

GLAUBERT LUCAS DE CARVALHO CABRAL

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS/COMPÓSITO DE
COLÁGENO E HIDROXIAPATITA PARA RECONSTITUIÇÃO ÓSSEA GUIADA.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Itajubá, para a obtenção do Grau de Mestre
em Materiais para Engenharia**

Orientador: Prof. Dr. Rossano Gimenes

Itajubá

2016

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS/COMPÓSITO DE COLÁGENO E HIDROXIAPATITA PARA RECONSTITUIÇÃO ÓSSEA GUIADA.

Cabral, G. L. C.¹; Gimenes, R.¹

1 Universidade Federal de Itajubá UNIFEI, Itajubá - MG

Resumo: Quando defeitos ósseos assumem grandes dimensões podendo não ser mais regenerados naturalmente, faz-se necessário o uso de técnicas para a correção desses defeitos, entre esta destaca-se a Regeneração Óssea Guiada (ROG). A ROG utiliza-se de uma membrana sintética ou de origem natural para excluir as células do tecido conjuntivo (altamente competitivas) do defeito ósseo. Desta forma, as células ósseas reabsorvem preferencialmente o coágulo formado na região, acelerando o processo de reparo ósseo. O presente estudo propõem a síntese de compósitos de colágeno tipo I/ Hidroxiapatita (HAp) conformados na forma de membrana. Foi empregado como fonte de colágeno dois tipos de tecidos de origem bovina, o Pericárdio Bovino (PB) e do Tendão de Aquiles Bovino (TB), ambos ricos em colágeno do tipo I. As amostras de HAp de natureza sintética foram submetidas a tratamento térmico, entre 900 e 1100°C, caracterizadas por difração de Raio-X. Picos referentes à HAp foi observada, assim como o aparecimento de uma fase cristalina de β -fosfato de cálcio, com o aumento da temperatura de tratamento. Para extração de colágeno tipo I, PB e TB foram coletados de animais abatidos em frigorífico registrados pelo SIF (Serviço Federal de Inspeção) e devidamente conservados em gelo logo após a remoção. Em períodos de no máximo 48 horas após abate, artérias, tecidos conjuntivo suprajacentes, bem como tecidos adiposos foram removidos utilizando pinças e bisturi, mantendo sempre a assepsia no ambiente de trabalho. Os tecidos foram lavados em solução de ringer lactato, e água destilada gelada. Foram confeccionados retalhos de 30x50 mm para PB e fragmentos de 30mm de comprimento para TB. Estes retalhos foram conservados em glicerina, por período não superior a 3 meses. Na extração do colágeno, os retalhos de PB e TB foram tratados com acetona e hidróxido de sódio para desidratação e retirada de tecido adiposo. A pepsina em meio ácido (ácido acético) foi empregada para o rompimento das interações entre as cadeias de colágeno, empregando agitador tipo mixer (velocidade de 5000rpm), expondo as fibras à digestão péptica. O sobrenadante mais gelatinoso obtido, rico em colágeno, foi separado e caracterizado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) e FTIR (espectroscopia

na região do infravermelho com transformada de Fourier). O peso molecular e as bandas de absorção na região do IR (infravermelho) foram coerentes com a molécula de colágeno do tipo I. O compósito foi obtido após a homogeneização do colágeno disperso em meio ácido, com a HAp utilizando-se agitador magnético durante 1 h. Após dispersão a mistura foi acondicionada em formas e liofilizada em temperatura criogênica durante 72 h. As membranas obtidas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e devidamente esterilizadas para encaminhamento ao teste de citotoxicidade *in vitro*. Pôde-se notar a interação dos cristais de HAp à estrutura fibrilar (lamelar) do colágeno extraído, assim como a não citotoxicidade do material final obtido.

Palavras-chave: *hidroxihapaptita, colágeno, pericárdio, tendão, membrana, regeneração óssea guiada, compósito.*

***SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION COLLAGEN MEMBRANE
DEPOSITED IN HYDROXYAPATITE COMPOSITE FOR BONE RECONSTRUCTION
GUIDED.***

Abstract: When bone defects assume large and can not be regenerated naturally, it is necessary to use techniques to correct these defects, between this there is the Bone Regeneration Guided (ROG). ROG is used a synthetic membrane or of natural origin to exclude connective tissue cells (highly competitive) the bone defect. Thus, preferably the bone cells resorb the clot formed in the region of accelerating the bone healing process. This study proposes the synthesis of composite type I collagen / hydroxyapatite (HAp) shaped in the form of membrane. It was used as a source of collagen two types of bovine tissues, Bovine Pericardium (CP) and Bovine Achilles Tendon (TB), both rich in collagen type I. Samples of synthetic nature HAp were subjected to heat treatment between 900 and 1100 ° C characterized by X-ray diffraction. Peaks related to HAp was observed, and the appearance of a crystalline phase of β -calcium phosphate, with increasing treatment temperature. For type I collagen extraction, PB and TB were collected from animals slaughtered in a slaughterhouse registered by SIF (Federal Inspection Service) and properly preserved in ice after removal. In periods within 48 hours after slaughter, arteries, overlying connective tissue and adipose tissues were removed using forceps and a scalpel, while maintaining the aseptic work environment. Tissues were rinsed in lactated Ringer's solution, and ice-cold distilled water. patchwork of 30x50 mm were prepared for CP and fragments 30mm length TB. These flaps were kept in glycerin for a period not exceeding three months. In the collagen extraction, the CP and TB flaps were treated with acetone and sodium hydroxide to dehydration and fatty tissue removed. Pepsin in acid (acetic acid) was used for the disruption of the interactions between the collagen chains, using agitator mixer type (5000rpm speed), exposing the fibers to peptic digestion. The more gelatinous supernatant obtained, rich in collagen was separated and characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and FTIR spectroscopy (in the infrared Fourier transform spectroscopy). The molecular weight and absorption bands in the IR region (IR) were consistent with the molecule of collagen type I. The composite was obtained after the homogenization of collagen dispersed in an acid medium, with HAp using magnetic stirrer for 1 H. After dispersing the mixture was packed in lyophilised form and at cryogenic temperature for 72 h. The obtained membranes were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and properly sterilized for referral to the in vitro cytotoxicity test.

It might be noted the interaction of the HAp crystals fibrillar structure (lamellar) of extracted collagen as well as non cytotoxicity of the final material obtained.

Keywords: *hydroxyapatite, collagen, pericardium, tendon, membrane guided bone reconstruction, composite.*

Lista de Figuras

- Figura 1:** Representação esquemática de tecidos que possam vir a ser substituídos por biomateriais. Extraído de SILVER & DOILLON ^[15]. _____ 4
- Figura 2** Esquema sistemático do processo de remodelação óssea, absorção e formação do tecido ósseo. _____ 11
- Figura 3:** organização esquemática das fibras de colágeno e sua estrutura. _____ 12
- Figura 4:** sequência dos aminoácidos presentes na estrutura fibrosa do colágeno. Extraído de YANNAS ^[35]. _____ 12
- Figura 5:** formação da tripla hélice, pela interação intermolecular dos aminoácidos existentes na estrutura polipeptídica colagênica. Extraído de YANNAS ^[35]. _____ 12
- Figura 6:** representação das regiões ósseas, compactas e porosas, em corte transversal do fêmur e camadas externas do osso compacto e interna do osso trabecular. _____ 13
- Figura 7.** Fluxograma de síntese do Colágeno Tipo I. _____ 20
- Figura 8:** Fluxograma de síntese da HAp. _____ 21
- Figura 9:** Esquema representativo da reflexão de elétrons em uma amostra, elétrons secundários e elétrons retroespalhados. _____ 24
- Figura 10:** Esquema representativo dos tipos de vibrações existentes nas ligações interatômicas de uma molécula ^[46]. _____ 25
- Figura 11:** Espectro FTIR dos tecidos pericárdio bovino (PB) e tendão bovino (TB) após processamento de limpeza, com solução de ringer lactato, água destilada e acetona. ____ 31
- Figura 12:** Espectro FTIR dos géis de colágeno preparados após digestão péptica. _____ 31
- Figura 13:** Espectro FTIR dos géis de colágeno após digestão péptica (concentração de pepsina de 1x e 10x) e liofilizada em temperatura a criogênica durante 72h. _____ 32
- Figura 14:** Espectro FTIR dos géis de colágeno liofilizados em temperatura a criogênica durante 72h. _____ 33
- Figura 15:** As micrografias são referentes aos tecidos nativos desidratados com misturas gradativas de álcool/água, até desidratação final com álcool absoluto, secas a vácuo e recobertas com ouro por sputtering. A imagens A e B são referentes ao PB e as imagens C e D são relacionadas ao TB. Imagens de MEV obtidas por elétrons secundários. _____ 36 e 37
- Figura 16:** Micrografias de MEV do colágeno bruto após digestão péptica extraído do PB e TB desidratados em álcool, liofilizadas e recobertas com uma fina camada de ouro. As micrografias A e B são relacionadas a membrana de PB, já as micrografias C e D são relacionadas a membrana de TB. Em A, B e C temos imagens geradas pela captação de

elétrons secundários e em D, temos a imagem gerada pela captação de elétrons retroespalhados. _____ 38 e 39

Figura 17: Espectro de EDS, referente ao gel de colágeno liofilizado proveniente do tendão bovino, utilizando-se HV = 15.0kV. _____ 40

Figura 18: Espectro de EDS, referente ao gel de colágeno liofilizado proveniente do pericárdio bovino, utilizando-se HV = 15.0kV. _____ 41

Figura 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS 10%, onde temos à direita os padrões de pesos moleculares pré-definidos C (120kDa), D (100kDa), E (70kDa), F (57kDa) e G (36kDa) e a esquerda temos as faixas correspondentes aos géis de colágeno proveniente de pericárdio bovino (B) e de tendão bovino (A). _____ 42

Figura 20: Difrátogramas de Raio-X dos pós de hidroxiapatita obtidos pelo método da coprecipitação calcinados a 900, 1000 e 1100°C. Condições experimentais: radiação K α do Cobre com varredura de ângulos entre 20 e 90°, passo de 0,02° a cada segundo, obtendo 3500 leituras. Picos marcados com (*) são referentes ao β -fostato de cálcio. _____ 44

Figura 21: As micrografias A e B são relacionadas a HAp tratadas termicamente a 1000°C, ambas devidamente recobertas com ouro, todas as imagens foram geradas pela captação de elétrons secundários. _____ 45

Figura 22: Espectro de EDS, referente ao pó de HAp, utilizando-se HV a 15.0kV. _____ 46

Figura 23: Fotografia da membrana de colágeno/HAp em embalagem selada de papel crepado e esterilizada por radiação gama. _____ 47

Figura 24: Fotografia da membrana de colágeno/HAp após realizar curvatura de aproximadamente 45° com auxílio de uma pinça. Note a membrana manteve a curvatura e não retornou a posição original. _____ 47

Figura 26: Micrografias de MEV do compósito colágeno/HAp (60/40% em massa) empregando distintas fontes de matriz colagênica: as micrografias A, C e E são relacionadas a membrana com matriz colagênica proveniente do PB, já as micrografias B, D e F são relacionadas a membrana com matriz colagênica proveniente do TB. Amostras liofilizadas e recobertas com ouro por sputtering, todas as imagens foram geradas pela captação de elétrons secundários. _____ 51, 52 e 53

Figura 27: Espectro de EDS, referente à membrana do compósito colágeno/HAp. EDS obtido utilizando HV a 15.0kV. _____ 54

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** principais materiais utilizados como biomateriais. Adaptada de SILVER & DOILLON^[15]. _____ 5
- Tabela 2:** principais usos da HAp em medicina e na odontologia. _____ 8
- Tabela 3:** Valores de comprimento de onda referente as vibrações moleculares presentes na estrutura do Colágeno, levando em conta os aminoácidos que o constituem^[46]. _____ 34
- Quadro 1:** Principais características das membranas colagênicas de origem bovina mais comuns no mercado^[53]. _____ 46
- Tabela 4:** Classificação do parâmetro IZ segundo a norma ASTM F895-84 (transcrito). __ 55
- Tabela 5:** Resultados de IZ obtidos na leitura das placas de culturas celulares em quadruplicatas. _____ 55

Lista de Abreviaturas e Siglas

ROG - Regeneração Óssea Guiada

HAp - Hidroxiapatita

α -TCP e β -TCP - Fosfato de Cálcio Tribásico

DCPA - Fosfato de Cálcio Dibásico Anidro

DCPD - Fosfato de Cálcio Dibásico Diidratado

ACP - Fosfato de Cálcio Amorfo

OCP - Fosfato Octacálcio

FA - Flourapatita

Ca - Cálcio

P - Fósforo

β -TCP - Beta Fosfato Tricálcio

TB - Tendão de Aquiles Bovino

PB - Pericárdio Bovino

DRX - Difração de Raio-X

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS - Espectroscopia por Dispersão de Raios-X

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

IR - Radiação Infravermelha

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio

SDS - Dodecilsulfato de Sódio

IV - Infra Vermelho

UNIFEI - Universidade Federal de Itajubá

FCa - Fosfato de Cálcio

SIF – Serviço Federal de Inspeção

Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Biomateriais	4
2.2. Biocompatibilidade e Bioatividade	6
2.3. Biocerâmicas	6
2.3.1. Fosfatos de Cálcio	7
2.3.2. Hidroxiapatita	7
2.3.3. β -TCP	8
2.4. Biomateriais Compósitos	9
2.4.1. Compósito Hidroxiapatita/Colágeno	9
2.5. Regeneração Óssea	10
2.5.1. Colágeno	11
2.5.2. Osso	13
2.5.3. Membranas para Regeneração Óssea Guiada	14
2.6. Revisão Científica	14
3. Objetivos	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. Procedimento Experimental	17
4.1. Extração do Colágeno Tipo I	17
4.1.1. Material	17
4.1.2. Método	18
4.1.2.1. Pericárdio Bovino	18
4.1.2.2. Tendão Bovino	19
4.2. Síntese da Hidroxiapatita	20

4.2.1. Material	20
4.2.2. Método	21
4.3. Confeção da Membrana de Colágeno	22
4.3.1. Material	22
4.3.2. Método	23
4.4. Caracterizações	24
4.4.1. MEV/EDS	24
4.4.2. FTIR	25
4.4.3. DRX	26
4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
4.4.5. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	28
5. Resultados e Discussão	29
5.1. Caracterização do Colágeno Tipo I	29
5.1.1. Caracterização do colágeno por FTIR	30
5.1.2. Caracterização do colágeno por MEV/EDS	35
5.1.3. Caracterização do colágeno empregando eletroforese em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE)	41
5.2. Caracterização da Hidroxiapatita	43
5.2.1. DRX	43
5.2.2. MEV/EDS	44
5.3. Caracterização da Membrana do compósito colágeno/HAp	45
5.3.1. MEV/EDS	49
5.3.2. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	54
6. Conclusão	56
7. Trabalhos Futuros	57
8. Referências Bibliográficas	58

1. Introdução

Métodos para restauração, correção ou substituição de partes do tecido ósseo danificados sempre foram de preocupação do homem, desde muitos séculos. Nos dias atuais, a recuperação desses defeitos, sejam eles causados por lesões provenientes de traumas ou até mesmo de doenças, são objetos de grande interesse principalmente nas áreas ortopédicas e odontológicas.

A técnica cirúrgica denominada regeneração óssea guiada (ROG) foi desenvolvida por Dahlin e colaboradores em 1988 ^[1], tem sido empregada com sucesso na odontologia no tratamento de doenças periodontais relacionadas à perda do volume ósseo, bem como o aumento do rebordo alveolar e como técnica auxiliar para a interação implante-tecido ^[1]. Quando os defeitos ósseos assumem uma grande dimensão estes não são regenerados naturalmente, tornando-se necessária a utilização de técnicas de regeneração óssea para correção dessas deficiências ^[1]. A ROG caracteriza-se pela utilização de uma membrana, reabsorvível ou não-reabsorvível, com características de permeabilidade seletiva que atua na manutenção do espaço e a proteção do mesmo, excluindo células epiteliais da gengiva ^[2]. A exclusão das células epiteliais altamente competitivas permite que as células ósseas jovens (osteoblastos), reabsorva o coágulo e se diferencie regenerando o local lesionado pela formação de osso novo ^[2].

Membranas de colágeno possuem características que as tornam ideais em ROG, já que são maleáveis, adaptáveis ao local do defeito, possuem função homeostática, facilidade de estabilização, semipermeabilidade, são reabsorvíveis (evitando uma segunda cirurgia para remoção da mesma), bem como apresentam ambiente químico adequado para a estabilização de osteoblastos e fibroblastos ^[3].

Por outro lado, fosfatos de cálcio, dentre eles se destacam a hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e o fosfato de cálcio (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) devido às suas semelhanças com os minerais constituintes do osso natural, sua biocompatibilidade e bioatividade ^[4]. Dado estas características, são empregados em diversas aplicações médicas ^{[4][5]}

A HAp e o colágeno quando associados na forma de um material compósito, podem constituir um interessante material para uso como barreiras para ROG, já que podem ser conformados na forma de membranas flexíveis e semipermeáveis, para a manutenção do coágulo durante o reparo ósseo, e como são materiais osteocondutores e reabsorvíveis, poderão fornecer nutrientes necessários para a manutenção do tecido ósseo neoformado ^{[6][7]}.

O fato de serem reabsorvíveis pode ser considerado uma vantagem para o emprego em ROG, já que evita a necessidade de uma segunda cirurgia para a sua retirada, porém apresenta limitações devido à sua alta taxa de absorção pelo organismo [8].

Membranas de colágeno têm sido exploradas na literatura e utilizadas em larga escala no mundo para a ROG, assim como outros materiais osteocondutores [7]. O número de materiais desenvolvidos para este tipo de aplicação no mercado interno é ainda insipiente. O desenvolvimento de compósitos biológicos para a reconstituição óssea do tecido se faz de grande importância atendendo assim uma demanda, cada vez maior, de aplicações em ramos da área de saúde [9].

Existem diversas fontes de colágeno disponíveis o que viabiliza sua extração por ser um material com alta disponibilidade. Considerando as diversas formas de colágeno, colágeno tipo I, é desejável para emprego em ROG e pode ser obtido da derme, tendão de Aquiles ou cortical óssea, podendo ser de origem bovina, equina ou suína. Um dos aspectos mais importantes para se utilizar matrizes colagênicas, na forma de compósitos, combinadas com fosfatos de cálcio, está no fato de que durante o processo de reparo o colágeno é a proteína na qual os sais de fosfato de cálcio se depositam, dando origem ao tecido ósseo [4].

Embora colágeno e hidroxiapatita sejam materiais que se encontram na composição dos ossos, a elaboração de um material, mesmo que empregue na sua composição materiais de origem natural, devem ser apresentar características específicas de um biomaterial para que seja possível o emprego no tratamento de doenças.

São denominados biomateriais substâncias naturais ou sintéticas com a finalidade de melhorar, substituição ou aumento, por uma duração de tempo curto, ou longo, parcial ou inteiramente, de órgãos ou tecidos do corpo humano [10]. Dentre os materiais biocerâmicos mais utilizados comercialmente estão os fosfatos de cálcio, dentre eles se destaca a HAp devido à sua semelhança com os minerais do osso natural, sua biocompatibilidade e bioatividade, integra um grupo de materiais chamados apatitas, possui a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [5][11].

Com a visão de melhorar as características de cada tipo de material, surgem os compósitos, os quais devem combinar as propriedades dos materiais base fim de que as propriedades do mesmo sejam superiores ou intermediárias àquelas dos constituintes individuais.

Biocompósitos são extensivamente aplicados na ortopedia, cardiologia, cirurgia plástica, oftalmologia, farmacologia, odontologia [13][14]. Embora compósitos

colágeno/hidroxiapatita já tenha sido abordados na literatura, compósitos deste tipo, empregando como matriz colagênica, colágeno tipo I extraído de pericárdio e tendão bovino empregando pepsina são pouco abordados na literatura, e desta forma, o presente trabalho visa estabelecer uma rota confiável de obter colágeno tipo I de TB e PB, bem como sintetizar um compósito colágeno/HAp.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biomateriais

Um biomaterial é denominado de toda e qualquer substância, sozinha ou combinada a outras, podendo ser natural ou sintética que, possui a capacidade de substituição ou melhoramento, sendo permanente ou por um determinado tempo, parcialmente ou por completo de tecidos ou órgãos do corpo humano (Figura 1) [15].



Figura 1: Representação esquemática de tecidos que possam vir a ser substituídos por biomateriais. Extraído de SILVER & DOILLON^[15]

Como principais características, os biomateriais não devem induzir respostas imunológicas no hospedeiro (biocompatibilidade), não deve ser carcinogênico e nem tóxico, deve possuir uma estabilidade mecânica e química adequada ao seu devido uso, densidade e peso coerentes ao emprego, possuir uma boa reprodutibilidade, baixo custo e fácil produção, assim como a indução de respostas e reações biológicas que favoreçam o correto uso das funções as quais foi designado [16].

Materiais como: metais, ligas, polímeros, cerâmicas e compósitos, podem ser utilizados como biomateriais (Tabela 1), tendo em vista sempre sua característica específica e sua biocompatibilidade com o organismo [15].

Tabela 1: Principais materiais utilizados como biomateriais. Adaptada de SILVER & DOILLON^[15]

Materiais	Vantagens	Desvantagens	Exemplos	Aplicações
Metais e Ligas	Altas resistências mecânicas à tração, ao impacto, à fadiga e ao desgaste.	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, alta densidade, diferença de propriedades mecânicas com relação a tecidos moles.	Pt, Pt-Ir, Au Aços 316, 316L, ligas Co-Cr, Ti, e ligas Ti6Al4V e Ti6Al17Nb	Eletrodos, fios, placas, parafusos, cravos, grampos, pinos, próteses articuladas e implantes dentários.
Polímeros	Resistência, facilidade de fabricação, baixa densidade, boa biocompatibilidade.	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo.	Polietileno, poliuretano, polimetacrilato de metila, politetrafluoretileno, nylon, dracon, silicone, e ácido polilático.	Superfícies articulares, vasos, cartilagens, cimento ortopédicos, sutura, substituições de tecidos moles, placas de reparação óssea.
Cerâmicas	Boa compatibilidade resistência à corrosão, inércia química, alta resistência à compressão.	Baixa resistência ao impacto, dificuldade de fabricação, baixa reprodutibilidade nas propriedades mecânicas, alta densidade.	Alumina, zircônia, fosfato tricálcio, hidroxiapatita, biovidro, carbono (vítreo) e carbono pirolítico.	Cabeças de fêmur, odontologia, reconstrução óssea, ligamentos artificiais, revestimentos reabitáveis, revestimento hemocompatíveis.
Compósitos	Boa biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão, alta resistência à tração.	Dificuldade de fabricação.	Teflon-carbono, carbono-carbono, nynol-poliuretano.	Cartilagens, odontologia, ortopedia, substituições de tecidos moles.

2.2. Biocompatibilidade e Bioatividade

Ao se introduzir um material cujo organismo identifique aquilo como um material estranho, em contato com tecidos ou fluido biológico, respostas de proteção imunológicas são desencadeadas, dando origem a processos inflamatórios ou a eliminação do material introduzido, portanto as características essenciais para um biomaterial são: biocompatibilidade e bioatividade ou biofuncionalidade ^[16].

Para que um determinado material possua desempenho satisfatório como biomaterial, o equilíbrio entre sua biocompatibilidade e bioatividade deve ser adequada, evitando assim os processos imunológicos, inflamatórios e a eliminação do corpo estranho ^[16].

A biocompatibilidade está diretamente relacionada com o fato do material, a ser introduzido no organismo, obter características adequadas e específicas, tendo em vista a área de sua aplicação, sem que haja reações adversas ^{[15][16]}.

Bioatividade está diretamente relacionada à funcionalidade a qual um determinado material é proposto a realizar ^{[15][17]}. De acordo com a natureza química e seu comportamento fisiológico, os biomateriais podem ser classificados como: bioinertes, biotoleráveis, bioativos e absorvíveis ^[18].

2.3. Biocerâmicas

Dentre os diversos materiais utilizados em processos de substituição de tecidos do organismo humano, principalmente em substituição óssea, temos as cerâmicas – biocerâmicas^[18].

Como vantagem da utilização de materiais cerâmicos temos baixo custo de obtenção, resistência à corrosão, inércia química e sua alta resistência e compressão, os principais usos desse tipo de material estão na área ortopédica e odontológica ^[18, 19].

2.3.1. Fosfatos de Cálcio

Destacam-se como materiais biocerâmicos os fosfatos de cálcio, principalmente na substituição e regeneração de tecido ósseo, pois sua alta biocompatibilidade química com a fase inorgânica do osso faz com que obtenham os melhores desempenhos ^[20].

Dentre os fosfatos de cálcio mais utilizados temos a hidroxiapatita, fosfato de cálcio ou fosfato tri-cálcio (α -TCP e β -TCP), fosfato de cálcio dibásico anidro e diidratado (DCPA e DCPD), fosfato de cálcio amorfo (ACP), fosfato octacálcio (OCP) e fluorapatita ou apatita (FA) ^{[18][21]}.

As principais características que fazem o uso desses materiais ser tão explorado assim são: bioatividade, similaridade com a porção mineral do osso, conduz a formação de um forte biomaterial semelhante ao osso natural e osteocondutividade ^[21].

2.3.2. Hidroxiapatita

A origem da palavra hidroxiapatita advém da junção das palavras hidroxila (referindo-se ao grupo hidroxila) e apatita (grupo mineral). A hidroxiapatita está presente em vertebrados como componente de seu esqueleto ósseo, também encontrado na composição de dentes, atua como uma grande reserva de cálcio (Ca) e fósforo (P) para o organismo ^[21].

A HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, possui uma forma cristalina hexagonal com cristais formando prismas terminados em faces dipiramidais, seu grupo espacial é $P6_3/m$, sua célula unitária possui dimensões de: $a=b=0,9422$ nm e $c=0,6880$ nm; contendo em cada célula 10 íons Ca^{2+} ^{[22][23]}. Estequiometricamente, a razão entre Ca/P na fórmula da HAp é igual a 1,67, podendo ser encontrada composições estáveis próximas a 1,5 ^[26].

Entre as hidroxiapatitas comercializadas as mais empregadas são de origem sintética, bioativa, preparada pela precipitação em meio básico de cálcio e fosfato, posteriormente, submetida a tratamento térmico (sinterização) em temperaturas acima de 1000°C ^{[21][27]}.

A hidroxiapatita é amplamente empregada em situações onde é requerido o reparo ósseo (Tabela 2), substituição do osso natural e regeneração óssea guiada entre outras aplicações onde é necessário estímulo do crescimento ósseo, já que a hidroxiapatita é um materiais bioativo e reabsorvível e osteocondutivo ^{[21][23]}.

Tabela 2: principais usos da HAp em medicina e na odontologia.

Usos	Formas da HAp
Matriz ou suporte para crescimento ósseo	Grão, porosa
Osso artificial	Grãos, densa ou porosa
Cimento ósseo	Pó com PMMA
Articulações artificiais	Metal recoberto com HÁp
Próteses vasculares	Densa
Próteses traqueais	Porosa ou densa
Terminais percutâneos	Densa
Sistema de liberação lenta	Densa, pó

2.3.3. β -TCP

É uma das fases cristalinas que podemos ter de fosfatos de cálcio. A fórmula molecular de β -TCP (β -fosfato tricálcio) é a seguinte: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, podendo ser caracterizado por difração de raios-X, no entanto não possui uma estabilidade elevada [24].

As suas propriedades, assim como todos os materiais, variam de acordo com sua estrutura onde, os parâmetros de síntese interferem diretamente em sua morfologia, tamanho de grão e porosidade [25].

Uma característica primordial, para que possa ser utilizado como um biomaterial, em casos de defeitos ósseos, está em sua proximidade constitucional do osso natural, podendo ser substituído pelo mesmo, gradativamente, conferindo ao β -TCP ser um matéria absorvível e biocompatível [25].

Em grande parte das vezes encontra-se presente, como constituinte, nos cristais de hidroxiapatita, quando utilizadas, em sua síntese, temperaturas de tratamento térmico, inferiores à 1100°C [25].

2.4. Biomateriais Compósitos

Compósitos são materiais no qual se tem, como constituintes, dois ou mais tipos de materiais diferentes entre si em composição, propriedade e estrutura [27]. A finalidade de se trabalhar com compósitos está em suas propriedades que, quando comparadas aos seus constituintes individualmente, encontram-se em um estado intermediário ou superior [27][28].

Para que sejam empregados, seus componentes devem possuir características imprescindíveis de um biomaterial como: bioatividade e biocompatibilidade, para que assim possam ser empregados no meio biológico ^[29].

Com o intuito de melhorar suas características, vários materiais estão sendo incorporados a outros, temos, por exemplo, o caso de materiais sintéticos como os fosfatos de cálcio (HAp) juntamente com colágeno, formando assim um biocompósito, visando o melhoramento da regeneração óssea ^[30].

2.4.1. Compósitos Hidroxiapatita/Colágeno

Compósitos constituídos por HAp/colágeno estão sendo desenvolvidos e empregados, por sua semelhança, tanto física como estruturalmente, em procedimento de substituição e/ou reparação de tecidos ósseos ^[31]. Os atuais estudos então possuem como principal objetivo o melhoramento das propriedades do material, assim como seu processamento, visando a biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, propriedades físicas e químicas ^[31].

Na área odontológica, temos sua aplicação em regeneração óssea periodontais, cimentações, recobrimento de peças e prótese implantáveis e preenchimento de defeitos ósseos ^[31]. Porém, atualmente, esses materiais sintetizados para a regeneração óssea possuem ainda muitas falhas como: biocompatibilidade insuficiente, baixa reabsortividade e propriedades mecânicas incompatíveis com as propriedades do osso natural.

2.5. Regeneração Óssea

No sistema humano, as principais células responsáveis pelo remodelamento ou regeneração do tecido ósseo são: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos, cada um desempenha, durante o processo, um papel específico dentro de sua especialidade ^[32]. O osso humano é composto por uma parte orgânica (colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas) e uma parte mineral (fosfato de cálcio) ^[32].

Os osteoblastos são responsáveis, primeiramente, pela síntese da parte orgânica da matriz óssea e, posteriormente, participam ativamente da mineralização concentrando fosfatos de cálcio ^[33]. A ação de hormônios, íons, lipídios, fatores de crescimento e esteroides

nos locais de remodelação é de crucial importância para que haja a sinalização do eventual defeito e sua posterior regeneração [32]. Após esse processo, alguns osteoblastos morrem, outros migram para outro local, outros permanecem na superfície do novo osso diferenciando-se em células de recobrimento e alguns se diferenciam de modo que passam a se chamar osteócitos os quais, por sua vez, são envolvidos por completo pela matriz óssea tornando-se células maduras do osso, ou seja, seu citoplasma se torna menos basófilo, funcionando como células mecânico-receptoras, facilitando assim a difusão de nutrientes e a sinalização das moléculas intracelulares, promovendo assim a organização da matriz óssea, mantendo sua integridade [32][33].

Já os osteoclastos estão relacionados ao processo de reabsorção do tecido ósseo, possuem um tamanho elevado, são multinucleadas e ramificadas, são o resultado da fusão de monócitos provenientes dos capilares sanguíneos, ao amadurecer se tornam acidófilos, ou seja, produzem compostos ácidos que participam da digestão da matriz óssea juntamente com enzimas hidrolíticas, solubilizam os cristais de cálcio fazendo com que a matriz seja desfeita, são macrófagos específicos e especializados, fagocitam pequenos pedaços do osso e o dissolve, terminado o processo, os osteoclastos sofrem apoptose [32][33].

Constantemente o processo de remodelação óssea está ocorrendo no organismo, estando sempre em equilíbrio entre a reabsorção e a produção de osso (Figura 2). Este mecanismo é responsável pela manutenção e firmeza da matriz óssea [34].

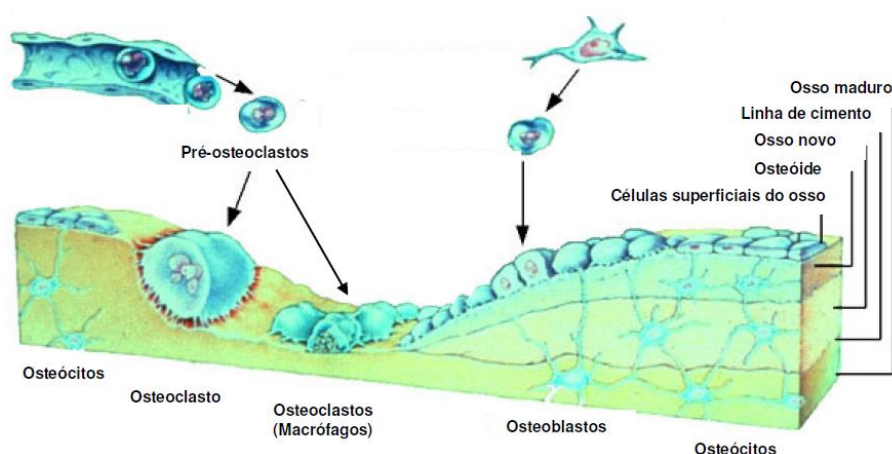


Figura 2 Esquema sistemático do processo de remodelação óssea, absorção e formação do tecido ósseo.

2.5.1. Colágeno

O colágeno é uma proteína natural, polimérico, existente nos tecidos conjuntivos como tendão, ligamentos, osso, dentina, pele, cartilagem e vasos sanguíneos, é a principal proteína estrutural encontrada nos animais vertebrados, por conta de suas diferentes organizações fibrosas estruturais, temos então uma ampla aplicabilidade desse material que, por sua vez, possui fibras com alta força elástica e resistentes á tração [35].

A utilização do colágeno até meados dos anos 80 esteve, de certa forma, muito restrito a fabricação de fios de sutura para procedimentos cirúrgicos, tendo visto que sua aplicabilidade teve um grande avanço, de uma forma diga como mais nobre indo, desde de processos de revestimento, principalmente em próteses vasculares, até mesmo suportes para orientação de crescimento celular, não somente funcionando como preenchimento de espaços, mas também como um importante estimulante de respostas biológicas na reconstituição de tecidos moles [36][37][38].

A menor unidade da estrutura polimérica do colágeno é chamada de fibrila, que se repete a cada 64 nm, seu diâmetro é variável estando entre 0,25 e 0,3 μm dependendo do tecido, normalmente essas fibrilas estão de forma agregada tendo o nome de fibras colagênicas (Figura 3), cada fibra de colágeno consiste de três cadeias polipeptídicas, formadas por uma sequência de aminoácidos (glicina, prolina e hidroxiprolina) (Figura 4), sofrendo interações intermoleculares, formando então uma tripla hélice (Figura 5) [32][35].

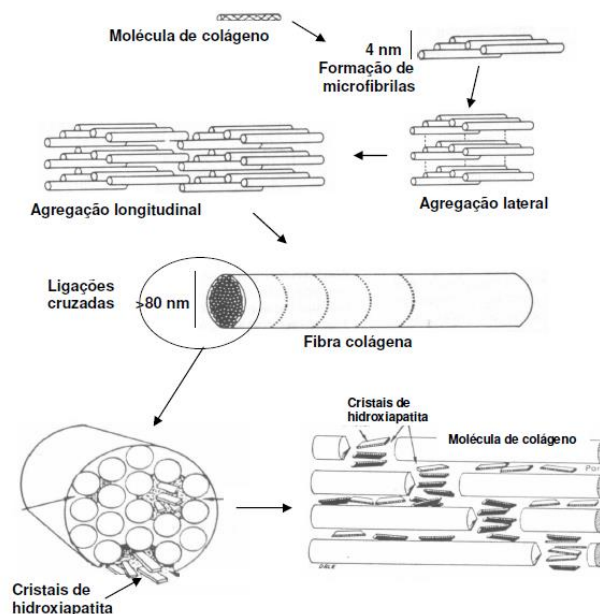


Figura 3: Organização esquemática das fibras de colágeno e sua estrutura.

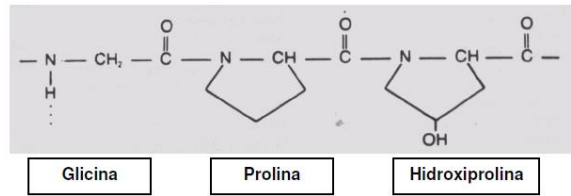


Figura 4: sequência dos aminoácidos presentes na estrutura fibrosa do colágeno. Extraído de YANNAS³⁵

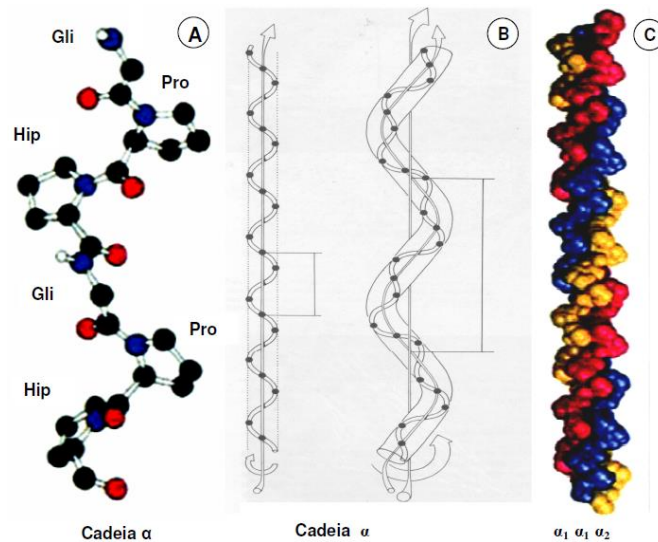


Figura 5: formação da tripla hélice, pela interação intermolecular dos aminoácidos existentes na estrutura polipeptídica colagênica. Extraído de YANNAS³⁵

2.5.2. Osso

O osso, tecido conjuntivo mineralizado, é um compósito natural formado por uma parcela orgânica, responsável por 25% de seu peso, constituída principalmente de colágeno tipo I (aproximadamente 92%), proteínas não colagenosas e água ^[25]. Os outros 75%, em peso, é formado por cristais de fosfatos de cálcio, majoritariamente pela hidroxiapatita, constituindo assim uma fase inorgânica (mineral), podendo estar densamente arranjadas ou não ^[23].

A estrutura óssea então divide-se em duas regiões: osso compacto que não possui cavidades e osso esponjoso osso trabecular que possui cavidades as quais se comunicam, histologicamente não possuem diferenciação (Figura 6) ^[32]. A parte compacta do osso possui aproximadamente 30% de poros, os vasos sanguíneos passam por canais muito densos

rodeados por uma matriz óssea madura, compõem cerca de 80% da estrutura esquelética [25]. Já a parte esponjosa, possui, aproximadamente 70% de poros, suas lamelas formam uma matriz menos densa, muito vascularizada e resistente a altas tensões, estimulam a formação óssea quando necessário [25].

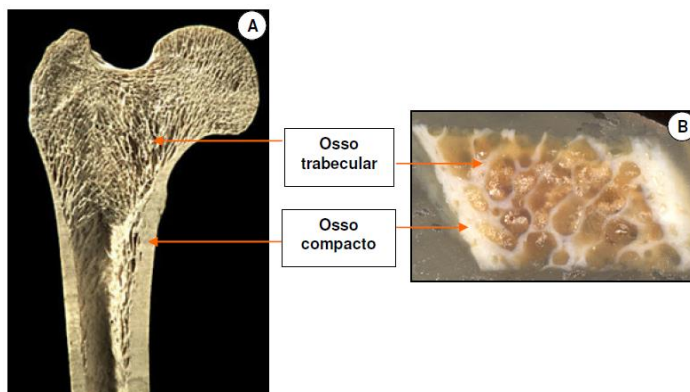


Figura 6: Representação das regiões ósseas, compactas e porosas, em corte transversal do fêmur e camadas externas do osso compacto e interna do osso trabecular.

2.5.3. Membranas para Regeneração Óssea Guiada

Os compósitos baseados em frações de hidroxiapatita/colágeno, possuem uma enorme aplicação na área biomédica onde, o melhoramento de suas características, visam mimetizar os problemas de biocompatibilidade, bioatividade e resistência mecânica em implantes, principalmente na substituição ou reparação de tecidos duros tal como o osso [29][39].

Estudos têm como principais objetivos o melhoramento do processamento e consequentemente das propriedades dos materiais, em especial, membranas compósitas de HAp/COL, por possuírem composições análogas ao da estrutura óssea, mineral e orgânica [29][30].

Na área odontológica, o uso de compósitos a base de biopolímeros depositados em fosfatos de cálcio, são empregados para a reconstituição óssea [27]. Aumento de rebordo alveolar; recobrimento de peças implantáveis; preenchimento, reconstrução e reabsorção óssea em tratamento buco-maxilo-facial; são alguns exemplos do uso deste tipo de membrana [27].

Porém, técnicas atuais de fabricação desses materiais ainda são muito complexas, quando analisamos seu processamento, fazendo com que o produto final seja de alto custo e,

de certa forma, indisponível em quantidades suficientes quando há um defeito que exija muito material [27]. Técnicas de preparo estão sendo desenvolvidas para resolver este problema, para que as propriedades físico-químicas e mecânicas do composto final sejam as mais parecidas possíveis com as do osso natural, melhorando sua biocompatibilidade e bioatividade [29].

2.6. Revisão Científica

Atualmente, estudos mais aprofundados estão sendo realizados, com o intuito de aperfeiçoar e otimizar o uso de materiais que possam ser utilizados em técnicas de ROG.

Avanços do processamento e na caracterização de membranas GTR/GTB, utilizadas em tratamentos da periodontite, auxiliada à liberação de fármacos durante o processo de reabsorção. Objetivando, não somente a correção dos defeitos ósseos e a regeneração de tecidos periodontais, como também o tratamento clínico da doença. Mostraram que a membrana utilizada se mostrou favorável à liberação de fármacos assim como a regeneração óssea no local de aplicação [50].

Há também a utilização de tratamentos térmicos diferenciados, interferindo diretamente na fibrilação das redes colagênicas. Material utilizado na observação da ROG, em calvária de ratos. A membrana estudada demonstrou que a formação da matriz óssea foi acelerada, em seu local de aplicação, tendo como comparação o processo natural de remodelação óssea [51].

Outros estudos trazem membranas com estruturas cologênicas de nanofibras onde, sua superfície, foi mineralizada com apatita. O material obteve capacidade de provocar o depósito de apatita no tecido, estimulando assim a regeneração óssea no local de aplicação. Houve também a liberação de fármaco durante o processo de reabsorção da membrana, otimizando a técnica de ROG e evitando reações adversas no organismo, como processos inflamatórios [52].

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização de uma membrana do compósito colágeno/Hidroxiapatita visando seu emprego em regeneração óssea guiada.

3.2. Objetivos Específicos

- Extração de colágeno tipo I de pericárdio bovino e tendão bovino, por tratamento com pepsina.
- Estudar a melhor condição para extração do colágeno (tempo do tratamento com pepsina, concentração de pepsina, pH).
- Processamento de hidroxiapatita visando obter HAp com alta cristalinidade
- Determinação das condições ideais para obtenção de compósitos colágeno/HAp na forma de membranas com espessura, flexibilidade e homogeneidade adequadas para emprego em ROG.
- Obtenção de membranas que não apresente citotoxicidade comprovada por ensaios normatizados.

4. Procedimento Experimental

4.1. Extração do Colágeno Tipo I

4.1.1. Materiais e Reagentes Empregados

- Pericárdio e tendão bovino, animal abatido no dia anterior da retirada do material, em abatedouro controlado pelo SIF.
- Água destilada e deionizada, posteriormente fervida
- Glicerina P.A. 99,5%, fabricante: Química Moderna, CAS: 56-81-5
- Acetona P.A.-A.C.S 99,5%, fabricante: Synth, código A1017.01.BJ
- Hidróxido de sódio P.A., fabricante: Synth
- Pepsina da mucosa gástrica de porco, 250 unidades/mg, fabricante: Sigma Aldrich, Código: 101535535
- Ácido clorídrico P.A.-A.C.S 36,5-38,0%, fabricante: Synth, código: A1028.01.BJ
- Etanol absoluto P.A., fabricante: Synth. Empregado para preparar a mistura álcool em água 70%
- Solução de Ringer Lactato, fabricante: Laboratórios Sanobiol
- Autoclave: Bioflex (Bio Safety System), modelo: Doctor M12
- Vidrarias esterilizadas em autoclave: béqueres, erlenmeyers, placas de petri, baguetas
- Parafilm
- Frascos âmbar de vidro, capacidade 250 mL
- Funil de Büchner
- Centrífuga refrigerada, fabricante: Solab
- Mixer, fabricante: Mondial, modelo: Versatile
- Freezer
- PHmetro
- Pinças de aço
- Bisturi cirúrgico,

4.1.2. Método

4.1.2.1. Pericárdio Bovino

O saco pericárdico bovino foi extraído manualmente de animais adultos com idade entre 20 a 24 meses por abatedouro fiscalizado pelo Serviço Federal de Inspeção (SIF). O saco pericárdio foi seccionado na altura das principais artérias, e lavado em água abundante. Após retirada, o mesmo foi refrigerado (5 °C) e manipulado em períodos não superior a 24h.

Houve sempre o cuidado à manutenção de temperatura baixa, para preservação do material e não contaminação do mesmo. A manipulação foi realizada em laboratório, com temperatura controlada (18 °C) utilizando utensílios previamente esterilizados em autoclave. Álcool 70% foi borrifado sobre utensílios bandejas de aço inox na qual foi utilizada para manipular o pericárdio, bem como o mesmo foi manipulado apenas com luvas cirúrgicas, e utilizando-se de máscaras. Estes procedimentos foram adotados para evitar contaminação do mesmo por bactérias.

Previamente a confecção dos retalhos de pericárdio, manipulou-se o saco pericárdico a fim de retirar mecanicamente vasos sanguíneos e tecidos adiposos adjacentes ao pericárdio, utilizando pinças, tesouras, e ocasionalmente bisturi cirúrgico. O saco pericárdico foi lavado com solução de ringer lactato por 2 a 3 vezes, e em seguida com água destilada gelada em abundância.

Retalhos de pericárdio bovino (PB) medindo aproximadamente 2x2cm foram confeccionados utilizando bisturi, e em seguida os mesmos foram armazenados em glicerina bidestilada em frascos de vidro âmbar, previamente esterilizados em autoclave, selados com parafilme e mantidos sob refrigeração -5°C por período não superior a 4 meses. O acondicionamento se fez necessário para que a estrutura da proteína fosse preservada.

Para extração do colágeno, os retalhos de PB conservados em glicerina foram lavados com porções de água deionizada gelada, até remoção da glicerina da superfície das mesmas. Em seguida foi lavado com acetona/água nas seguintes proporções: 10:90, 25:75, 50:50, 75:25 e 100:0%. Posteriormente os pedaços foram lavados novamente com água e submetidos a tratamento com NaOH (0,1 mol/L) durante 48 horas, sob temperatura entre 5 a 10°C. Posteriormente separou-se o PB da solução com NaOH por centrifugação a 1000 rpm, durante 10 minutos, a uma temperatura de 10°C.

O PB foi tratado com pepsina de mucosa gástrica de porco dissolvida em 200 mL de HCl (0,1 mol/L), nas proporções pepsina/colágeno de 83,7 unidades/g (pepsina 1x) e 838

unidades/g (pepsina 10x), o PB foi então triturado em solução de pepsina/HCl com o auxílio de um mixer durante 15 minutos sob banho de gelo. Posteriormente foi feito o ajuste do pH para aproximadamente 4 utilizando solução de NaOH (0,1 mol/L). Após digestão péptica a solução foi filtrada a vácuo utilizando funil de büchner. O filtrado foi então mantido em frascos de polipropileno sob refrigeração por um período de 4 horas, até que houve a separação de duas fases: líquida e gelatinosa. A separação foi realizada por centrifugação a 10.000 rpm utilizando centrífuga refrigerada. A fase gelatinosa recolhida, devido a consistência do colágeno produzido, foi designada de gel de colágeno, o qual foi mantido armazenado em frascos de polipropileno, devidamente armazenados sob refrigeração (-5°C), para posterior utilização em período não superior a 3 meses.

Todas as etapas foram realizadas em temperatura entre 5 e 10°C, utilizando-se banho de gelo e conservando as amostras em geladeira.

As etapas realizadas no processo estão resumidas no fluxograma da figura 6.

4.1.2.2. Tendão Bovino

Tendões de aquiles bovino foi extraído manualmente de animais adultos com idade entre 20 a 24 meses por abatedouro fiscalizado pelo Serviço Federal de Inspeção (SIF). Os tendões foram retirados próximos a união do osso, com tamanhos variando entre 10 e 12 cm, e lavados em água abundante. Após retirada, o mesmo foi refrigerado (5 °C) e manipulado em períodos não superior a 24h.

A manipulação do mesmo foi realizada em laboratório, com temperatura controlada (18 °C) utilizando utensílios previamente esterilizados em autoclave. Durante a manipulação dos tendões de Aquiles bovino, foram tomados cuidados para manter a assepsia do ambiente, tal como descritos para obtenção do colágeno a partir de pericárdio bovino.

Os procedimentos de limpeza e desinfecção dos tendões de Aquiles seguiram os mesmos procedimentos descritos para o pericárdio. Pelo fato de que tendão de Aquiles se tratar de um tecido mais rígido que o pericárdio, foi possível somente obtenção de recortes medindo de 2 a 3 cm. O tendão foi então conservado em glicerina bidestilada em refrigerador a -5°C por período não superior a 4 meses.

Os procedimentos de digestão péptica e extração do colágeno bruto para os fragmentos de tendão de Aquiles, foram os mesmos descritos para o processamento do pericárdio bovino, e podem ser resumidos no fluxograma apresentado pela Figura 7.

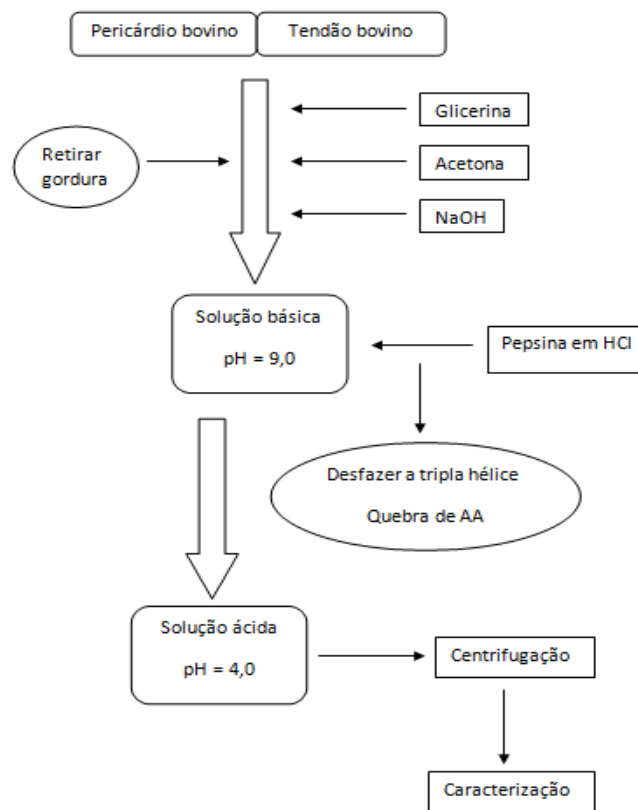


Figura 7. Fluxograma de síntese do Colágeno Tipo I.

4.2. Síntese da Hidroxiapatita

4.2.1. Material

- Fosfato de calcio anidro P.A., fabricante: Biotec Reagentes Analíticos
- Nitrato de Calcio Tetra Hidratado P.A., fabricante: Biotec Reagentes Analíticos
- Hidróxido de Amônio P.A., fabricante: Química Moderna, CAS: 1336-21-6
- Água deionizada.
- Agitador magnético
- Centrífuga
- PHmetro
- Forno tipo mufla para sinterização com controle digital de temperatura, fabricante MAITEC
- Almofariz e pistilo de ágata.

4.2.2. Método

A HAp foi sintetizada por precipitação a partir de soluções aquosas de nitrato de cálcio e fosfato de cálcio, ambas concentração de 1,0 mol/L pelo método sol-gel, seguindo o procedimento ilustrado no fluxograma da Figura 8, fazendo uso dos seguintes reagentes: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e NH_4OH .

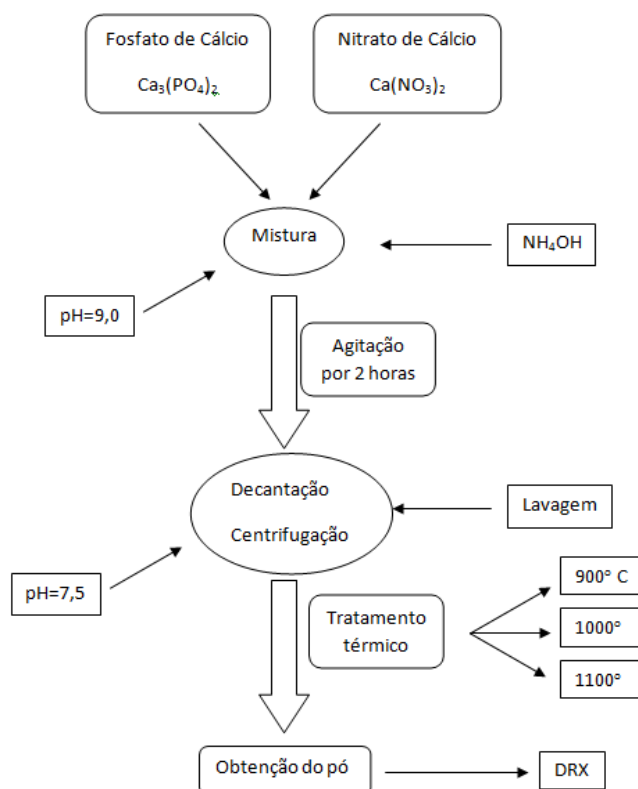


Figura 8: Fluxograma de síntese da HAp.

O fosfato de cálcio e o nitrato de cálcio foram utilizados como precursores para síntese da hidroxiapatita pela co-precipitação. O fosfato de cálcio foi diluído a 1mol/L sob agitação. Em seguida a solução de sulfato de cálcio foi adicionada à solução, por gotejamento (5 segundos/gota), mantida em temperatura ambiente ^[14].

A mistura de soluções foi então lentamente titulada com hidróxido de amônio até que o pH ~ 9 fosse atingido, a solução resultante foi colocada sob agitação magnética por 2 horas (temperatura ambiente). Após a agitação a amostra foi deixada em repouso por 24 horas. A solução foi centrifugada e o precipitado foi lavado em água destilada até estabilizar o pH entre 7 e 8.

A massa resultante foi seca em estufa a 100° C por 24 horas, o produto foi então dividido em três partes iguais, acondicionados em cadinhos de platina e tratados termicamente em forno tipo mufla na seguinte programação: temperatura de patamar de 500°C por 30 minutos, após esta etapa foi feito o tratamento térmico da amostra nas temperaturas de patamar de 900°C, 1000°C e 1100°C por 2 horas com taxa de aquecimento de 5°C/min.

Após o tratamento térmico a hidroxiapatita foi pulverizada, com pistilo e almofariz de ágata, e encaminhada para análise de Difração de Raio X (DRX) e FTIR.

4.3. Confeção da Membrana do compósito colágeno/HAp

4.3.1. Material

- Gél de colágeno tipo I, proveniente do pericárdio bovino, tratado com pepsina na proporção 83,7 unidades/g. (pepsina 1x)
- Gél de colágeno tipo I, proveniente do pericárdio bovino, tratado com pepsina na proporção 837 unidades/g. (pepsina 10x)
- Gél de colágeno tipo I, proveniente do tendão de Aquiles bovino, tratado com pepsina na proporção 83,7 unidades/g. (pepsina 1x)
- Gél de colágeno tipo I, proveniente do tendão de Aquiles bovino, tratado com pepsina na proporção 837 unidades/g. (pepsina 10x)
- Acido acético, fabricante Synth
- Homogeneizador ultrasônico, Fabricante: Sonics and Materials, modelo: VCX750
- Liofilizador, fabricante: JJ Científica, modelo LJJ04
- Pó de hidroxiapatita, sinterizado à 1000°C
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), fabricante: Shimadzu, modelo SM500
- Difratômetro de Raios X (DRX), fabricante: Pan Analytical, modelo X'Expert Pro
- Espectrometro na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), fabricante: Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 com acessório ATR

- Cuba de eletroforese fabricante dgel, modelo DGV10

4.3.2. Método

Os compósitos foram preparados utilizando pós hidroxiapatita sintetizados, bem como soluções estoque dos géis de colágeno, tanto provenientes do PB como do TB. Utilizou-se a seguinte fração mássica de colágeno/HAp: 60/40% (em massa).

Foi utilizado para a confecção das membranas, os géis de colágeno não liofilizados, pois estes já se encontravam dispersos em meio ácido, facilitando assim a homogeneização com as partículas de HAp.

As amostras foram preparadas pela lenta adição de HAp em colágeno, mantida então sob constante agitação mecânica em temperatura controlada (18°C) por 12 horas. A dispersão foi vertida em placas de Petri, devidamente esterilizadas, e foram congelados em temperaturas criogênicas empregando nitrogênio líquido. As membranas foram obtidas por liofilização desta dispersão após 72 horas. As membranas destinadas aos ensaios de citotoxicidade foram embaladas em papel crepado e submetidas a esterilização por radiação gama, empregando uma dose de 15 kGy.

As membranas liofilizadas foram caracterizadas por FTIR e MEV, a fim de verificar suas características e sua morfologia.

4.4. Caracterizações

4.4.1. MEV/EDS

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), a superfície de uma determinada amostra é varrida com um feixe de elétrons, os elétrons são então refletidos (Figura 9), sendo que, os retro-espalhados são coletados e exibidos, na mesma taxa de varredura, sobre um tubo de raios catódicos, a imagem é gerada, representando as características superficiais da amostra [47].

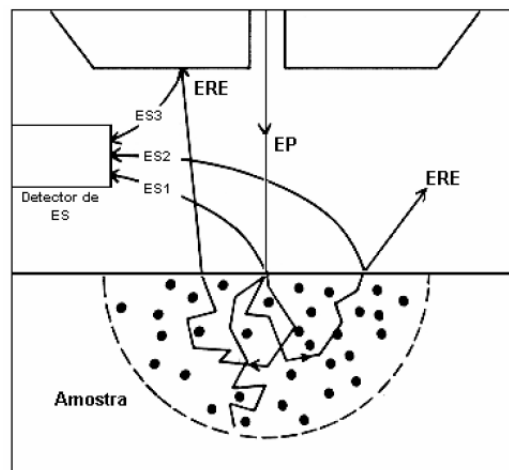


Figura 9: Esquema representativo da reflexão de elétrons em uma amostra, elétrons secundários e elétrons retroespalhados. Adaptado de Ana Maria Maliska^[45]

Vários comprimentos de ondas são emitidos juntamente com reflexão de elétrons, tais como os raios-X^[43]. Os raios-X emitidos são coletados e, pela medida de sua energia, técnica conhecida como espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS), avalia a composição da amostra qualitativamente, não sendo útil para análises quantitativas^[43].

A análise em conjunto MEV/EDS, são importantes na obtenção do mapa composicional da região observada, permitindo assim a correlação com sua morfologia^[43].

No entanto, a técnica necessita de um preparo prévio pois, para que ocorra a penetração do feixe de elétrons, a amostra deve ser condutiva, desta forma foi depositado por *sputtering* uma fina camada de ouro sobre o material.

4.4.2. FTIR

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica muito eficaz tanto para análises qualitativas. A técnica fornece informações a respeito dos tipos de ligações presentes em seu composto, quais átomos estão ligados entre si e também de grupos funcionais presentes, pois a absorção de radiação infravermelha (IR) para determinados grupos ocorre em intervalos, de frequências, muito definidos e facilmente inidentificáveis [42].

Na região de comprimento de onda do IR temos a absorção referente vibrações e estiramentos das ligações interatômicas (Figura 10), embora que bem definidas, algumas perturbações podem causar certo deslocamento das bandas, causadas pela presença de grupos ou átomos vizinhos eletronegativos ou pela geometria da molécula [42].

Considerando que o colágeno seja uma proteína constituída por glicina, prolina e hidroxiprolina, a espectroscopia no infravermelho consiste numa técnica útil para caracterizar as bandas referentes aos grupos presentes nestas moléculas[42], bem como avaliar possíveis alterações do ambiente químico provocados pela digestão péptica, bem como pelo processamento em meio ácido. FTIR é um método não destrutivo, e o emprego dispositivo de reflectância atenuada e o preparo de amostra é relativamente muito fácil [42].

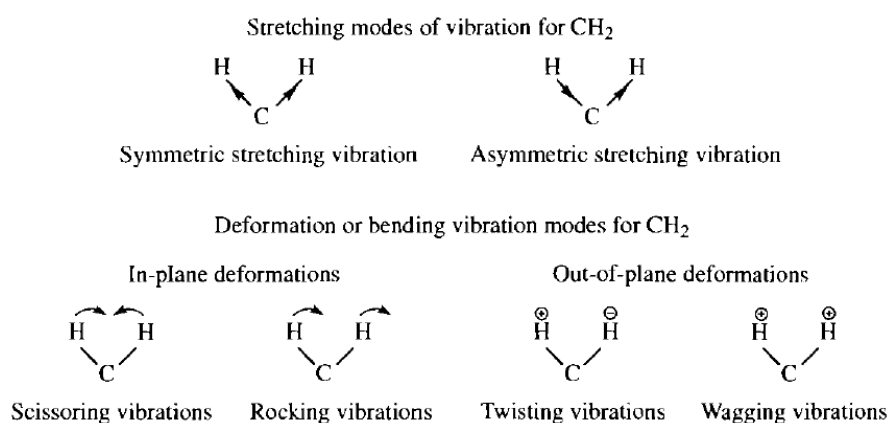


Figura 10: Esquema representativo dos tipos de vibrações existentes nas ligações interatômicas de uma molécula [46].

As amostras foram analisadas diretamente sobre o cristal do acessório de reflectância atenuada do equipamento, sem que fosse preciso um preparo antes, apenas cuidados usuais para não contaminar o material analisado durante o manuseio da amostra, bem como aferir o

pH da mesma no momento da medida, já que amostra fora da faixa de pH entre 10-4 não podem ser utilizadas.

4.4.3. DRX

O fenômeno de difração ocorre quando uma onda eletromagnética, se depara com uma série de obstáculos definidos e espaçados regularmente, utilizando-se então desse fenômeno, podemos definir distâncias atômicas interplanares assim como a estrutura cristalina, através do padrão de difração de raios-X de cada material [47].

A radiação utilizada é de raios-X pelo fato de possuir altas energias e comprimentos de onda da ordem de grandeza dos espaçamentos interatômicos dos sólidos [47].

Quando temos a sobreposição de ondas de forma construtiva, ou seja, que se reforçam mutuamente, temos as manifestações de difração de um dado material, seguindo um padrão determinado e dependente do comprimento de onda, da distância interplanar, do ângulo de incidência do feixe de raios-X e da ordem de refração (podendo assumir qualquer número inteiro) [47]. A correlação destas variáveis se dá por meio da Lei de Bragg, expressa pela equação 1:

$$n\lambda = d_{hkl} \cdot \text{sen}\theta = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \text{sen}\theta \quad \text{Equação (1)}$$

onde, n é a ordem de difração, λ é o comprimento de onda, d_{hkl} é a distância interplanar dos planos hkl e θ é o ângulo de incidência da radiação.

As amostras foram então pulverizadas, utilizando-se de pistilo e grau de ágata, previamente para as análises de DRX. Foram utilizados as seguintes condições experimentais: radiação com comprimento de onda do cobre, 2θ entre 20 a 90°, passo de 0,02°, tempo de coleta por passo: 1s.

4.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A Eletroforese se baseia no estudo (por comparação) do movimento das moléculas carregadas, ou fragmentos para polímeros biológico, sob ação de um campo elétrico [40]. O

deslocamento é diretamente proporcional ao peso molecular, conseqüentemente, seu tamanho, sua forma, sua carga e sua natureza química ^[40].

Empregou-se o método eletroforético chamado de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizada na caracterização de proteínas, seu peso molecular e sua pureza ^[40]. Consiste em uma técnica de caráter desnaturante pela presença de um detergente aniônico, o dodecilsulfato de sódio (SDS), ligando-se covalentemente às proteínas, desenovelando-as e carregando-as negativamente, rompendo assim suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, resultando em cadeias polipeptídicas ^{[40][41]}.

As proteínas já tratadas, são colocadas sobre um gel de poliacrilamida, que atua como uma espécie de peneira molecular. Pela ação de um campo elétrico, as proteínas são deslocadas do polo negativo para o polo positivo pois encontram-se carregadas negativamente, sendo possível então a separação em função de seu tamanho e peso, já que, as moléculas menor peso molecular e menor tamanho, se deslocam mais rapidamente em comparação as que possuem maior peso e maior tamanho ^{[40][41]}.

Através da separação das proteínas e, tendo como padrões de comparação proteínas já conhecidas, pode-se saber o peso molecular de cada cadeia polipeptídica ^[41], já que o gel é corado com um corante que revela a presença ou não de proteína.

Para tal, procedeu a desnaturação da proteína da amostra, deixando-a 5 minutos a uma temperatura de 90°C, antes da aplicação do tampão de amostra.

O tampão de amostra, foi preparado pela mistura de Tris HCl 100 mmol/L, SDS 4,0%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%. O gel de resolução (gel de corrida), foi obtido utilizando-se como reagentes: água destilada, Tris HCl (TRIZMA) 1,5 mol/L, poliacrilamida 30%, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED. O gel de amostra foi preparado empregando os seguintes reagentes: água destilada, TRIZMA 1,0 mol/L, poliacrilamida 30%, SDS 10%, persulfato de amônio 10% e TEMED.

A solução precursora dos géis (de amostra e resolução) foram aplicados então nas placas da cuba de eletroforese e após gelificação dos mesmos foi adicionado na cuba o tampão de corrida, que consiste na mistura de TRISZMA 250 mmol/L, glicina 2,5 mol/L e SDS 1%. Foi utilizado o sistema de eletroforese da marca dgel, modelo DGV10.

Após o término houve a aplicação do corante (solução com comassie blue) durante 30 minutos e posteriormente o descorante (com solução de metanol) até que fosse visível as linhas coradas de proteínas no gel de corrida.

Para a análise da corrida eletroforética foram utilizados padrões dos seguintes pesos moleculares: 120 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 57kDa e 36kDa. Os padrões são certificados (Sigma Aldrich, St Louis, USA), e foram devidamente preparados, com tampão de amostra, previamente a aplicação sobre o gel de poliacrilamida. Aplicou-se a quantidade de 5 μ L da mistura de padrões na canaleta.

4.4.5. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A metodologia utilizada na avaliação do potencial citotóxico foi derivada da norma ASTM F895-84. Esta metodologia é usada para avaliar o potencial citotóxico de novos materiais e formulações, sendo apropriada para análise de materiais sólidos, tal como a membrana desenvolvida. Este método utiliza linhagem celular de tecido conjuntivo de camundongo.

O meio de cultura líquido foi preparado pela solução de MEM (Meio Essencial Mínimo), L-glutamina, soro bovino e antibióticos. As células são multiplicadas no meio de cultura líquido durante 48 horas. O meio de cultura líquido é substituído por ágar vermelho neutro, que permite a solidificação. Fragmentos da amostra, com tamanho ~5x5mm são posicionados no centro das placas contendo o meio de cultura e incubado por 24 horas. Caso a amostra libere componentes tóxicos, estes poderão difundir no meio de cultura formando um gradiente de concentração de células afetadas. A área corada que contém células vivas indica o índice de zona (IZ), que é proporcional a área não corada pelo corante vital. As observações foram realizadas em microscópio óptico (200X). Os índices foram obtidos pela comparação do controle negativo, que contém material atóxico (USP Negative Control Plastic) e do controle positivo, que contém material totalmente tóxico, no ensaio foi empregado fenol.

5. Resultados e Discussão

5.1. Extração do Colágeno

A seleção dos animais doadores de tecidos para o presente trabalho levou em consideração aspectos como disponibilidade, facilidade de manipulação e ausência de riscos por contaminação com doenças graves. Entre os animais candidatos, várias opções são disponíveis na literatura, tais como: bovinos, equinos, suínos, leporídeos. Considerando estas opções, bovinos apresentam a maior disponibilidade de material, já que tanto o PB quanto TB são disponíveis em grandes quantidades por animal abatido, e são tecidos na maioria das vezes descartados. A opção de trabalhar com tecidos provenientes de equinos é uma alternativa interessante considerando inexistência de doenças graves transmitidas por este tipo de animal, tal como a encefalopatia espongiiforme bovina - EEB (doença da vaca louca), no entanto a ausência de frigoríficos de equinos na região foi fator determinante para selecionar bovinos, já que são animais com grande disponibilidade de abatedouros ou frigoríficos para o fornecimento da matéria prima.

Embora não se tenha destinado a membrana do compósito colágeno/HAp sintetizado a ensaios clínicos, selecionou-se uma fonte segura para extração do colágeno. O Brasil é considerado um país altamente improvável de apresentar animais contaminados com EEB, desta forma, a extração de colágeno de PB ou TB, em frigorífico certificado pelo SIF, garante alto nível de segurança de material não conter doenças transmissíveis relacionadas a príons. No entanto, para aplicações clínicas do material aqui proposto faz-se necessário obter material de fornecedor que tenha controle rigoroso sobre a alimentação do animal, bem como vetores que possam conduzir uma improvável contaminação por EEB.

Todo o processo de extração e processamento do colágeno, bem como armazenagem foram realizados sob refrigeração, utilizando freezer para armazenar os materiais. Durante limpeza do PB e TB, confecção dos retalhos, digestão péptica e separação do colágeno bruto, empregou-se soluções em temperaturas entre 5 a 10°C. Estes procedimentos foram tomados para evitar proliferação de bactérias. Seria pertinente a manipulação do PB e TB bem como do colágeno, e membranas do compósito em capela de fluxo laminar, evitando assim a contaminação por bactérias, no entanto, não dispúnhamos deste tipo de instalação.

5.1.1. Caracterização do colágeno por FTIR

A estrutura do Colágeno, sendo este uma sequência de aminoácidos (glicina, prolina e hidroxiprolina) temos que, algumas vibrações já são esperadas, auxiliando assim para a constatação de sua presença no material em questão.

Os espectros de FTIR para os tecidos nativos estão representados na figura 11. Analisando esta figura, pode-se observar que as bandas a 1650 cm^{-1} e principalmente a banda a 1550 cm^{-1} são mais intensas para o PB, estas bandas estão relacionadas a estiramento das ligações C=O de amida I e N-H amida II (secundária), respectivamente. No espectro do PB pode-se observar 3 bandas definidas, porém de baixa intensidade a 1459 cm^{-1} , 1403 cm^{-1} e 1361 cm^{-1} , enquanto que para o espectro de TB existe apenas uma banda ampla e intensa centrada em 1412 nesta região, podendo ser relacionadas à amidas terciárias. Outra particularidade é encontrada na região de 882 , pois para TB existe uma banda bem definida e intensa, e para PB esta banda é discreta, atribuída a deformação angular da ligação $\text{-NH}_2\text{-CH}_2$. Estes resultados sugerem que o PB possui bandas mais intensas referentes a amidas I (primária) e amidas II. De acordo com a literatura^[8], a integridade da tripla hélice no colágeno nativo está relacionada com a absorbância das bandas referentes ao estiramento N-H em amina III (a 1235 cm^{-1}) e as vibrações do grupo C-H do anel pirrolidínico, ou seja, a integridade da estrutura secundária desta macromolécula depende da absorbância relativa entre as bandas a 1235 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} (I_{1235}/I_{1400}). Nota-se que as absorbâncias relativas destas bandas são distintas nos tipos de colágeno nativo: para TB a $I_{1235}/I_{1400} = 1,0$ enquanto que para PB $I_{1235}/I_{1400} = 0,36$, indicando que durante o processo de processamento dos tecidos que houve quebra da estrutura secundária da proteína no PB, porém a estrutura do colágeno tipo I foi mantida.

De acordo com a Figura 12, que mostra o espectro de FTIR para o colágeno bruto em forma de gel após a digestão péptica, existe ampla banda a 3400 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação -O-H livre, devido a presença de água. Dado a intensidade desta banda os sinais do espectro na região entre 400 a 1500 cm^{-1} não estão definidos. Observa-se uma banda ampla centrada em 1638 cm^{-1} , devido a junção das bandas referente ao estiramento da ligação C=O, C-N e N-H dos grupos amida presente nos aminoácidos, segundo dados retirados da literatura (tabela 3).

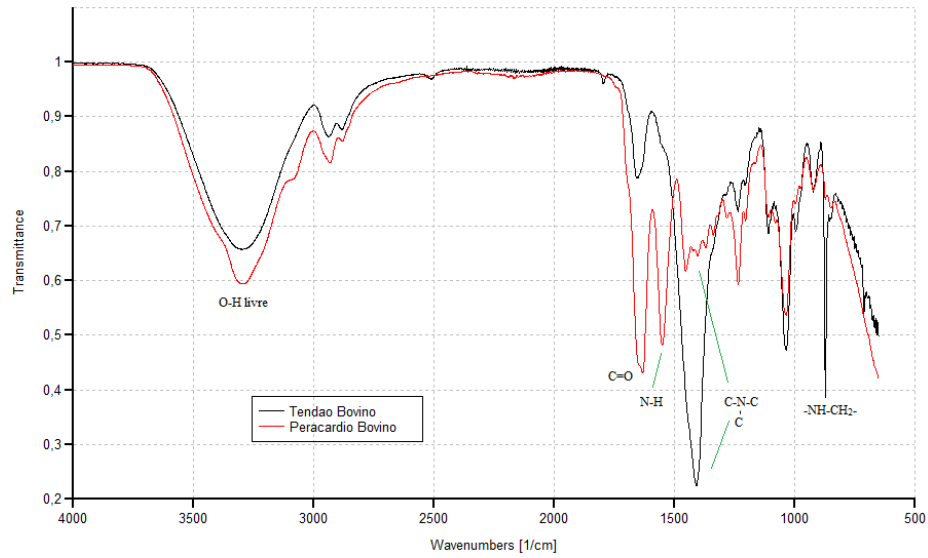


Figura 11: Espectro FTIR dos tecidos pericárdio bovino (PB) e tendão bovino (TB) após processamento de limpeza, com solução de ringer lactato, água destilada e acetona.

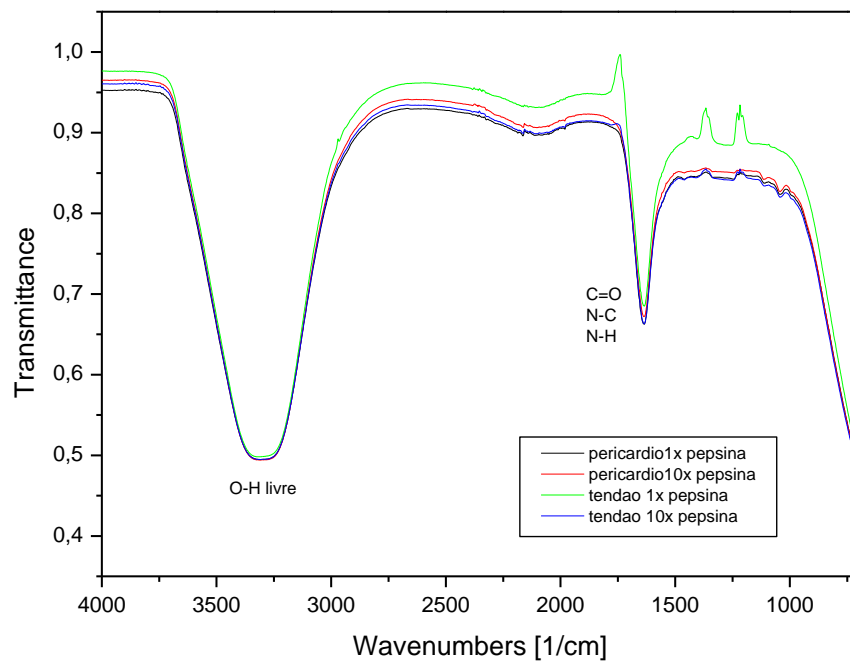


Figura 12: Espectro FTIR dos géis de colágeno preparados após digestão péptica.

Os espectros dos géis liofilizados tratados com diferentes proporções de pepsina estão organizados na figura 13. Uma análise comparativa foi feita, entre as bandas, referentes ao material tratado com diferentes concentrações de pepsina, empregada em cada amostra, não

houve observação de diferenciação significativa em questão de concentração dos seus constituintes e/ou outras bandas, sendo assim pode-se afirmar que não há diferença entre se utilizar as diferentes massas do reagente para a digestão péptica empregada. Analisando o efeito da concentração de pepsina no tratamento dos géis, nota-se que apenas a banda 1650 cm^{-1} referente a vibração C=O de amida primária apresenta diferença significativa: na amostra de TB tratado com 10X. Ambas as amostras apresentara relação I_{1235}/I_{1400} próximo a unidade, evidenciando que a estrutura secundária da proteína foi mantida.

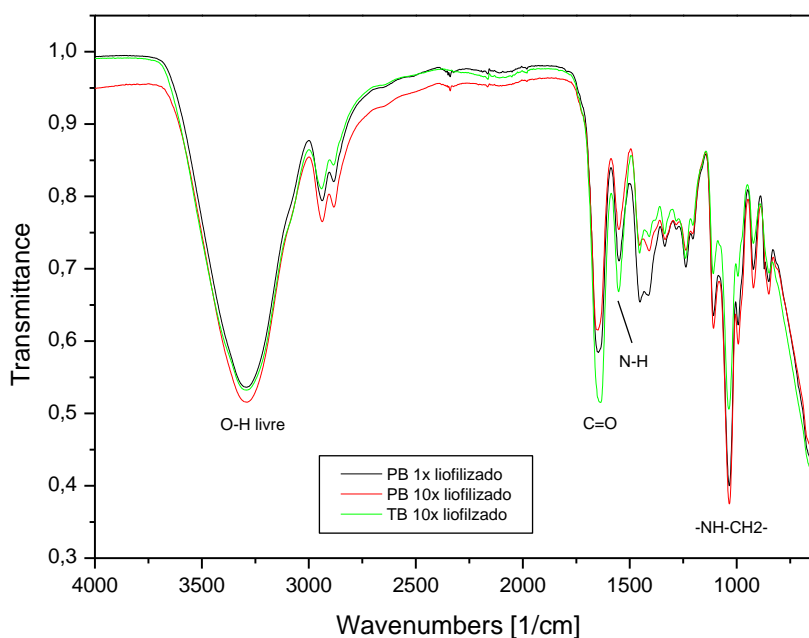


Figura 13: Espectro FTIR dos géis de colágeno após digestão péptica (concentração de pepsina de 1x e 10x) e liofilizados em temperatura a criogênica durante 72h. preparados.

Podemos observar na Figura 14 que os géis de colágeno liofilizados apresentam muita similaridade com os tecidos TB e PB. São observadas as bandas características de colágeno, relacionada aos seus respectivos aminoácidos presentes. A presença de bandas no intervalo de 1260 cm^{-1} a 1405 cm^{-1} indica a presença de colágeno tipo I ^[9].

A pepsina é uma enzima que atua na quebra do colágeno na região dos telopeptídeos, ou seja, nos peptídeos das extremidades da proteína. Desta forma o tropocolágeno, manteve a estrutura secundária intacta, visto que as absorbâncias relativas entre as bandas a 1235 e 1450 mantiveram próximas a unidade, nas amostras tratadas com pepsina, no entanto, nota-se que a

intensidade da banda a 1650 cm^{-1} , referente ao estiramento C=O de amida I depende da organização estrutural do colágeno no tecido, conforme evidenciado na Figura 11. Com efeito a intensidade desta banda é maior para colágeno tratado com maior concentração de pepsina, já que a enzima pode ter atuado na quebra de telopeptídeos, em regiões de reticulação intermolecular.

A digestão peptica resultou numa solução com uma fase viscosa (gelatinosa) a partir dos retalhos de PB e TB, indicando assim que houve efetiva quebra de telopeptídeos, resultando assim na extração do colágeno com menor reticulação, já que produziu um material viscoso e solúvel em água. Como esta fase, separada por centrifugação dos fragmentos remanescentes dos retalhos dos tecidos apresentou espectros de FTIR compatíveis com o colágeno, com estrutura secundária preservada, pode-se dizer que foi um método eficiente de extração de colágeno de tecidos. A vantagem de se obter colágeno com menor reticulação molecular, reside no fato de que estes podem ser mais biocompatíveis, já que o processo de reabsorção óssea será facilitado dado a menor complexidade da molécula.

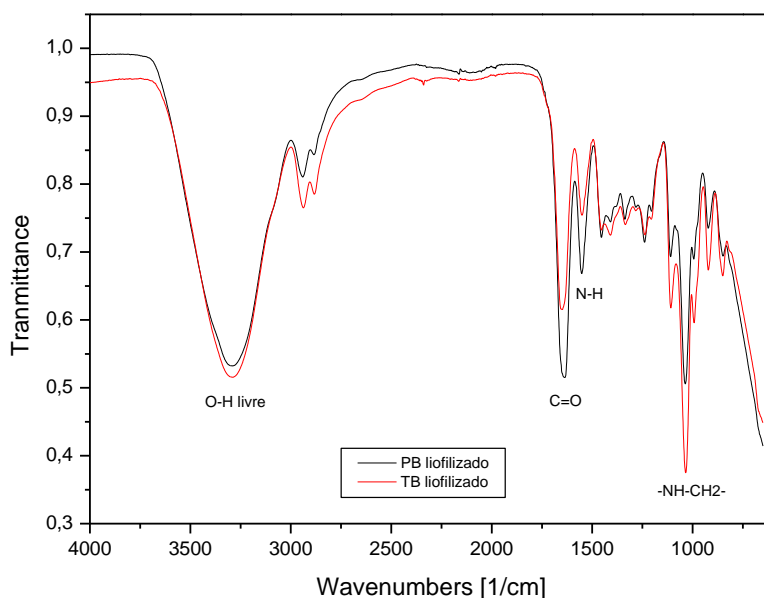


Figura 14: Espectro FTIR dos géis de colágeno liofilizados em temperatura a criogênica durante 72h. preparados.

Tabela 3: Valores de comprimento de onda referente as vibrações moleculares presentes na estrutura do Colágeno, levando em conta os aminoácidos que o constituem ^[46].

Frequência das bandas (1/cm)	Tipo de vibração ou deformação	Ligação associada	Características
3550 - 3230	Estiramento simétrico	—O—H	Não livre e nem sendo de ácido carboxílico, obtendo interação intermolecular do tipo “Ponte de Hidrogênio”
3600 - 3200	Angular Estiramento	$\begin{array}{c} \text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Vibrações referentes a molécula de água
1400 - 1330	Angular (abano)	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{OH} \end{array}$	Ligação de álcool secundário
2940 - 2915	Estiramento (simétrico e assimétrico)	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array}$	Carbono secundário acíclico
2870 - 2840		$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array}$	
1840 - 1440	Angular (tesoura)	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array}$	Carbono secundário
1360 - 1320	Angular	$\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \\ \text{CH} \end{array}$	Carbono terciário
1660 - 1680	Estiramento simétrico	C=O	Ligado a amina secundária
1530 - 1560	Estiramento simétrico	N—H	Ligado a amina secundária
1440-1457	Estiramento	C—N	Amida secundária
1180 - 1300	Estiramento simétrico	C—O	Carboxílicos, quando quebrada a estrutura do colágeno (glicina, prolina e hidroxiprolina), forma-se ácidos carboxílicos, devido a isso temos 3 picos de vibrações nesta região
1145 - 1130	Estiramento simétrico	C—N	Ligado a mina alifática (terminação de glicina)
945 - 835	Angular (balanço)	—CH ₂ —NH ₂	Ligado a amina primária
1090 - 1020	Estiramento simétrico	C—N	Geral
930 - 900	Angular (dentro e fora do plano)	C—H	Geral
870 - 840			

O tratamento dos retalhos de PB e TB com NaOH (0,1 mol/L) durante 48 horas, sob temperatura entre 5 a 10°C, teve por objetivo a remoção de possíveis tecidos adiposo ou gorduras aderidos ao colágeno, já que as bandas características de gorduras, referentes a moléculas de olefinas, gliceróis e triacilglicerol não foram detectadas nos espectros de FTIR de PB e TB, a saber: 1745 cm⁻¹ estiramento da ligação —C=O do grupo carbonil de ester de

triacilglicerol, 1161 cm^{-1} estiramento do grupo C–O em esters, 960 cm^{-1} deformação C–H dos grupos –HC=CH de transolefinas^[48].

5.1.2. Caracterização do colágeno por MEV/EDS

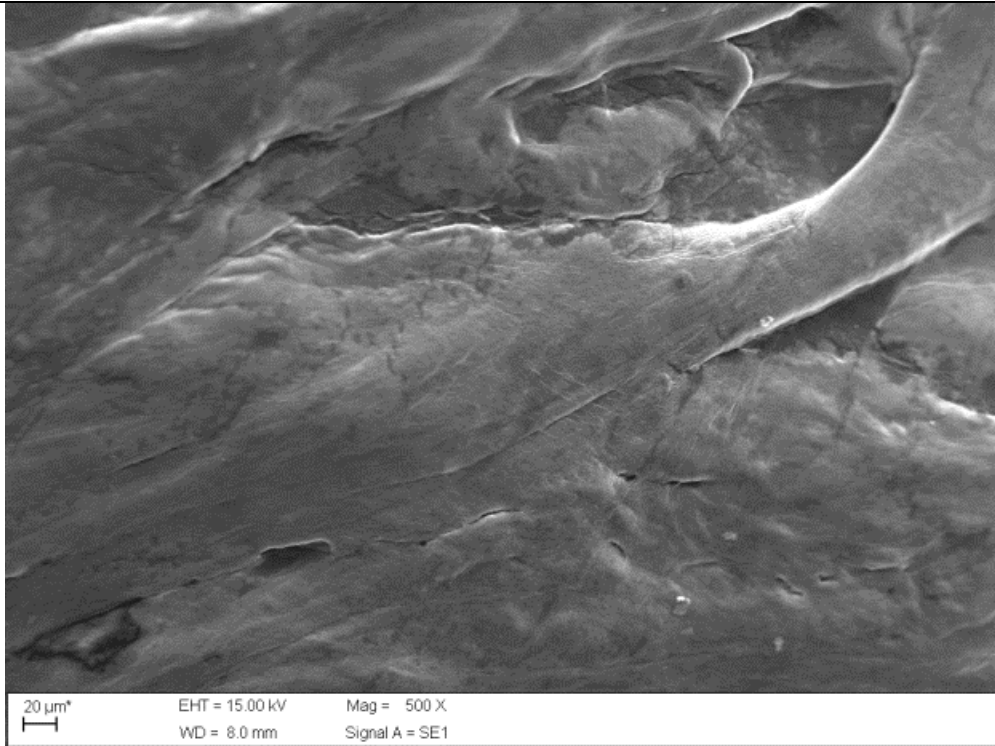
Com a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura pôde-se observar o aspecto morfológico do colágeno, após digestão péptica, liofilizado (Figura 16), assim como também a morfologia do material nativo obtido tanto do pericárdio bovino como do tendão de Aquiles bovino (Figura 15).

Para o preparo das amostras foi necessário fazer uma liofilização, para a retirada de água já que a obtenção de alto vácuo é necessária na câmara da amostra do MEV. Houve também a necessidade de se recobrir a amostra com uma fina camada de ouro para evitar o carregamento da amostra.

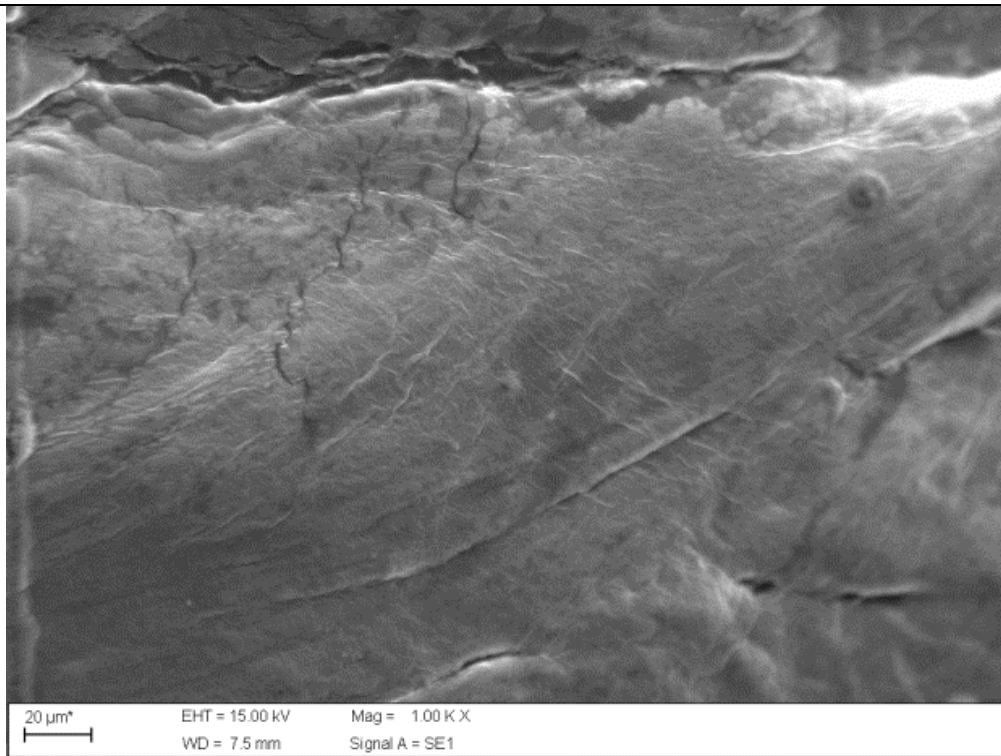
Analisando a Figura 16 pode-se observar a estrutura organizada e compacta preservada dos tecidos nativos. O PB apresenta superfície mais lisa, e pode-se sugerir que as fibras de colágeno no PB possuem maior alinhamento longitudinal se comparado com as micrografias obtidas para o TB no mesmo aumento. Nota-se que o tendão bovino apresenta um aspecto lamelar (Figura 15 C e D).

O emprego de um mixer para facilitar a digestão péptica é justificado pela estrutura observada nas micrografias dos tecidos nativos, já que a ação das pás cortantes do mixer destruiu a estrutura compacta e organizada observada nas micrografias apresentadas na Figura 15, expondo as fibrilas ao ataque da pepsina.

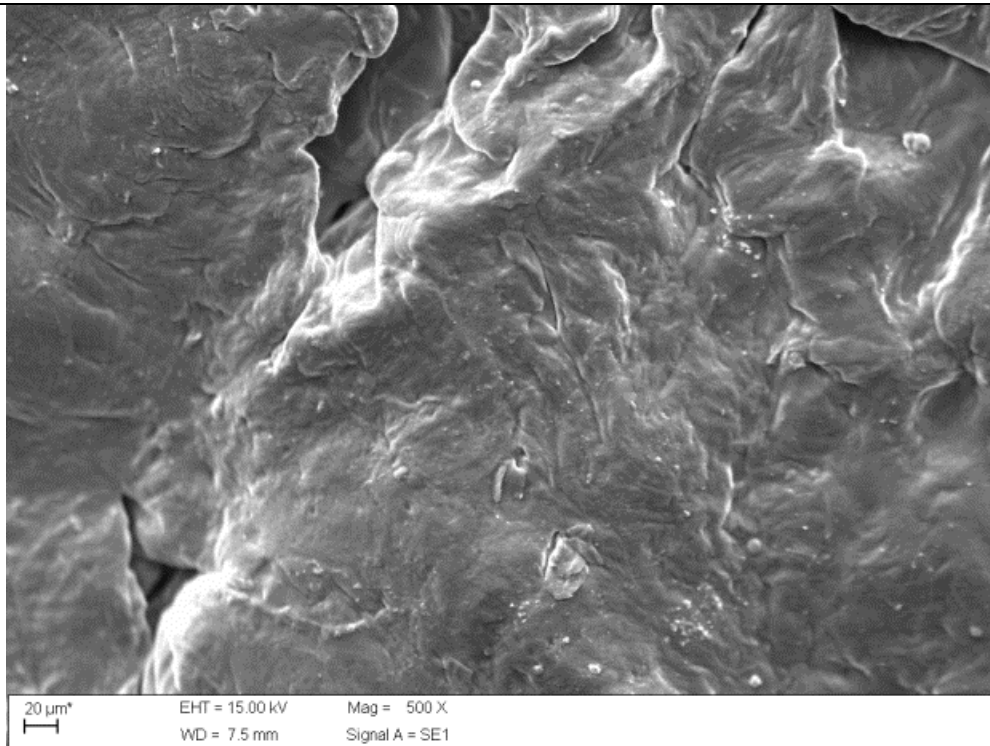
Conforme pode ser observado nas micrografias da Figura 16, referente ao colágeno do TB e PB após digestão péptica, mesmo para as micrografias de menor aumento (A e C), a presença de fibrilas entrelaçadas, em algumas regiões estas fibrilas parecem assumir uma organização lamelar, diferente daquela observada para o tecido nativo, principalmente para o PB (Figura 16 A), indicando que a ação da pepsina facilitada pela desfragmentação da estrutura nativa provocada pelo mixer, produziu um novo padrão de organização das fibrilas. A morfologia das fibras colagênicas do gel de PB e do TB em forma de rede com porosidade significativa, apresenta uma estrutura adequada para a incorporação de partículas de HAp.



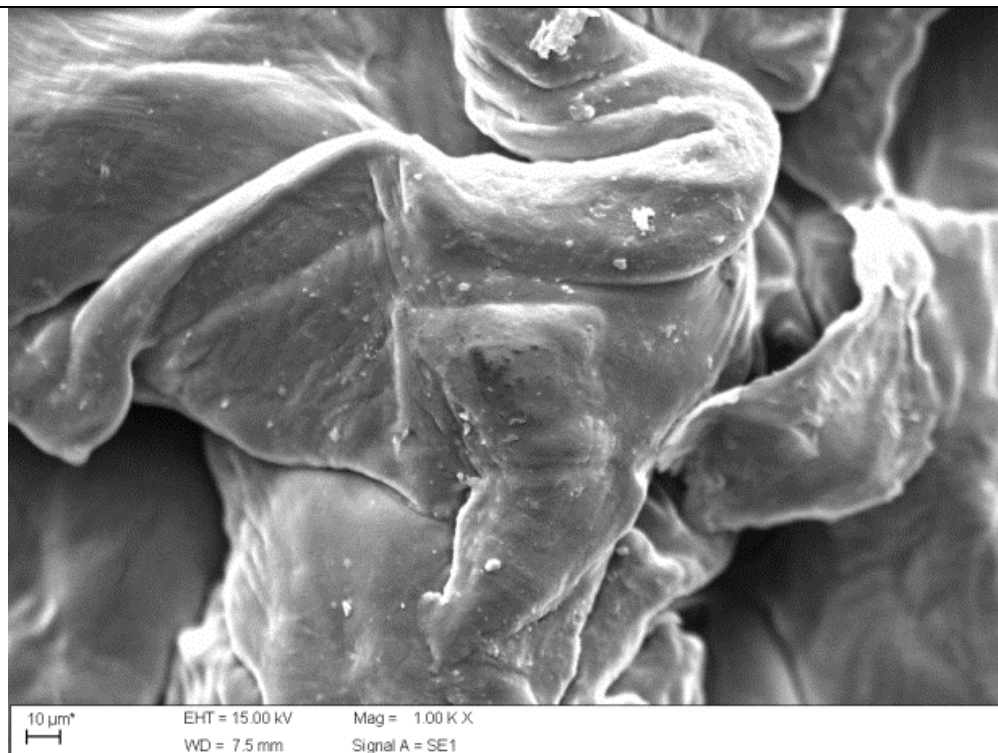
(A) Aumento 500x



(B) Aumento 1kx

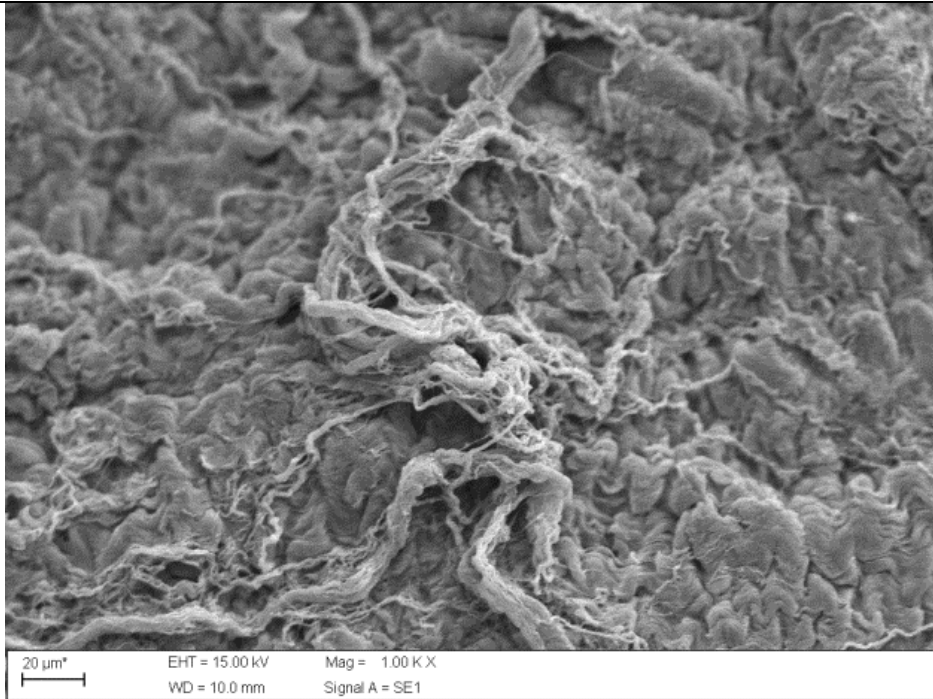


(C) Aumento 500x

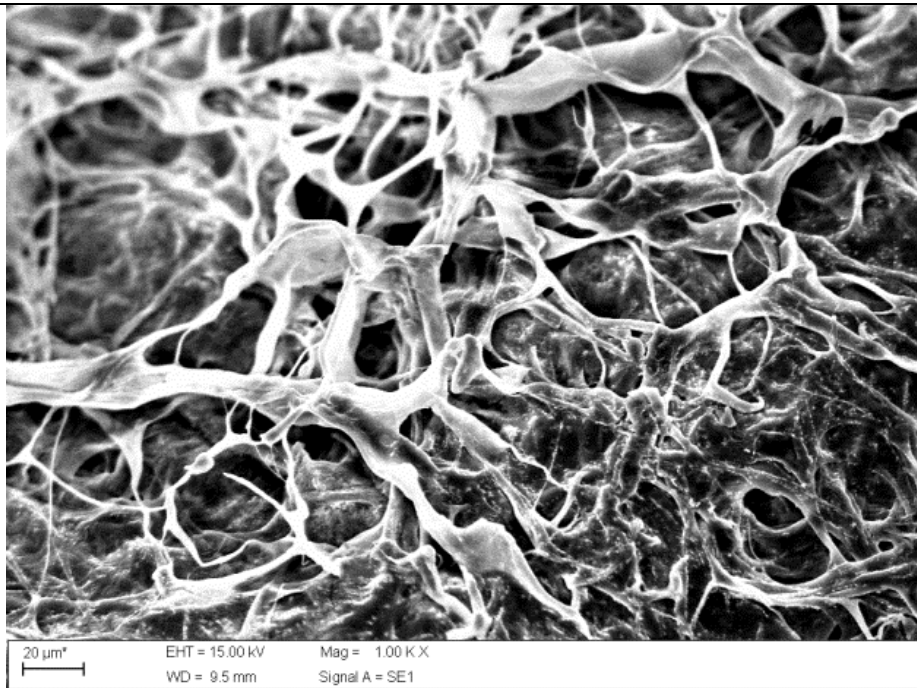


(D) Aumento 1kx

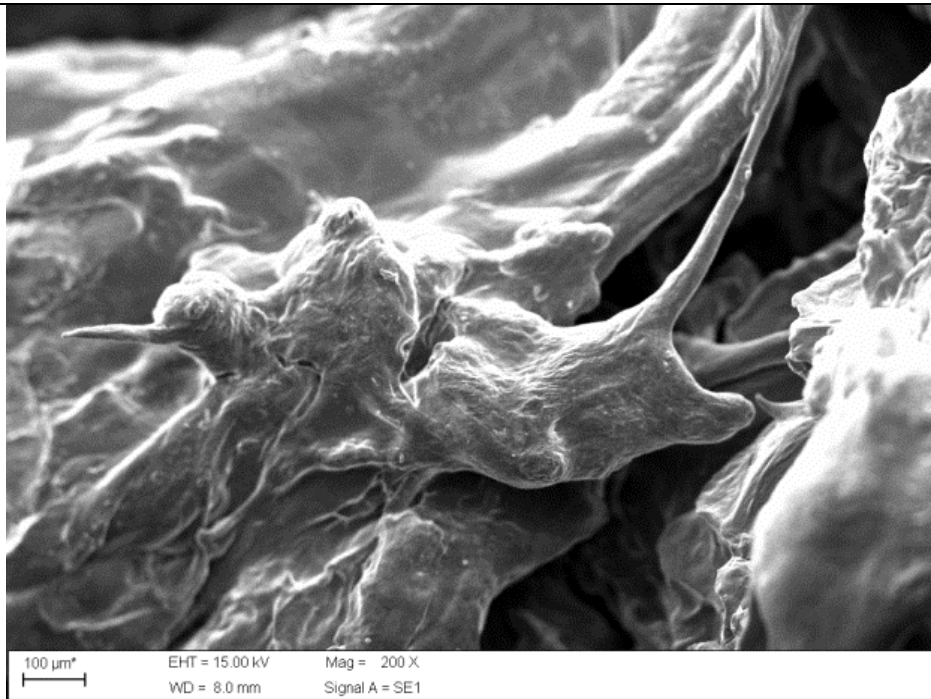
Figura 15: As micrografias são referentes aos tecidos nativos desidratados com misturas gradativas de álcool/água, até desidratação final com álcool absoluto, secas a vácuo e recobertas com ouro por sputtering. A imagens A e B são referentes ao PB e as imagens C e D são relacionadas ao TB. Imagens de MEV obtidas por elétrons secundários.



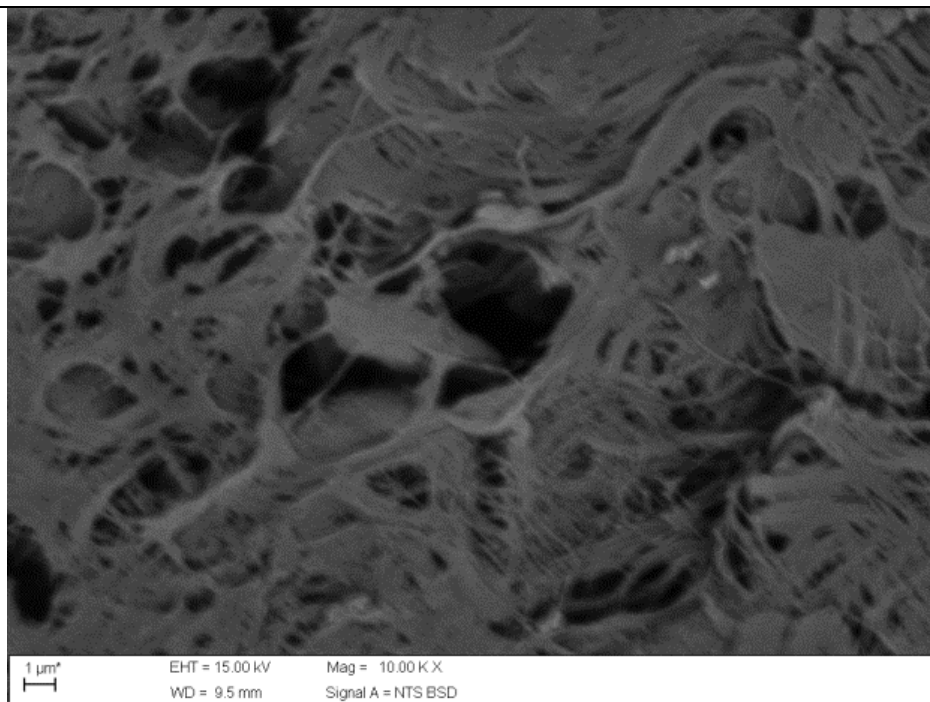
(A) Aumento 10kx



(B) Aumento 15kx



(C) Aumento 200x



(D) Aumento 10kx

Figura 16: Micrografias de MEV do colágeno após digestão péptica extraído do PB e TB desidratados em álcool, liofilizados e recobertos com uma fina camada de ouro. As micrografias A e B são relacionadas a membrana de PB, já as micrografias C e D são relacionadas a membrana de TB. Em A, B e C temos imagens geradas pela captação de elétrons secundários e em D, temos a imagem gerada pela captação de elétrons retroespalhados.

A microanálise química realizada por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) dos géis de colágeno liofilizado (Figuras 17 e 18) revelou a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio, conforme esperado, devido a constituição química dos aminoácidos presentes no colágeno. Em ambos os espectros de EDS nota-se a presença de ouro devido ao recobrimento das amostras.

No gel de colágeno extraído do PB, nota-se a presença dos elementos cloro e sódio, indicando que o processo de enxague dos retalhos de PB não foi eficiente, já que sódio proveniente do tratamento do NaOH estava presente. A presença de cloro indica que durante a centrifugação do material, para separação do gel do sobrenadante (solução de pepsina em meio de HCl(aq)), houve arraste do ácido clorídrico para o gel. Estes resultados indicam que o processamento do PB deve-se controlar a presença dos íons Na^+ e Cl^- após enxague dos retalhos e separação do gel por centrifugação.

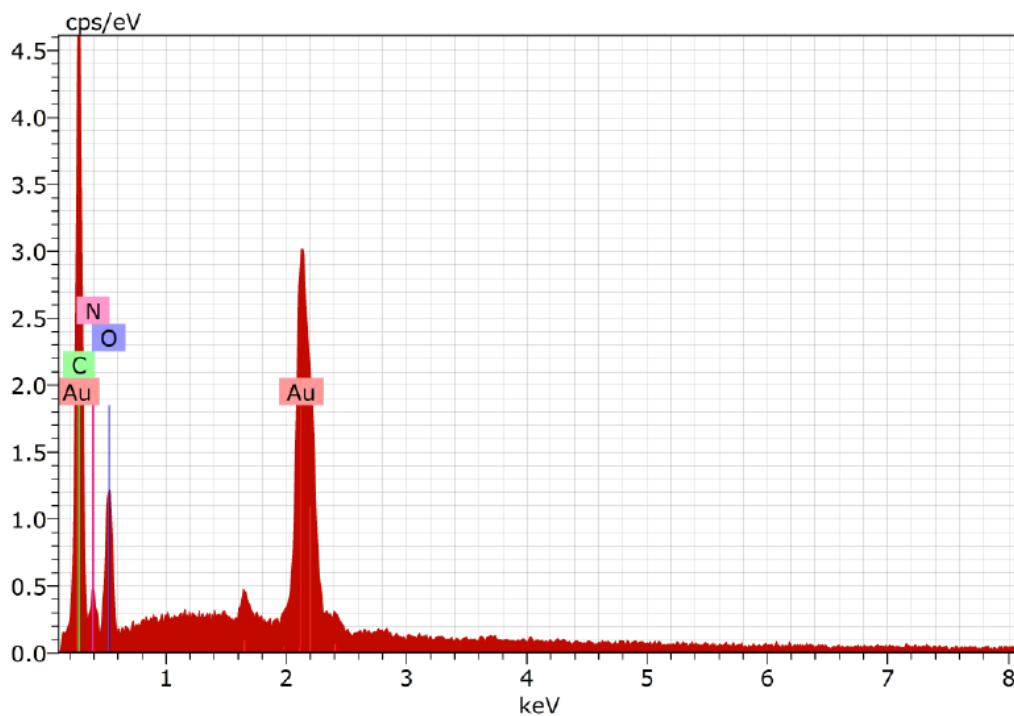


Figura 17: Espectro de EDS, referente ao gel de colágeno liofilizado proveniente do tendão bovino, utilizando-se HV = 15,0kV..

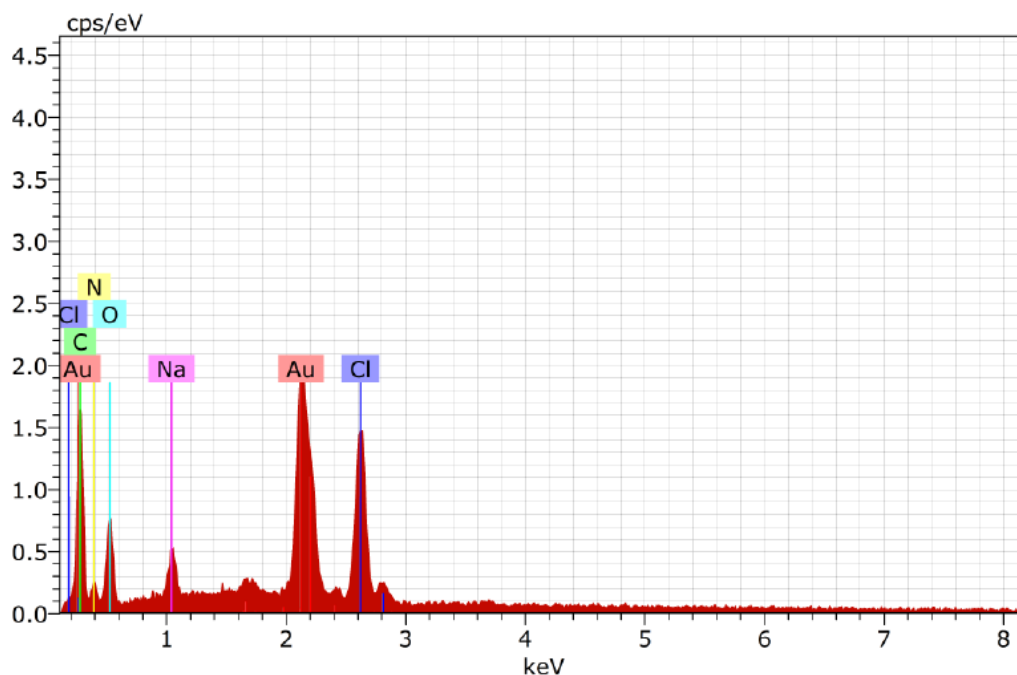


Figura 18: Espectro de EDS, referente ao gel de colágeno liofilizado proveniente do pericárdio bovino, utilizando-se HV = 15.0kV.

5.1.3. Caracterização do colágeno empregando eletroforese em gel de poliacrilamina (SDS-PAGE)

Utilizando-se da técnica de eletroforese, onde se tem uma estimativa do peso molecular de determinadas sequências de aminoácidos, utilizando como padrão de comparação uma mistura de proteínas com pesos moleculares previamente determinados, pode-se inferir a faixa de peso molecular na qual o colágeno processado encontra-se.

De acordo com a literatura^{[8][42][43][44]}, os pesos moleculares esperados para o colágeno Tipo I possuem valores entre 95,5 kDa a 112 kDa, para uma amostra de matriz colagênica de origem bovina. Para a análise da corrida eletroforética foram utilizados padrões dos seguintes pesos moleculares: 120 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 57kDa e 36kDa.

Previamente à corrida eletroforética, faz-se necessário a desnaturação da proteína para que ocorra o desenovelamento da mesma. A desnaturação tem como objetivo romper as estruturas secundárias, obrigando a proteína a percorrer o gel de forma esticada, fazendo com que a única variável durante o percurso seja o seu tamanho, inferindo diretamente em seu peso molecular. A amostra deve estar em tampão para manter o pH constante.

Todo o procedimento deve ser feito mergulhado em um tampão de corrida, evitando assim a variação de pH, uma variável muito importante quando se trata de proteínas, pois

variações de pH, concentração e temperatura são responsáveis pela desnaturação de uma dada proteína.

Foi feita a corrida eletroforética com gel de 10% seguindo o protocolo padrão ^[49] para o gel de corrida e de parada. O persulfato de amônio e o TEMED fazem com que a mistura de poliacrilamida se polimerize formando um gel rígido e permeável à proteínas, já o SDS mantém a amostra desnaturada durante todo o processo.

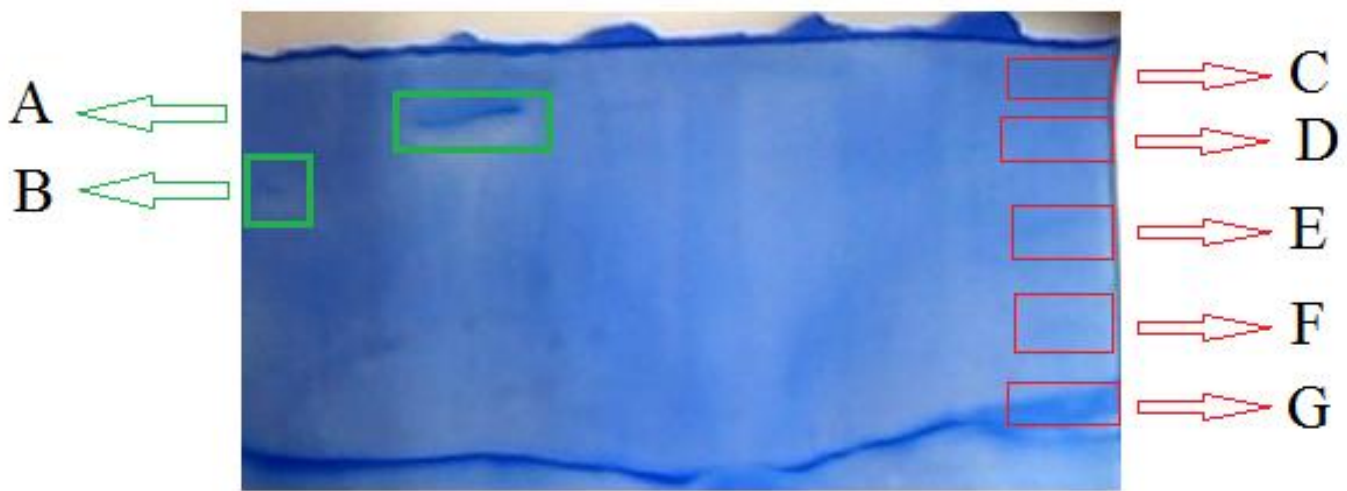


Figura 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS 10%, onde temos à direita os padrões de pesos moleculares pré-definidos C (120kDa), D (100kDa), E (70kDa), F (57kDa) e G (36kDa) e a esquerda temos as faixas correspondentes aos géis de colágeno proveniente de pericárdio bovino (B) e de tendão bovino (A).

Analisando a figura 19 observa-se os deslocamentos dos géis de colágeno provenientes do TB (A), e PB (B). Para os padrões temos linhas pouco coradas, identificáveis empregando lupa. Como na figura impressa não é possível observar as linhas referentes ao padrão, destacou-se as regiões (C, D, E, F e G) nas quais elas foram identificadas utilizando a lupa. A resolução poderia ser aumentada utilizando padrões mais concentrados, ou ainda equipamento mais adequado para permitir o descoramento do gel de corrida.

Pela figura 19 o colágeno gel proveniente de tendão bovino tem massa molecular entre 100 kDa a 120 kDa, e o colágeno proveniente de pericardio bovino tem massa molecular entre 70 kDa a 100 kDa. Considerando os deslocamentos, pode-se afirmar que o colágeno proveniente de PB tem peso molecular ~90 kDa e do TB o peso molecular é ~110 kDa sendo desta forma colágeno tipo I.

5.2. Caracterização da Hidroxiapatita

5.2.1. DRX

As hidroxiapatitas obtidas experimentalmente, e tratadas termicamente nas temperaturas de 900, 1000 e 1100 °C, foram caracterizadas quanto a presença de fases cristalinas por difração de raios-X. Os difratogramas obtidos, foram comparados com as fichas cristalográficas do banco de dados JCPDS (*Joint Commitee on Powder Diffraction Standards*, organizado pelo ICDD - *International Centre for Diffraction Data*).

Foi feito o tratamento térmico do material já que o método de síntese empregado, método da coprecipitação, requer tratamento térmico a fim de se obter pós cristalinos a partir dos precursores precipitados.

Analisando os difratogramas de raios X, nota-se que o tratamento térmico não provocou um aumento de cristalinidade dos pós, já que a largura a meia altura dos principais picos aumentou com a temperatura de tratamento térmico. Nota-se que o perfil de difração obtido assemelha-se as fichas 1-1008 e 9-432 do JCPDS, ambas referentes a hidroxiapatita, sistema hexagonal de grupo espacial P63/m. Nota-se também a presença de picos marcados com (*) referentes as reflexões do β -fosfato de cálcio, ficha 3-604 do JCPDS, sistema tetragonal, grupo espacial P41. Com o aumento da temperatura nota-se que a intensidade dos picos referentes de β -fosfato de cálcio torna-se maior, exceto do pico em $2\theta=34,6^\circ$. Desta forma existe uma transição de fases para temperaturas acima de 900°C cristalizando as fases hidroxiapatita e β -fosfato de cálcio.

Embora não tenhamos obtido hidroxiapatita pura, os pós sintetizados podem ser empregados na formulação das membranas, já que o β -fosfato de cálcio é também um material biocompatível, sendo bastante empregado em processos de regeneração óssea.

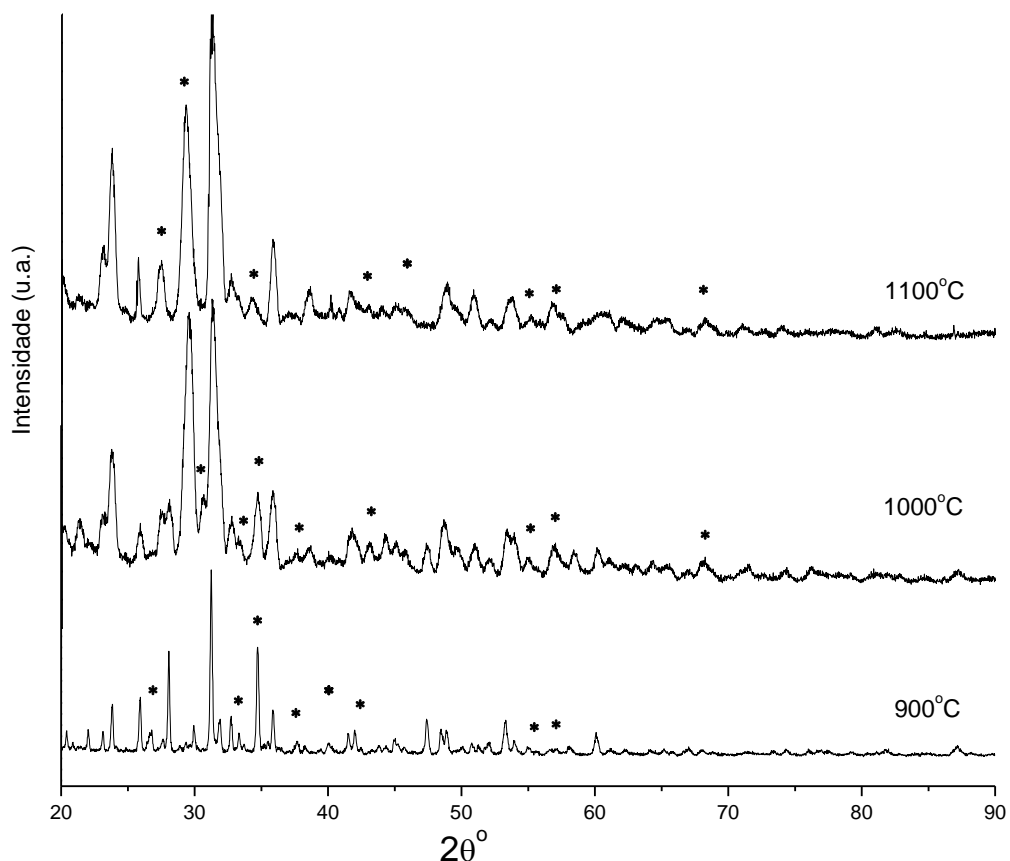
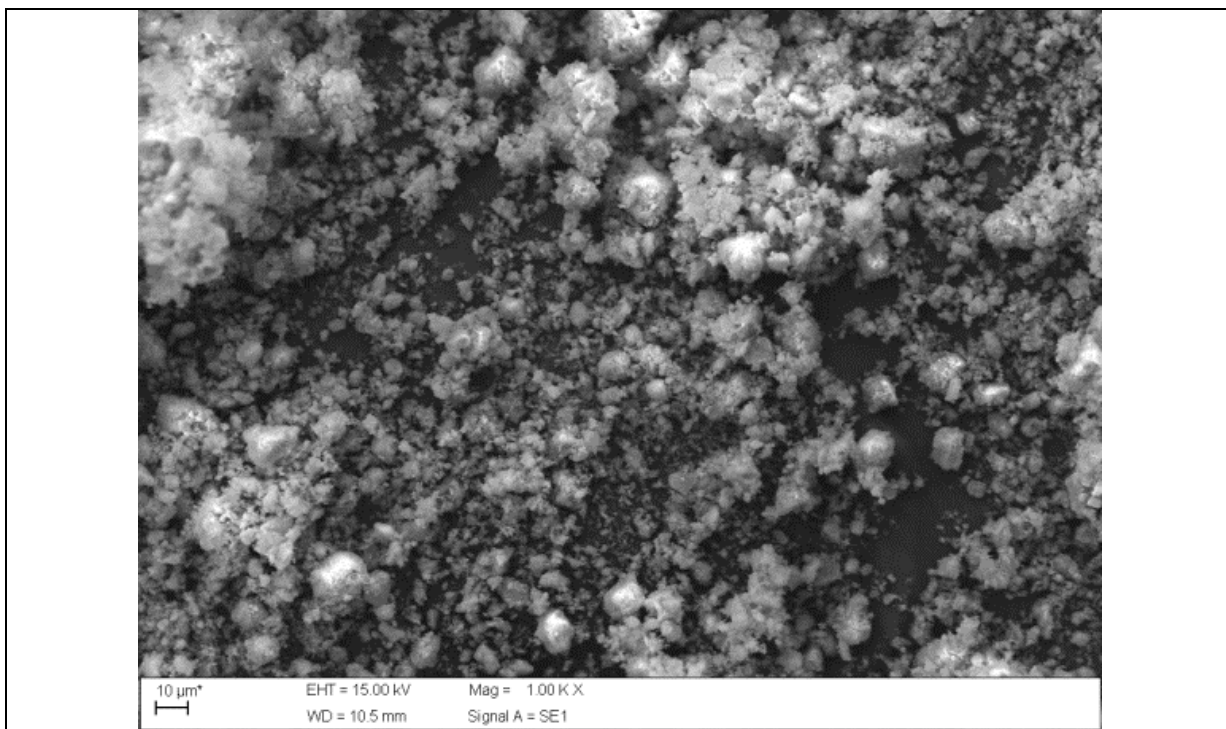


Figura 20: Difratomogramas de Raio-X dos pós de hidroxiapatita obtidos pelo método da coprecipitação calcinados a 900, 1000 e 1100°C. Condições experimentais: radiação $K\alpha$ do Cobre com varredura de ângulos entre 20 e 90°, passo de 0,02° a cada segundo, obtendo 3500 leituras. Picos marcados com (*) são referentes ao β -fosfato de cálcio

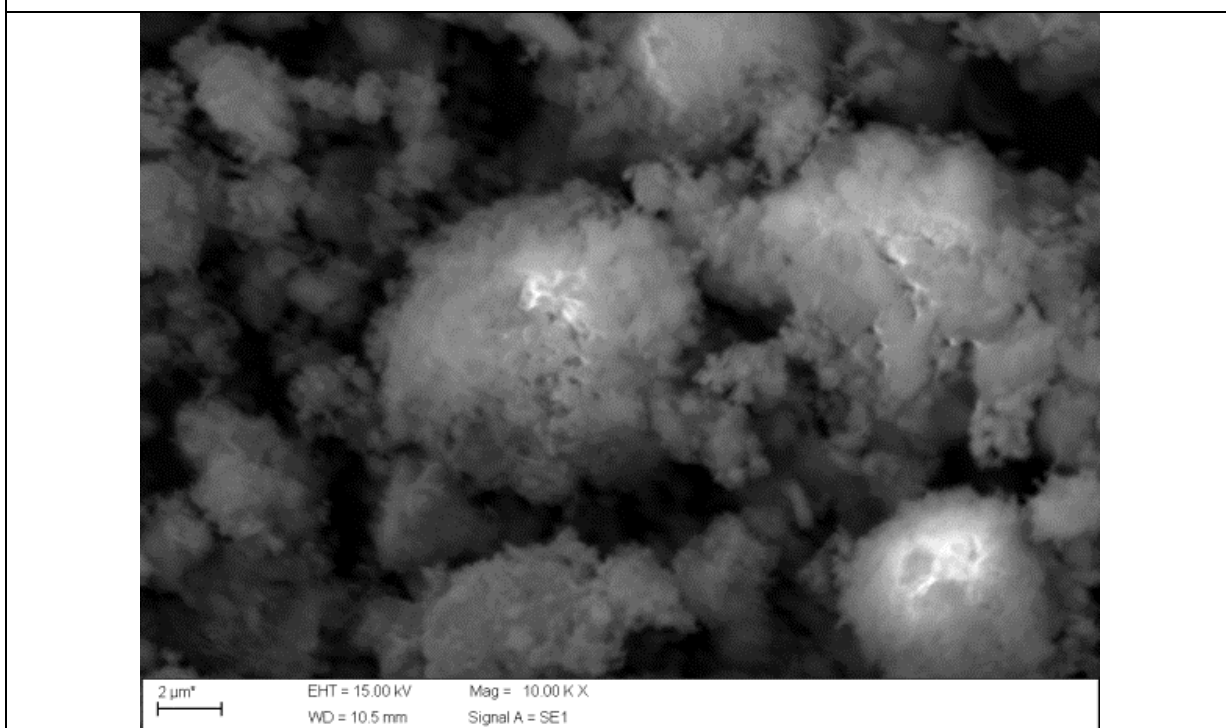
5.2.2. MEV/EDS

Utilizando-se da Microscopia Eletrônica de Varredura podemos observar a morfologia do pó obtido após tratamento térmico. Como não houve alteração na morfologia e tamanho de partículas em função do tratamento térmico, foi ilustrada somente as micrografias de HAp tratadas a 1000°C (Figura 21).

Analisando as micrografias de MEV, os pós de HAp apresentaram alto grau de aglomeração, com formação de aglomerados de partículas com tamanho variando de 3 a 15 μm . Grande parte dos aglomerados apresentam morfologia esférica. Analisando a figura 21 B, as partículas de HAp apresentam aspecto irregular, com tamanho de partículas entre 100 a 300 nm. Desta forma, as partículas podem ser consideradas como nanométricas. Partículas nanométricas apresentam tendência de aglomeração, conforme pode ser evidenciado nas micrografias.



(A) Aumento 1kX



(B) Aumento 10kX

Figura 21: As micrografias A e B são relacionadas a HAp tratadas termicamente a 1000°C, ambas devidamente recobertas com ouro, todas as imagens foram geradas pela captação de elétrons secundários.

Analisando o espectro de EDS, figura 22, nota-se a presença dos seguintes elementos químicos: cálcio, fósforo, oxigênio. O elemento químico hidrogênio não foi detectado pois o espectrômetro de EDS empregado resolve elementos a partir do Boro.

A análise qualitativa revelou a presença apenas dos elementos constituintes da hidroxiapatita. Desta forma, pode-se afirmar que não houve contaminação durante o processamento do material. A ausência de nitrogênio nos pós sintetizados, indica que a temperatura de tratamento térmico utilizado foi eficiente para degradação dos nitratos empregados nas soluções precursoras.

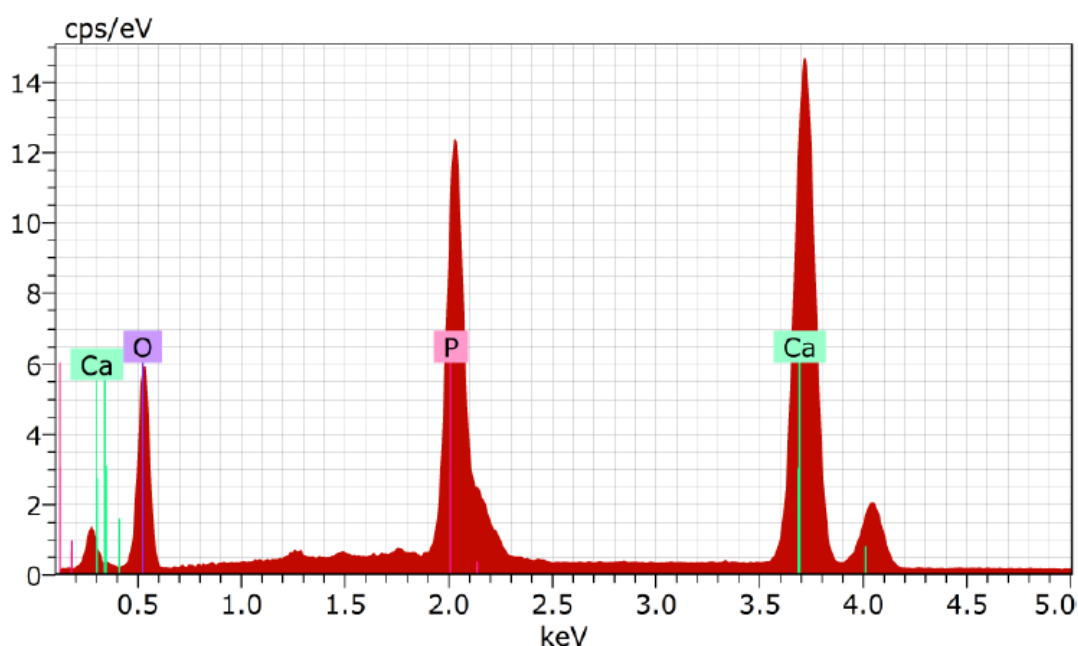


Figura 22: Espectro de EDS, referente ao pó de HAp, utilizando-se HV a 15.0kV.

5.3. Caracterização da Membrana do compósito colágeno/HAp

Os compósitos colágeno/HAp foram preparados pela dispersão dos pós de HAp no gel de colágeno de TB e PB. O gel de colágeno apresentou frações próximas de 3% (em massa) quando comparadas as amostras liofilizadas com os géis extraídos e mantidos em estoque. Desta forma, o gel de estoque apresentava água e também HCl que não foi possível extrair após o procedimento de centrifugação, conforme foi evidenciado no EDS do colágeno liofilizado, como também pelo pH do gel de colágeno, entre 4 e 5.

A hidroxiapatita não dissolveu no gel, já que inicialmente uma pequena quantidade foi misturada por vários minutos sem que houvesse dissolução da mesma. Desta forma, adicionou-se uma quantia de 40% em massa de HAp. Adição de quantidades maiores que 40% produziu um compósito heterogêneo e quebradiço. Esperava-se atingir a quantidade de 75% em HAp, similar a composição dos ossos, mas no entanto, o comprometimento da homogeneidade e maneabilidade das membranas produzidas foram impeditivos. O fato do gel de colágeno estar em meio aquoso evitou uso de solventes orgânicos, os quais poderiam ficar retidos no material, de afetando a biocompatibilidade do mesmo.

Embora não se tenha avaliado o material clinicamente, procurou-se produzir um compósito na forma de membrana que apresentassem espessura não superior a 1,0 mm, e pudesse ser recortado e manuseado de forma semelhante a membranas de colágeno existentes no mercado, quadro 1 (GenDerm, Baumer, Mogi Mirim/SP, e Lumina-Coat, Critéria, São Carlos/SP).

Quadro 1: Principais características das membranas colagênicas de origem bovina mais comuns no mercado.

	GenDerm	Lumina-Coat
Características	<ul style="list-style-type: none"> - Reabsorvível - Origem cortical bovina - Evita a invasão de células não osteogênicas para o local do implante - Atua como barreira para o tecido mole - Estabiliza a falha óssea. - Homogênea - Fácil manipulação - Rreabsorção a partir de 45 dias. - Eevita segunda cirurgia para sua remoção - Permeável a troca de nutrientes - Impede a invaginação de células não osteogênicas - Registro ANVISA: 10345500069. 	<ul style="list-style-type: none"> - Origem óssea, bovina - Constituída de colágeno do tipo I - Biocompatível e estéreo - Permita troca de fluídos - Reabsorvível - Protege o novo osso formado em sítios enxertados - Favorece a formação de vasos sanguíneos - Registro ANVISA: 80522420002.

A Figura 23 é uma fotografia do material embalado e esterilizado por radiação GAMA. As membranas foram acondicionadas individualmente (formato circular com 60mm de diâmetro) em papel crepado, seladas e esterilizadas. A embalagem utilizada não permite a entrada de bactérias, e desta forma, após abrir a embalagem o material perde sua esterilidade. Nota-se também o aspecto homogêneo da superfície texturizada, provocada pela saída do solvente durante o processo de liofilização das mesmas.

Na Figura 24 pode-se notar a maneabilidade das membranas, a qual apresentou grande facilidade de dobramento e não se rasgou ao dobrar a membrana. Este aspecto é de grande importância clínica já que durante a aplicação da membrana em cirurgias periodontais, curvaturas podem ser necessárias e, portanto, a membrana não deve partir-se ou qualquer alteração na sua estrutura após este tipo de manobra.

Outro aspecto importante é o fato da mesma não apresentar memória de forma, conforme pode ser observado na Figura 25. Nesta figura a amostra foi curvada levemente (cerca de 45°) e não retornou a forma original (plana) mantendo a curvatura imposta. Este aspecto é relevante clinicamente, já que numa cirurgia, ao posicionar a membrana sobre o osso da mandíbula, por exemplo, deve-se manter sobre o osso, mantendo a curvatura ajustada, até que seja posicionado os tecidos moles sobre a mesma.

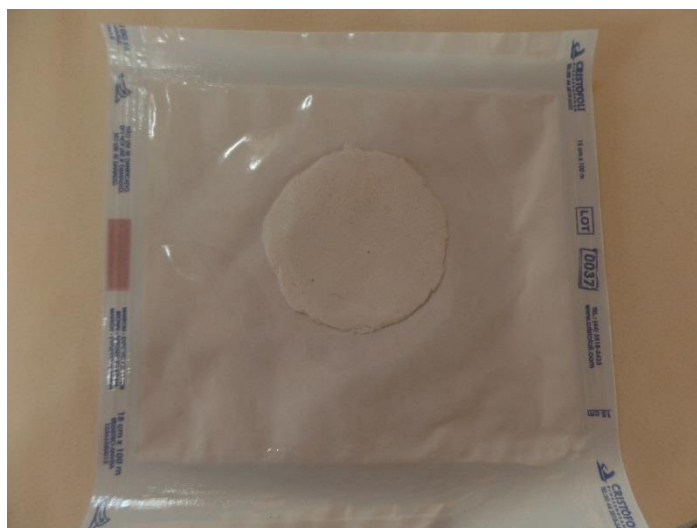


Figura 23: Fotografia da membrana de colágeno/HAp em embalagem selada de papel crepado e esterilizada por radiação gama.



Figura 24: Fotografia da membrana de colágeno/HAp sendo curvada a 180° com auxílio de uma pinça. Note que a superfície curvada se manteve intacta, não foi observada rachaduras ou outras falhas na superfície da mesma.



Figura 24: Fotografia da membrana de colágeno/HAp após realizar curvatura de aproximadamente 45° com auxílio de uma pinça. Note a membrana manteve a curvatura e não retornou a posição original.

5.3.1. MEV/EDS

A técnica de MEV foi utilizada para avaliar morfologia da membrana em sua superfície, bem como no interior da mesma (*bulk*), como também para avaliar a distribuição das partículas de HAp, o aspecto fibroso avaliado para os géis liofilizados bem como avaliar a porosidade do compósito. Foram caracterizados por MEV (Figura 26) os compósitos de

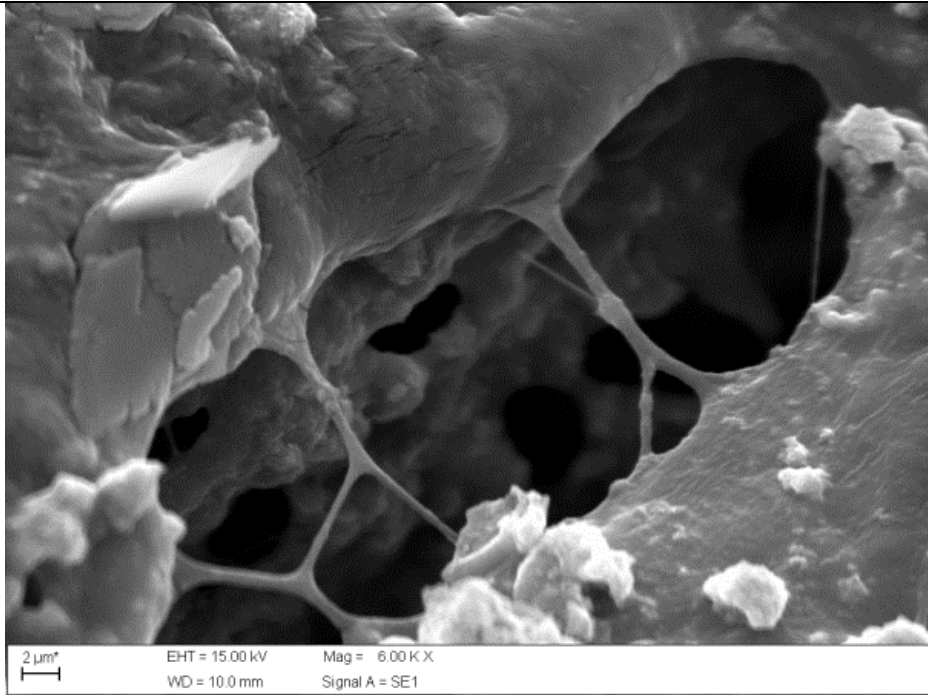
colágeno/HAp, utilizando-se uma matriz colagênica originária do pericárdio bovino e outra matriz proveniente do tendão de Aquiles bovino, dando origem a dois materiais finais distintos.

Em relação a análise da superfície das membranas, Figura 26 E e F, é possível observar a presença de aglomerados de partículas dispersos mesmo com pequeno aumento (200X). A superfície dos compósitos colágeno/HAp com matriz colagênica proveniente de PB e TB são semelhantes, porém para a TB observae-se a presença de mais poros. Analisando por entre fendas na superfície da membrana, empregando aumento de 1kX, pode-se observar que o colágeno assumiu um padrão de organização estrutural diferente daquele observado para os géis de colágeno liofilizados: ao invés do padrão fibrilar observado nos géis, para o compósito colágeno/HAp é observado um padrão lamelar. A estrutura observada sugere que as lamelas da matriz são estabilizadas pela HAp, que se distribui de forma uniforme dentro das lamelas. Mesmo para os aglomerados maiores de partículas, as lamelas de colágeno parecem envolver as partículas, tal como um tecido. Este aspecto é particularmente evidente na matriz proveniente do PB (figura 26 C).

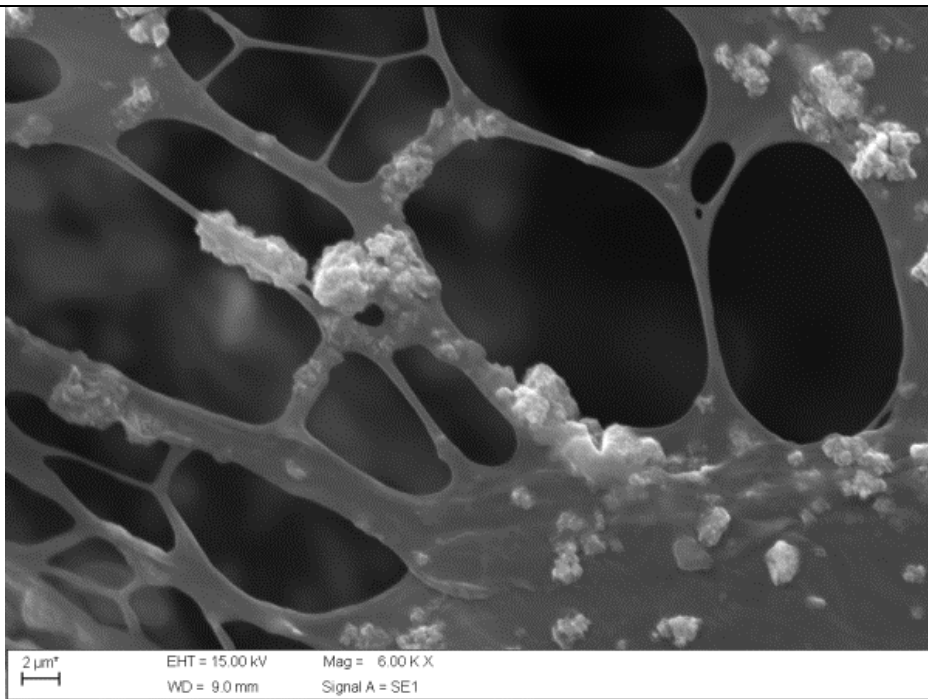
A estrutura porosa foi formada durante a saída do solvente (água) no processo de liofilização. Com a saída do solvente, houve colapso nas lamelas dando origem a fibras submicrométricas ($\sim 2\mu\text{m}$) e até mesmo nanométricas ($\sim 250\text{nm}$), figura 26 A e B. Pode-se observar a presença dos aglomerados de partículas de HAp depositadas sobre estas fibras.

Não observou-se diferenças estruturais e morfológicas nos compósitos sintetizados. Para ambas as matrizes colagênicas empregadas (PB e TB) a morfologia, distribuição de partículas e porosidade são semelhantes. O compósito obtido tem conectividade 0-3, o que significa que as partículas e aglomerados de HAp não possuem conectividade em nenhuma direção, e que a matriz colagênica é conectada tridimensionalmente.

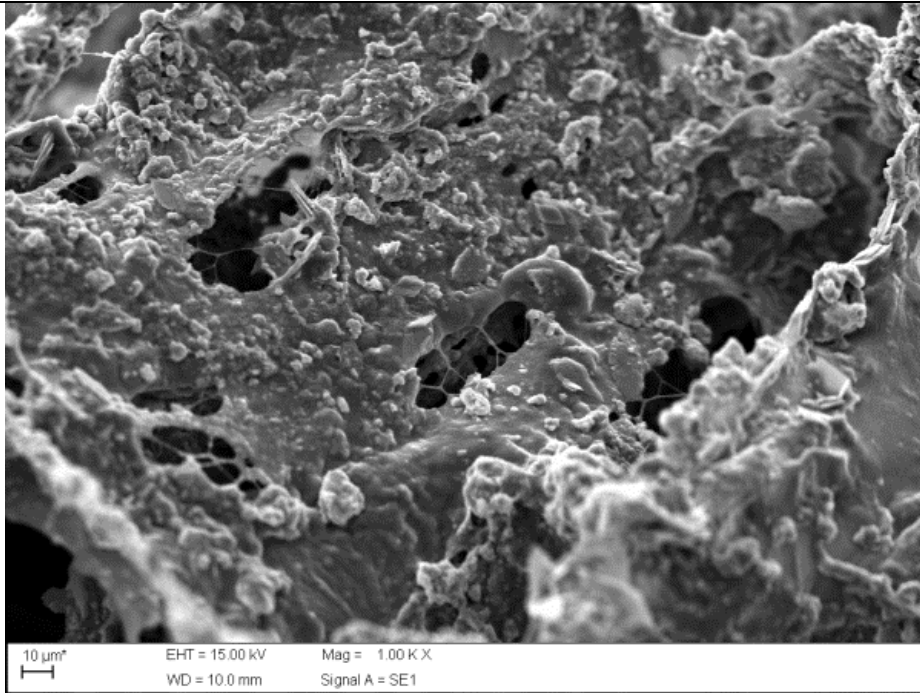
O aspecto morfológico obtido é um indicativo da potencialidade de uso deste material, já que dado a presença de porosidade, poderá ser um material osteoindutivo, e também se comportar como um arcabouço para crescimento de células ósseas (*scaffolds*) já que a matriz empregada, o colágeno, naturalmente é o material que fornece estabilidade mecânica aos osteoblastos durante processo de neoformação óssea. As partículas de HAp poderão ser reabsorvidas pelas células ósseas, e a presença dos espaços vazios na microestrutura do compósito facilitarão a troca de nutrientes, bem como poderão ser ocupadas por células ósseas jovens.



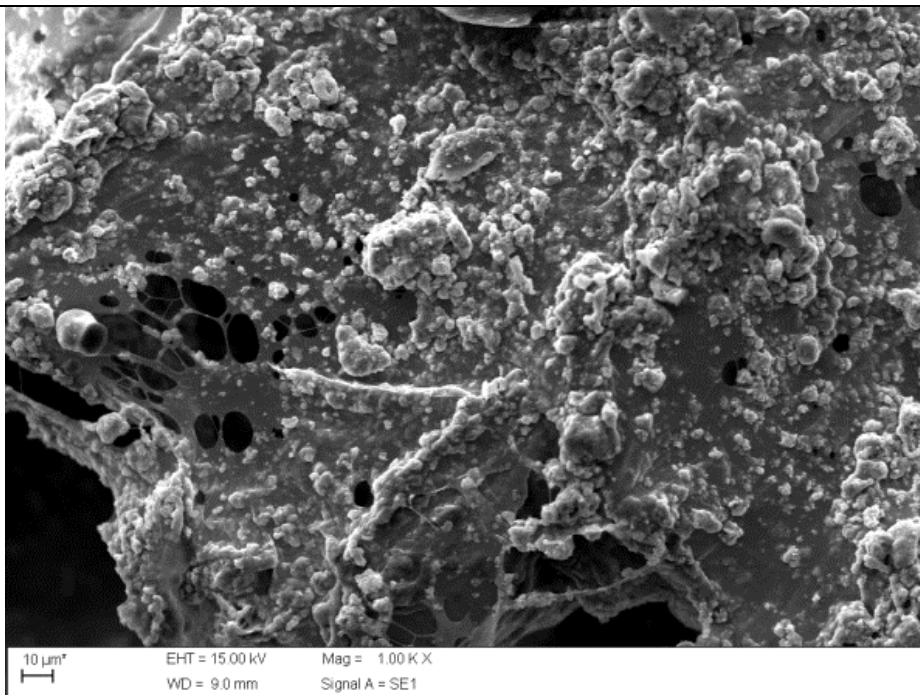
(A) Aumento de 6kX



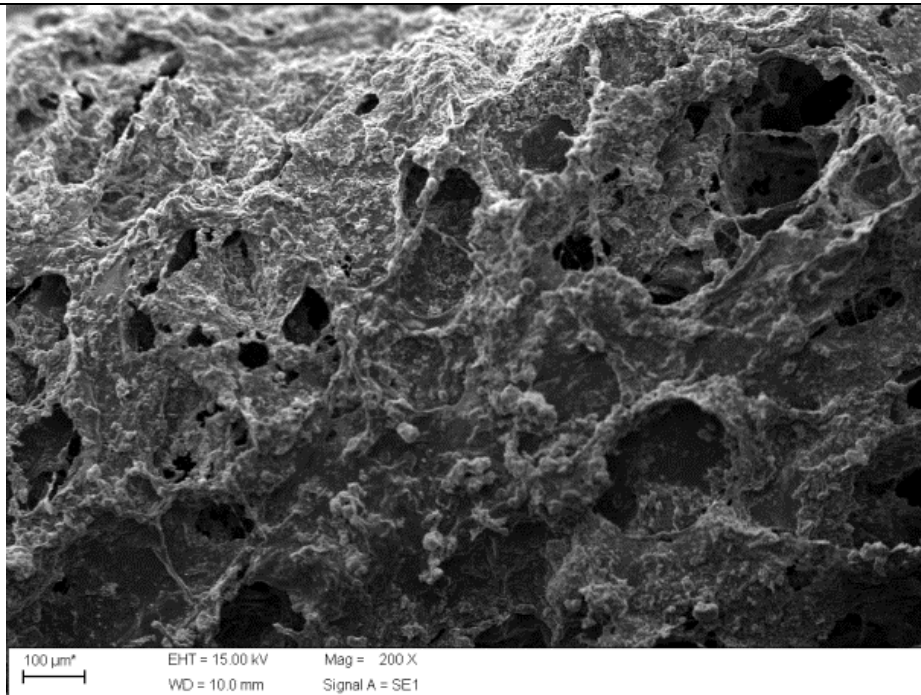
(B) Aumento de 6kX



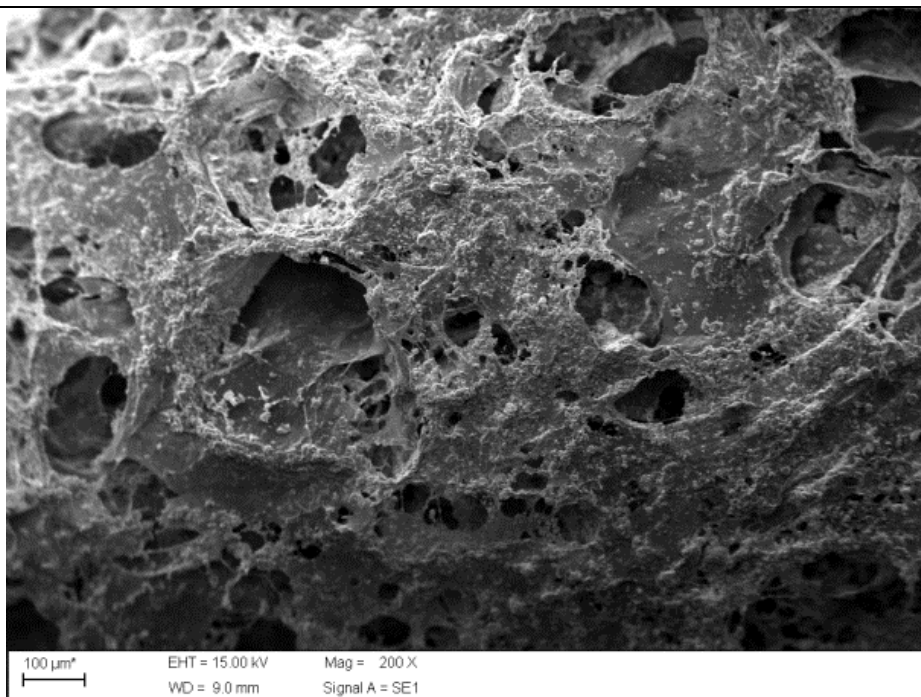
(C) Aumento de 1kX



(D) Aumento de 1kX



(E) Aumento de 200X



(F) Aumento de 200X

Figura 26: Micrografias de MEV do compósito colágeno/HAp (60/40% em massa) empregando distintas fontes de matriz colagênica: as micrografias A, C e E são relacionadas a membrana com matriz colagênica proveniente do PB, já as micrografias B, D e F são relacionadas a membrana com matriz colagênica proveniente do TB. Amostras liofilizadas e recobertas com ouro por sputtering, todas as imagens foram geradas pela captação de elétrons secundários.

Fazendo a análise de EDS da membrana de colágeno final obtida, obtivemos o espectro demonstrado na Figura 27.

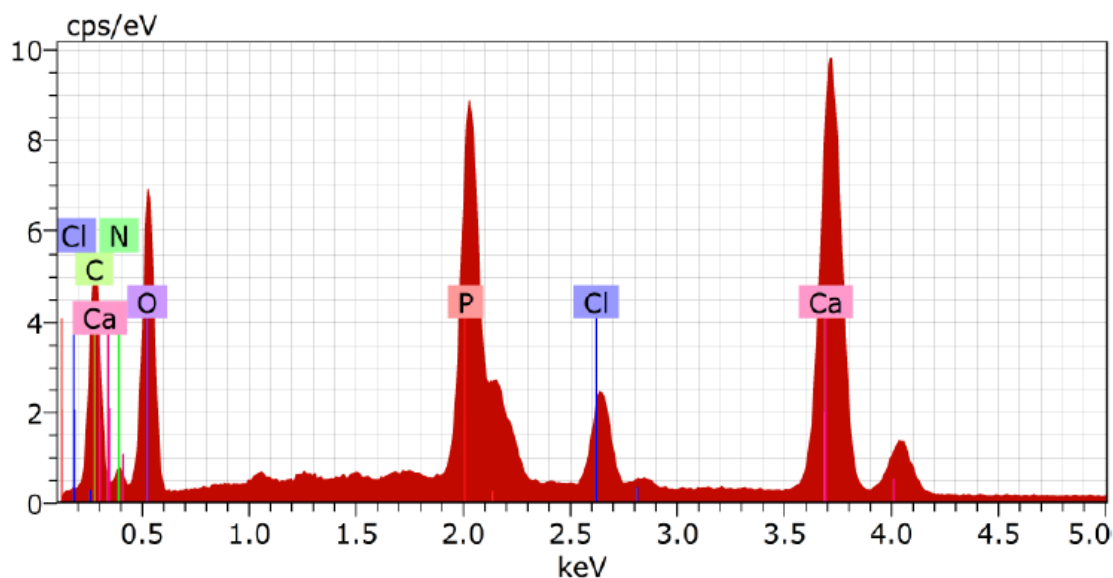


Figura 27: Espectro de EDS, referente à membrana do compósito colágeno/HAp. EDS obtido utilizando HV a 15.0kV.

Analisando o espectro de EDS, onde obtêm-se informações referentes aos composição do compósito, podemos dizer que a membrana final possui os constituintes dos colágeno, ou seja, carbono, nitrogênio, oxigênio, e da hidroxiapatita, ou seja, fósforo, cálcio e oxigênio. A presença de cloro é devido ao HCl presente no gel de colágeno, que provavelmente não foi eliminado durante o processo de liofilização.

5.3.2. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A avaliação do potencial citotóxico é um dos protocolos básicos para implantação de materiais em organismos vivos. Os ensaios empregados na avaliação citotóxica da membrana do compósito colágeno/HAp com matriz colagênica proveniente de PB e TB foram realizados segundo a norma ASTM F895-84 adaptada.

Os resultados são obtidos pela comparação dos índices de zona da membrana com índices do controle negativo (discos de papel atóxico) e positivo (fragmento de látex tóxico e fenol). A porcentagem de células degenerada indica o índice de zona (IZ), que é proporcional a área não corada pelo corante vital. A norma ASTM F895-84, estabelece os critérios, listados

na tabela 4, para classificação do potencial de citotoxicidade *in vitro* em relação ao IZ. O índice de zona é observado por Microscópio óptico, utilizando aumento de 200X. Ao centro das placas onde é depositado o meio de cultura são posicionados os materiais.

Tabela 4: Classificação do parâmetro IZ segundo a norma ASTM F895-84 (transcrito)

IZ	Descrição	Classificação
0	Nenhuma zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5 a 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Conforme pode ser verificado analisando a tabela 5, os materiais testados apresentaram índice de zona igual 0 em todas as placas. Desta forma, pode-se concluir que as referidas membranas não apresentaram efeito tóxico para a linhagem celular utilizada.

Tabela 5: Resultados de IZ obtidos na leitura das placas de culturas celulares em quadruplicatas.

Material	Índices de Zona nas Placas de Culturas Celulares			
	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4
Colágeno/HAp com matriz colagênica proveniente de PB	0	0	0	0
Colágeno/HAp com matriz colagênica proveniente de TB	0	0	0	0
Controle Negativo	0	0	0	0
Controle Positivo	4	4	4	4

Os resultados indicam que o compósito colágeno/HAp empregando matriz de colágeno proveniente de PB ou TB são atóxicos e, portanto, promissores materiais para avaliação da biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*.

6. Conclusões

Com a auxílio das técnicas de caracterização, pôde-se afirmar que a extração de colágeno foi bem sucedida, quando juntamos os dados obtidos da eletroforese que forneceu a resposta, em massa, de uma proteína dentro da faixa indicada para a literatura referente ao colágeno tipo I, auxiliada pela espectrometria de IV obtida pelo FTIR, onde temos respostas vibracionais coerentes com as ligações encontradas nos aminoácidos que compõem o colágeno do tipo I (glicina, prolina e hidroxiprolina), assim como a resposta constitucional dada pelo EDS, mostrando os elementos encontrados nestes aminoácidos.

Observações de MEV comprovam que a estrutura reticular e fibrosa do colágeno não foi danificada durante a extração, comprovando então, a correta extração do material proposto, podendo assim ser utilizado nos demais trabalhos.

A síntese de hidroxiapatita foi bem sucedida, com a formação de HAp e também uma fase de β -Fostato de cálcio. Controle mais rigoroso na temperatura de calcinação se faz necessário a fim de obter HAp pura.

Imagens MEV informou a porosidade e reticulação da estrutura do colágeno tanto de PB quanto TB, com partículas e aglomerados de partículas de HAp distribuídas de forma regular nas membranas do compósito colágeno/HAp. A presença de poros na microestrutura é uma característica desejada a uma membrana de regeneração óssea guiada, pois poderá favorecer o processo de diferenciação celular, fornecendo estabilidade mecânica a células ósseas reposicionadas, bem como nutrientes, pela reabsorção dos constituintes da membrana.

Pode-se concluir também que não houveram diferenças significativas entre os resultados, tanto para as membranas quanto para os compósitos, provenientes de tecidos do PB e do TB.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que os compósitos colágeno/HAp, independente da fonte de matriz colagênica (PB ou TB) são atóxicos e, portanto, promissores materiais para avaliação da biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*.

7. Trabalhos Futuros

As próximas etapas do trabalho serão a síntese mais detalhada da HAp, variando mais fielmente as concentrações dos reagentes utilizados, o controle mais efetivo da variação de pH e também o tempo de gotejamento e ajuste da temperatura de calcinação ideal para obtenção de HAp pura.

Estudo de biocompatibilidade do material sintetizado, comparando-o com amostras de colágeno já disponibilizadas no mercado, avaliando por ensaios estatísticos (ANOVA)

Outra etapa será a aplicação desse material em animais, para avaliar o reparo ósseo do material sintetizado comparativamente a outros materiais comerciais.

8. Referências Bibliográficas

- 1 DAHLIN, C.; LINDE, A.; GOTTLAW, J.; NYMAN, S. **Healing of bone defects by guided tissue regeneration**. *Plast Reconstructive Surg*, v.81, ed.5, p.672-676, May 1988
- 2 QUESADA, G. A. T.et al. **Análise das membranas de colágeno bovino, comparativamente às membranas de politetrafluoretileno expandido, como barreira de proteção em regenerações ósseas guiadas para posterior colocação de implantes e no tratamento de periimplantes com e sem o uso de enxertos bovinos**, *Revista Dentística on line*, ano 10, n.20, p.29-38. Santa Maria, 2011
- 3 ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, S. H.; **Biomateriais: Fundamentos & Aplicações**. Guanabara Koogan. Cultura Médica. Reimpressão
- 4 MANN, S. WEBB, J.; WILLIAMS, R.J.P. **Biomineralization: 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
- 5 LeGEROS, R. Z. **Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates**. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.1, p.81-98, 2002
- 6 VERCÍK, L. C. O. et al. **Recobrimento De Hidroxiapatita Sobre Estrutura De Colágeno Utilizada Como Membrana De Regeneração Tecidual Guiada**. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara /Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo 2004
- 7 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
- 8 TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. **Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-Quitossana**, *Quím. Nova*, v.25, n. 6, p.943-948. São Carlos, 2002
- 9 SANTOS, M. H.; **Síntese e Caracterização de Biocompósitos Fosfatados de Cálcio/Colágeno Dopados com Zinco**; Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005
- 10 WILLIAM, D. F. **Definitions in Biomaterials**, ed. 1987, New York: Elsevier
- 11 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
- 12 Li Zheng, Xianfang Jiang, Xuening Chen, Hongsong Fan, Xingdong Zhang. **Evaluation of novel in situ synthesized nano-hydroxyapatite/collagen/alginate hydrogels for osteochondral tissue engineering**. *Biomed. Mater.* 9 (2014) 065004
- 13 ANUSAVICE, K. J. **Phillips: materiais dentários**. Tradução por Edson Jorge Lima Moreira. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998

- 14 SANTOS, H. M. **Síntese e Caracterização de Biocompósitos Fosfatados de Cálcio/Colágeno Dopados com Zinco**. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas. Universidade Federal de Minas Gerais. 2005
- 15 SILVER, F.; DOILLON, C. **Biocompatibility, interations and implantable materials**. New York: VCR. v.1. 1989
- 16 PARK, J. **Biomaterials Science and engineering**. New York. Plenum Press. Ed.1984
- 17 RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: na introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996
- 18 HENCH, L. L. **Bioceramics: from concept to clinic**. Journal of American Ceramics Society, v.74, p.1487-1510, 1994
- 19 EVANS, G. R. D. et al. **In vivo evaluation of poly(-lactic acid) porous conduits for pheripheral nerve regeneration**. Biomaterials, Guildford, v.20, n.12, p.1109-1115, 1999
- 20 DAVIES, J. E. **The bone material interface**. Toronto: University of Toronto Press. 1990
- 21 LeGEROS, R. Z. **Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine: in Monographs in Oral Science**. Basel: Karger, 1991
- 22 SCHUMANN, W. **Minerals of the world**. New York: Sterling, 1992
- 23 JONES, F. H. **Teeth and bones: application of surface science to dental materials and related biomaterials**. Surface Science Reports, n.42, p.75-205, 2001
- 24 OKAZAKI, M.; SATO, M. **Computer graphics of hydroxyapatite and _-tricalcium phosphate**. Biomaterials, v.11, p.573-578, 1990
- 25 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.
- 26 FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. **Formation of Calcium deficiente Hidroxyapatite at near-physiological temperature**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v.3, p.299-305, 1992
- 27 ANUSAVICE, K. J. **Phillips: materiais dentários**. Tradução por Edson Jorge Lima Moreira. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.5, 1998
- 28 ALEXANDER, H. Composites. In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, Chapter 2.8, 1996
- 29 OGAWA, C. A.; PELPIS, A. M. G. **Estudos preliminares de liberação de ciprofloxacina em compósitos hidroxiapatita:colágeno**. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v.17, n.3p.123-130, 2001

- 30 LIN, X. F.; FAN, H. S.; LI, X. D.; TANG, M.; ZHANG, X. D. **Evaluation of bioactivity of nano-hydroxyapatite/collagen composite *in vitro***. Key Engineering Materials, v.284-286, 553-556, 2005
- 31 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, 2004
- 32 TEM CATE, A. R. **Oral histology: development, structure and function**. Mosby. ed.4, 1994
- 33 OURSLER, M. J.; BELLIDO, T. **Bone cells. American Society for Bone and Mineral Research – ASBMR**. 2003
- 34 SWAN, J. **The skeletal system. Online Anatomy & Physiology Resources**. University of New Mexico. Class notes 237. 2003
- 35 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, Chapter2.7, 1996
- 36 GRISTINA, A. G. **Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration**. Science, Washington, v.237, n.4822, p.1588-1595, 1987
- 37 BURET, A. et al. **An *in vivo* model to study the pathology of infectious biofilms on biomaterial surfaces**. Journal of Biomedical Materials Research, New York, v.25, 1991
- 38 CHEN, Y. S. et al. **Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin**. Biomaterials, Guildford, v.21, 2000
- 39 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.03-32, 1999
- 40 COPELAND, R. A. **Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols**. New York: Chapman & Hall. 1994
- 41 ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. **Como purificar proteínas? Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.24, p.30-35, 2002
- 42 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. Dissertação, Mestrado em Ciências, Química Analítica
- 43 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, 1996
- 44 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

- 45 ANA MARIA MALISKA. **Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise.** Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Departamento de Engenharia Mecânica – EMC. Laboratório de Materiais – LABMAT. Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens – LCMAI
- 46 GEORGE SOCRATES. **Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies.** Tables and Charts. John Wiley & Sons LTDA, ed.3, 2001
- 47 WILLIAM D. CALLISTER, Jr. **Materials Science and Engineering** – John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991
- 48 Nurrulhidayah, A.F., Che Man, Y.B., Rohman, A., Amin, I., Shuhaimi, M., Khatib, A. **Authentication analysis of butter from beef fat using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics.** International Food Research Journal 20(3): 1383-1388 (2013)
- 49 Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E. F. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd ed., 2001
- 50 Bottino, M. C.; Thomas, V.; Schimidt, G.; et al. **Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration-A materials perspective.** Dental Materials. v.28, ed.7, p.703-721, 2012
- 51 Chou, J.; Komuro, M.; Hao, J.; et al. **Bioreabsorbable zinc hydroxyapatite guided bone regeneration membrane for bone regeneration.** Clinical Oral Implants Research. v.27, ed.3, p.354-360, 2016
- 52 Tang, Y.; Chen, L.; Zhao, K.; Wu, Z.; Wang, Y; Tan, Q. **Fabrication of PLGA/HA (core)-collagen/amoxicillin, (shell) nanofiber membranes through coaxial electrospinning for guided tissue regeneration.** Composites Science and Technology. v.125, p.100-107, 2016