatase alcalina presente. Essa reação inicia o aparecimento de cor azul e libera um próton que ao reduzir o NBT o faz liberar uma cor púrpura que junto com o azul formam um precipitado arroxeadado. O sobrenadante de cada poço foi retirado e a camada de foi lavada 2 vezes com PBS. Em cada poço foram acrescentados 200  $\mu$ L de SDS 10% e a placa foi incubada por 18 h. A absorbância foi medida a 595 nm.

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar.

#### **1.4.6 Teste estatístico**

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste da análise de variância ANOVA, usando o pós-teste de Bonferroni.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPÓSITOS

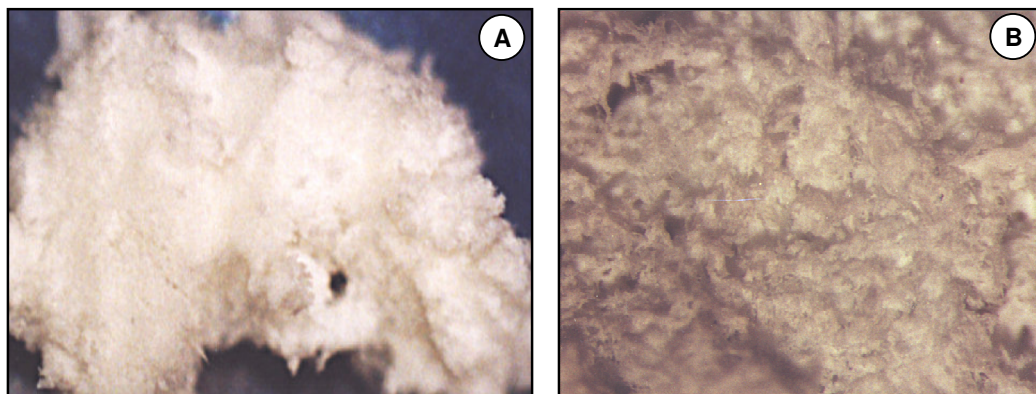
A proporção de 80% de HAP e 20% de COL apresentou uma manta mais homogênea, na qual observou-se uma total agregação da HAP no COL, sendo utilizada no preparo de todos os compósitos. Na proporção de 90%/10% o material apresentou-se quebradiço e com partículas de HAP visivelmente expostas. Nas proporções abaixo de 80%:20% as mantas apresentaram-se gradativamente mais viscosas. A proporção de 80% em peso de HAP e 20% em peso de solução de COL foi escolhida como padrão no preparo das amostras.

As amostras dos compósitos, após a liofilização, mostraram-se como uma manta de aspecto esponjoso e de cor esbranquiçada (Fig. IV.2). Os compósitos permitiram, com a utilização de uma espátula, serem conformados em formas de silicone. Na Figura IV.2 pode ser visualizado o aspecto dos compósitos com diferentes proporções, após a liofilização (A), a ampliação da figura da manta com proporção 80%/20% (B), e os modelos de amostras obtidas deste compósito (C).



**Figura IV.2** – Fotografia dos compósitos com diferentes proporções de HAP/COL (A); compósito C1 na proporção 80%/20% após liofilização (B); e variados modelos obtidos do compósito em formas de silicone (C).

A estrutura do compósito desenvolvido neste estudo (Fig. IV.3A) pode ser comparada, macroscopicamente, à de um compósito hidroxiapatita/colágeno comercial (Fig. IV.3B), sugerindo uma estrutura de aspecto homogêneo. A relação HAP/COL de 80%/20% em peso foi suficiente para fazer com que todas as partículas de hidroxiapatita ficassem agregadas para formar um compósito estável.



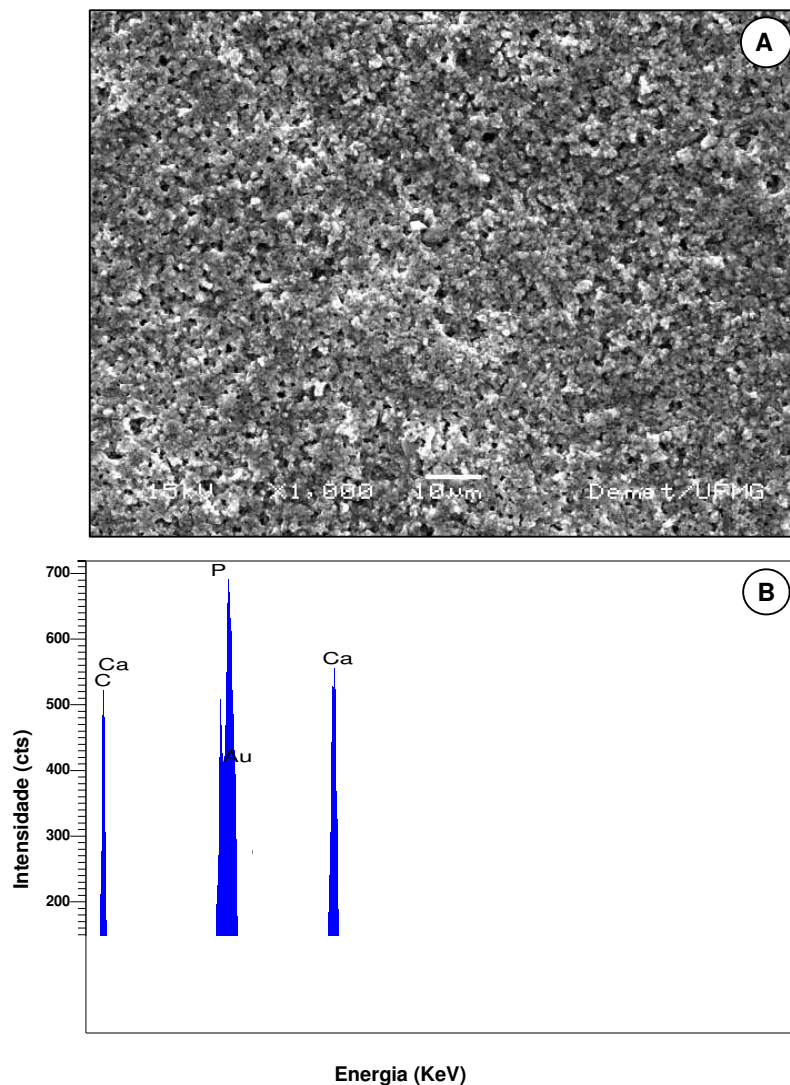
**Figura IV.3** – Fotografia na lupa estereoscópica de uma porção da manta do compósito C1 (A); e da manta de um compósito hidroxiapatita/colágeno comercial, 32X (B).

### 2.2.1 MEV/EDS

A morfologia da superfície da amostra de HAP/COL é mostrada na micrografia de MEV da Figura IV.4A, onde foram observadas duas fases distintas, sugerindo a formação de um material compósito. Os resultados da análise qualitativa elementar por EDS dos compósitos HAP/COL (Fig. IV.4B) apresentaram picos de maior intensidade referentes ao Ca e P, sugerindo a presença de hidroxiapatita como constituinte do compósito. O espectro também mostrou os picos de baixa intensidade das impurezas mostradas nos espectros de EDS da HAP. Notou-se um pico de alta intensidade de C, elemento constituinte principal da parte inorgânica do compósito, e a presença de pequenas quantidades de Na e Cl, como apresentado no espectro de EDS do COL. Os constituintes HAP e COL dos compósitos mostraram as mesmas características apresentadas quando analisados por EDS separadamente. Esses resultados sugerem a formação de um novo material, o compósito HAP/COL. Os resultados de EDS obtidos nesta amostra de HAP/COL estão de acordo com os estudos de Lin et al., em 2005.

A manta formada após a liofilização do compósito foi rompida com o auxílio de duas pinças que forçaram o material em sentido contrário uma à outra. A superfície de ruptura foi analisada por MEV e revelou a distribuição das partículas de HAP na matriz de COL (Fig. IV.5). As partículas mostraram-se envoltas pelo material colagenoso (seta estreita), e poucas partículas mostraram-se expostas (seta larga), o que provavelmente pode ter acontecido pela ruptura do material. O espectro de EDS pontual da partícula exposta (seta larga) pode ser visto na Figura IV.6A, que mostra picos de alta intensidade

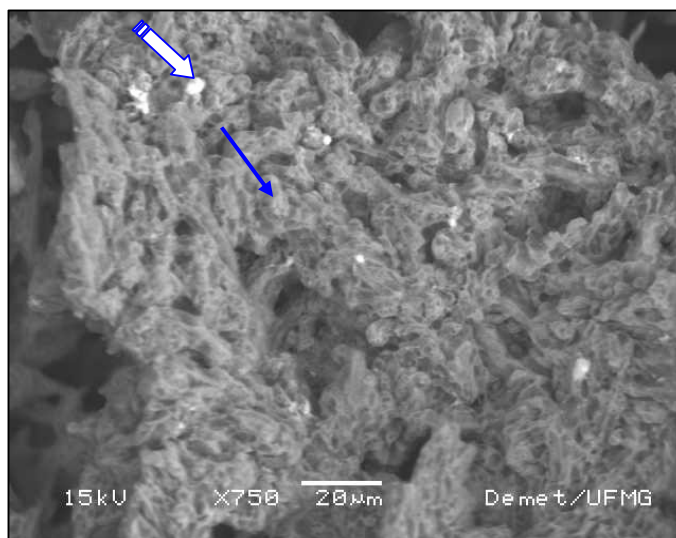
de Ca e P; e o espectro da partícula agregada ao colágeno (seta estreita) pode ser observado na Fig. IV.6B.



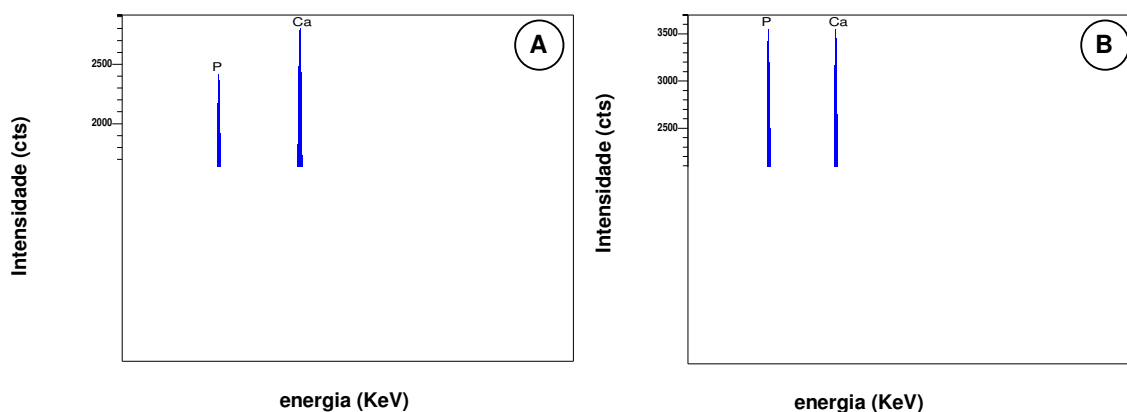
**Figura IV.4** - Micrografia de MEV da superfície da amostra C1, HAP/COL, com distribuição das partículas de HAP na matriz de COL (A), aumento de 1000X, 15 KeV; espectro de EDS com picos de alta intensidade dos principais constituintes do compósito: C, Ca e P.

As imagens de MEV do compósito C1 sugeriram que houve distribuição das partículas de HAP em toda a extensão da matriz de COL. Mesmo assim, em algumas áreas observou-se concentração de partículas, que pode ser atribuída ao próprio tamanho dos grãos de HAP, à não uniformidade de tamanho e forma desses grãos, à sua facilidade de aglomeração, ou até mesmo por uma relação HAP/COL ainda não adequada. Nos compósitos C1 com relações abaixo de 80%:20% observou-se áreas constituídas apenas pela matriz e áreas com maior concentração de fase inorgânica

(Fig.IV.7A), sugerindo uma distribuição não homogênea dessas partículas, atribuída à maior quantidade de matriz.



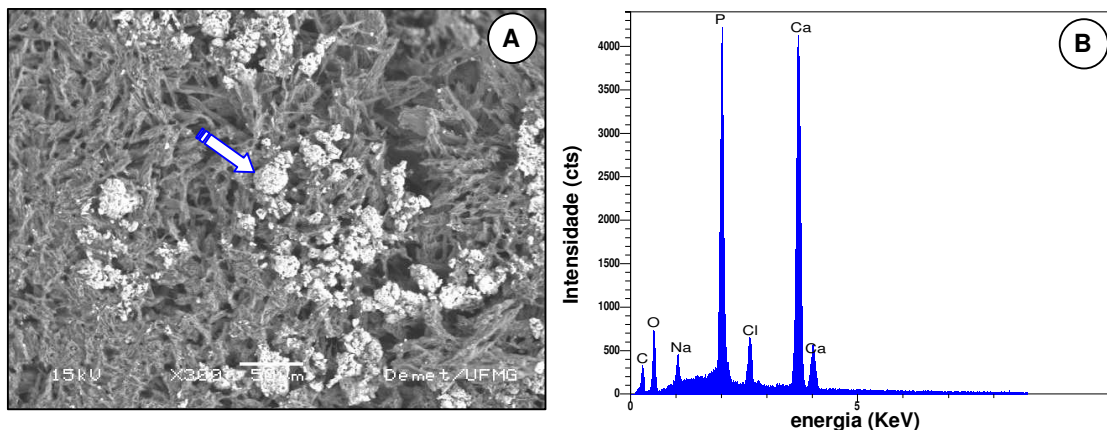
**Figura IV.5** - Micrografias de MEV pela técnica de elétrons retroespalhados da superfície de ruptura da manta do compósito C1: partícula de HAP exposta (seta larga) e partícula de HAP envolta por colágeno (seta estreita), aumento de 750X, 15 KeV.



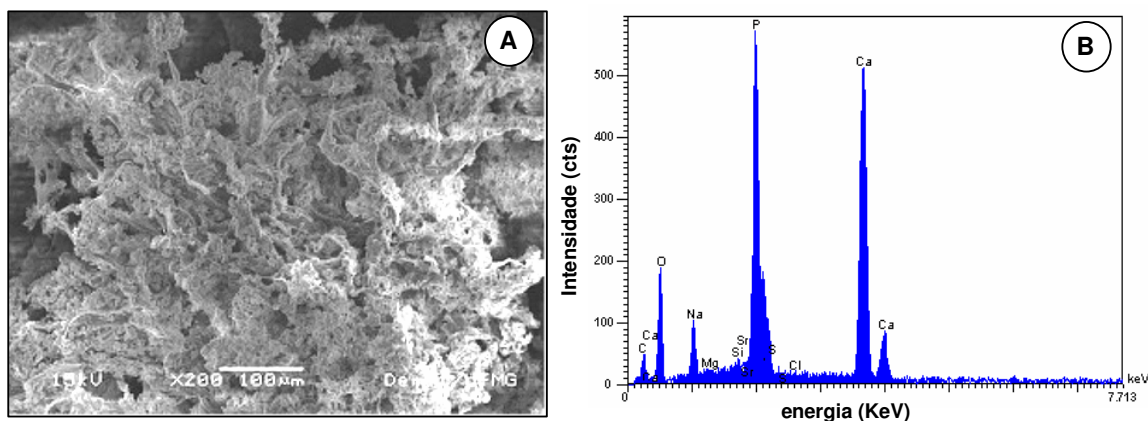
**Figura IV.6** - Espectros de EDS pontuais da partícula de HAP exposta (A) (Fig. IV.5 - seta larga), e da partícula envolta pela matriz de COL (B) (Fig. IV.5 - seta estreita), com picos de alta intensidade de seus principais constituintes.

A micrografia de MEV e o EDS do compósito C1 (Fig. IV.5A e IV.5B) podem ser comparados aos da hidroxiapatita/colágeno comercial (Fig. IV.8A e IV.8B). A imagem de MEV de C1 sugeriu uma estrutura mais compacta que a do compósito comercial, que se mostrou com um aspecto mais fibroso. Esta diferença pode ser devido a procedimentos diferentes de preparo, e colágeno obtido de

outra estrutura diferente do PB. Entretanto, os espectros foram similares, mostrando a presença dos mesmos elementos químicos na composição dos compósitos.



**Figura IV.7** - Micrografias de MEV de partículas de HAP concentradas em determinadas áreas no compósito (A), aumento de 300X, 15 KeV; espectro de EDS pontual da partícula de HAP indicada por seta na micrografia (B).

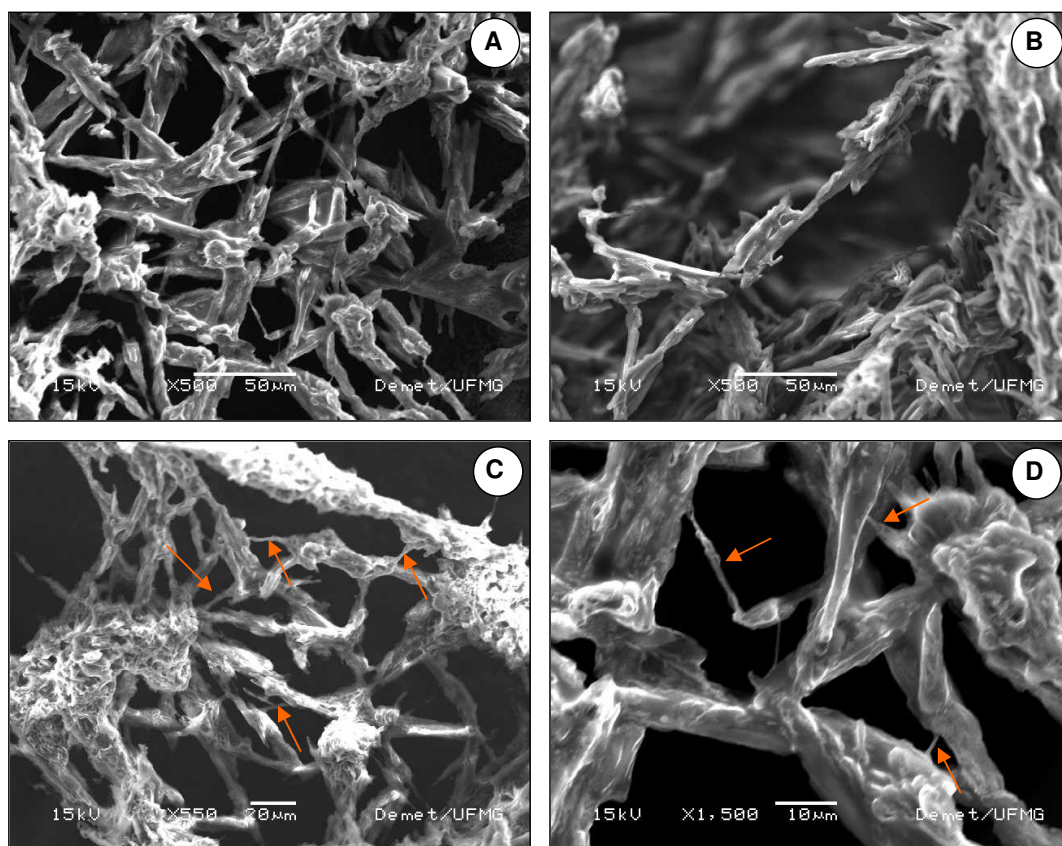


**Figura IV.8** - Micrografia de MEV do compósito hidroxiapatita/colágeno comercial (A), aumento de 200X, 15KeV; e seu espectro de EDS (B).

As amostras do compósito C2 mostraram picos semelhantes aos espectros das amostras C1. O Zn não foi detectado nos espectros de EDS de C2, apesar de ter apresentado no EDS da HAPZn. Devido ao fato da HAPZn possuir os íons  $Zn^{+2}$  participando de sua estrutura cristalina em substituição aos íons  $Ca^{+2}$ , além de estar distribuída em uma matriz de COL, torna-se pouco provável a sua detecção no compósito. Outro fato que também deve ser considerado é que o Zn usado apenas como um dopante, às vezes não pode ser detectado pelo equipamento. Na amostra C3, também não foi encontrada a presença de Zn. A análise de EDS não encontrou evidências da precipitação dos íons

$Zn^{+2}$  adicionados, sugerindo a incorporação destes íons na estrutura do compósito, provavelmente na fase amorfa, sem a formação de uma nova fase, tanto em C2 como em C3.

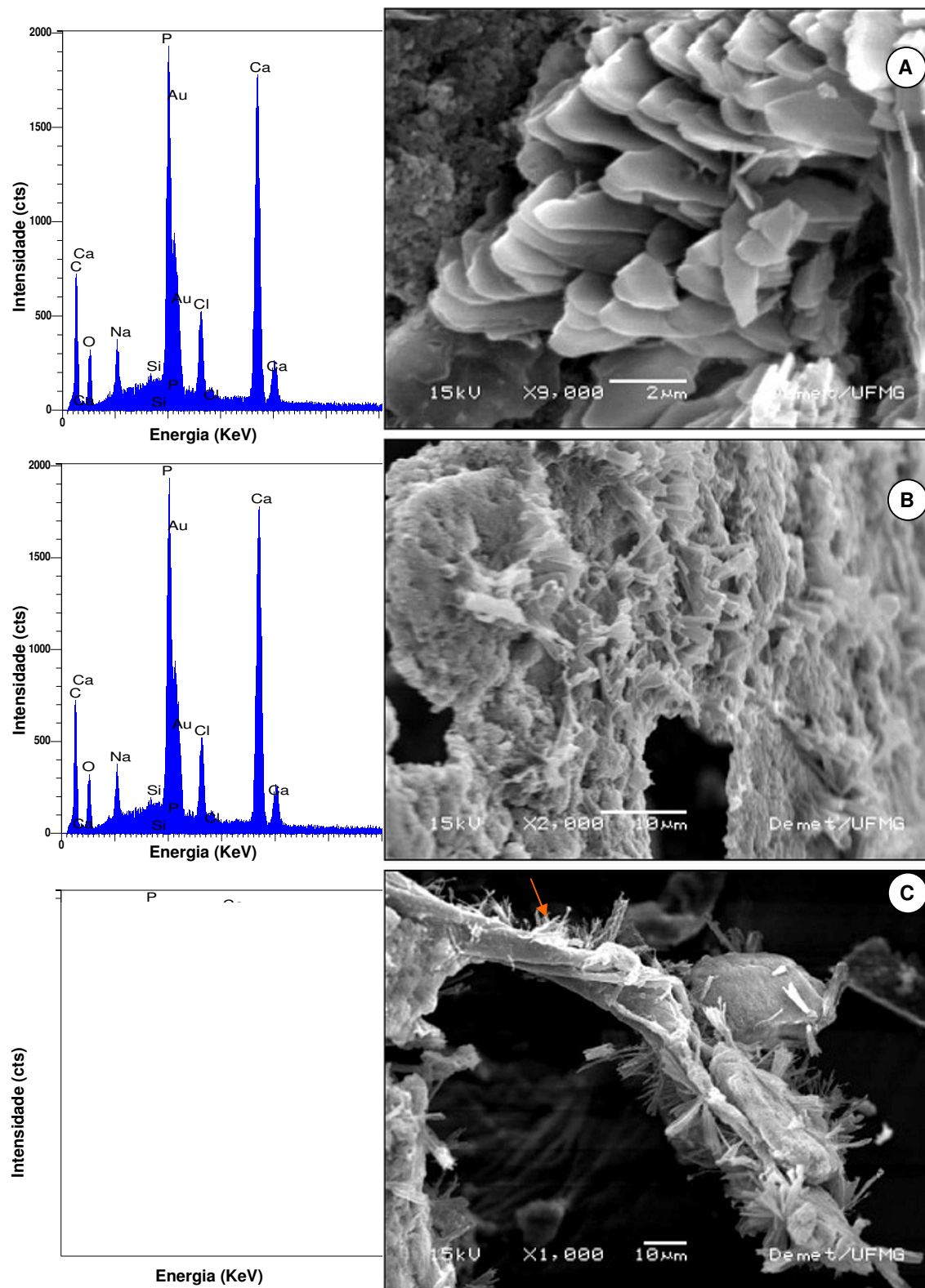
Nas micrografias de MEV da Figura IV.9 pode ser visualizado o compósito HAP $\beta$ TCPZn/COL, sugerindo que as partículas de HAP $\beta$ TCPZn foram recobertas com colágeno (A e B) e mostraram-se interligadas por filamentos desta estrutura (C e D – setas). Nestas micrografias pode-se notar o formato mais alongado das partículas de HAP $\beta$ TCP em relação àquelas de HAP.



**Figura IV. 9** – Micrografias de MEV do compósito HAP $\beta$ TCPZn/COL com partículas de HAP $\beta$ TCPZn agregadas ao colágeno com aumento de 500X (A e B), de 550X (C); e de 1500X (D); 15 KeV.

Na Figura IV.10A pode ser visualizada micrografia de MEV do compósito HAP/COL, que mostrou na sua estrutura pequenas aglomerações de partículas de HAP carbonada. Estas partículas apresentaram-se com forma diferente daquela observada nas partículas de HAP e HAP $\beta$ TCP. A forma elicoidal destas partículas também foi visualizada através de micrografia de MEV por Okazaki e Takahashi, em 1999, quando sintetizaram apatita com diferentes concentrações de carbonato.

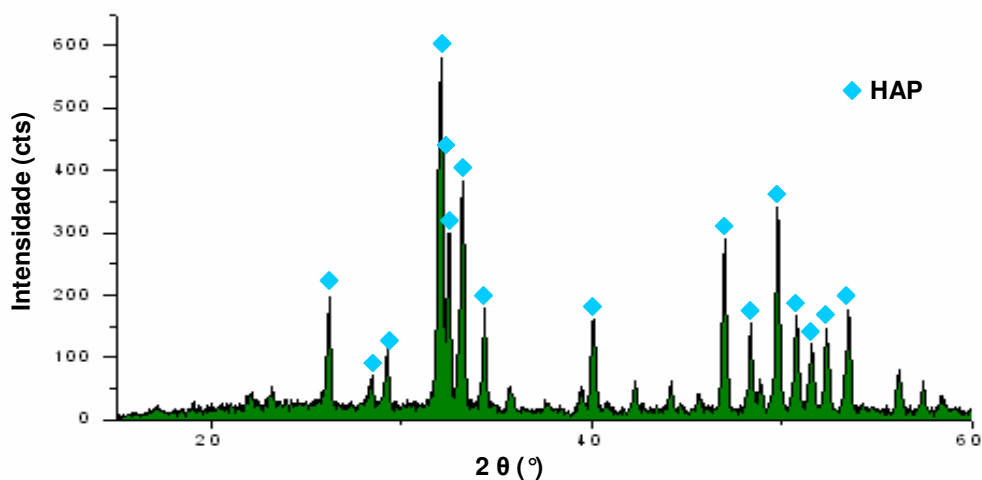
Na Figura IV.10B e IV.10C podem ser visualizadas micrografias de MEV da estrutura de colágeno recobertas com sais de CaP, observada em algumas áreas dos compósitos.



**Figura IV. 10** – Micrografias de MEV de partículas de HAP carbonada no composto HAP/COL (A); estruturas de COL recobertas com partículas de HAPβTCPZn (B) e de HAP (C); e respectivos espectros de EDS.

### 2.2.2 XRD

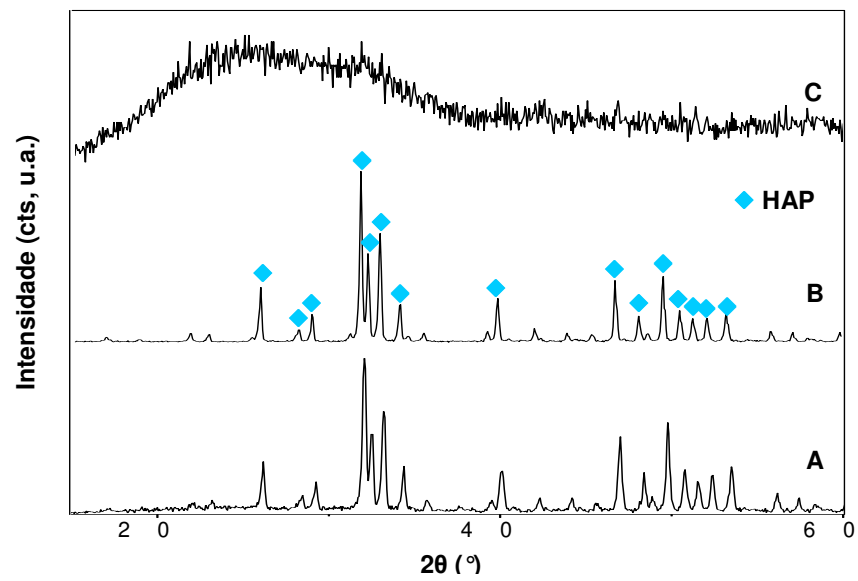
Os difratogramas de raios-X dos compósitos apresentaram um perfil já esperado, mostrando picos característicos da hidroxiapatita, já que o colágeno não apresenta um difratograma característico por não ser uma matriz cristalina. Além dos picos referentes ao material inorgânico observou-se grande quantidade de fase amorfa referente ao material orgânico. Na Figura IV.11 pode-se observar o difratograma típico apresentado pelos compósitos com relação 80%/20%.



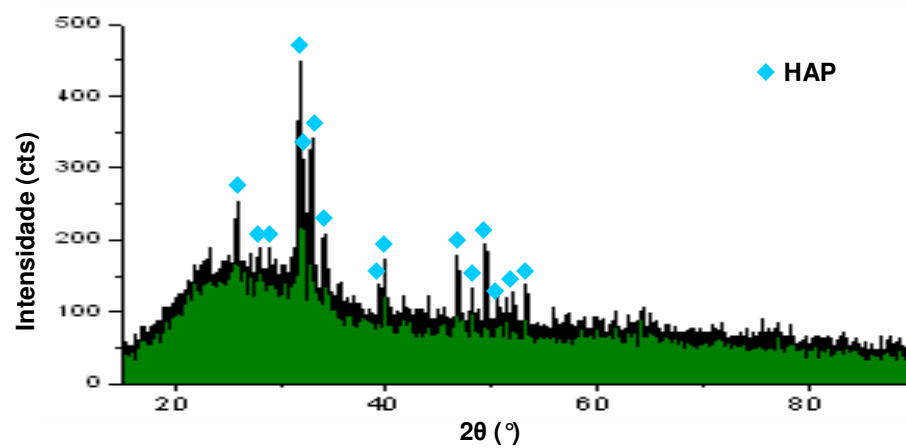
**Figura IV.11** – Difratograma de raios-X do compósito C1, HAP/COL, com presença de picos característicos de HAP e de fase amorfa correspondente ao COL.

Nos difratogramas da Figura IV.12 são apresentados os difratogramas do compósito C1 (Fig. IV.12A), da HAP (Fig. IV.12B) e do COL (Fig. IV.12C). Notou-se que os picos da hidroxiapatita presentes no compósito apresentaram-se mais largos e com menor intensidade que aqueles picos apresentados nos difratogramas da hidroxiapatita pura, devido a presença do colágeno. Também pode ser observada no difratograma dos compósitos C1 e C2, a associação daquelas características já observadas anteriormente nos difratogramas tanto da HAP como do COL. Os resultados obtidos pela análise dos difratogramas dos compósitos CaP/COL foram concordantes com os resultados apresentados em outros estudos (Bet, 1995; Ogawa e Plepis, 2001; Ogawa e Plepis, 2002; Hsieh et al, 2004).

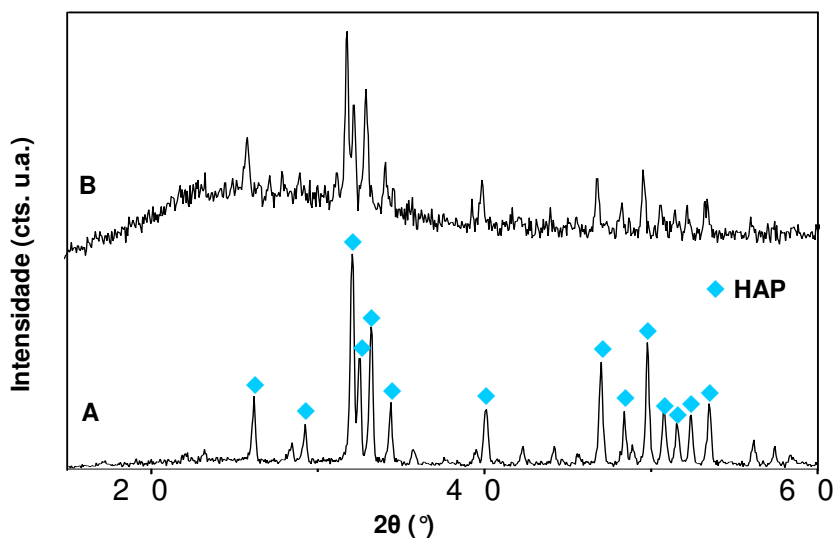
A análise pelo MEV sugeriu que as amostras dos compósitos nas quais foi usada relação abaixo de 80%:20% houve excesso da matriz orgânica com observação de regiões com falta de HAP. No difratograma da Figura IV.13 pode ser visualizada uma grande quantidade de fase amorfa e alguns picos bem largos referentes ao compósito C1 com a relação 60%:40%, confirmando os resultados da análise de MEV. O perfil dos difratogramas obtidos nos compósitos com diferentes relações CaP:COL pode ser observado e comparado na Figura IV.14.



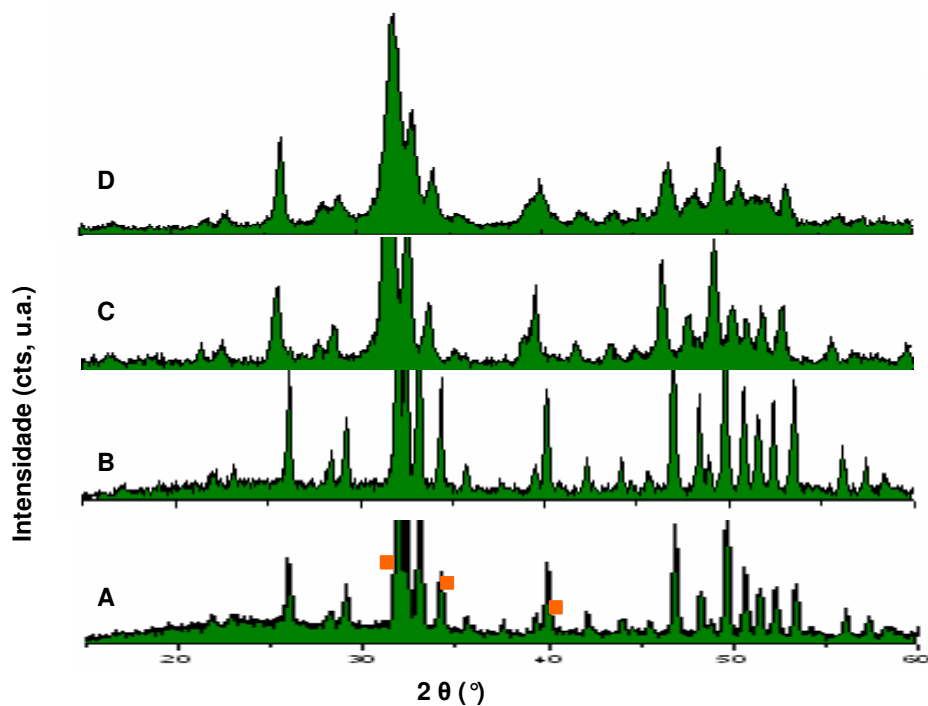
**Figura IV.12** – Difratomogramas de raios-X do composto HAP/COL (A), da HAP (B) e do COL (C).



**Figura IV.13** - Difrátograma de raios-X do composto C1 com a relação 60%:40% com presença de picos de HAP e grande quantidade de fase amorfa referente ao COL.



**Figura IV.14** – Perfil do difratograma do compósito preparado com a relação CaP:COL = 80%:20% (A), e do compósito C1 preparado com a relação 60%:40%.



**Figura IV.15** – Difratogramas para comparação entre os compósitos HAPβTCP/COL (A), HAPZN/COL (B), hidroxiapatita/colágeno comercial (C), e HAP após secagem a 100°C (D).

Não foram observadas diferenças significativas, comparando-se os difratogramas dos compósitos C1, C2 e C5, onde foram usados HAP e HAPZn, e entre os compósitos C3 e C4, onde foram usados o material bifásico HAP $\beta$ TCP e o material HAP $\beta$ TCPZn. Na Figura IV. 15 pode ser observado o difratograma do compósito HAP $\beta$ TCP/COL, que também representa o resultado de XRD para HAP $\beta$ TCPZn/COL (A); e os difratogramas de HAPZn/COL, que representa o resultado para HAPZN/COL e HAP/COL/ZN (B).

Takechi et al., em 1998 reportou que o difratograma do compósito hidroxiapatita/colágeno apresenta o mesmo aspecto do difratograma da hidroxiapatita não cristalina. Entretanto, observou-se que os difratogramas dos compósitos CaP/COL dopados ou não com Zn apresentaram picos mais definidos e menos largos, apesar da presença de fase amorfa (Fig. IV.15A e IV.15B). Isto sugere a associação de um material cristalino a um material amorfo. O difratograma de um compósito hidroxiapatita/colágeno comercial pode ser visualizado na Figura IV.15C. O compósito comercial apresentou maior quantidade de fase amorfa, quando comparado com os compósitos obtidos neste estudo, mostrando maior similaridade com HAP cristalina.

### 2.2.3 FTIR

Os espectros de FTIR para a amostra dos compósitos C1 e C3 são mostrados nas Figuras IV.16 e IV.17, respectivamente. Observou-se que as típicas bandas da ligação N – H do grupamento –NH<sub>2</sub> das aminas primárias (Fig. IV.16A) foram detectadas no comprimento de onda de 3449 a 3343 cm<sup>-1</sup> representadas por duas bandas fortes de estiramento, e em 1627 cm<sup>-1</sup> e 783 cm<sup>-1</sup> por bandas de dobramento.

Na Figura IV.17 o espectro de FTIR de C1 pode ser comparado ao espectro do compósito C3. Observou-se a presença da ligação C – H assimétrica do grupo funcional –COOH (Fig. IV.16A) em 2937 cm<sup>-1</sup> para C1 e em 2939 cm<sup>-1</sup> para C3. E apenas em C3 foi observada a ligação C – H simétrica em 2811 cm<sup>-1</sup>, além da presença da ligação O – H do grupo funcional –COOH em 2634 cm<sup>-1</sup> e 2464 cm<sup>-1</sup>, que também foram observadas nos espectros de FTIR de HAP $\beta$ TCP e HAc. Em 717 cm<sup>-1</sup> foi absorvida a banda referente à ligação C – H do grupo funcional –CH<sub>2</sub>.

As bandas de estiramento da ligação C = O para a amida I foram absorvidas em 1664 cm<sup>-1</sup>. Normalmente a banda de C = O são absorvidas em 1725 cm<sup>-1</sup>, mas devido à sua conjugação com outra banda, neste estudo a ligação N – H, pode ser movida para uma frequência menor (Pavia et al., 1979). A banda de amida I é especialmente representativa do conteúdo de colágeno na estrutura. Sua avaliação é complexa devido a vibrações diferentes de carbonilas similares (Chang e Tanaka, 2002b).

A vibração de estiramento assimétrico de C = O também foi absorvida em  $1342\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de C = O absorvidas no comprimento de onda de  $1400$  a  $1260\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à presença da prolina nas cadeias do colágeno tipo I em tecido biológico (Chang et al., 2003), e são usadas para estimação de ligações covalentes entre os nanocristais da hidroxiapatita e moléculas de colágeno (Chang e Tanaka, 2002). A presença desta banda sugere a formação de uma união dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  da hidroxiapatita aos grupos carboxílicos  $-\text{COOH}$  do colágeno (Kikuchi et al., 2001; Chang e Tanaka, 2002; Chang et al., 2003). Aproximadamente 20% dos 1000 resíduos de aminoácidos de cada molécula do colágeno possui grupos carboxílicos,  $-\text{COOH}$  ou grupos amino,  $-\text{NH}_2$  nas suas cadeias. Os íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$  na superfície dos nanocristais da hidroxiapatita organizam-se através de interações eletrostáticas entre eles e os grupamentos funcionais (Kikuchi et al., 2001).

A interação química entre HAP e COL foi examinada por FTIR. A banda da carbonila do grupamento carboxílico em  $1347\text{ cm}^{-1}$  para o COL baixou para um menor número de onda,  $1343\text{ cm}^{-1}$ , no compósito HAP/COL (Fig. IV.18A e IV.18B). Kikuchi et al, em 2001 e em 2004b, explicaram este fato pela quebra das cadeias da molécula de colágeno. Assim,  $-\text{COO}^-$  transforma-se em dois equivalentes C – O para a formação de uma nova união química entre os íons  $\text{Ca}^{+2}$  na superfície da hidroxiapatita. Chang et al., em 2003, atribuíram a formação de banda fraca nesta área, ao fato da hidroxiapatita ser constituída por cristais de tamanho nanométrico. Os cristais de hidroxiapatita aderidos às moléculas de COL sugerem uma energia mais baixa da vibração de estiramento assimétrico da prolina na cadeia de colágeno. Também relatam uma diminuição destas bandas quanto maior é a quantidade de matriz orgânica usada. Notou-se que a banda formada no compósito CaP/COL apresentou como uma banda fraca com deslocamento para um número de onda menor. Isto sugeriu a união química entre as partículas de CaP e COL. A quantidade de COL usado para o desenvolvimento dos compósitos pode ter afetado a intensidade dessa ligação.

Na Figura IV.19A pode ser visualizado o espectro de FTIR de C3 e a formação da banda correspondente à união HAP e COL em  $1344\text{ cm}^{-1}$  (Fig. IV.19B). Estas bandas também foram observadas para o compósito C4 na mesma área de absorção.

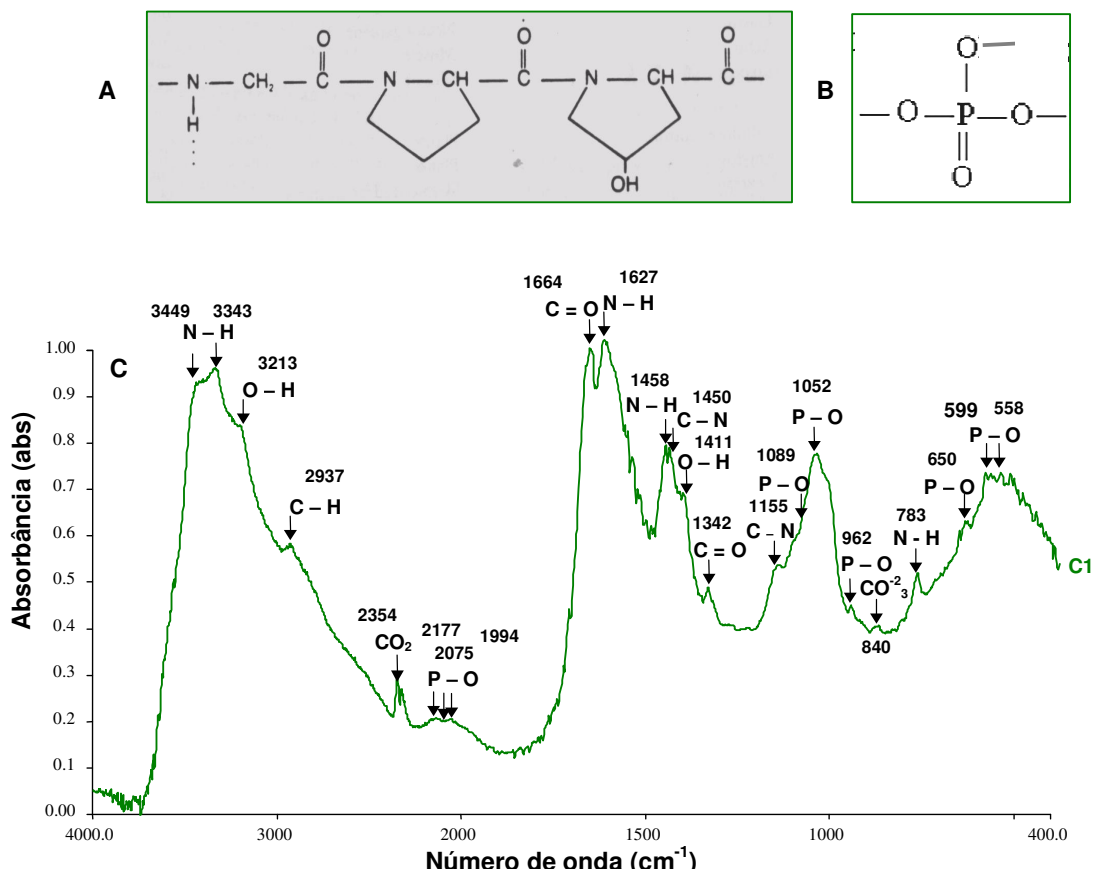
A combinação das bandas de deformação de N – H, aproximadamente 60%, associada às bandas de estiramento de C – N, aproximadamente 40%, é característica das ligações peptídicas. Estas bandas podem ser observadas em  $1458\text{ cm}^{-1}$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, nos espectros dos compósitos C1 e C3 (Fig. IV.16 e IV.17). De acordo com os estudos de Chang et al., em 2003, a presença da banda da amida I em  $1664\text{ cm}^{-1}$  indica que os compósitos adotaram a configuração predominante da  $\alpha$ -hélice do colágeno, que é confirmada pela presença da banda de amida II em  $1458\text{ cm}^{-1}$ . O espectro apresentou também uma banda de estiramento da ligação C – N para as aminas em  $1155\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro da Figura IV.18 observa-se que as bandas de  $\text{CO}_3^{2-}$  presentes em HAP carbonada tipo B prevaleceram no compósito, indicando a formação de um compósito carbonado tipo B.

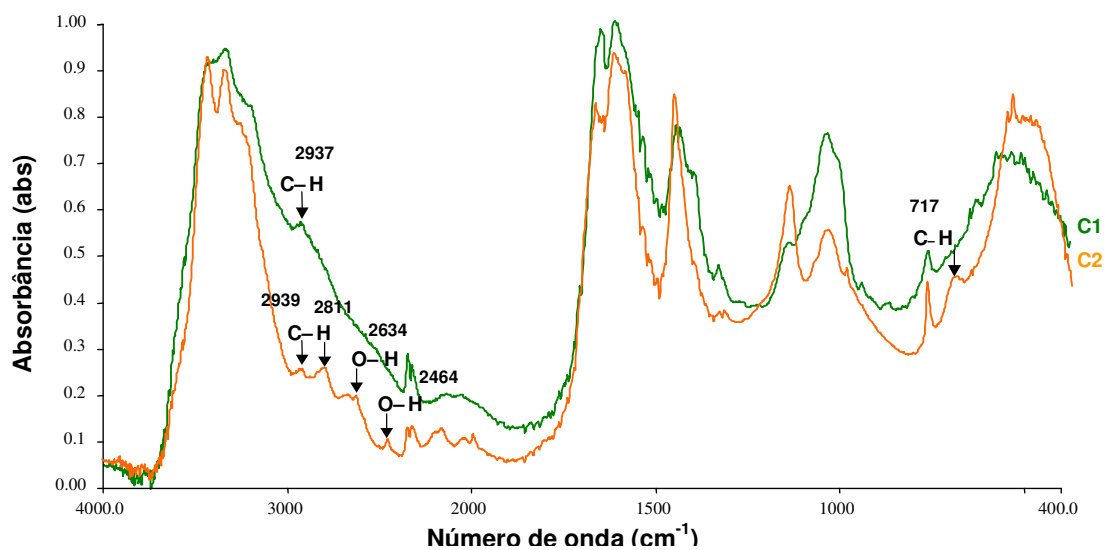
As ligações P – O de  $\text{PO}_4^{3-}$  (Fig. IV.16 B) foram absorvidas em  $1052\text{ cm}^{-1}$ ,  $1089\text{ cm}^{-1}$ ,  $650\text{ cm}^{-1}$ ,  $599\text{ cm}^{-1}$  e  $558\text{ cm}^{-1}$  nos compósitos CaP/COL, mostrando a presença da sua fase inorgânica (Fig. IV.16 e IV.17). Notou-se que os íons  $\text{PO}_4^{3-}$  na área entre aproximadamente  $840\text{ cm}^{-1}$  foram substituídos por  $\text{CO}_3^{2-}$  presentes na HAP. Isto sugere que realmente o material transformou-se em um compósito hidroxiapatita/colágeno carbonado tipo B, apresentando a mesma constituição do tecido ósseo (Fig.18c). No compósito C3 não foi observada a presença de  $\text{CO}_3^{2-}$ , devido a sua ausência em HAP $\beta$ TCP (Fig.19c).

As ligações absorvidas no FTIR foram ligações características dos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, formadores das cadeias da molécula de colágeno, e de íons  $\text{PO}_4^{3-}$  constituintes dos materiais CaP. A banda característica de ligação química covalente dos íons  $\text{COO}^-$  com os íons  $\text{Ca}^{+2}$  dos materiais CaP também foi observada. Isto sugeriu que houve a formação do compósito CaP/COL, a partir da mistura dos pós de CaP sintetizados e o COL tipo I obtido de PB.

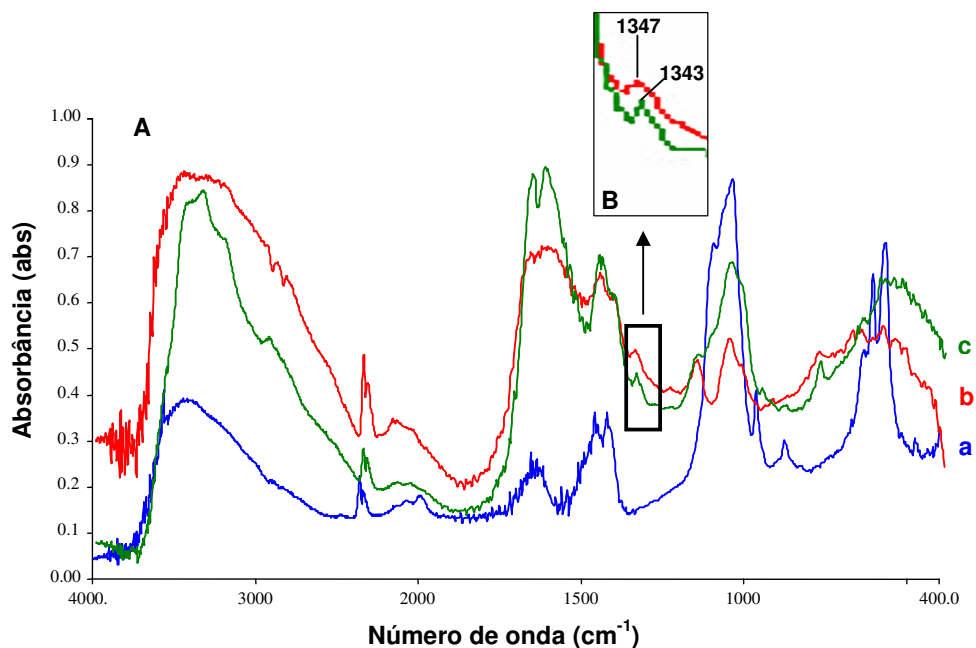
A presença das bandas descritas para os compósitos estão de acordo com as informações a respeito de espectroscopia de infravermelho reportadas por Pavia et al., em 1979, e Mantsch e Chapman, em 1996. Os resultados de FTIR encontrados para os compósitos HAP/COL e HAP $\beta$ TCP foram semelhantes aos resultados de espectroscopia de infravermelho dos estudos com compósitos fosfato de cálcio/colágeno relatados por Kikuchi et al., em 2001, Chang e Tanaka, em 2002, Chang et al., 2003 e Kikuchi et al., em 2004.



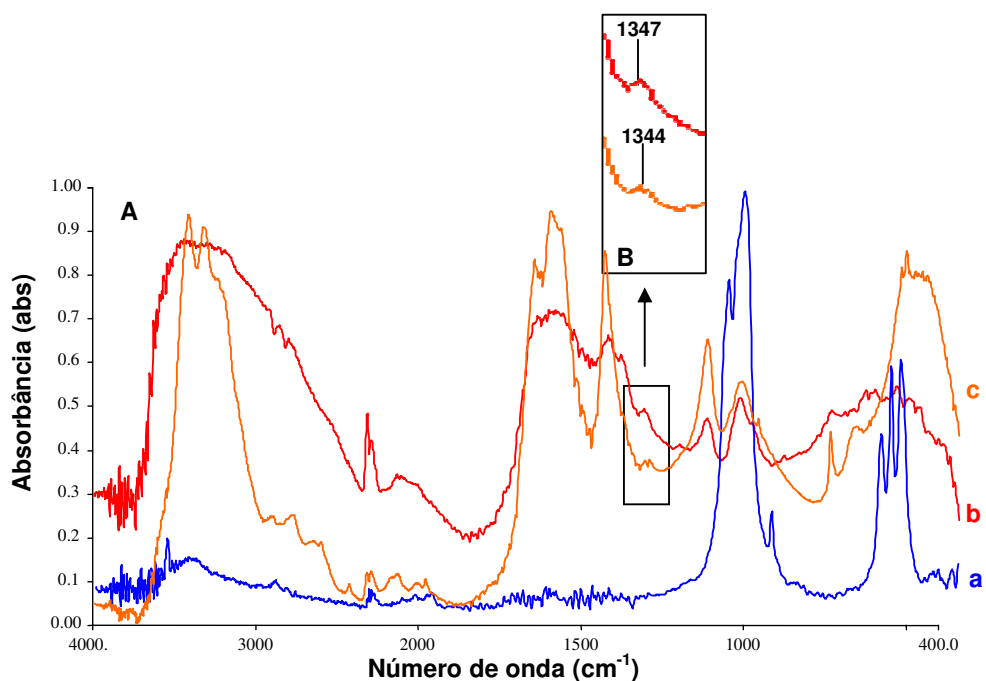
**Figura IV.16** – Grupos funcionais da cadeia da molécula de COL (A) e dos grupos fosfatos dos materiais CaP (B); espectro de FTIR do compósito HAP/COL (C1) com bandas características de suas ligações químicas e respectivos números de onda de absorção (C).



**Figura IV.17** – Espectros de FTIR do compósito HAP $\beta$ TCP/COL (C2) com bandas características de suas ligações químicas, e de HAP/COL (C1) (A).

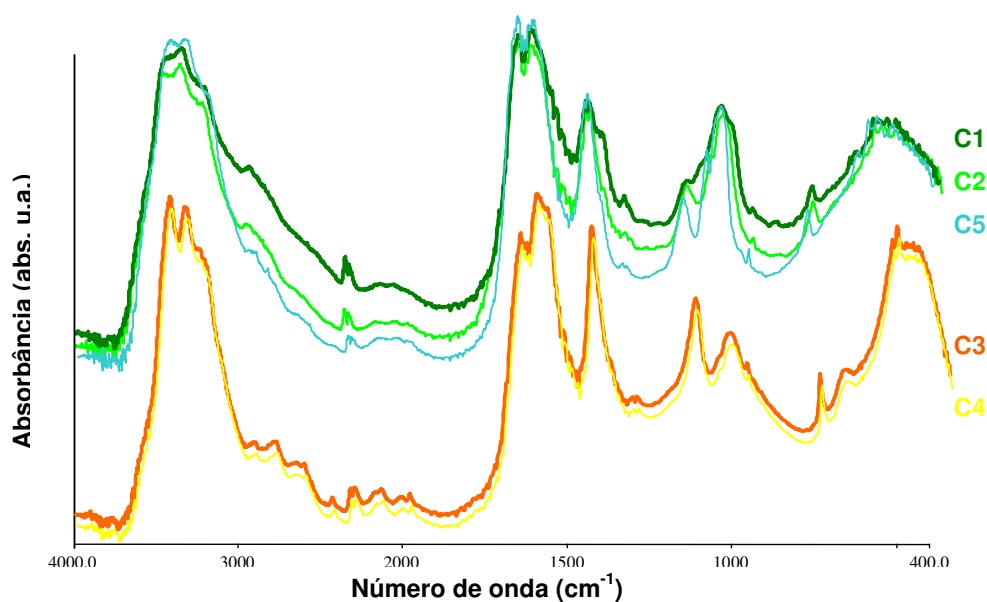


**Figura IV.18** – Espectros de FTIR para comparação entre HAP (a), COL (b) e o composto HAP/COL (c) (A); área ampliada do espectro com as bandas referentes à ligação C = O em 1347 cm<sup>-1</sup> no COL e sua diminuição para o número de onda 1343 cm<sup>-1</sup> no composto HAP/COL (B).



**Figura IV.19** – Espectros de FTIR para comparação entre HAPβTCP (a), COL (b) e o composto C3 HAPβTCP/COL (c) (A); área ampliada do espectro com as bandas referentes à ligação C = O em 1347 cm<sup>-1</sup> no COL e sua diminuição para o número de onda 1344 cm<sup>-1</sup> no composto HAPβTCP/COL (B).

Os espectros de FTIR dos compósitos HAPZn/COL (C2) e HAP $\beta$ TCPZn/COL (C4) mostraram-se semelhantes aos espectros dos compósitos C1 e C3, respectivamente. O resultado obtido para os compósitos dopados com Zn já eram esperados, considerando que na sintetização de HAPZn e HAP $\beta$ TCPZn pode ter acontecido uma substituição de íons  $\text{Ca}^{+2}$  por íons  $\text{Zn}^{+2}$  no reticulado cristalino da HAP sem a formação de uma nova fase. Os espectros de C1 e C2 e de C3 e C4 podem ser comparados na Figura IV.20.



**Figura IV.20** – Espectros de FTIR para comparação entre HAP/COL (C1), HAPZn/COL (C2), HAP $\beta$ TCP/COL (C3), HAP $\beta$ TCPZn/COL (C4) e HAP/COL/Zn (C5).

O compósito HAP/COL/Zn (C5) não apresentou diferença no seu espectro de FTIR em relação aos espectros de C1 e C3. Nenhuma ligação diferente daquelas observadas nos outros compósitos foi observada em C5, sugerindo que os íons  $\text{Zn}^{+2}$  apresentaram-se como partículas isoladas na matriz de COL, ou talvez formaram pequenas quantidades de óxido de zinco como sugeriram Sogo et al., 2005.

A relação CaP/COL proporcionou mantas relativamente homogêneas, em que a HAP foi agregada ao COL, sugerindo união química entre estes dois materiais. A relação 80%:20% de CaP:COL e a simples mistura de HAP e COL resultou em um compósito com determinada estabilidade, entretanto serão necessárias experimentações para o desenvolvimento de um compósito com características que possam melhorar essa estabilidade e atribuir propriedades adequadas para o seu uso em aplicações específicas.

### **3 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE *IN VITRO* DOS COMPÓSITOS CaP**

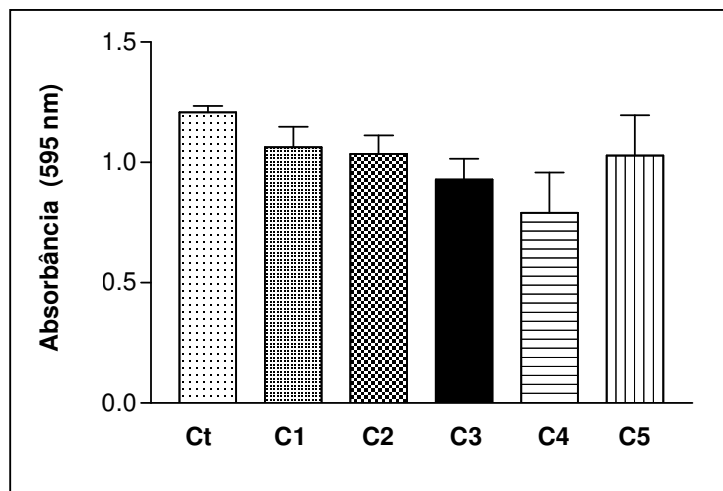
#### **3.1 Viabilidade celular**

A viabilidade e proliferação dos osteoblastos não mostraram alteração estatisticamente significativa ( $P < 0,005$ ) na presença dos compósitos quando comparados com o controle (Fig. IV.21) (Anexo II). Entretanto, através da análise individual das amostras, observou-se que C3 e C4 mostraram uma diminuição da proliferação celular em relação aos outros grupos e em relação ao controle. No grupo C5, onde o Zn não foi incorporado anteriormente na síntese de HAP, a proliferação foi comparável aos grupos C1 e C2.

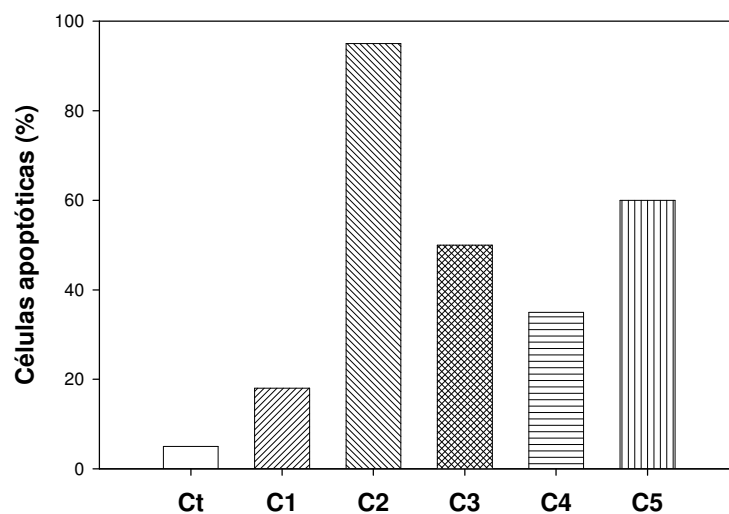
Células mortas foram observadas por MLT após o período de 72 h, o que levou à realização do ensaio de apoptose. Os resultados podem ser observados na Figura IV.22, onde notou-se que os grupos C2 e C5 mostraram uma maior porcentagem de células mortas por campo analisado, comparado com o controle. Os osteoblastos na presença de todos os compósitos mostraram uma maior porcentagem de células mortas, quando comparados com os do controle. Os osteoblastos no grupo C2 apresentaram uma maior porcentagem de apoptose, e o grupo C1 mostrou o melhor comportamento entre os compósitos. O grupo C4, apesar de ter mostrado menor porcentagem de apoptose que C2, C3 e C5, apresentou a presença de células vivas, que pelo seu aspecto morreriam dentro de poucas horas. O não tratamento prévio das amostras antes dos ensaios pode ter causado este comportamento dos osteoblastos na presença dos compósitos, já que nenhuma contaminação bacteriana foi observada durante todo o ensaio. Outras considerações que podem ser analisadas são a possibilidade de ter permanecido uma concentração não desejável de Na e Cl nestas amostras, ou de terem sido usadas quantidades excessivas das amostras do compósito em relação a um pequeno volume de cultura celular.

#### **3.2 Produção de fosfatase alcalina e morfologia dos osteoblastos**

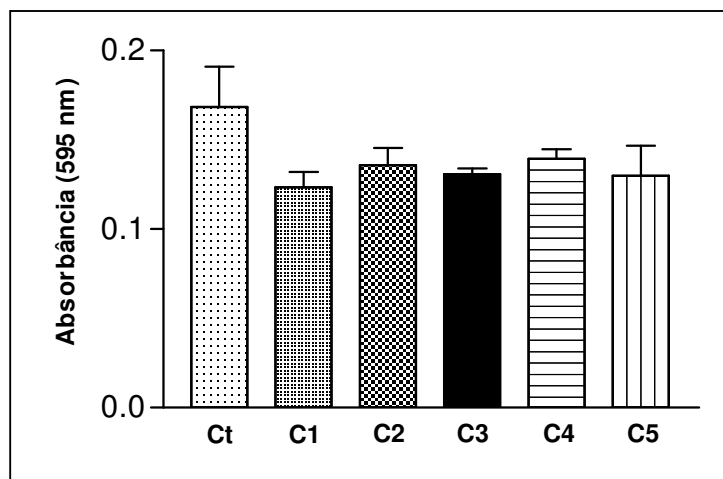
A produção de fosfatase alcalina presente no sobrenadante da cultura celular foi medida e pode ser observada através do gráfico da Figura IV.23. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para os osteoblastos na presença de todos os compósitos. A produção de fosfatase alcalina foi similar àquela dos osteoblastos do grupo controle. Isto significa que os compósitos não interferiram na produção normal desta enzima nos osteoblastos. O comportamento individual de cada grupo mostrou que os grupos C2 e C4, onde o Zn presente no compósito foi advindo da incorporação na síntese dos CaP, apresentaram maior produção de fosfatase alcalina comparados aos outros grupos; que o grupo C1, sem presença de zinco e da fase  $\beta$ TCP apresentou menor produção de fosfatase alcalina comparado a todos os outros grupos; e que o grupo C3 com a presença do material CaP bifásico mostrou maior produção comparado ao grupo C1 e o grupo C5.



**Figura IV.21** – Proliferação e viabilidade celular avaliados pelo ensaio de MTT: a viabilidade dos osteoblastos em presença dos compósitos, após 72 h de incubação, não mostrou diferença estatisticamente significativa comparado com os osteoblastos do grupo controle; ( $P < 0,005$ ).



**Figura IV.22** – Apoptose dos osteoblastos (%) na presença dos compósitos de CaP.

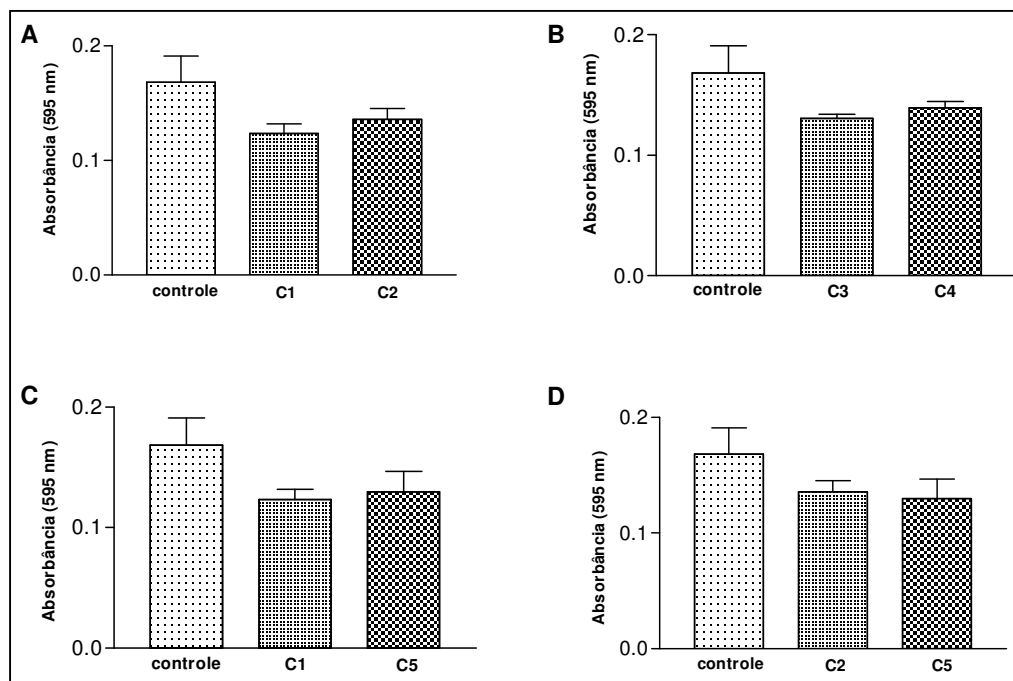


**Figura IV.23** – Produção de fosfatase alcalina medida pelo ensaio de BCIP-NBT: a fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos em presença dos compósitos, após 72 h de incubação, não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação aos osteoblastos do grupo controle; ( $P < 0,005$ ).

Na Figura IV.24 observa-se a comparação gráfica dos resultados da produção de fosfatase alcalina dos osteoblastos em pares de amostras mais significativas, considerando a presença ou não de zinco: (A) HAP/COL (C1) e HAPZn/COL (C2); (B) HAP $\beta$ TCP/COL (C3) e HAP $\beta$ TCPZn/COL (C4); (C) HAP/COL (C1) e HAP/COL/Zn (C5). Observou-se também os compósitos HAPZn/COL (C2) e HAP/COL/Zn (C5) (Fig. IV.24D). A produção de fosfatase alcalina foi maior nos compósitos contendo Zn em sua composição, quando comparados com os compósitos não dopados com Zn; nos compósitos onde o Zn foi incorporado durante a síntese de CaP, quando comparados os compósitos dopados ou não com Zn e os compósitos HAPZn/COL e HAP/COL/Zn. Nos compósitos com presença do Zn em maior concentração associado à sua incorporação durante a síntese de CaP houve maior formação de fosfatase alcalina que o compósito HAP/COL/Zn, onde o Zn foi incorporado no momento da mistura de HAP e COL e em menor concentração.

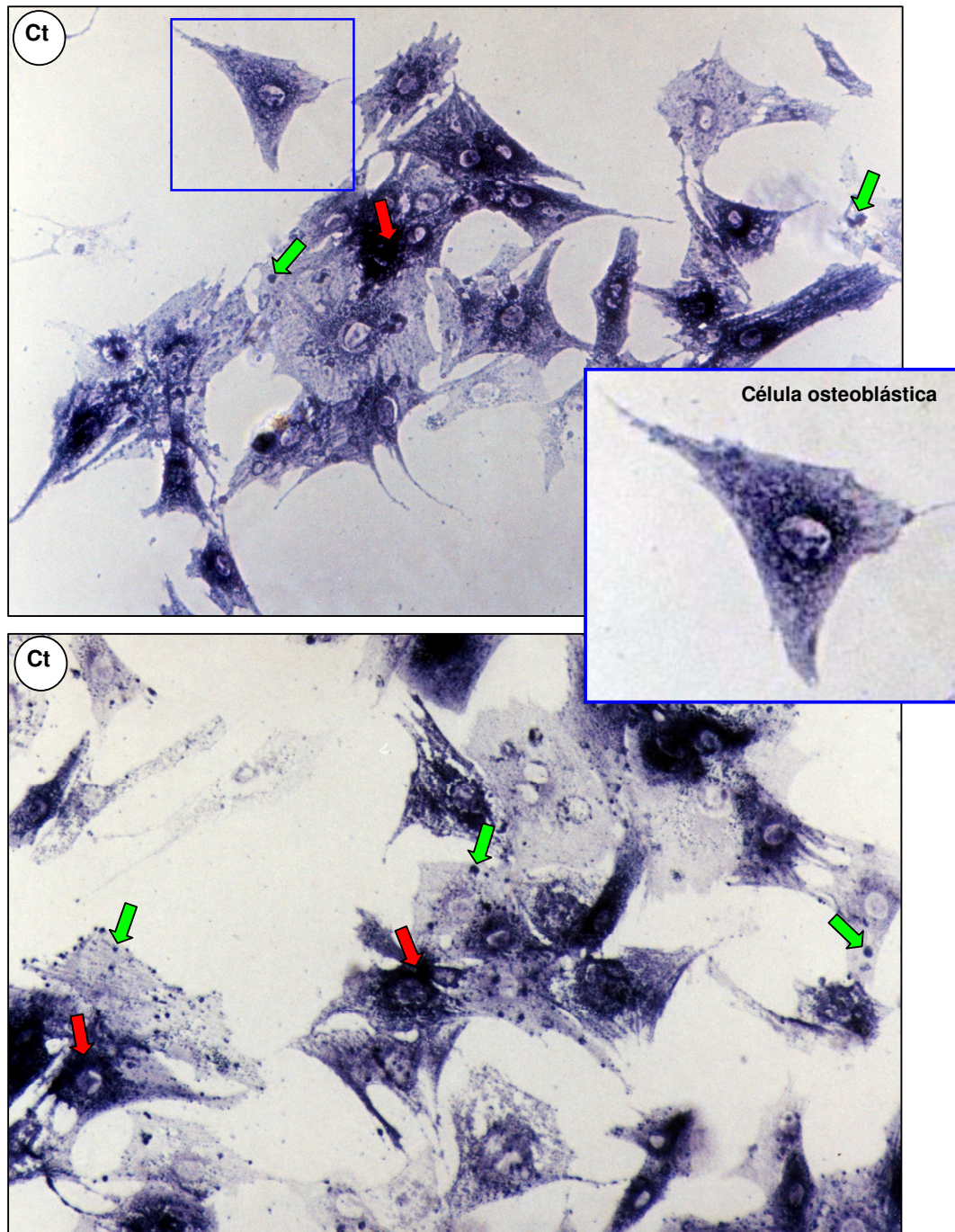
Estes resultados sugerem que a presença de Zn nos compósitos induziu uma maior metabolização e produção de fosfatase alcalina dos osteoblastos. A concentração de 1% de Zn e a substituição do Ca por Zn na rede cristalina dos materiais CaP podem ter contribuído para a maior produção desta enzima.

A produção de fosfatase alcalina dos osteoblastos também foi analisada através das imagens obtidas no microscópio de luz transmitida (Fig. IV. 25 e IV.26).

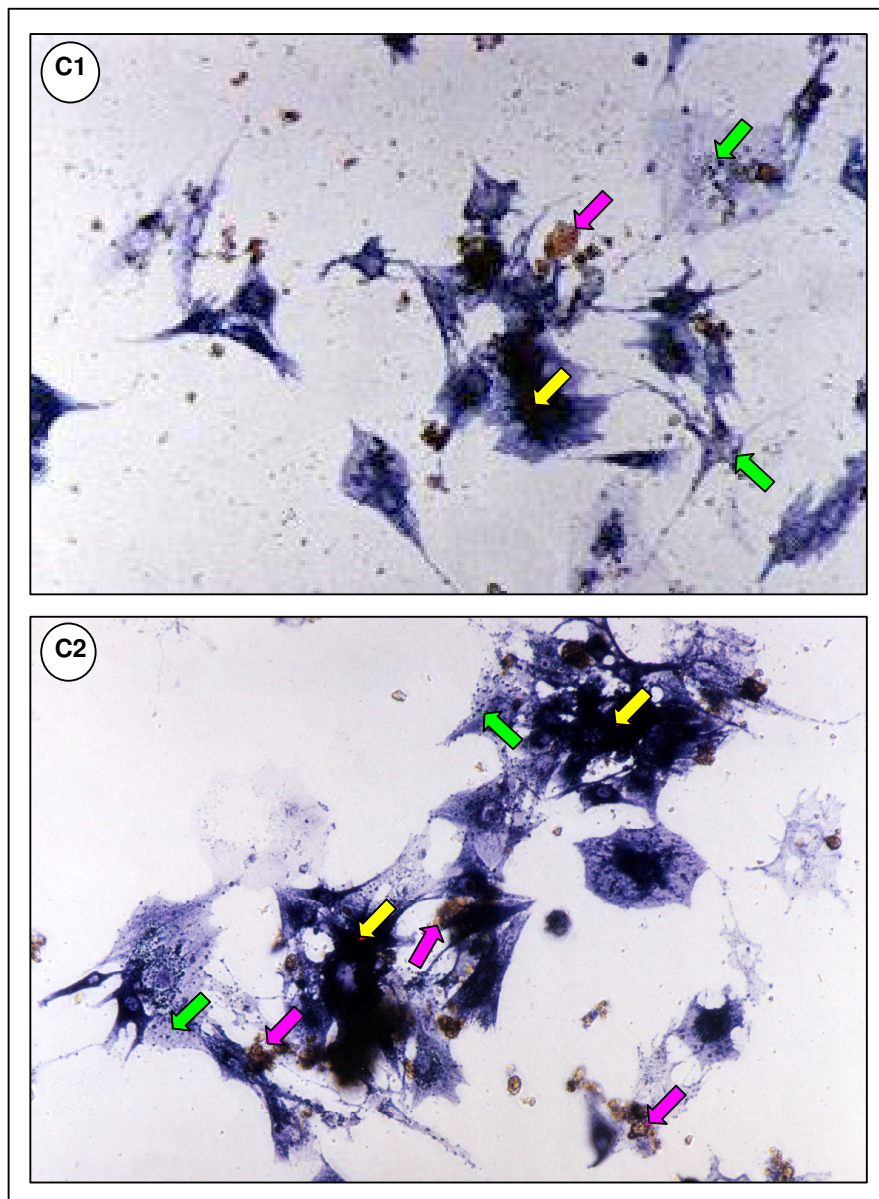


**Figura IV.24** – Comparação gráfica dos resultados estatísticos para a produção de fosfatase alcalina dos osteoblastos nos grupos: (A) HAP/COL (C1) e HAPZn/COL (C2); (B) HAPβTCP/COL (C3) e HAPβTCPZn/COL (C4); (C) HAP/COL (C1) e HAP/COL/Zn (C5); e (D) HAPZn/COL (C2) e HAP/COL/Zn (C5).

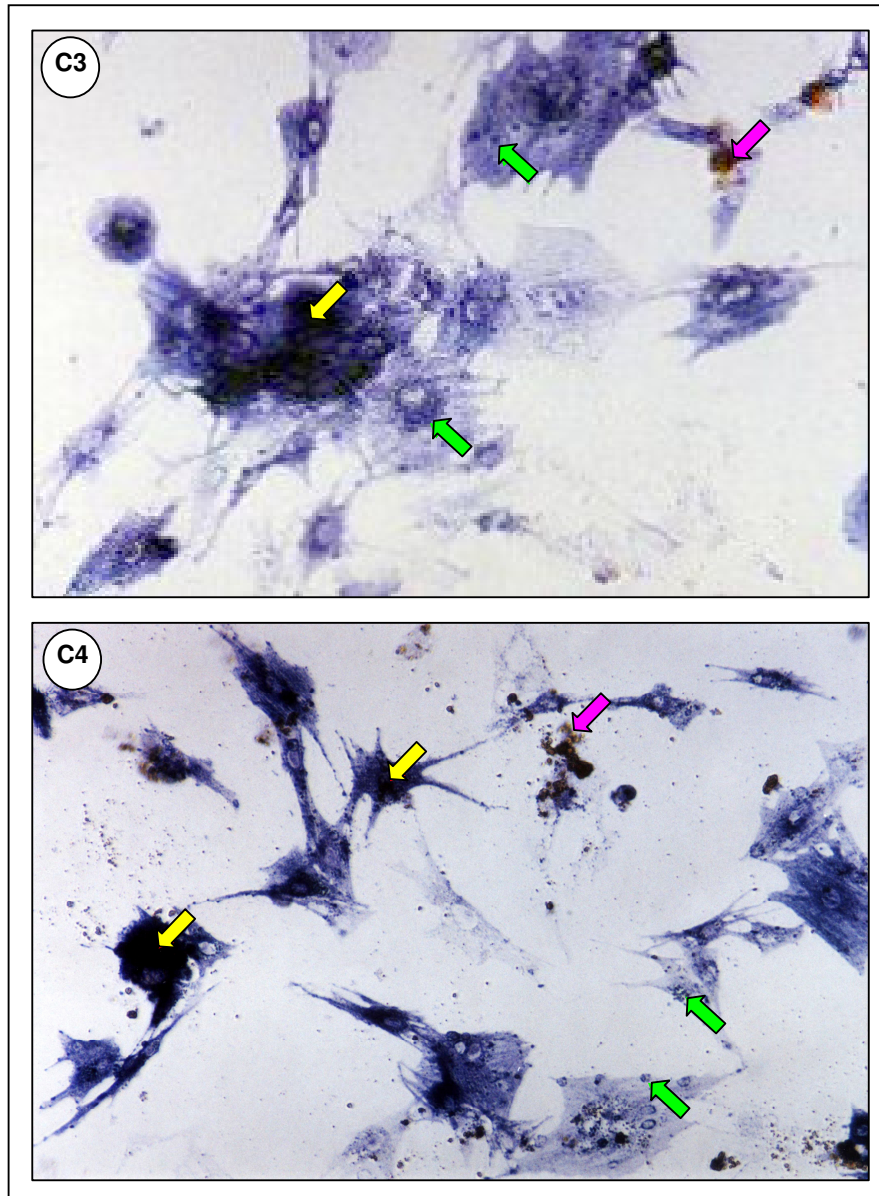
A produção de fosfatase alcalina dos osteoblastos também foi analisada através das imagens obtidas no microscópio de luz transmitida (Fig. IV. 25 e IV.26). Os osteoblastos produziram fosfatase alcalina, que foi corada pelo BCIP-NBT. Somente células que são metabolicamente normais podem transformar o sal tetrazólico em cristais de cor azul arroxeado, como pode ser observado nas imagens das células visualizadas nas Figuras IV.25 e IV.26. Notou-se a pureza da cultura primária, evidenciando apenas a presença de células osteoblásticas (Fig. IV.25 – ampliação), já que a presença de fosfatase alcalina as diferenciam de células fibroblásticas. Observou-se bom crescimento das células em contato com os compósitos, mostrando uma morfologia normal, como pode ser observada nas células do grupo controle (Ct) e comparada com as células dos grupos C1, C2, C3, C4 e C5 (Fig. IV.25 a 28). Os osteoblastos em contato com os compósitos produziram fosfatase alcalina como os osteoblastos do grupo controle. Notou-se a presença de fosfatase alcalina livre na matriz, que foi corada pelo BCIP-NBT (Fig. IV.25 – setas de cor vermelha). Isto significa a presença de fosfatase alcalina já metabolizada que dará início à mineralização. Também foram notadas células com grande número de grânulos corados, que são vesículas de fosfatase alcalina em formação (Fig.IV.25 – setas de cor verde).



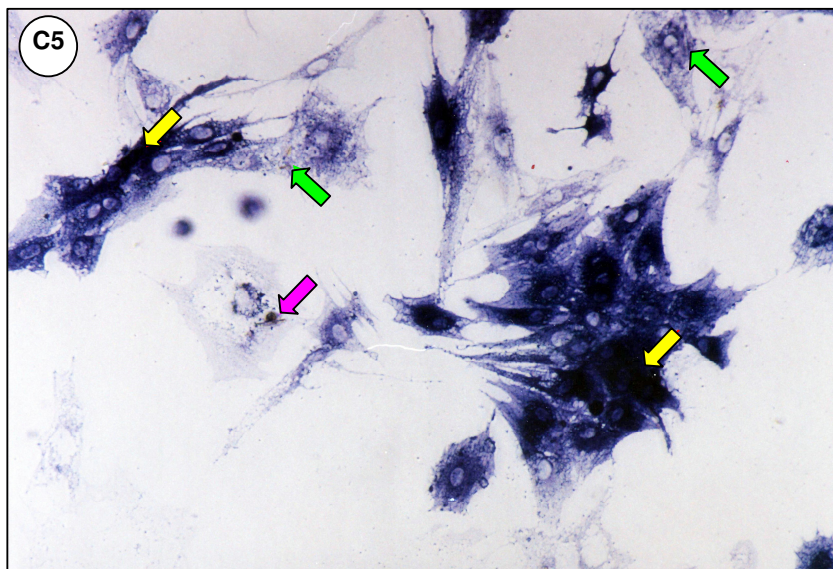
**Figura IV.25** – Imagens com aumento de 150X da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença do grupo controle (Ct); ampliação de uma célula osteoblástica (quadro azul à direita); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor vermelha); coloração das vesículas de formação da fosfatase alcalina na matriz (seta de cor verde).



**Figura IV.26** – Imagens com aumento de 150X da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença dos grupos C1 e C2; presença do compósito (seta de cor rosa); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor amarela); coloração das vesículas de formação da fosfatase alcalina na matriz (seta de cor verde).



**Figura IV.27** – Imagens com aumento de 150X da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença dos grupos C3 e C4; presença do compósito (seta de cor rosa); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor amarela); coloração das vesículas de formação da fosfatase alcalina na matriz (seta de cor verde).



**Figura IV.28** – Imagens com aumento de 150X da coloração por BCIP-NBT da fosfatase alcalina produzida pelos osteoblastos na presença do grupo C5; presença do compósito (seta de cor rosa); coloração da fosfatase alcalina presente na matriz (seta de cor amarela); coloração das vesículas de formação da fosfatase alcalina na matriz (seta de cor verde).

Esses resultados estão em concordância com estudos de avaliação da produção de fosfatase alcalina de diferentes biomateriais (Valério et al., 2004a e 2004b; Andrade et al., 2005; Sampaio et al., 2005a e 2005b; Schainberg et al., 2005; Valerio et al., 2005a e 2005b), como também com os testes iniciais de biocompatibilidade com a hidroxiapatita dopada com íons  $Zn^{+2}$  aumentando a proliferação de células osteoblásticas (Ito et al., 2002; Sogo et al., 2004; Webster et al., 2004).

O estudo preliminar da citocompatibilidade dos compósitos CaP/COL dopados e não dopados com Zn mostrou que, a longo prazo, foram encontradas alterações na morfologia dos osteoblastos, quando avaliada a sua citotoxicidade. Entretanto, mostraram proliferação e viabilidade celular comparável às células osteoblásticas usadas como controle. Os osteoblastos mostraram atividade celular na presença dos compósitos, mostrando-se capazes de produzir fosfatase alcalina, sem mudanças consideráveis na sua morfologia. As concentrações de Zn usadas na dopagem dos compósitos evidenciaram mudanças na atividade dos osteoblastos. Os resultados sugeriram que os compósitos testados mostraram propriedades adequadas para aplicações biológicas.

Novos testes com o tratamento prévio das amostras serão necessários para a avaliação da citocompatibilidade desses materiais. Torna-se também importante a quantificação das amostras a serem testadas, bem como experimentar compósitos com diferentes concentrações de Zn, para avaliação da capacidade de estimulação da formação óssea deste elemento usado como dopante nos materiais.

## CAPÍTULO V – CONCLUSÕES - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 1 CONCLUSÕES

Os fosfatos de cálcio hidroxiapatita carbonada e hidroxiapatita/ $\beta$ -fosfato tricálcico foram sintetizados com características semelhantes àsquelas encontradas na literatura, a partir de processamento simples em laboratório.

A hidroxiapatita sintetizada a partir dos reagentes hidróxido de cálcio e ácido ortofosfórico com o pH controlado em 7 foi a rota através da qual se obteve a hidroxiapatita com menor presença da fase CaO e a rota mais economicamente viável.

O tratamento térmico a 900°C foi suficiente para a obtenção de fosfatos de cálcio cristalinos e o tratamento térmico com resfriamento brusco foi responsável pela obtenção de hidroxiapatita sem a presença da fase CaO.

O tratamento químico com solução de ácido ortofosfórico foi responsável pela obtenção do fosfato de cálcio bifásico, a hidroxiapatita/ $\beta$ -fosfato tricálcico.

Hidroxiapatita carbonada e hidroxiapatita/ $\beta$ -fosfato tricálcico foram dopadas com nitrato de zinco na concentração molar de 1% sem alterações nas suas características morfológicas e estruturais.

O colágeno foi extraído de sua fonte natural, o pericárdio bovino, pela digestão enzimática, obtendo-se quantidade razoável de colágeno bruto.

O colágeno bovino tipo I foi obtido pelo desenvolvimento de um protocolo específico para sua purificação, através da técnica cromatográfica de troca iônica, e com grau de pureza comparável ao colágeno bovino tipo I encontrado no comércio de importação.

O protocolo desenvolvido para a purificação do colágeno mostrou-se um processo simples de purificação com viabilidade econômica e com facilidade de produção.

Os métodos de quantificação de proteína utilizados não foram adequados para a quantificação precisa do colágeno bovino tipo I puro.

Os fosfatos de cálcio dopados e não dopados com zinco desenvolvidos neste estudo foram associados, através do processo de simples mistura, ao colágeno bovino tipo I puro (COL), obtendo-se os compósitos fosfatos de cálcio/COL.

Os compósitos fosfatos de cálcio dopados com Zn/COL mostraram-se com morfologia e estrutura semelhantes aos compósitos fosfatos de cálcio/COL.

O compósito obtido pela incorporação de zinco durante a síntese da hidroxiapatita não apresentou diferenças morfológicas e estruturais do compósito no qual o zinco foi incorporado no momento da mistura hidroxiapatita e COL.

No teste de citotoxicidade *in vitro* os compósitos fosfatos de cálcio/COL dopados e não dopados com zinco na presença de células osteoblásticas primárias mostraram viabilidade e proliferação celular comparáveis às células osteoblásticas do controle; após 72 horas, os osteoblastos mostraram-se com núcleos apoptóticos na presença dos compósitos, indicando a necessidade do preparo prévio das amostras para reavaliação do teste de citotoxicidade.

A produção de fosfatase alcalina pelos osteoblastos na presença dos compósitos mostrou-se comparável à produção das células osteoblásticas do controle; os compósitos dopados com Zn mostraram maior produção de fosfatase alcalina que os compósitos não dopados com Zn; o compósito com incorporação de Zn na síntese de hidroxiapatita mostrou maior produção de fosfatase alcalina que o compósito com incorporação de zinco no momento da mistura.

Os compósitos fosfatos de cálcio/COL desenvolvidos neste estudo mostraram propriedades adequadas para aplicações biológicas.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHAR, A., GHORBANI, M., EHSANI, N., SAERI, M.R., SORRELL, C.C. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. **Materials & Design**, v.24, p.197-202, 2003.
- ALEXANDER, H. Composites. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. Chapter 2.8, p.94-105.
- ALMEIDA, M.S; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.24, p.30-35, 2002.
- ANDRADE, A. L.; FERREIRA, J. M. F.; DOMINGUES, R. Z. Zeta potencial measurement in bioactive collagen. **Materials Research**, v.7, n.4, p.631-634, 2004.
- ANDRADE, A.L.; VALERIO, P.; GOES, A.M.; LEITE, M.F.; DOMINGUES, R.Z. Behavior of osteoblasts cultured on collagen coated bioactive glass. **Key Engineering Materials**, v.284-286, p.675-677, 2005.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v.21, p.667-681, 2000.
- ANUSAVICE, K.J. **Phillips: materiais dentários**. Tradução por Edson Jorge Lima Moreira. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.5, p.44-66.
- ARCÍS, R. W.; LÓPEZ-MACIPE, A.; TOLEDANO, M.; OSORIO, E.; RODRÍGUEZ-CLEMENTE, R.; MURTA, J.; FANOVICH, M. A.; PASCUAL, C. D. Mechanical properties of visible light-cured resins reinforced with hydroxyapatite for dental restoration. **Dental Materials**, v.18, p.49-57, 2002.
- ARENDS, J; CHRISTOFFERSEN, J.; CHRISTOFFERSEN, M.R.; ECKERT, H.; FOWLER, B.O.; HEUGHEBAERT, J.C.; MANCOLLAS, G.H.; YESINOWSKI, J.P.; ZAWACKI, S.J. A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution-an international multimethod analysis. **Journal of Cryst. Growth**, v.84, p.515-532, 1987.
- AVERY, J.K. Histology of the periodontum. In: AVERY, J.K. (Ed.) **Oral development and histology**. New York: Thieme Medical Publishers Inc. 1994.
- AXÉN, N., PERSSON, T., BJÖRKLUND, K., ENGQVIST, H., HERMASSON, L. An injectable bone void filler cement based on CaAluminate. **Key Engineering Materials**, v.254-256, p.265-268, 2004.
- BAKOS, D.; SOLDÁN, M.; HERNÁNDEZFUENTES, I. Hydroxyapatitecollagenhyaluronicacid composite. **Biomaterials**, v.20, p.191-195, 1999.
- BAN, S., et. al., Composite Mesh Consisting of Titanium, Apatite and Biodegradable Copolymer. **Key Engineering Materials**, v.254-256, p.517-520, 2004.
- BAUER, T.W. Coating hydroxyapatites controversies. **Orthopedics**, v.18, p. 885-888, 1995.
- BET, M.R. **Preparação e caracterização de biocerâmicas compostas de colágeno e sais de fosfato de cálcio**. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 1995. 62p. (Dissertação, Mestrado em Ciências, Química Analítica).
- BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N. Hidroxyapatite-gelatin films: a structural and mechanical characterization. **Biomaterials**, v.19, p.739-744, 1998.
- BOTELHO, C. M.; BROOKS, R. A.; BEST, S. M.; LOPES, M. A.; SANTOS, J. D.; RUSHTON, N.; BONFIED, W. Biological and physical-chemical characterization of phase pure HA and Si-substituted

hydroxyapatite by different microscopy techniques. **Key Engineering Materials**, v.254-256, p.645-646, 2004.

BOTTINO, M.A.; QUINTAS, A.F.; MIYASHITA, E. et al. **Estética em Reabilitação Oral Metal Free**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

BOYDE, A. Microstructure of enamel. In: **Dental enamel**, Ciba Foundation Symposium, v.205, Wiley, New York, 1997, p.18-31.

BOYER,

BRENDOLAN, A.P.; MANSUR, H.S.; REZENDE, C.M.F. Caracterização por espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica do pericárdio bovino para aplicação biomédica. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, III, 2004, Campinas. **Livro de Resumos ... III COLAOB**, 2004. p.136. (BR075).

CALLIS, P. D.; SANTINI, A. Response of rat and guinea-pig subcutaneous tissue to implanted human roots containing collagen/hydroxyapatite preparations. **International Endodontic Journal**, v.18, n.4, p.267-273, 1985.

CALLISTER JR, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução**. Tradução por Sérgio Murilo Stamile Soares. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora, 2002. Cap.6, p.78-107.

CARRODEGUAS, R.G. Composites de aplicación biomédica. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, III, 2004, Campinas. **Livro de Resumos ... III COLAOB**, 2004. p.45 (PO3).

CARRODEGUAS, R.G.; MONDÉJAR, S.P.; SANTOS, L.A.; RIGO, E.C.S.; BOSCHI, A.O. Cimentos de fosfatos de cálcio. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, v.10, p. 30-32, 1999.

CHANG, M. C.. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. **Biomaterials**, v.24, p.2853-2862, 2003.

CHANG, M. C.; TANAKA J., FTIR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite crosslinked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v.22, p.4811-4818, 2002.

CHANG, M. C.; TANAKA J., XPS study for the microstructure development of hydroxyapatite collagen nanocomposites crosslinked using glutaraldehyde. **Bomaterials**, v.23, p.3879-3885, 2002.

CHANG, Y. L.; STANFORD, C. M.; KELLER, J. C. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA) enhanced bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.52, p.270-278, 2000.

CHEN, R.; HO, H. O.; SHEU, M. T. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. **Biomaterials**, v.26, p.4229-4235, 2005.

CHENG, Z. H.; YASUKAWA, A.; KANDORI, K.; ISHIKAWA, T. FTIR study on incorporation of CO<sub>2</sub> into calcium hydroxyapatite. **Journal of Chemistry Society, Faraday Trans.** v.94, n.10, p.1501-1505, 1998.

CHU, N.; JANCKILA. J.; WALLACE, J.H; YAM, L.T. Assessment of a method for immunochemical detection of antigen on nitrocellulose membranes. **Journal of Histochem. Cytochem.**, v.37,n.2, p.257-263, 1988.

COPELAND, R.A. **Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols**. New York: Chapman & Hall. 1994.

COSTA, E., NOVAKI, L., TSAI, H., PEREIRA, L.T.P., ANDRADE, A.V.C., SANTOS, C.O.P., BORGES, C.P.F., MARQUES, M.B., CRUZ, A.C.C., SANTOS, F.A., SILVA, J.C.Z. Biovidros: sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.6, n.30, p. 2003.

COSTA, A.M.; SOARES, G.A.; CALIXTO, R.; ROSSI, A.M. Preparation and properties of zinc containing biphasic calcium phosphate bioceramics. **Key Engineering Materials**, v.254-256, p.119-122, 2004.

CRAIG, R. G.; POWERS, J. M. **Materiais Dentários Restauradores**. São Paulo: Livraria Santos Editora. 2004.

CULLITY, B.D. **Elements of X-ray diffraction**. 2.ed. Reading, Massachussets: Addison-Wesley, 1978. Cap.10, p.324-349.

DALKÝZ, M.; ÖZCAN, A.; YAPAR, M.; GÖKAY, N.; YÜNCÜ, M. Avaliação dos efeitos de diferentes biomateriais em defeitos ósseos. **Journal Implant Dentistry**, ano III, n.11, 2002.

DEYL, Z., MIKSÍK, I., ECKHARDT, A. Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins. **Journal of Chromatography B**, v.790, p.245-275, 2003.

DEUTSCHER, M. Methods in enzymology. Guide To protein Purification. San Diego: Academic Press. V.182, p.309-380, 1990.

DI RENZO, M.; ELLIS, T. H.; SACHER, E.; STANGEL, I. A photoacoustic FTIRS study of the chemical modifications of human dentin surfaces: I. Demineralization. **Biomaterials**, v.22, p.787-792, 2001.

DOROZHKINA, E. I.; DOROZHKIN, S. V. Surface mineralization of hydroxyapatite in modified simulated body fluid (mSBF) with higher amounts of hydrogencarbonate ions. **Colloids and Surfaces**, v.210, p.41-48, 2002.

D'SOUZA, R.N.; BACHMAN, T.; BAUMGARDNER, K.R; et al. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. **Journal of Dental Research**, Washington DC, v.74, n.2, p.702-709, 1995.

DU, C.; CUI, F.Z.; FENG, Q.L.; ZHU, X.D.; de GROOT, K.J. Tissue response to nanohydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. **Biomedical Materials Research**, v.42, p.540-548, 1998.

ELLEGAARD, B.; LÖE, H. New attachment of periodontal tissues after treatment of intrabony lesions. **Journal of Periodontology**, v.42, p.13-19, 1990.

ExpASy Proteomics Server (Expert Protein Analysis System), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). Disponível em : <<http://au.expasy.org/>> Acesso em:14/04/2004.

LI, J.; FARTASH, B.; HERMANSSON, L. Hydroxyapatite-alumina composites and bone-bonding. **Biomaterials**, v.16, p.417-422, 1995.

FIGUEIREDO, M.C.; PARRA, S.L.N. Aspectos normais da membrana periodontal e osso alveolar. Medcenter: Ortodontia e Ortopedia Facial, 2002. Disponível em: <<http://medcenter.com>>. Acesso em 2004.

FINISIE, M.R., JOSUÉ, A.; FÁVERE, V.T.; LARANJEIRA, M.C.M. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.73, 2001.

FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.; VILÓRIA, M.I.V.; FERNANDES, E.S.; FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.4, 2001.

FROST, R. L. An infrared and Raman spectroscopic study of natural zinc phosphates. **Spectrochimica acta. Part A**, v.60, p.1439-1445, 2004.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.3, p. 299-305, 1992.

GARBEROGLIO, R.; BRÄNNSTROM, M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. **Archives of Oral Biology**, v.21, n. , p.355-362, 1976.

GARCIA, C.; PAUCAR, C.; GAVIRIA, J.; DURÁN, A. Effect of some physical-chemical variables in the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route. **Key Engineering Materials**, v.284-286, p.47-50, 2005.

GOISSIS, G. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v.20, p.27-34, 1999.

GRAHAM, N.B.; WOOD, D.A. **Macromolecular Biomaterials**. New York: RC Press, 1984.

HARALSON, M.A., HASSEL, J.R. **Extracellular Matrix**. New York: Oxford University Press. 1995.

HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of American Ceramics Society**, v.74, p.1487-1510, 1994.

HO, P.L., KITAHARA, E., OGAWA, D.M.O., SILVA, A.R.B.P., RAMOS, C.R.R., NASCIMENTO, A.L.T.O. Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.2, p.24-26, 2000.

HSIEH, M. F.; CHUNG, R.J.; HSU, T.J.; PERNG, L.H.; CHIN, T.S. Organic-inorganic hybrids of collagen or biodegradable polymers with hydroxyapatite, **Key Engineering Materials**, v.254-256, p.473-476, 2004.

IKEDA, T. **Fundamentals of Piezoelectricity**. Oxford –Inglaterra: Oxford University Press. 1996.

ITO, A.; KAWAMURA, H.; MIYAKAWA, S.; LAYROLLE, P.; AOMORI, R.; TSUTSUMI, S. Resorbability reduction by the incorporation of zinc into tricalcium phosphate. **Key Engineering Materials**, v.192-195, p.199-202, 2001.

ITO, A.; KAWAMURA, H.; OTSUKA, M.; IKEUCHI, M.; OHGUSHI, H., ISHIKAWA, K.; ONUMA, K.; KANZAKI, N.; SOGO, Y.; ICHINOSE, N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation, **Materials Science and Engineering C**, v. 22, p.21-25, 2002.

ITO, A.; OJIMA, O.; NAITO, H.; ICHINOSE, N.; TATEISHI, T. Preparation, solubility and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.50, p.178-183, 2000.

ITOH, S.; KIKUCHI, M; TAKAKUDA, K; KOYAMA, Y; MATSUMOTO, H.N.; ICHINOSE, S.; TANAKA, J.; KAWAUCHI, T.; SHINOMIYA, K. The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP2. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.54, n.3, p.445-453, 2001.

ITOH, S.; KIKUCHI, M; TAKAKUDA, K; KOYAMA, Y; TAKAKUDA, K.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Development of an artificial vertebral body using a novel biomaterial, hydroxyapatite-collagen composite. **Biomaterials**, v.23, p.3919-3926, 2002.

JARCHO, M. CaP ceramics as hard tissues prosthetics. **Clinical Orthopaedics**, v.157, p.259278, 1981.

- JARCHO, M.; BOLEN, C.H.; THOMAS, M.B.; BOBICK, J.; KAT, J.F.; DOREMUS, R.H. Hydroxyapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline forms. **Journal of Materials Science**, v.11, p.2027-2035, 1976.
- JONES F.H. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials. **Surface Science Reports**, n.42, p.75-205, 2001.
- KAWACHI, E.Y.; BETRAN, C.A.; DOS REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v.23, p.518-522.
- KIESWETTER, K., BAUER, T.W., BROWN, S.A., VAN LENTE, F., MERRIT, K.. Characterization of calcium phosphate powders by ESCA and EDXA. **Biomaterials**, v.15, 4609-4620, 1994.
- KIKUCHI, M.; IKOMA, T.; ITOH, S.; MATSUMOTO, H.N.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Biomimetic synthesis of bonelike nanocomposites using the selforganization mechanism of hydroxyapatite and collagen, **Composites Science and Technology**, v.64, p.819-825, 2004a.
- KIKUCHI, M.; ITOH, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Selforganization mechanism in a bonelike hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo, **Biomaterials**, v.22, N.13, p.1705-1711, 2001.
- KIKUCHI, M.; MATSUMOTO, H.N.; YAMADA, T.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; TANAKA, J. Glutaraldehyde crosslinked hydroxyapatite/collagen selforganized nanocomposites, **Biomaterials**, v.25, p.6369, 2004b.
- KOKUBO, T.; KIM, H-M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v.24, p.2161-2175, 2003.
- KOUSVELARI, E. **Biomaterials, biomimetics and tissue engineering branch**. 164<sup>th</sup> Meeting of the National Advisory Dental and Craniofacial Research Council. 2001. Disponível em: <<http://www.nidcr.nih.gov/about/nadrc/agend164.asp>> Acesso em: 09/02/2003.
- KUMUDINIE, C.; PREMACHANDRA, J.K. Collagen. In: **Polymer Data Handbook**. Oxford University Press, 1999.
- LACERDA, R.; PLEPIS, A. M.; GOISSIS, G.. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de aspargina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v.21, p.267-271, 1998.
- LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBECK, B.; PERDIGÃO, J. et al. Restorative therapy for erosive lesions. **European Journal of Oral Science**, Denmark, v.104, p.229240, 1996.
- LANGDON, S.E.; CHERNECKY, R.; PEREIRA, C.A. Biaxial mechanical/structural effects of equibiaxial strain during crosslinking of bovine pericardial xenograft materials. **Biomaterials**, v.20, p.137-153, 1999.
- LANGER, R. Tissue Engineered. **Molecular Therapy**, v.1, p.12-15, 2000.
- LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue Engineered. **Science**, v.260, p.920926, 1993.
- LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v.221, p.1-22, 2001.
- LEE, W.K., PARK, K.D., HAN, D.K., SUSH, H., PARK, J.C., KIM, Y.H. Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis. **Biomaterials**, v.21, p.2323-2330, 2000.
- LeGEROS, R.Z. **Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine**: in Monographs in Oral Science (Myers, H.M. Ed.). Basel: Karger, 1991. 201p.

- LeGEROS, R.Z. CaP materials: a review. **Adv Dent Res**, v.3, p.164180, 1988.
- LeGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.1, n.395, p.8198, 2002.
- LEIVAS, T.P. Biomecânica do tecido ósseo. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, III, 2004, Campinas. **Livro de Resumos... III COLAOB**, 2004. p.44. (Palestra P02).
- LEVENTOURI, TH.;BUNACIU, C.E.; PERDIKATSI. V. Neutron powder diffraction of silicon-substituted hydroxyapatite. **Biomaterials**, v.24, p.4205-4211, 2003.
- LIAO, K., SEIFTER, E., HOFFMAN, D., YELLIN, E.L., FRATER, R.W. Bovine pericardium versus porcine aortic valve: comparison of tissue biological properties as prosthetic valves. **Artificial Organs**, v.16, n.4, p.361365, 1992.
- LIN, X.Y.; FAN, H.S.; LI, X.D.; TANG, M.; ZHANG, X.D. Evaluation of bioactivity and cytocompatibility of nano-hydroxyapatite/collagen composite *in vitro*. **Key Engineering Materials**, v.284-286, p.553-556, 2005.
- FALCON, L.A.S. Apuntes química cromatografía. Sitio de estudiantes y docentes universitarios. 2001. Disponível em: <<http://www.lafacu.com/apuntes/quimica/cromatografia/default/.htm>>. Acesso em 09/08/2003.
- LIOU, SZ-C.; CHEN, S-Y.; LIU, D-M. Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratios. **Biomaterials**, v.24, p.3981-3988, 2003.
- LIU, H. S. Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method. **Ceramic International**, v.23, p.19-25, 1999.
- LOWRY, O.H.; ROSE BROUGH, N.J; FARR, A.L; RANDALL,R.J .Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biol. Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- LYNN, A. K.; CAMERON, R. E.; BEST, S. M.; BROOKS, R. A.; RUSHTON, N.; BONFIELD, W. Phase mapping: a novel design approach for the production of calcium phosphate-collagen biocomposites. **Key Engineering Materials**, v.254256, p.593-596, 2004.
- MA, Q. Y.; TRAINA, S. J.; LOGAN T. J.; RYAN J. A. In situ lead immobilization by apatite. **Environment Science Technology**, v.27, p.1803-1810, 1993.
- MAGALHÃES, D.; MENEZES, H.H.M.; TAGA, M. Perspectivas atuais na utilização dos biomateriais em regeneração periodontal. **Revista do CROMG**, v.8, n.1, p.915, 2002.
- MANN, S. WEBB, J.; WILLIAMS, R.J.P. **Biom mineralization: chemical and biochemical perspectives**. Weinheim: VHC, 1989. In: OGAWA, C.A.; PLEPIS, A.M.G. Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em compósito hidroxiapatita:colágeno. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.17, n.3, p.123130, 2001.
- MANSTSH, H.H.; CHAPMAN, D. **Infrared spectroscopy of biomolecules**. New York: John Wiley-Liss, 1996.
- MANSUR, H.S; MANSUR, A.A.P.; BICALHO, S.M.C.M. Lignin-hydroxyapatite/tricalcium phosphate biocomposites: SEM/EDX and FTIR characterization. **Key Engineering Materials**, v.284-286, p.745-748, 2005.
- MARSHALL Jr, G.W.; MARSHALL S.J.; KINNEY, J.H. and BALLOCH, M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **Journal of Dentistry**, v.25, n.6, p.441-458, 1997.
- MARTUCCI, R.C., ANBROGINI, A., CALADO, A.A., ZERATI, M., MULLER, M.A. Pubovaginal sling with bovine pericardium for treatment of stress urinary incontinence. **Brazilian Journal of Urology**, v.26, n.2, p.208214, 2000.

MAVROPOULOS, E., ROSSI, A.M., ROCHA, N.C.C., SOARES, G.A., MOREIRA, J.C., MOURE, G.T. Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions. **Materials Characterization**, v.50, p.203-207, 2003.

MESTGER, D.S.; RIEGER, M.R.; FOREMAN, D.W. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. **Journal of Materials Science – Materials Medical**, v.10, p.917, 1999.

MIAO, S.; WENG, W.; GHENG, K.; DU, P.; SHEN, G.; HAN, G.; ZHANG, S. Sol-gel preparation of Zn-doped fluoridated hydroxyapatite films, **Surface e Coatings Technology**. 2004 (in press, SCT-10829).

MONMA, H.; GOTO, M.; KAJIMA, H.; HASHIMOTO, H. Preparation of tetracalcium phosphate. **Gypsum and Lime**, p.202, 1986.

MOONGA, B.S. DEMPSTER, D.W. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. **Journal of Bone Mineral Research**, v.10, p.453-457, 1995.

MUKHERJEE, D.; SEN, S. Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. **Journal of Clinical Investigation**, v.88, p.1141-1146, 1991.

MURRY, M.G.S.; WANG, J.; PONTON, C.B.; MARQUIS, P.M. An improvement in processing of hydroxyapatite ceramics. **Journal of Materials Science**, v.30, p.3061-3074, 1995.

NAGAI, T.; HIROSI; NISHIMURA; YASUSHI. Hydroxyapatite, ceramic material and process for preparing thereof. United States Patent, 4.330.514, 1982.

NAGAI, T., SUZUKI, N. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. **Food Chemistry**, v.76, p.149153, 2002.

NAKABAYASHI, N.; PASHLEY, D.H. **Hybridization of dental hard tissues**. 1.ed. Tokyo: Quintessence, 1998.

OLIVEIRA, M. **Síntese e caracterização de biomateriais à base de fosfato de cálcio**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia-UFMG, 2004. 104p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais).

OGAWA, C.A., PLEPIS, A.M.G., Liberação *in vitro* de cloridrato de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita:colágeno, **Polímeros: ciência e tecnologia**, v.12, p.115-122,2002.

OGAWA, C.A.; PLEPIS, A.M.G. Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em compósito hidroxiapatita:colágeno. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.17, n.3, p.123-130, 2001.

OHTA, M.; YASUDA, M.; OKAMURA, H. Susceptibility of calciumdeficient hydroxyapatitecollagen composite to irradiation, **Radiation Protection Dosimetry**, v.94, no.4, p.385-388, 2001.

OKAZAKI, M.; YAMAZAKI, Y.; YOSHIDA, Y.; SHIMADZU, A.; NOKIHARA, K.; HAMADA, Y.; TAKAHASHI, J.; MATSUURA, N. A. A new concept of CO<sub>3</sub> apatitecollagen composites with adhesion motif as biomaterials. **Dentistry in Japan**, v.37, p.95-100, 2001.

OKAZAKI, M.; SATO, M. Computer graphics of hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v.11, p.573-578, 1990.

OKAZAKI, M.; TAKAHASHI, J. Synthesis of functionally graded CO<sub>3</sub> apatite as surface biodegradable crystals. **Biomaterials**, v.20, p.1073-1078, 1999.

OKTAR, F.N., GENÇ, Y., GOLLER, G., AGATHOPOULOS, S., TULYAGANOV, D.U., FERREIRA, J.M.F., KAYALI, E.S., SALMAN, S. The influence of sintering temperature on the properties of composites of biologic hydroxyapatite and zirconia. **Key Engineering Materials**, v.284-285, p.709-712, 2005.

- OSAKA, Y. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. **Journal of Materials Science**, v.2, p.51-55, 1995.
- OSBORN, J.F.; NEWESELEY, H. The material science of CaP ceramic. **Biomaterials**, v.1, p.108-111, 1980.
- OURSLEER, M.J.; BELLIDO, T. **Bone** cells, 2003. ASBMR – American Society for Bone and Mineral Research. Disponível em: <<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/cells.html>>. Atualizado em 28/02/2005. Acesso em 03/03/2005.
- PARI, L.; VENKATESWARAN, S. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 861-870, 2003.
- PARK, J. **Biomaterials Science and Engineering**. New York: Plenum Press, 1984.
- PARK, J.B.; LAKES, R.S. **Biomaterials: an introduction**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1992. 394p.
- PASHLEY, D.H.; PASHLEY, E.L.; CARVALHO, R.M. and TAY, F.R. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. **The Dental Clinics of North America**, v.46, n.2, p.211-245, 2002.
- PAULA, M.; GOISSIS, G.; MARTINS, V.C.A. Compósitos de colágeno aniônico: ramsana como géis injetáveis para correções plástica: preparação, caracterização e propriedades reológicas. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.18, p.7-16, 2002.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. Estados Unidos: Saunders College Publishing, 1996.
- PAYNE, K.J.; VEIS, A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. **Biopolymers**, v.27, p.1749-1760, 1988.
- PEÑA, J.; VALLET-REGI, M. Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique. **Journal of the European Ceramic Society**. v.23, p.1687-1696, 2003.
- PEREIRA, A.P.V.; VASCONCELOS, W.L.; ORÉFICE, R.L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. **Polímeros: ciência e Tecnologia**, v.9, p.104-109, 1999.
- PEREIRA, M. M., et. al., Preparation and Biocompatibility of Poly (Methyl Methacrylate) Reinforced with Bioactive Particles, **Materials Research**, v.6, no.3, p.311-315, 2003.
- PETERS, F.; SCHWARZ, K.; EPPLER, M. The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis. **Thermochemica acta**, v.361, p.131-138, 2000.
- PHILLIPS, R.W. **Skinner - Materiais Dentários**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 334p.
- PIEPER, J. S.; OOSTERHOF, A., DIJKSTRA, P. J.; VEERKAMP, J. H.; VAN KUPPEVELT, T. H. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. **Biomaterials**, v.20, p.847-858, 1999.
- PIEZ, K.A. Structure and assembly of the native collagen fibril. **Connect. Tissue Research**, v.10, p.25-36, 1982.
- PORTER, W.J. Reconstruction of severe atrophy and resorption of maxillae and mandibule with collagen hydroxyapatite. **N C Dent Gaz**, v.13, n.2, p.14-15, 1991.

PITUCO, M.E.; STEFANO, E. **Encefalopatia Espongiforme Bovina – EEB**, Instituto Biológico – São Paulo. <<http://www.biologicalo.sp.gov.br/encefalopatia.htm>> Atualizada em 25/10/2004. Acesso em 25/10/2004.

PTEI – Pittsburgh Tissue Engineering Initiative. **About tissue engineering**. 2002. Disponível em: <[http://www.ptei.org/about\\_te/index.html](http://www.ptei.org/about_te/index.html)>. Acesso em 13/02/2003.

RATNER, B.D. Biomaterials Science: an interdisciplinary endeavor. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. p.18.

RAYNAUD, S. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. **Biomaterials**, v.23, p.1065-1072, 2002.

RHEE, S.H.; TANAKA, J. Hydroxyapatite coating on a collagen membrane by a biomimetic method. **Journal of American Ceramic Society**, v.81, p.3029-3031, 1998.

ROCHA, L. B. **Estudo de biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico para reparo de defeitos ósseos**. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 2000. (Dissertação, Mestrado em Patologia Experimental).

RUYS, A. J.; WEI, M.; SORREL, C. C.; DICKSON, M. R.; BRANDWOOD, A.; MILTHORPE, B. K. Sintering effects on the strength of hydroxyapatite. **Biomaterials**, v.16, n.5, p.409-415, 1995.

SAMPAIO, B. V. et al., Evaluation of Osteoblast Viability, Alkaline Phosphatase Production and Collagen Secretion in the Presence of Hydroxyapatite Reinforced with Oxide Glasses. **Key Engineering Materials**, v. 284286, p.635-638, 2005a.

SAMPAIO, B. V. et. al., Biocompatibility Evaluation of Three Different Titanium Hydroxyapatite Composites. **Key Engineering Materials**, v. 284286, p.639-642, 2005b.

SATO, K., TANASHISHIINA, T., JUN, F., ABEKAWAMURA, A., ICHINOMIYA, M., MINEGISHI, Y., TSUKAMASA, Y., NAKAMURA, Y., KAWABATA, M., OHTSUKI, K. Simple and rapid chromatographic purification of type V collagen from a pepsin digest of porcine intestinal connective tissue, an unmanageable starting material for conventional column chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.790, p.277-283, 2003.

SCHEPERS, E.J.G., DUCHEYNE, P., BARBIER, L. Bioactive glass particle of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant Dentistry**, v.3, p.151-156, 1993.

SCHUMANN, W. **Minerals of the world**. New York: Sterling, 1992.

SERRE, C.M., PAPILLARD, M., CHAVASSIEUX, P., VOEGEL, J.C., BOIVIN, G. Influence of magnesium substitution on a collagenapatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.42, p.626-633, 1998.

SHEU, M. T.; HUANG, J. C.; YEH, G. C., HO, H. O. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. **Biomaterials**, v.22, p.1713-1719, 2001.

SILVA, R.M.; SILVA, G.A.; COUTINHO, O.P.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes, **Journal of materials science: materials in medicine**, v.15, p.1105-1112, 2004.

SILVER, F.; DOILLON, C. **Biocompatibility, interactions and implantable materials**. V.1. New York: VCR, 1989.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. **Principles of instrumental analyses**. 4.ed. [s.l.]: Saunders College Publishing, 1992. 700p.

SMITH, A.J. Dentin formation and repair. In: HARGREAVES, K.M.; GOODIS, H.E. **Seltzer and Bender's Dental Pulp**. 1. ed. Tokyo: Quintessence, 2002. Chapter 3, p.4162.

SOGO, Y.; ITO, A.; KAMO, M.; SAKURAI, T.; ONUMA, K.; ICHINOSE, N.; OTSUKA, M.; LEGEROS, R.Z. Hydrolysis and cytocompatibility of zinccontaining atricalcium phosphate powder. **Materials Science and Engineering C**, v.24, p.709-715, 2004.

SOGO, Y., ITO, A., FUKASAWA, K., SAKURAI, T., ICHINOSE, N., LeGEROS, R.Z. Zinccointaining calcium phosphate ceramics with a (Ca+Zn)/P molar ratio of 1.67. **Key Engineering Materials**, v.284286, p.3134, 2005.

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1982. V.1.

SWAN, J. **The skeletal system**, 2003. Online Anatomy & Physiology Resources. University of New Mexico. Class notes 237. Disponível em: <<http://webanatomy.net/anatomy/skeletalnotes.htm>>. Revisado em 24/02/2005. Acesso em 27/02/2005.

TAGUCHI, T.; SAITO, H.; UCHIDA, Y.; SAKANE, M.; KOBAYASHI, H.; KATAOKA, K.; TANAKA, J. Bonding of soft tissues using a novel tissue adhesive consisting of a citric acid derivative d collagen. **Materials science & Engineering C**, v.24, p.775-780, 2004.

TAKECHI, M.; MIYAMOTO, Y.; ISHIKAWA, K.; TOH, T.; YUASA, T.; NAGAYAMA, M.; SUZUKI, K. Initial histological evaluation of anti-washout type fast-setting calcium phosphate cement following subcutaneous implantation. **Biomaterials**, v.19, p.2057-2063, 1998.

TAY, B.K.; LE, A.X.; HEILMAN, M.; LOTZ, J.; BRADFORD, D.S. Use of a collagen-hydroxyapatite matrix in spinal fusion. A rabbit model. **Spine**, v.23, n.21, p.2276-2281, 1998.

TEN CATE, A.R. **Oral histology: development, structure and function**. 4.ed. Mosby, 1994.

TIRREL, M.; KOKKOLI, E. and BIESALSKI, M. The role of surface science in bioengineered materials. **Surface Science**, v.500, n. , p.6183, 2002.

TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v.25, p.943-948, 2002.

UTECH, M.; VUONO, D.; BRUNO, M.; LUCA, P. de; NASTRO, A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite. **Key Engineering Materials**, v.254-256, p.43-46, 2004.

VALERIO, P.; OKTAR, F.N.; OZYEGIN, L.S.; GOLLER, G; GOES, A.M.; LEITE, M.F. Biocompatibility Evaluation of Dentine, Enamel and Bone Derived Hydroxyapatite. **Key Engineering Materials**, v. 254-256, p.837-840, 2004a.

VALERIO, P.; PEREIRA, M.M.; GOES,A.M.; LEITE,M.F. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution osteoblast proliferation and collagen production, **Biomaterials**, v.25, p.2941-2948, 2004b.

VALERIO, P.; AGATHOPOULOS, S.; CALADO, A.J.; LEITE,M.F.; GOES, A.M.; Attachment of blood cells onto ZrO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub>-containing glass. **Key Engineering Materials**, v. 284-286, p.671-674, 2005a.

VALERIO, P.; MENDES, C.C.P.; PEREIRA, M.M.; GOES,A.M.; LEITE,M.F. Glutamate Release by Osteoblasts in the Presence of Ionic Products from Bioactive Glass 60S. **Key Engineering Materials**, v. 284-286, p.537-540, 2005b.

VAN VLACK, L.H. **Elements of materials science and engineering**. 5.ed. MA, AddisonWesley, 1984.

VEIS, A.; SCHLUETER, R.J. The macromolecular organization of dentin matrix collagen. **Biochemistry**, v.3, p.16501654, 1964.

VIDEAU, J. J., DUPUIS, V. Phosphates and biomaterials. **Eur. J. State Inorg. Chem.**, v.28, n.1, p.303343, 1991.

VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen**. London: Academic Press. V.1, 1980. p.313324.

VULCANI, V.A.S. **Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona**. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos - USP, 2004. (Dissertação, Mestrado em Bioengenharia).

XIAO, Y.; FAN, H.; WU, Y.; XU, J.; TAN, Y.; LIN, X.; LI, X.; ZHANG X. In Vivo Evaluation of Nano-HA/PDLLA Composite. **Key Engineering Materials**, v.284-286, p.881-884, 2005.

WANG, M.; AU, C.L.; LAI, P.K.; BONFIELD, W. Tensile and compressive behaviours and properties of a bone analogue biomaterial. **Key Engineering Materials**, v.284-286, p.693-696, 2005.

WATAZU, A.; OGUCHI, H.; YAMADA, T.; SONODA, T.; KATO, K.; NONAMI, T.; SAITO, N. Growth of normal human osteoblast cells on hydroxyapatite/titanium alloy composites formed by implantation of hydroxyapatite granules into titanium alloy. **Key Engineering Materials**, v.284-286, p.843-846, 2005.

WEBSTER, T.J.; MASSA-SCHLUETER, E.A.; SMITH, J.L.; SLAMOVICH, E.B. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. **Biomaterials**, v.25, p.2111-2121, 2004.

WEI, X., AKINC, M. Si, Znmodified tricalcium phosphates: a phase composition and crystal structure study. **Key Engineering Materials**, v.284286, p.8386, 2005.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials. Proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials**. V.4. New York: Elsevier, 1987.

YAMAGUCHI, M.; OISHI, H.; SUKETA, Y. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. **Biochemistry Pharmacology**, v.36, p.4007-4012, 1987.

YANG, Y.; TIAN, J.; DENG, L.; ONG, J.L. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. **Biomaterials**, v.23, p.1, 2002.

YANG, X.; WANG, Z. Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity. **Journal of Materials Chemistry**, v.8, p.2233-2237, 1998.

YANNAS, I.V. Natural Materials. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. Chapter 2.7, p.84-94.

YOSHIDA, A.; MIYAZAKI, T.; ISHIDA, E.; ASHIZUKA, M. Preparation of Cellulose-Carbonate Apatite Composites through Mechanochemical Reaction. **Key Engineering Materials**, v.284286, p.855-858, 2005.

ZARDIACKAS, L.D.; TEASDALL, R.D.; BLACK, R.J.; JONES, G.S; ST. JOHN, K.R.; DILLON, L.D.; HUGHES, J.L. Torsional properties of healed canine diaphyseal defects grafted with a fibrillar collagen and hydroxyapatite/tricalcium phosphate composite. **Journal of Applied Biomaterials**, v.5, n.4, p.277-283, 1994.

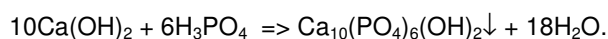
ZENÓBIO, E.G. et al. Regeneração periodontal, associação do uso de biomateriais. **Revista de Periodontia**, v.7, n.1, 1998.

ZIOUPOS, P., BARBENEL, J.C., FISHER, J.C. Mechanical and optical anisotropy of bovine pericardium. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v.1, n.30, p.76-82, 1992.

### 3 ANEXOS

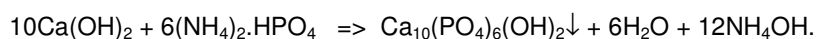
#### 3.1 ANEXO I

**A** – Cálculo das massas dos reagentes para o preparo de 10 g de fosfato de cálcio em R1, com base na razão ideal para hidroxiapatita pura, Ca/P = 1,67. Usou-se o número de moles envolvidos na reação (eq. II.1):



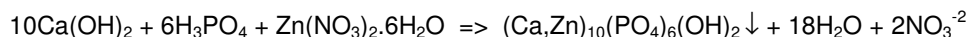
- Peso molecular de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 1004 \text{ g/mol}$
- Nº de moles de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  em 10 g de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 10 \text{ g}/1004 \text{ g} = 99,60 \cdot 10^{-5}$
- Nº de moles de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  em 1 mol de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 99,60 \cdot 10^{-5} \cdot 10 = 99,60 \cdot 10^{-4}$
- Peso molecular de  $\text{Ca}(\text{OH})_2 \Rightarrow 74,08 \text{ g/mol}$
- Massa de  $\text{Ca}(\text{OH})_2 \Rightarrow 74,08 \cdot 99,60 \cdot 10^{-4} = 7,38 \text{ g}$
- Nº de moles de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  em 1 mol de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 99,60 \cdot 10^{-5} \cdot 6 = 59,76 \cdot 10^{-4}$
- Peso molecular de  $\text{H}_3\text{PO}_4 \Rightarrow 98 \text{ g/mol}$
- Massa de  $\text{H}_3\text{PO}_4 \Rightarrow 98 \cdot 59,76 \cdot 10^{-4} = 5,86 \text{ g}$
- Volume de  $\text{H}_3\text{PO}_4 \Rightarrow V = m/d \Rightarrow 5,86 \text{ g}/1,69 \text{ g/cm}^3 = 3,47 \text{ mL}$
- Volume final de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%  $\Rightarrow 3,47 \text{ mL}/0,85 = 4,08 \text{ mL}$

**B** – Cálculo das massas dos reagentes para o preparo de 10 g de fosfato de cálcio em R2, com base na razão ideal para hidroxiapatita pura, Ca/P = 1,67. Usou-se o número de moles envolvidos na reação (eq. II.2):



- Massa de  $\text{Ca}(\text{OH})_2 \Rightarrow 7,38 \text{ g}$  (já calculada para R1)
- Nº de moles de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  em 1 mol de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 99,60 \cdot 10^{-5} \cdot 6 = 59,76 \cdot 10^{-4}$
- Peso molecular de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \Rightarrow 132 \text{ g/mol}$
- Massa de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \Rightarrow 132 \cdot 59,76 \cdot 10^{-4} = 7,89 \text{ g}$

**C** – Cálculo das massas dos reagentes para o preparo de 10 g de fosfato de cálcio dopado com zinco (1% mol) em R3, com base na razão (Ca + Zn)/P = 1,67. Usou-se o número de moles envolvidos na reação (eq. II.3):



- Nº de moles de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  em 10 g de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 10 \text{ g}/1004 \text{ g} = 99,60 \cdot 10^{-5}$
- Nº de moles de Ca em 10 g de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 99,60 \cdot 10^{-5} \cdot 10 = 99,60 \cdot 10^{-4}$
- Concentração do nº de moles de Zn para o nº de moles de Ca de 7,4 g de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 0,01 \cdot 99,60 \cdot 10^{-4} = 99,60 \cdot 10^{-6}$
- Peso molecular de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 297,49 \text{ g/mol}$
- Nº de moles de Zn em  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 297,49 \text{ g/mol}$
- Massa de Zn no composto  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a ser adicionada a 7,4 g de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 297,49 \cdot 99,60 \cdot 10^{-6} = 0,02963 \text{ g} \Rightarrow 29,63 \text{ mg}$

**D** – A massa de Zn (0,15% mol) no composto  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a ser adicionada em 66 mg de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  foi determinada a partir da seqüência de cálculos:

- Nº de moles de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  em 66 mg de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 0,066 \text{ g}/1004 \text{ g} = 6,57 \cdot 10^{-5}$
- Nº de moles de Ca em 66 mg de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 6,57 \cdot 10^{-5} \cdot 10 = 6,57 \cdot 10^{-4}$
- Concentração do nº de moles de Zn para o nº de moles de Ca de 66 mg de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 0,0015 \cdot 6,57 \cdot 10^{-4} = 9,85 \cdot 10^{-6}$
- Peso molecular de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 297,49 \text{ g/mol}$
- Nº de moles de Zn em  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \Rightarrow 297,49$
- Massa de Zn no composto  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a ser adicionada a 66 mg de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \Rightarrow 297,49 \cdot 9,85 \cdot 10^{-6} = 2,93 \cdot 10^{-4} \text{ g} = 0,0003 \text{ g} = 0,3 \text{ mg}$

### 3.2 ANEXO II

Exemplos da determinação dos parâmetros de rede  $a = b$  e  $c$  da célula unitária cristalina de uma amostra do material sintetizado (A3), baseados no ângulo  $2\theta$  dos planos adjacentes  $211$  e  $112$  do conjunto dos índices de Miller,  $hkl$ . Os valores de  $d$  para estes planos na ficha catalográfica 74-0566, hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , no banco de dados do JCPDS 2001 foram respectivamente: 2,8146 e 2,7781.

Os valores dos ângulos  $2\theta$  correspondentes aos valores de  $d$  para os planos  $211$  e  $112$  foram 31,750 e 32,195, respectivamente, e podem ser observados, com realce, no resultado do difratograma da amostra A3, logo a seguir:

-&gt;File: AM03650.DI

10-Oct-2003 11:28

=====

Philips Analytical X-Ray B.V.

PC-APD, Diffraction software

Sample identification: A12

Data measured at: 9-Oct-2003 8:40:00

Diffractometer type: PW1710 BASED

Tube anode: Cu

Generator tension [kV]: 40

Generator current [mA]: 20

Wavelength Alpha1 [Å]: 1.54056

Wavelength Alpha2 [Å]: 1.54439

Intensity ratio (alpha2/alpha1): 0.500

Divergence slit: AUTOMATIC

Irradiated length [mm]: 12

Receiving slit: 0.2

Spinner: OFF

Monochromator used: YES

Start angle [°2θ]: 3.030

End angle [°2θ]: 89.910

Step size [°2θ]: 0.060

Maximum intensity: 1317.690

Time per step [s]: 1.000

Type of scan: CONTINUOUS

Intensities converted to: FIXED

Minimum peak tip width: 0.00

Maximum peak tip width: 1.00

Peak base width: 2.00

Minimum significance: 0.75

Number of peaks: 51

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	Peak width [°2θ]	Peak int [counts]	Back. int [counts]	Rel. int [%]	Signif.
10.775	8.2040	8.2244	0.240	180	59	13.6	1.00
16.790	5.2760	5.2891	0.300	38	26	2.9	1.23
18.830	4.7088	4.7205	0.600	23	21	1.7	1.34
21.740	4.0846	4.0948	0.300	67	18	5.1	1.73
22.865	3.8861	3.8958	0.300	92	17	7.0	2.13
25.850	3.4437	3.4523	0.240	441	15	33.5	3.93
28.080	3.1751	3.1830	0.240	130	14	9.9	2.21
28.910	3.0858	3.0935	0.240	213	14	16.2	2.65
31.750	2.8160	2.8230	0.240	1318	13	100.0	5.92
32.195	2.7781	2.7850	0.180	650	13	49.3	1.82
32.900	2.7201	2.7269	0.300	767	13	58.2	9.94
34.030	2.6323	2.6389	0.240	313	12	23.8	3.40
35.435	2.5311	2.5374	0.360	61	12	4.6	3.51
39.170	2.2979	2.3037	0.240	72	12	5.5	1.70
39.820	2.2619	2.2675	0.240	292	12	22.2	3.93
41.975	2.1506	2.1560	0.180	69	11	5.2	4.96
43.840	2.0634	2.0685	0.240	56	10	4.3	1.60
45.305	2.0000	2.0050	0.240	42	10	3.2	1.25
46.695	1.9436	1.9485	0.240	335	9	25.4	4.00
48.090	1.8905	1.8952	0.240	130	9	9.9	2.64
48.655	1.8698	1.8745	0.180	53	9	4.0	2.48

File: AM03650.DI

10-Oct-2003 11:28

Philips Analytical X-Ray B.V.

PC-APD, Diffraction software

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	Peak width [°2θ]	Peak int [counts]	Back. int [counts]	Rel. int [%]	Signif.
49.515	1.8394	1.8439	0.300	339	8	25.7	7.84
50.535	1.8046	1.8091	0.240	180	8	13.6	2.85
51.285	1.7799	1.7844	0.240	125	8	9.5	2.52
52.100	1.7540	1.7584	0.300	123	8	9.4	4.74
53.185	1.7208	1.7250	0.300	139	8	10.6	5.26
54.390	1.6854	1.6896	0.240	14	7	1.0	0.83
55.860	1.6445	1.6486	0.300	59	7	4.5	2.87
57.145	1.6106	1.6146	0.240	36	7	2.7	1.18
58.280	1.5819	1.5858	0.420	19	7	1.5	2.06
59.910	1.5427	1.5465	0.240	36	7	2.7	1.03
60.455	1.5301	1.5339	0.240	32	6	2.5	0.95
61.660	1.5030	1.5067	0.300	56	6	4.3	2.93
62.975	1.4748	1.4784	0.300	61	6	4.6	3.01
64.080	1.4520	1.4556	0.300	85	6	6.4	3.08
65.000	1.4336	1.4372	0.240	61	6	4.6	1.94
66.385	1.4070	1.4105	0.300	18	6	1.3	1.60
69.660	1.3487	1.3520	0.300	10	6	0.7	0.92
71.635	1.3163	1.3195	0.360	24	6	1.8	1.10
72.240	1.3067	1.3100	0.240	19	6	1.5	0.82
74.000	1.2799	1.2831	0.240	31	6	2.4	1.04
74.925	1.2664	1.2696	0.300	16	5	1.2	0.79
75.565	1.2573	1.2604	0.240	40	5	3.0	1.55
77.050	1.2367	1.2398	0.420	42	5	3.2	3.95
78.165	1.2218	1.2249	0.240	34	5	2.6	0.99
81.810	1.1763	1.1793	0.360	14	5	1.0	1.02
83.415	1.1577	1.1606	0.360	25	5	1.9	1.98
84.260	1.1483	1.1511	0.300	27	5	2.1	1.54
85.515	1.1346	1.1374	0.480	9	5	0.7	1.13
87.380	1.1151	1.1179	0.240	40	5	3.0	2.08
88.465	1.1042	1.1070	0.240	34	5	2.6	1.35

↳ Equação usada para cálculo, de acordo com Cullity, 1978:

$$\sin^2 \theta = \frac{\lambda^2}{4} \left[ \frac{4}{3} \cdot \frac{(h^2 + hk + k^2)}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \right]$$

onde, a radiação  $K\alpha\text{Cu}$  tem o valor de 1,54 Å.

↳ Plano 2 1 1

$$\sin^2 \left( \frac{31,75}{2} \right) = \frac{(1,54)^2}{4} \left[ \frac{4}{3} \cdot \frac{(2^2 + 2 \cdot 1 + 1^2)}{a^2} + \frac{1^2}{c^2} \right] \Rightarrow 0,1262$$

$$0,0748 = 0,5929 \left[ 1,33 \cdot \frac{7}{a^2} + \frac{1}{c^2} \right]$$

$$0,1261 = \frac{9,33}{a^2} + \frac{1}{c^2}$$

$$0,1261 a^2 c^2 = 9,33 c^2 + a^2 \Rightarrow 0,1261 a^2 c^2 - 9,33 c^2 = a^2 \Rightarrow (0,1261 a^2 - 9,33) c^2 = a^2$$

$$\boxed{c^2 = \frac{a^2}{0,1261 a^2 - 9,33}} \Rightarrow 1$$

↳ Plano 1 1 2

$$\operatorname{sen}^2\left(\frac{32,19}{2}\right) = \frac{(1,54)^2}{4} \left[ \frac{4}{3} \cdot \frac{(1^2 + 1,1 + 1^2)}{a^2} + \frac{2^2}{c^2} \right] \Rightarrow 0,1297$$

$$0,0768 = 0,5929 \left[ 1,33 \cdot \frac{3}{a^2} + \frac{4}{c^2} \right]$$

$$0,1295 = \frac{3,99}{a^2} + \frac{4}{c^2}$$

$$0,1295 = \frac{3,99 c^2 + 4 a^2}{a^2 c^2}$$

$$\boxed{0,1295 a^2 c^2 = 3,99 c^2 + 4 a^2} \Rightarrow \mathbf{2}$$

↳ Substituir 1 (c<sup>2</sup>) em 2

$$0,1295 = \frac{3,99}{a^2} + \frac{4}{\frac{0,1261 a^2 - 9,33}{a^2}}$$

$$0,1295 = \frac{3,99}{a^2} + \frac{4 (0,1261 a^2 - 9,33)}{a^2} \quad (\text{multiplicar por } a^2)$$

$$0,1295 a^2 = 3,99 + 4 (0,1261 a^2 - 9,33)$$

$$0,1295 a^2 = 3,99 + 4 \cdot 0,1261 a^2 - 4 \cdot 9,33$$

$$0,1295 a^2 = 3,99 + 0,5044 a^2 - 37,32$$

$$0,1295 a^2 - 0,5044 a^2 = 3,99 - 37,32$$

$$-0,3749 a^2 = -33,33$$

$$a^2 = 88,9037$$

$$\boxed{a = 9,4288}$$

↳ Substituir o valor de a (9,42) em 1 (c<sup>2</sup>)

$$c^2 = \frac{88,9037}{0,1261 \cdot 88,9037 - 9,33}$$

$$c^2 = \frac{88,9037}{1,8807}$$

$$c^2 = 47,2716$$

$$\boxed{c = 6,8754}$$