UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Mineralização *in vitro* de matrizes colagênicas derivadas
de tendões calcâneos bovinos e de avestruz

KLAUS GIOVANELLI KIRSCHBAUER

São Carlos

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Mineralização *in vitro* de matrizes colagênicas derivadas
de tendões calcâneos bovinos e de avestruz

KLAUS GIOVANELLI KIRSCHBAUER

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de São
Carlos, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Química
Analítica).

Orientadora: Profa. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2009

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado o dom da vida e por me permitir ter uma família maravilhosa, cheia de saúde e de amigos.

Aos meus pais (Luiz Arno e Ana Beatriz), pelo esforço que tiveram para me manter estudando, mesmo depois de tantos percalços. Pelo carinho, atenção, compreensão e incentivo ao longo de todo esse tempo distante, Muito Obrigado!

Também agradeço ao meu irmão Konrad, pela ajuda, pela companhia e pelo incentivo.

À Profa Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, pelo apoio, pela orientação e pela amizade e pela paciência durante esse tempo.

Ao pessoal do laboratório, aos que ficam e aos que já se foram: Virginia, Thelma, Fabiana, Marília, Edgar, Minero, Maitê, Pina, Edson, Verde, Juba “Jackson” (é nós...).

À galera da turma 03: Miyage (eterno parceiro de lab.), MP, Bob, Office, Koxonha, Slot, Fima, Scooby, Nervão, Nervinho, Xaruto, Zero, Sardinh,a Tio Chico, Maringá, Sabugo, Esponja, Negão, Wilson, Babi, Sílvia e todos os outros. Também às pessoas que conheci depois: Turcão, Bolão, Rala, e todos de 04 pra frente.

À Fazenda Ninhos Avestruz AS e à Casa de Carnes Santa Paula pelos tendões utilizados nesse trabalho.

Aos funcionários da pós, do CAQI e todos os professores que contribuíram para a minha formação... Enfim, a todos que, de alguma forma, me ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	4
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUÇÃO	14
I.1.Biomateriais e Engenharia de Tecidos	14
I.2.Colágeno	19
I.2.1.Colágeno tipo I	21
I.3.Matrizes de colágeno	24
I.4.Mineralização	25
I.5.Osso	26
I.6.Tendão	29
II.OBJETIVOS	31
III.METODOLOGIA	32
III.1.O processo de mineralização	34

III.2.Caracterização	37
III.2.1.Termogravimetria (TG)	37
III.2.2.Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	37
III.2.3.Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)	38
III.2.4.Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
III.2.5.Dispersão de Energia por Raios-X (EDX).....	39
IV.RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
IV.1.Obtenção das Matrizes	40
IV.2.Caracterização das Matrizes	42
IV.2.1.Termogravimetria (TG).....	42
IV.2.2.Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	54
IV.2.3.Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
IV.2.4.Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FT-IR).....	68
IV.2.5. Dispersão de Energia por Raios-X (EDX).	71
V. CONCLUSÕES	75
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de funções biológicas que podem ser substituídas ou auxiliadas por biomateriais.....	17
Figura 2: Figura esquemática do tropocolágeno.....	21
Figura 4: Hidrólise dos resíduos de glutamina em meio básico.....	24
Figura 5: Estrutura do osso.....	27
Figura 6: Arranjo estrutural do colágeno de da hidroxiapatita no osso	28
Figura 7: Organização da estrutura do tendão	29
Figura 8: Tipos de cruzamento das fibras de colágeno em tendões: Paralelas (A), cruzamento simples (B), duas fibras cruzadas e uma longitudinal (C), dobra (D) e enlace (E).....	30
Figura 9: Tendão de avestruz (A) e bovino (B).....	32
Figura 10: Esquema do processo de mineralização por imersão alternada. .	35
Figura 11: Esquema do desenvolvimento experimental.	36
Figura 12: mecanismo de deposição do fosfato de cálcio sobre as matrizes aniônicas	40
Figura 13: Fotografias digitais das matrizes de colágeno TA960 (a) e TA96C6 (b)	41

Figura 14: Fotografias digitais das matrizes de colágeno TB960 (a) e TB96C6 (b)	41
Figura 15: Curva termogravimétrica da hidroxiapatita sintética.	43
Figura 16: Curvas termogravimétricas para os tendões nativos.	44
Figura 17: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 72 horas.....	45
Figura 18: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 96 horas.....	46
Figura 19: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 120 horas.....	47
Figura 20: Relação entre número de ciclos e a porcentagem de material inorgânico para as matrizes de tendão de avestruz.	49
Figura 21: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 72 horas.....	50
Figura 22: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 96 horas.....	51
Figura 23: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 120 horas.....	52
Figura 24: Relação entre número de ciclos e a porcentagem de material inorgânico para as matrizes de tendão bovino.	53

Figura 25: Esquema da desnaturação do colágeno.	54
Figura 26: Curva representativa da determinação de Td por DSC para o tendão bovino nativo e a matriz TB120C6.....	55
Figura 27: Fotomicrografias das matrizes, TA72C0 (a) , TA96C0 (c) e TA120C0 (d) com um aumento de 2000 vezes.....	58
Figura 28: Fotomicrografias das matrizes, TB72C0 (a) , TB96C0 (c) e TB120C0 (d) com um aumento de 2000 vezes.....	59
Figura 29: Fotomicrografias superficial e de interna da matriz TA96C6 com um aumento de 100 vezes.	60
Figura 30: Fotomicrografias das matrizes, TA72C1 (a) , TA72C2 (b) , TA72C3 (c) , TA72C4 (d) , TA72C5 (e) e TA72C6 (f) com um aumento de 2000 vezes.	61
Figura 31: Fotomicrografias das matrizes, TA96C1 (a) , TA96C2 (b) , TA96C3 (c) , TA96C4 (d) , TA96C5 (e) e TA96C6 (f) com um aumento de 2000 vezes.	62
Figura 32: Fotomicrografias das matrizes TA120C1 (b) , TA120C2 (c) , TA120C3 (d) , TA120C4 (e) , TA120C5 (f) e TA120C6 (g) com um aumento de 2000 vezes.....	63
Figura 33: Fotomicrografias das matrizes, TB72C1 (a) , TB72C2 (b) , TB72C3 (c) , TB72C4 (d) , TB72C5 (e) e TB72C6 (f) com um aumento de 2000 vezes.	64
Figura 34: Fotomicrografias das matrizes, TB96C1 (a) , TB96C2 (b) , TB96C3 (c) , TB96C4 (d) , TB96C5 (e) e TB96C6 (f) com um aumento de 2000 vezes.	65

Figura 35: Fotomicrografias das matrizes, TB120C1 (a) , TB120C2 (b) , TB120C3 (c) , TB120C4 (d) , TB120C5 (e) e TB120C6 (f) com um aumento de 2000 vezes.....	66
Figura 36: Fotomicrografia da matriz TB120C6 com um aumento de 10000 vezes.....	67
Figura 37: Espectro FT-IR da hidroxiapatita sintética.	68
Figura 38: Espectro FT-IR para os resíduos de TG das matrizes de tendão de avestruz.....	69
Figura 39: Espectro FT-IR para os resíduos de TG das matrizes de tendão bovino.....	70
Figura 40: Gráficos de EDX para as matrizes TA72C6 (a) , TA96C6 (b) e TA120C6 (c)	72
Figura 41: Gráficos de EDX para as matrizes TB72C6 (a) , TB96C6 (b) e TB120C6 (c)	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 72h	45
Tabela 2: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 96h	46
Tabela 3: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 120h	47
Tabela 4: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 72h.	50
Tabela 5: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 96h.	51
Tabela 6: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 120h	52
Tabela 7: Temperatura de desnaturação (T_d) das matrizes de colágeno aniônico oriundas de tendão de avestruz.	56
Tabela 8: Temperatura de desnaturação (T_d) das matrizes de colágeno aniônico oriundas de tendão bovino.	57
Tabela 9: Valores médios de relação cálcio/fósforo, erro e desvio padrão. ...	74

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

C0 - Não mineralizado.

C1 - Um ciclo de mineralização.

C2 - Dois ciclos de mineralização.

C3 - Três ciclos de mineralização.

C4 - Quatro ciclos de mineralização.

C5 - Cinco ciclos de mineralização.

C6 - Seis ciclos de mineralização.

DSC – Calorimetria exploratória diferencial.

EDX – Dispersão de energia por raios-x.

FT-IR – Espectroscopia de absorção no infravermelho

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

TA120 – Matriz de colágeno oriundo de tendão de avestruz obtida após 120h de tratamento alcalino.

TA72 – Matriz de colágeno oriundo de tendão de avestruz obtida após 72 h de tratamento alcalino.

TA96 – Matriz de colágeno oriundo de tendão de avestruz obtida após 96h de tratamento alcalino.

TANAT – Tendão de avestruz nativo.

TB120 – Matriz de colágeno oriundo de tendão bovino obtida após 120h de tratamento alcalino.

TB72 – Matriz de colágeno oriundo de tendão bovino obtida após 72h de tratamento alcalino.

TB96 – Matriz de colágeno oriundo de tendão bovino obtida após 96h de tratamento alcalino.

TBNAT – Tendão bovino nativo.

Td – Temperatura de desnaturação

TG – Termogravimetria.

RESUMO

Um dos maiores desafios da ortopedia moderna é recuperar o tecido ósseo que tenha sido perdido por motivo de doença ou acidente. Na busca de substitutos para os enxertos, tem-se utilizado comumente biomateriais para recuperação desse tecido. Um dos vários tipos de biomateriais usados são os preparados à base de colágeno. Além de desempenhar papel importante na estrutura dos tecidos, o colágeno é capaz de orientar a formação de tecidos em desenvolvimento fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial. Uma nova vertente de pesquisa do processo de mineralização de matrizes colagênicas que vem sendo desenvolvida é a análise de como a organização do tecido interfere no modo como ocorre esse processo de deposição. O uso do tendão vem sido pesquisado devido ao fato de ser um tecido extremamente organizado, com as fibras colagênicas alinhadas por toda a sua extensão. Este trabalho teve como objetivo a preparação e caracterização de matrizes de colágeno tipo I, oriundas de tendão bovino (TB) e avestruz (TA) após a hidrólise alcalina e mineralização. Os tendões foram colocados em solução alcalina contendo sais de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} por 72, 96 e 120 h a 25°C e depois equilibrados em solução de sais, lavados em H_3BO_3 , EDTA e água. As matrizes resultantes foram então mineralizadas em soluções de $CaCl_2$ 0,2 mol L⁻¹, pH = 7,4 e de Na_2HPO_4 0,12 mol L⁻¹ pH = 9,0 durante 6 h, ocorrendo a troca de soluções a cada 30 min. As matrizes antes e após mineralização foram congeladas, liofilizadas e submetidas à análise termogravimétrica (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infra-vermelho (FT-IR) e dispersão de energia por raios-X (EDX). DSC mostrou que não houve desnaturação do colágeno durante o processo de tratamento alcalino e mineralização. A análise termogravimétrica mostrou que houve deposição de fosfato de cálcio, com o valor dependendo do número de ciclos de mineralização. MEV mostrou que essa mineralização não é uniforme, ocorrendo a formação de aglomerados. FT-IR e EDX mostrou que o fosfato de cálcio depositado provavelmente seja hidroxiapatita, mas não em sua estrutura estequiométrica.

ABSTRACT

One of greatest challenges of modern orthopedics is to restore bone tissue that has been lost due to sickness or accident. Searching for substitutes for grafts, biomaterials have been commonly used for recovery of bone tissue. Between different types of biomaterials, several are based on collagen. In addition to have important role in tissue structure, collagen is able to guide the formation of tissues, a highly favorable fact in its use as biomaterial. A possible research in collagen scaffolds mineralization is the analysis of how tissue organization interferes in deposition process. The tendon has been used because it is a highly organized tissue, with collagen fibers lined on its structure. This research aims the preparation and characterization of type I collagen scaffolds, prepared from bovine tendon (TB) and ostrich tendon (TA) after alkaline hydrolysis and mineralization. Tendons were maintained in alkaline solution containing K^+ , Na^+ and Ca^{2+} ions for 72, 96 and 120 hours at $25^{\circ}C$ and then equilibrated in salt solution, washed with H_3BO_3 , EDTA and water. The resulting matrices were then mineralized in 0.2 mol L^{-1} , $pH = 7.4$ $CaCl_2$ solution and 0.12 mol L^{-1} Na_2HPO_4 $pH = 9.0$ for 6 h, changing solutions after 30 minutes. The matrices before and after mineralization were frozen, lyophilized and subjected to thermogravimetric analysis (TG), differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FT-IR) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). DSC showed that the collagen was not denaturated by alkaline treatment process and mineralization. TG analysis showed deposition of calcium phosphate on the scaffolds, with values depending on the number of mineralization cycles. SEM showed that the mineralization is not uniform, forming clusters of phosphate crystals. FT-IR and EDS showed that the deposited calcium phosphate is probably hydroxyapatite, but not in its stoichiometric structure.

I. INTRODUÇÃO

I.1.Biomateriais e Engenharia de Tecidos

O mau funcionamento ou perda de função total de um órgão ou tecido, resultante de doenças ou ferimentos é um dos mais importantes e preocupantes problemas de saúde, atingindo um número muito significativo de pessoas em todo o mundo. A melhor abordagem clínica para a solução destes problemas é a reconstrução ou transplante cirúrgico. O transplante de órgãos ou tecidos é restrito devido à falta de doadores^[1]. Outras terapias para tratar destes problemas incluem a reconstrução cirúrgica, terapia de drogas, próteses e dispositivos mecânicos. Apesar destas terapias não terem limites de estoque, elas também tem problemas. Por exemplo, próteses sintéticas e dispositivos médicos não podem substituir todas as funções do dano ou perda de órgãos ou tecidos^[2,3].

Um dos maiores desafios da ortopedia moderna é recuperar o tecido ósseo que tenha sido perdido por qualquer motivo. Nos dias de hoje, o método mais usado na reconstrução dos defeitos ósseos é a utilização de enxertos, que podem ser de três tipos:

- Os enxertos heterólogos, de origem animal, são os mais usados, pois são de fácil obtenção e disponibilidade, porém oferecem risco de contaminação e/ou rejeição pelo paciente.

- Os enxertos autólogos, de uma região do paciente pra outra, têm sido considerado o melhor substituto, pois contêm na sua estrutura células osteogênicas

viáveis e fatores de crescimento adequados à osteogênese^[4], Porém, sua utilização é limitada devido ao risco de necrosamento do local e, dependendo a extensão do dano, da insuficiência da quantidade disponível.

- Os enxertos homólogos, de uma pessoa pra outra, não apresentam as complicações relacionadas com a área doadora, contudo, têm a desvantagem da resposta inflamatória que pode ser causada pelo corpo ao considerar o enxerto um corpo estranho^[5], além da possibilidade de contaminações como, por exemplo, por HIV.

Na busca de substitutos para os enxertos, tem-se utilizado comumente biomateriais para recuperação de tecido ósseo. O termo biomaterial pode ser aplicado a qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que seja farmacologicamente inerte, desenvolvida para ser implantada e/ou incorporada em um período de tempo, podendo servir ou não como matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido, onde houve perda de matéria viva ou de sua função^[6].

A natureza química de um biomaterial é uma característica fundamental que o classifica em duas grandes categorias:

- Naturais: Colágeno, Quitosana e outros polissacarídeos.
- Sintéticos: Cerâmicas, polímeros sintéticos, metais e ligas metálicas.

Além do tecido ósseo, os biomateriais podem ser usados em diferentes aplicações, como enxertos arteriais, implantes mamários e dentais, articulações, válvulas cardíacas, entre outros^[7].

As principais características de um biomaterial são ^[8]:

- Ser atóxico
- Ser não-carcinogênico
- Ter resistência mecânica adequada para sua utilização
- Ser biofuncional, ou seja, desempenhar a função ao qual ele foi designado com o máximo de eficiência.
- Ter propriedades químicas projetadas para o trabalho de reconstrução;
- Ter processo de produção reprodutível
- Ter peso e densidade adequados à sua função.
- Ser biocompatível, ou seja, não induzir respostas teciduais ou imunológicas.

Em adição, suas propriedades mecânicas devem incluir permeabilidade, estabilidade, elasticidade, flexibilidade, reabsorvível a uma taxa congruente com o tecido substituído ^[9].

A grande vantagem da utilização de biomateriais está relacionada com seu fornecimento ilimitado, porém eles não substituem por completo a função de um órgão ou tecido perdido. O desenvolvimento desses biomateriais está baseado nos mecanismos controladores da função que se pretende substituir e na relação estrutural do material com a propriedade desejada. É neste contexto que surge nos anos 60 um novo ramo da ciência - a Engenharia de Tecidos ^[10] - que é uma área interdisciplinar que reúne conceitos da engenharia e ciências da vida tendo como principal objetivo o desenvolvimento de biomateriais que permitam restaurar, manter ou melhorar as funções de determinado tecido ou órgão. A Figura 1 traz um

esquema representativo das funções biológicas que podem ser substituídas por biomateriais.

Figura 1: Esquema representativo de funções biológicas que podem ser substituídas ou auxiliadas por biomateriais. (Adaptado de ^[8])

As pesquisas e utilização desses materiais na área médica têm conseguido grandes avanços nos últimos anos, graças a um melhor entendimento dos mecanismos de interação do material com os tecidos do corpo. O maior objetivo dos profissionais da área é produzir materiais, para fins médicos, que sejam compatíveis, duráveis e funcionais quando em interação com sistemas biológicos.

As principais estratégias adotadas para o desenvolvimento de materiais a serem empregados na área de engenharia de tecido são as seguintes ^[6]:

- Utilização de células isoladas do próprio paciente ou células substitutas, que são cultivadas fora do corpo e posteriormente implantadas.

- Cultura de tecidos fora do corpo humano para posterior implantação, para reparar ou substituir tecidos danificados. Os exemplos mais comuns para esta estratégia são os enxertos de pele utilizados no tratamento de queimaduras graves.

- Utilização de substâncias que induzem a regeneração do tecido danificado. São exemplos os fatores de crescimento e os fatores de adesão.

- Utilização de matrizes poliméricas, que são normalmente utilizadas como um suporte físico, porém, em alguns casos, estas induzem a regeneração tecidual, por meio de propriedades estruturais e físico-químicas de sua superfície.

Dentro da utilização de matrizes, temos a estratégia biomimética, utilizada no desenvolvimento de novos materiais para reconstrução de tecido ósseo que se inspira nos processos bioquímicos e biofísicos que ocorrem na formação dos tecidos mineralizados ^[11-14]. A matriz extracelular na qual os cristais de sais de cálcio se depositam durante a formação de tecido ósseo é principalmente colágeno tipo I, que constitui cerca de 90% da matéria orgânica do osso. Sendo assim, matrizes que

contenham colágeno e hidroxiapatita (HA) são materiais promissores para serem usados como base para um substituto do osso, dentro da engenharia de tecidos^[15,16].

Todas as matrizes usadas para desenvolver tecido têm três funções principais^[17]:

- facilitar a localização e liberação de células para locais específicos no corpo;
- definir e manter um espaço tridimensional para a formação de novos tecidos com estruturas apropriadas;
- direcionar o desenvolvimento de novos tecidos com funções adequadas.

I.2.Colágeno

O colágeno é uma proteína estável e fibrosa sintetizada por células do tecido conjuntivo, denominadas fibroblastos. Ele tem como função manter a integridade estrutural do tecido e conferir resistência mecânica. Por ser estável, sua renovação é muito lenta, mas o ritmo de sua renovação varia de um órgão para outro. Por exemplo, o colágeno dos tendões quase não é renovado, enquanto que o do conjuntivo frouxo (pele) renova-se em ritmo relativamente rápido.

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrado na pele, em ossos, tendões, vasos sanguíneos, intestinos e dentes. Suas propriedades diferem de acordo com o tipo de organização das fibras que o constituem. Tem como principal característica a formação de fibras insolúveis que possuem alta força elástica, o que o torna o principal responsável pela modulação

das forças exercidas sobre o organismo. Além de desempenhar importante papel na estrutura dos tecidos, o colágeno é capaz de orientar a formação de tecidos em desenvolvimento fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial^[18,19].

Atualmente, são identificados 29 tipos de colágeno^[20], que se diferenciam na composição dos aminoácidos, nos domínios de cada molécula e nos diferentes arranjos estruturais.

As principais vantagens de se usar o colágeno como biomaterial são^[21]:

- Grande disponibilidade.
- Baixa antigenicidade.
- Atóxico
- Biocompatível
- Sua degradabilidade pode ser controlada através de agentes de reticulação.
- Pode ser usado sob várias formas (matrizes, géis, esponjas)
- É facilmente absorvido pelo corpo humano.

Devido às suas várias propriedades físico-químicas (reticulação variável, que controla o grau de embebição), físico-mecânicas (entrelaçamento ou orientação das fibras) e biológicas (antigenicidade mínima, reduzida por tratamento com enzimas ou por reticulação), o colágeno é muito utilizado como material para implante tanto na forma pura como géis de colágeno^[21], ou ainda associado a outras moléculas, como polissacarídeos^[22]. Assim, o colágeno tem sido utilizado em aplicações médicas na reconstrução de tecidos moles, revestimento de queimaduras e outras lesões e como suporte para o crescimento de nervos periféricos^[21]. na forma de matrizes para aplicações em engenharia de tecido^[23].

I.2.1. Colágeno tipo I

O colágeno mais conhecido química e estruturalmente é o do tipo I, facilmente encontrado na pele, nos tendões, ossos, dentes, vasos sanguíneos e intestinos. É a proteína mais abundante no corpo humano. A macromolécula de colágeno tipo I consiste de um filamento semiflexível de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Sua estrutura formada por uma unidade monomérica, denominada tropocolágeno, consistindo de três cadeias polipeptídicas de mesmo tamanho denominadas α , sendo duas iguais ($\alpha 1$) e uma diferenciada ($\alpha 2$). A Figura 2 mostra a estrutura do tropocolágeno.

Figura 2: Figura esquemática do tropocolágeno.

Estas cadeias se entrelaçam formando uma estrutura helicoidal, ligadas entre si por pontes de hidrogênio, o que se conhece por tripla hélice. Cada uma dessas cadeias α contém 1055 ($\alpha 1$) e 1029 ($\alpha 2$) resíduos de aminoácidos, e a sequência destes é notavelmente regular, apresentando-se na forma de unidades repetitivas, os tripletos do tipo: $(-\text{Gly-X-Pro-})_n$ ou $(-\text{Gly-X-Hydro-})_n$, onde X é um aminoácido qualquer, essencial para a organização do colágeno em fibra^[24], com exceção das regiões terminais onde são encontrados os telopeptídeos que contém no N e C

terminal 16 e 25 resíduos de aminoácidos, respectivamente^[25]. A Figura 3 mostra a estrutura do colágeno.

Figura 3: Esquema da estrutura em tripla-hélice do Colágeno (Adaptado de ^[26]).

Os fatores essenciais para estabilidade esta hélice tripla são: a presença de um resíduo de glicina a cada terceiro resíduo ^[27], ligações de hidrogênio, a periodicidade da distribuição de resíduos de aminoácidos polares carregados e hidrofóbicos nas subunidades α que são responsáveis pela formação de

aglomerados de interações eletrostáticas e hidrofóbicas^[28]. Estas forças também são importantes para a interação entre as moléculas do tropocolágeno para formar a microfibrilas, que são as menores unidades estruturais do tecido conjuntivo. As microfibrilas se agregam formando as fibrilas que posteriormente também se unem para formar as fibras que compõem a matriz colagênica dos tecidos.

Para o colágeno tipo I, a formação de fibras ocorre em pH 7,0, sendo este o pH onde se tem a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno, fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja zero (colágeno nativo).

Estas matrizes de colágeno, além de sua biocompatibilidade, podem sofrer modificações químicas, devido a elas possuírem uma grande quantidade de grupos reativos, como aminas (R-NH₂), ácidos carboxílicos (R-COOH) e hidroxilas (R-OH)^[29]. Outro tipo de modificação pela qual o colágeno pode passar é a reticulação com glutaraldeído^[30]. A resultante das cargas no colágeno pode ser modificada por reações de esterificação^[31] e succinilação^[32], resultando em uma matriz colagênica carregada positiva ou negativamente. As matrizes carregadas positivamente são utilizadas como suporte para crescimento celular, visto que superfícies carregadas estimulam este crescimento^[33]. Já as matrizes aniônicas, além de serem empregadas como suporte para crescimento ósseo, são eficientes em sistema de liberação de drogas catiônicas, baseado nas propriedades de troca iônica^[34].

Um processo para a preparação de materiais de colágeno carregados negativamente (colágeno aniônico) a pH 7,4, o qual foi utilizado neste trabalho, é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do colágeno tipo I,

como demonstrado na Figura 4. Como resultado, foi observado que a reação de hidrólise promove alterações no padrão da organização da estrutura microfibrilar da matriz colagênica, que estão relacionadas com o rompimento parcial de algumas ligações cruzadas do tecido e também com o novo padrão de interações eletrostáticas, que ocorre em função do aumento de cargas negativas da matriz^[35].

Figura 4: Hidrólise dos resíduos de glutamina em meio básico.

I.3. Matrizes de colágeno

Biomateriais feitos a partir de colágeno têm sido utilizados desde o século XIX na forma de suturas, pele de cadáver humano e pele porcina^[36]. As matrizes de colágeno têm demonstrado resultados extremamente satisfatórios em uma grande variedade de aplicações^[37,38], aumentando o número de pesquisas e o desenvolvimento de novos tipos de matrizes derivadas de tecidos biológicos. Entre estes tecidos estão a pele, o pericárdio, a serosa e os tendões que podem ser obtidas de fontes diferentes como bovina, suína e eqüina. Exemplos de aplicações

de matrizes de colágeno modificadas são suas utilizações como substituintes de válvulas cardíacas^[30] pele artificial^[39] e suporte para crescimento de nervos periféricos.^[40]

Várias matrizes de colágeno tem sido estudadas ^[41], tais como esponjas de colágeno com deposição de fosfato de cálcio que tem demonstrado grande potencial para aplicação em reconstrução óssea através dos resultados obtidos em culturas de condrócitos^[42]. Filmes de colágeno recobertos com hidroxiapatita tem demonstrado migração de células de tecido ósseo para o interior da matriz, sugerindo que o material é bioativo.^[43]

I.4.Mineralização

O colágeno e a hidroxiapatita, são usadas como materiais de preenchimento em cirurgias ortopédicas^[44]. Por ter composição química semelhante à fase mineral dos ossos e possuir características como biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade^[45], a hidroxiapatita sintética tem sido considerada o material ideal como um implante ósseo em uma variedade de situações e mostrou promover o crescimento de células e diferenciação osteogênica^[46].

Infelizmente, a implantação direta da hidroxiapatita na forma de pó resulta no deslocamento do material pelo tecido. Para eliminar esta mobilidade indesejada, a hidroxiapatita é incorporada ou misturada ao colágeno^[21], à gelatina^[22] ou a outros materiais^[47].

A formação de depósitos de cálcio em diferentes matrizes pode ser denominada como mineralização, que é um processo de múltiplos parâmetros e muitos fatores mecânicos, químicos e biológicos que possuem um importante papel na cinética do processo^[48]. Atualmente existem diversos trabalhos utilizando compósitos de colágeno obtidos por mineralização ou calcificação, para aplicação na engenharia de tecido ósseo^[49-55], onde dentro desse campo existem várias linhas de pesquisa como a formação de compósitos com outros polímeros^[50], estudo dos mecanismos da mineralização^[53,54] e o uso de outras proteínas^[55] para promover uma maior eficiência no processo de mineralização.

O colágeno tipo I apresentado na forma de membranas, géis e esponjas, entre outros, é descrito em vários trabalhos na literatura^[50-52], mas trabalhos descrevendo a mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno acelulares como pericárdio e tendão bovino, serosa porcina e centro frênico eqüino encontram-se em muito menor número^[56].

1.5.Osso

O tecido ósseo é constituído por fibras de colágeno reforçadas por partículas minerais. Cerca de 70% da massa do tecido ósseo está sob a forma de fosfato de cálcio depositado sobre as fibras colagênicas. Os 30% referentes à parte orgânica são quase que exclusivamente compostos por uma única proteína, o colágeno tipo I. É o colágeno que dá ao osso suas características de resistência e habilidade para

resistir a tensões, além disso, ele participa de forma importante no processo de mineralização óssea.

É geralmente aceito que a fase inorgânica, que frequentemente é chamada de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, seja na verdade uma hidroxiapatita não estequiométrica, carbonatada, na forma de cristais que se formam nas regiões de “gap” das fibras de colágeno. Além da hidroxiapatita, outros componentes inorgânicos do osso são pequenas quantidades de magnésio, flúor e sódio, que dão ao osso sua dureza característica e sua habilidade para resistir à compressão. A Figura 5 mostra a estrutura do osso.

Figura 5: Estrutura do osso. (Adaptado de ^[57])

A formação da fase mineral do osso ocorre através dos sítios de nucleação mineral que são encontrados dentro do osso ou associados a vesículas extracelulares e fibrilas de colágeno^[58]. Os cristais, já maduros, estão associados os canais presentes entre as moléculas de colágeno, resultando em um composto material ordenado orgânico mineralizado^[59]. A Figura 6 mostra o arranjo do colágeno e da hidroxiapatita dentro do osso

Figura 6: Arranjo estrutural do colágeno e da hidroxiapatita no osso (Adaptado de ^[59]).

I.6.Tendão

Tendões são estruturas anatômicas presentes entre os músculos e os ossos, transmitindo a força criada no músculo ao osso, tornando possível o movimento das articulações. Os tendões são constituídos de colágenos (predominantemente colágeno do tipo I) e elastina agregados uma matriz protéica onde o colágeno responde por 65 a 80 % e a elastina por aproximadamente 1 a 2 % da massa seca do tendão ^[60]. Tendões são constituídos de colágeno organizado em fibrilas, fibras, fibrados e fascículos em uma sistemática e densamente empacotada organização de tecido. A natureza dos componentes individuais do tendão é preparada para resistir a altas tensões e forças. A divisão dos tendões em fibrilas garante que danos pequenos não necessariamente se espalhem para todo o tendão, e também fornece uma alta resistência estrutural total ^[61]. A Figura 7 mostra a organização do tendão.

Figura 7: Organização da estrutura do tendão. (Adaptado de ^[60])

As fibras do tendão não são alinhadas apenas longitudinalmente, mas também transversalmente e horizontalmente, com as fibras longitudinais cruzando entre elas, formando dobras e espirais. Esta estrutura complexa e altamente organizada é o que permite ao tendão suportar as forças ao qual ele é submetido durante o movimento. A Figura 8 mostra a seguir mostra todos os tipos de cruzamento possível entre as fibras.

Figura 8: Tipos de cruzamento das fibras de colágeno em tendões: Paralelas (A), cruzamento simples (B), duas fibras cruzadas e uma longitudinal (C), dobra (D) e enlace (E) ^[60].

O uso do tendão para a produção de matrizes acelulares abre um campo novo para a pesquisa, pois permite estudar como a mineralização se comporta em um tecido com organização tão complexa.

II.OBJETIVOS

- Preparação e caracterização matrizes de colágeno aniônico derivadas de tendão bovino e de avestruz para uso como matriz de reconstrução óssea.

- Mineralização *in vitro* e análise dessas matrizes pra ver se há diferenças na quantidade de material depositado, ou na estrutura do fosfato depositado entre as matrizes de diferentes origens ou diferentes tempos de hidrólise.

A escolha do tendão para esse estudo é devido ao fato de ser um tecido extremamente organizado, com as fibras colagênicas alinhadas por toda a sua extensão.

III.METODOLOGIA

As matrizes de colágeno aniônico foram preparadas a partir de tendões calcâneos bovinos e de avestruz. Os tendões de avestruz foram cedidos de animais abatidos na Fazenda Ninhos Avestruz SA, distrito de Água Vermelha, município de São Carlos – SP. Os tendões bovinos foram cedidos pela Casa de Carnes Santa Paula, município de São Carlos - SP. Para este experimento foram utilizadas quatorze (14) peças de tendão de cada origem, com aproximadamente 10 cm de comprimento. A Figura 9 mostra os tendões utilizados.

Figura 9: Tendão de avestruz (A) e bovino (B).

Observam-se visualmente diferenças entre os dois tendões, com o bovino sendo tendo uma grossura maior que o de avestruz. Por ser mais fino, é possível ver a estrutura alinhada do tendão de avestruz à olho nu, algo que não é possível no tendão bovino

Os tendões primeiramente foram lavados com solução salina 0,9%, para remoção de sangue sendo em seguida tratados a 25°C, com uma solução contendo sais de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} por períodos de 72, 96 e 120 h, para que ocorresse a retirada de células e gorduras, e para que ocorresse a hidrólise do colágeno. Em seguida eles foram estabilizados com cloretos e sulfatos de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} por 6h. Esse tratamento teve como objetivo aumentar o número de cargas negativas na molécula de colágeno, por meio da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamida dos resíduos de aspargina e glutamina presentes na cadeia α do colágeno. Este tratamento é capaz de aumentar em até 57% o número de cargas presentes na molécula de colágeno para outros materiais como o pericárdio bovino ^[35]. Depois, os tendões foram lavados com solução de ácido bórico por 3 vezes, mantendo as em solução e respeitando-se um intervalo de 2 horas entre as lavagens. Posteriormente, os tendões foram colocados em solução de EDTA 0,3% a pH=11, alternando com lavagens com água desionizada por 3 vezes cada uma, mantendo-os em solução de EDTA por duas horas e por uma hora em água desionizada. Depois os tendões foram lavados seguidamente com água desionizada até que elas estivessem em um pH próximo de 7^[56], resultando em uma matriz acelular, com a estrutura do colágeno e da elastina preservada^[35].

As matrizes assim preparadas foram denominadas de:

TA72 – Matriz de colágeno oriundo de tendão de avestruz obtida após 72 h de tratamento alcalino.

TA96 – Matriz de colágeno oriundo de tendão de avestruz obtida após 96h de tratamento alcalino.

TA120 – Matriz de colágeno oriundo de tendão de avestruz obtida após 120h de tratamento alcalino.

TB72 – Matriz de colágeno oriundo de tendão bovino obtida após 72h de tratamento alcalino.

TB96 – Matriz de colágeno oriundo de tendão bovino obtida após 96h de tratamento alcalino.

TB120 – Matriz de colágeno oriundo de tendão bovino obtida após 120h de tratamento alcalino.

III.1.O processo de mineralização

Inicialmente, com o objetivo de diminuir o pH e aumentar o intumescimento da matriz, as amostras foram colocadas em solução de H_3PO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ por 24 horas e depois liofilizadas e armazenadas em sacos plásticos até o momento de seu uso no processo de mineralização.

Para o processo de mineralização foram preparadas duas soluções:

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, em tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,4.

– $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,12 \text{ mol L}^{-1}$, em tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 9,0.

O processo de mineralização ocorreu por imersão alternada nessas duas soluções. Em cada processo de mineralização, foram usadas 6 (seis) matrizes,

trocando-se a solução a cada 30 minutos, lavando-se as matrizes a cada troca com água desionizada. A toda vez que as amostras passavam pelas duas soluções, uma matriz foi retirada, ou seja, cada uma das matrizes foi submetida a um tempo de mineralização, levando-se em conta o número de trocas de soluções. Todo este processo foi realizado dentro de uma estufa a uma temperatura de 37°C, incluindo a água de lavagem, que foi mantida dentro da estufa junto com as amostras.

Após a mineralização, as amostras foram condicionadas em uma placa de vidro, onde foram congeladas, liofilizadas e depois armazenadas em sacos plásticos para posterior análise. A Figura 10 esquematiza como foi realizado este processo:

Figura 10: Esquema do processo de mineralização por imersão alternada.

Além da nomeação descrita anteriormente, após o processo de mineralização cada amostra recebeu um nome dependendo do número de ciclos de mineralização

ao qual ela foi submetida: C0 para as não mineralizadas e de C1 a C6, dependendo no número de ciclos. Por exemplo: TA72CX, onde X varia de 0 a 6.

A Figura 11 mostra o esquema com os passos desenvolvidos desde a preparação das matrizes aniônicas até a caracterização das matrizes calcificadas.

Figura 11: Esquema do desenvolvimento experimental.

III.2.Caracterização

III.2.1.Termogravimetria (TG)

Para observar se houve a incorporação de fosfato de cálcio e a quantidade de material inorgânico residual na amostra foi feita a análise termogravimétrica (TG) das matrizes calcificadas. O resíduo obtido a 750°C foi considerado o teor de material inorgânico, ou seja, fosfato de cálcio, depositado sobre a matriz. As medidas foram realizadas na razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, de 25 até 800°C, em atmosfera de ar sintético (fluxo de 90 mL min⁻¹), com amostras de aproximadamente 8 mg em um analisador da TA Instruments, acoplado ao módulo TGA-2050.

III.2.2.Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para observar se houve ou não desnaturação do colágeno durante o processo de preparação da matriz e de calcificação, a amostra foi submetida a uma análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) A análise calorimétrica por DSC permite a medida da estabilidade das estruturas helicoidais das moléculas do colágeno, relativas à transição colágeno → gelatina. Nas curvas DSC, essa transição aparece como uma descontinuidade na linha de base, que é proporcional a diferença na capacidade de calor antes e depois da desnaturação. O valor da temperatura de desnaturação (Td) foi obtida pelo valor intermediário nas curvas DSC.

Antes da análise as amostras foram mantidas por 24h em solução de tampão fosfato $0,13 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$, com o excesso de líquido sendo removido antes da análise através de prensagem entre folhas de papel absorvente com um peso de 107 gramas por dois minutos. As medidas foram realizadas em uma panela de alumínio hermeticamente selada, na razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, de 5 a 120°C , em atmosfera de ar sintético (fluxo de 80 mL min^{-1}), com amostras de aproximadamente 10 mg em um analisador da TA Instruments, acoplado ao módulo DSC-2010.

III.2.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia de absorção no Infravermelho (FT-IR) foi feita por empastilhamento com KBr do resíduo de termogravimetria. Essa análise foi feita buscando bandas características ao íon PO_4^{3-} e à hidroxiapatita. O espectro de absorção foi obtido em um intervalo entre 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} utilizando um espectrofotômetro de FT-IR BOMEN MB-120.

III.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observar a morfologia da superfície e se ocorreu a formação de cristais nas fibras de colágeno foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estas análises foram realizadas em um equipamento do tipo LEO 440 (LEO Electron

Microscopy Ltda.), operando com feixe de elétrons de 20 keV. As amostras foram fixadas em porta-amostras de alumínio com fita adesiva de carbono, recobertas com 20 nm de liga ouro-paládio em um metalizador Balsers modelo SDC 050.

III.2.5. Dispersão de Energia por Raios-X (EDX)

A dispersão de energia por raios-X foi utilizada para observar a relação entre as quantidades de cálcio e fósforo nas amostras. Esta relação foi obtida a partir de uma média dos valores de relação em quatro pontos diferentes da amostra. Os valores semi-quantitativos de cálcio e fósforo presentes na amostra foram obtidos diretamente do aparelho. Para o EDX, após ser submetida a uma pressão de 5000 psi, as amostras foram fixadas em porta-amostras de alumínio com fita adesiva de carbono e recobertas com carbono (30 nm). Os espectros foram obtidos a partir de uma resolução de 112 eV a uma distância de 20 mm. Os padrões que foram utilizados para quantificação de Ca e P são: CaCO_3 , quartz, GaP e Wollas (CaSiO_3).

IV.RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1.Obtenção das Matrizes

A Figura 12 mostra um modelo do mecanismo de deposição do fosfato de cálcio sobre as matrizes aniônicas.

Figura 12: mecanismo de deposição do fosfato de cálcio sobre as matrizes aniônicas (adaptado de [62].)

Este mecanismo foi proposto a partir de pesquisas realizadas em nosso laboratório com matrizes de pericárdio bovino [62].

Depois do tratamento alcalino e liofilização, as matrizes apresentam um aspecto esponjoso, aparentemente frágil, que aumenta conforme aumenta o tempo de hidrólise. Após a mineralização as matrizes se tornaram mais brancas e mais rígidas, sendo que a rigidez é maior conforme se aumenta o número de ciclos. As Figuras 13 e 14 mostram como ficaram os aspectos visuais das matrizes de

colágeno antes e depois da mineralização, para o tempo de 96 horas de tratamento alcalino.

Figura 13: Fotografias digitais das matrizes de colágeno TA960 **(a)** e TA96C6 **(b)**.

Figura 14: Fotografias digitais das matrizes de colágeno TB960 **(a)** e TB96C6 **(b)**.

As matrizes de outros tempos de tratamento alcalino, tanto para tendão bovino quanto de avestruz, possuem o mesmo comportamento, se tornando mais

rígidas após a mineralização, independente do número de ciclos e da procedência dos tendões.

IV.2.Caracterização das Matrizes

IV.2.1.Termogravimetria (TG)

Através da termogravimetria obteve-se a variação da massa das matrizes em função da temperatura, podendo-se assim observar as diferenças que ocorrem entre as matrizes calcificadas referentes a diferentes tempos de hidrólise alcalina.

Para efeito de comparação foi feita a curva termogravimétrica da hidroxiapatita sintética, obtida no laboratório, onde claramente se observa que a hidroxiapatita perde uma pequena quantidade de água no intervalo entre 25 e 100°C e é termicamente estável até aproximadamente 750°C (Figura 15).

Figura 15: Curva termogravimétrica da hidroxiapatita sintética.

A decomposição das matrizes em atmosfera de ar ocorre em três etapas: perda de água na faixa de 25 até cerca de 150°C, a decomposição do colágeno, da elastina e de outros materiais orgânicos presente nas matrizes ocorre próximo a 150 e vai até aproximadamente 400°C. Acima de 400 °C ocorre a carbonização do material orgânico ^[56], deixando um resíduo acima desta temperatura, que pode ser atribuído ao sal de fosfato de cálcio formado, no caso, a hidroxiapatita, que apresenta estabilidade térmica na temperatura em que o estudo foi feito ^[63]. A Figura 16 mostra as curvas termogravimétricas para os tendões nativos (não hidrolisado).

Figura 16: Curvas termogravimétricas para os tendões nativos.

As curvas termogravimétricas para as matrizes de colágeno de tendão de avestruz que passaram por diferentes tempos de hidrólise e foram posteriormente calcificadas são apresentadas nas Figuras 17 a 19. Os valores de material inorgânico nestas matrizes estão mostrados nas Tabelas 1 a 3.

Figura 17: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 72 horas

Tabela 1: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 72h

Matriz	Porcentagem de perda de massa (%)			Resíduo (%)
	25-150 °C	150-400°C	400-750°C	
TA72C0	12,45	46,82	38,84	1,89
TA72C1	9,56	34,17	29,54	26,73
TA72C2	10,40	32,38	25,39	31,83
TA72C3	10,19	31,95	22,59	35,27
TA72C4	7,40	26,04	19,11	47,45
TA72C5	9,16	22,46	18,20	50,18
TA72C6	7,56	20,96	16,53	54,95

Figura 18: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 96 horas.

Tabela 2: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 96h

Matriz	Porcentagem de perda de massa (%)			Resíduo (%)
	25-150 °C	150-400°C	400-750°C	
TA96C0	13,57	42,76	41,63	2,04
TA96C1	8,47	40,06	25,35	26,12
TA96C2	9,37	32,37	20,33	37,93
TA96C3	6,62	29,87	9,36	54,15
TA96C4	6,50	23,13	9,41	60,96
TA96C5	5,33	22,33	6,14	66,20
TA96C6	5,87	17,36	4,24	72,53

Figura 19: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 120 horas.

Tabela 3: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão de avestruz tratado por 120h

Matriz	Porcentagem de perda de massa (%)			Resíduo (%)
	25-150 °C	150-400 °C	400-750 °C	
TA120C0	13,37	44,73	38,73	3,17
TA120C1	8,30	34,35	30,03	27,32
TA120C2	9,88	30,27	19,83	40,02
TA120C3	8,20	24,99	20,01	46,80
TA120C4	10,42	22,66	12,14	54,78
TA120C5	8,67	23,12	13,11	55,10
TA120C6	6,43	20,47	13,82	59,28

A quantidade de resíduo para as matrizes não-mineralizadas (2 a 3%), se deve à presença de sais que não foram removidos mesmo depois das lavagens as quais a matriz foi submetida. A quantidade de água nas matrizes tende a diminuir com a mineralização, com as matrizes submetidas a seis ciclos sendo as que possuem a menor quantidade. As curvas termogravimétricas mostraram que a quantidade de material inorgânico na matriz aumenta conforme se aumenta o número de ciclos.

Para as matrizes de tendão de avestruz tratadas por 72h, o valor máximo obtido foi de 60%. As matrizes tratadas por 96h foram as que mais conseguiram incorporar material inorgânico à sua estrutura. Esse fenômeno ocorre porque o número de sítios de deposição de fosfato de cálcio aumenta conforme se aumenta o número de cargas negativas na matriz. Acima de 96 horas de tratamento, o número de cargas não sofre grande variação ^[35]. Para 120 horas de tratamento, o número de cargas é similar ao obtido com 96h, porém o colágeno começa a perder sua organização, diminuindo assim o número de sítios hábeis a suportarem a deposição.

A figura 20 mostra a relação entre o número de ciclos de mineralização e a porcentagem de material inorgânico para cada matriz de tendão de avestruz mineralizada. Observa-se uma tendência a estabilização no valor de material inorgânico após 6 ciclos de mineralização, em torno de 70%.

Figura 20: Relação entre número de ciclos e a porcentagem de material inorgânico para as matrizes de tendão de avestruz.

As curvas termogravimétricas e os valores de material inorgânico obtidos para as matrizes de tendão bovino estão mostrados nas Figuras 21 a 23 e nas Tabelas 4 a 6.

Figura 21: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 72 horas.

Tabela 4: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 72h.

Matriz	Porcentagem de perda de massa (%)			Resíduo (%)
	25-150 °C	150-400°C	400-750°C	
TB72C0	10,69	43,62	42,78	2,91
TB72C1	9,53	37,10	36,11	17,26
TB72C2	11,78	36,48	34,42	17,32
TB72C3	8,93	36,04	27,13	27,90
TB72C4	9,50	33,37	18,85	38,28
TB72C5	7,82	29,73	14,22	48,23
TB72C6	8,06	27,04	11,72	53,18

Figura 22: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 96 horas.

Tabela 5: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 96h.

Matriz	Porcentagem de perda de massa (%)			Resíduo (%)
	25-150 °C	150-400°C	400-750°C	
TB96C0	12,38	47,06	40,56	0,0
TB96C1	12,36	33,66	34,26	19,72
TB96C2	7,90	27,43	22,71	41,96
TB96C3	8,22	26,64	19,00	46,14
TB96C4	8,78	28,76	20,04	42,42
TB96C5	6,40	21,49	7,32	64,79
TB96C6	7,47	19,09	7,59	65,85

Figura 23: Curvas TG das amostras de matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 120 horas.

Tabela 6: Porcentagem de perda de massa das matrizes de colágeno aniônico de tendão bovino tratado por 120h

Matriz	Porcentagem de perda de massa (%)			Resíduo (%)
	25-150 °C	150-400°C	400-750°C	
TA120C0	12,28	44,75	42,25	0,72
TA120C1	8,93	35,85	37,46	17,76
TA120C2	9,68	29,20	23,07	38,05
TA120C3	7,48	27,44	18,10	46,98
TA120C4	8,04	23,38	13,21	55,37
TA120C5	6,72	21,83	9,60	61,85
TA120C6	6,72	20,29	7,09	65,90

As matrizes de tendão bovino possuem uma menor quantidade de sal residual em comparação com as matrizes de tendão de avestruz. A quantidade de material depositado também é proporcional ao número de ciclos, mas o tendão bovino não foi capaz de ancorar a mesma quantidade de sal que o tendão (10% menos), provavelmente por sua estrutura ser mais compacta em relação à da matriz de tendão de avestruz, o que não permitiu uma deposição maior de fosfato de cálcio. A figura 24 mostra a relação entre o número de ciclos e a porcentagem de material inorgânico para cada matriz de tendão bovino.

Figura 24: Relação entre número de ciclos e a porcentagem de material inorgânico para as matrizes de tendão bovino.

Os tendões tratados por 96 e 120h apresentam a mesma quantidade de material inorgânico depositado, pois o número de cargas negativas na matriz não

sofre grande variação após 96 horas de tratamento alcalino^[35], mas o valor de material inorgânico não diminuiu como para o tendão de avestruz, o que mostra que a estrutura do tendão bovino não sofreu da mesma desorganização estrutural que o de avestruz para tempos de hidrólise maiores que 96 horas.

IV.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As moléculas de colágeno se degeneram facilmente. A análise calorimétrica por DSC permite a medida da estabilidade das estruturas helicoidais das moléculas do colágeno, relativas à transição colágeno $\rightarrow$ gelatina. A quebra da estrutura da hélice tripla dá lugar a uma estrutura amorfa formada por cadeias polipeptídicas. A Figura 25 mostra o esquema da desnaturação do colágeno.

Figura 25: Esquema da desnaturação do colágeno.

Nas curvas DSC essa transição aparece como uma descontinuidade na linha de base, que é proporcional a diferença na capacidade de calor antes e depois da desnaturação. O valor da temperatura de desnaturação (T_d) foi obtida pelo valor intermediário nas curvas DSC, como mostrado na Figura 26:

Figura 26: Curva representativa da determinação de T_d por DSC para o tendão bovino nativo e a matriz TB120C6.

Quanto maior o valor de material inorgânico sobre a matriz, menor é a transição presente no DSC, devido à menor quantidade proporcional de colágeno, o que em alguns momentos acarretou na dificuldade em obtenção de alguns valores.

Os valores de Temperatura de desnaturação para os tendões nativos e as matrizes de tendão bovino e de avestruz, mineralizadas e não mineralizadas estão mostrados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Temperatura de desnaturação (T_d) das matrizes de colágeno aniônico oriundas de tendão de avestruz.

Matriz	T_d ($^{\circ}\text{C}$)
TANAT	66,71
TA72C0	49,17
TA72C1	66,82
TA72C6	67,75
TA96C0	47,82
TA96C1	58,23
TA96C6	56,75
TA120C0	49,86
TA120C1	59,81
TA120C6	55,03

O colágeno não sofreu desnaturação durante o tratamento alcalino, fato demonstrado pela presença das transições, e por consequência da temperatura de desnaturação. Para as matrizes não mineralizadas, houve uma diminuição na temperatura de desnaturação em relação ao tendão nativo (não hidrolisado), como já observado em outros trabalhos do grupo, com matrizes derivadas de outras fontes^[56]. Essa diminuição na temperatura de desnaturação pode estar associada ao rompimento das ligações cruzadas do tecido, ao aumento do número de cargas negativas na matriz de colágeno e à desorganização da estrutura fibrilar da matriz de colágeno aniônico^[35]. Para as matrizes mineralizadas, houve um aumento no valor

da temperatura de desnaturação em relação às matrizes não mineralizadas, indicando que a deposição do fosfato de cálcio aumentou a estabilidade da hélice tripla do colágeno ^[56,64]. Este comportamento pode ser explicado pela interação dos íons cálcio com os grupos carboxílicos do colágeno, que dificulta a desestruturação da hélice tripla

Tabela 8: Temperatura de desnaturação (T_d) das matrizes de colágeno aniônico oriundas de tendão bovino.

Matriz	T_d ($^{\circ}\text{C}$)
TBNAT	63,86
TB72C0	44,11
TB72C1	49,51
TB72C6	44,31
TB96C0	44,10
TB96C1	47,66
TB96C6	46,34
TB120C0	45,86
TB120C1	45,19
TB120C6	45,96

Para as matrizes de tendão bovino, ocorre o mesmo fenômeno quando se compara as temperaturas de desnaturação do tendão nativo com as matrizes

hidrolisadas, ocorrendo uma diminuição na Td. Mas para as matrizes de tendão bovino, a mineralização não causou nenhum efeito sobre a estabilidade da matriz, resultando em um não aumento nos valores de temperatura de desnaturação em relação às matrizes não mineralizadas.

IV.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através das fotomicrografias por MEV pôde-se observar as mudanças que ocorrem após a mineralização. As imagens foram obtidas após um corte transversal, com o objetivo de se observar tanto o interior quanto a superfície da matriz. As fotomicrografias para as matrizes não mineralizadas estão mostradas nas figuras 27 e 28.

Figura 27: Fotomicrografias das matrizes, TA72C0 (a), TA96C0 (c) e TA120C0 (d) com um aumento de 2000 vezes.

Figura 28: Fotomicrografias das matrizes, TB72C0 (a), TB96C0 (c) e TB120C0 (d) com um aumento de 2000 vezes.

Nas figuras é possível observar as fibras de colágeno. Para o tendão de avestruz, há mais espaços entre as fibras que para o tendão bovino, que possui uma estrutura mais compacta, o que pode explicar a diferença nos valores obtidos pela termogravimetria.

A Figura 29 mostra a matriz TB96C6 superficial e transversalmente com um aumento de 100X, onde se observa que a mineralização é preferencialmente superficial. A maioria do sal foi depositada superficialmente, com apenas uma pequena quantidade conseguindo ir para o interior da matriz

Figura 29: Fotomicrografias superficial e de interna da matriz TA96C6 com um aumento de 100 vezes.

As Figuras 30 a 35 mostram as fotomicrografias das matrizes de tendão bovino e de avestruz que passaram por diferentes tempos de hidrólise (72, 96 e 120h) e de ciclos (1 a 6).

Figura 30: Fotomicrografias das matrizes, TA72C1 **(a)**, TA72C2 **(b)**, TA72C3 **(c)**, TA72C4 **(d)**, TA72C5 **(e)** e TA72C6 **(f)** com um aumento de 2000 vezes.

Figura 31: Fotomicrografias das matrizes, TA96C1 **(a)**, TA96C2 **(b)**, TA96C3 **(c)**, TA96C4 **(d)**, TA96C5 **(e)** e TA96C6 **(f)** com um aumento de 2000 vezes.

Figura 32: Fotomicrografias das matrizes TA120C1**(b)**, TA120C2**(c)**, TA120C3**(d)**, TA120C4**(e)**, TA120C5 **(f)** e TA120C6 **(g)** com um aumento de 2000 vezes.

Figura 33: Fotomicrografias das matrizes, TB72C1 **(a)**, TB72C2 **(b)**, TB72C3 **(c)**, TB72C4 **(d)**, TB72C5 **(e)** e TB72C6 **(f)** com um aumento de 2000 vezes.

Figura 34: Fotomicrografias das matrizes, TB96C1 (a), TB96C2 (b), TB96C3 (c), TB96C4 (d), TB96C5 (e) e TB96C6 (f) com um aumento de 2000 vezes.

Figura 35: Fotomicrografias das matrizes, TB120C1 **(a)**, TB120C2 **(b)**, TB120C3**(c)**, TB120C4**(d)**, TB120C5 **(e)** e TB120C6 **(f)** com um aumento de 2000 vezes.

As imagens mostram a formação de depósitos cristalinos sobre e entre as fibras da matriz. Essa deposição não é uniforme, ocorrendo a formação de aglomerados de cristais de fosfato de cálcio. Para o tendão bovino esses aglomerados são maiores, tendendo a depositar sobre as folhas, enquanto que para o tendão de avestruz os cristais são menores e mais espalhados, tendendo a se depositar sobre as fibras de colágeno. A Figura 36 mostra a forma do cristal.

Figura 36: Fotomicrografia da matriz TB120C6 com um aumento de 10000 vezes.

Os cristais tentem a crescer e formar aglomerados esféricos, com tamanho variando entre 3 e 6 μm sobre as matrizes, como a Figura 29 mostra. Essa

morfologia sugere a formação de hidroxiapatita sobre as fibras de colágeno da matriz, pois a formação de aglomerados semelhantes foi observada em hidroxiapatita cristalizada sobre superfícies metálicas.^[65]

IV.2.4. Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FT-IR).

A hidroxiapatita possui bandas bem características no espectro de infravermelho^[66], que são bandas referentes ao íon fosfato em 1031, 605 e 531 cm^{-1} . A Figura 37 mostra o espectro da hidroxiapatita sintética, obtido no laboratório, e que será usada como padrão para comparação com o resíduo obtido através da termogravimetria.

Figura 37: Espectro FT-IR da hidroxiapatita sintética.

O espectro de infravermelho foi obtido por empastilhamento com KBr do resíduo obtido pela termogravimetria. Foram feitos os espectros de absorção no infravermelho de todas as matrizes submetidas a seis ciclos de mineralização, com o objetivo de se observar se ao final do processo de mineralização, foi a hidroxiapatita o mineral depositado sobre a matriz. Os espectros foram obtidos na região de 4000 a 400 cm^{-1} . As bandas de vibração do fosfato para a hidroxiapatita aparecem em forma de dois dubletos em 1091-1029 cm^{-1} e 602-563 cm^{-1} . Os espectros obtidos estão mostrados nas Figuras 38 e 39.

Figura 38: Espectro FT-IR para os resíduos de TG das matrizes de tendão de avestruz.

Figura 39: Espectro FT-IR para os resíduos de TG das matrizes de tendão bovino.

Ao se comparar os espectros FT-IR dos resíduos de TG com a da hidroxiapatita, observa-se as bandas características atribuídas ao fosfato. Não houve deslocamentos significativos das bandas para as matrizes, independentemente do

tempo de hidrólise alcalina. Pelos espectros pode se dizer que é hidroxiapatita o mineral que foi depositado sobre as matrizes durante a mineralização.

IV.2.5. Dispersão de Energia por Raios-X (EDX).

A dispersão de energia por raios-X foi utilizada para observar a relação entre as quantidades de Ca e P na amostra. Antes da análise, as amostras foram prensadas a fim de obter uma amostra mais lisa. Cada uma das amostras foi submetida a quatro varreduras em diferentes pontos a fim de se obter uma média dos valores de relação Cálcio/Fósforo nas amostras. Os valores quantitativos de cálcio e fósforo presente na amostra foram obtidos diretamente do aparelho. As Figuras 39 e 40 mostram os gráficos obtidos a partir do EDX. Os gráficos mostram a presença, na amostra, de Carbono (0.2 keV), Oxigênio (0.5 keV), Cálcio (3.7 e 4.0 keV), e Fósforo (2.0 keV).

Observa-se nas amostras uma quantidade pequena de sódio nas amostras proveniente dos próprios sais utilizado na calcificação (CaCl_2 e Na_2HPO_4) e, portanto, pode ser desconsiderado. Os valores médios obtidos para a relação cálcio/fósforo, bem como o erro e o desvio estão mostrados na Tabela 9.

(a) **(b)** **(c)**

Figura 40: Gráficos de EDX para as matrizes TA72C6 **(a)**, TA96C6 **(b)** e TA120C6 **(c)**.

(a)

(b)

(c)

Figura 41: Gráficos de EDX para as matrizes TB72C6 (a), TB96C6 (b) e TB120C6 (c).

Tabela 9: Valores médios de relação cálcio/fósforo, erro e desvio padrão.

Matriz	Valor médio da relação cálcio/fósforo.	Erro	Desvio Padrão
TA72C6	1,592	$\pm 0,035$	$\pm 0,017$
TA96C6	1,621	$\pm 0,032$	$\pm 0,016$
TA120C6	1,626	$\pm 0,033$	$\pm 0,016$
TB72C6	1,623	$\pm 0,030$	$\pm 0,015$
TB96C6	1,593	$\pm 0,028$	$\pm 0,014$
TB120C6	1,618	$\pm 0,016$	$\pm 0,008$

Estes valores mostram que o valor médio da relação cálcio/fósforo nas matrizes analisadas está em torno de 1,6. Para a hidroxiapatita, forma na qual o cálcio e o fósforo estão presentes no osso, a relação cálcio/fósforo é de 1,67, isso mostra que o sal depositado sobre a matriz de colágeno provavelmente seja uma hidroxiapatita não estequiométrica, o que causa essa diminuição no valor de relação cálcio/fósforo.

V. CONCLUSÕES

O estudo mostrou que foi possível realizar uma mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno aniônico derivados de tendão bovino e de avestruz, dentro das condições determinadas para este experimento.

A extensão da calcificação foi proporcional ao número de ciclos de mineralização. Quanto maior o número de ciclos, maior a extensão da calcificação.

A hidrólise não causou desnaturação da estrutura do colágeno, como mostrado pelo DSC. O tendão bovino sofreu um maior desarranjo na estrutura do colágeno que o tendão de avestruz. Para as matrizes de tendão de avestruz, mineralização aumentou a estabilidade das matrizes, aumentando a temperatura de desnaturação.

A mineralização é preferencialmente superficial, sendo não uniforme sobre as fibras de colágeno.

Acredita-se que o produto resultante da calcificação é uma hidroxiapatita não estequiométrica, o que explicaria a diferença nos valores na relação cálcio/fósforo.

A matriz que obteve os melhores resultados foi a matriz de tendão de avestruz submetida a 96 horas de tratamento alcalino, pois foi a que conseguiu ancorar a maior quantidade de fosfato de cálcio na sua estrutura, tornando ela proporcionalmente parecida com a estrutura do osso (70% hidroxiapatita e 30% de água e componentes orgânicos).

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] TABATA, Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. **PSTT**, v. 3, n. 3, p. 80-89, 2000.
- [2] TATEISHI, T.; CHEN, G.; USHIDA, T. Biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. **J. Artif. Organs.**, v.5, p. 77-83, 2002.
- [3] KIM, B.; MOONEY, D. J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 224-230, 1998.
- [4] SALGADO, A.J.; COUTINHO, O.P.; REIS, R.L. Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression. **Tissue Eng.**, v. 10, p. 465-474, 2004.
- [5] ROSE, F.R.A.J.; OREFFO, R.O.C. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 292, p. 1-7, 2002.
- [6] WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 72.
- [7] RATNER B.D.; BRYANT S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 6, p. 41-75, 2004.
- [8] PARK, J.B; LAKES, R.S. **Biomaterials: an introduction**. New York: Springer, 2007. p. 561.
- [9] YANG, S.; LEONG, K.; DU, Z.; CHUA, C. The design of scaffolds for use in tissue engineering: part I. traditional factors. **Tissue Eng.**, v. 7, p. 679-689, 2001.
- [10] GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. **Science**, v. 295, p. 1009-1014, 2002.
- [11] JIANG, W.; CHU, X.; WANG, B.; PAN, H.; XU, X.; TANG, R. Biomimetically triggered inorganic crystal transformation by biomolecules: a new understanding of biomineralization. **J. Phys. Chem. B.**, v. 113, p. 10838-10844, 2009
- [12] WANG, Y.; YANG, C.; CHEN, X.; ZHAO N. Biomimetic formation of hydroxyapatite/collagen matrix composite. **Adv. Eng. Mater.**, v. 8, p. 97-100, 2006.
- [13] LIAO, S.; MURUGAN, R.; CHAN, C.K.; RAMAKRISHNA, S. Processing nanoengineered scaffolds through electrospinning and mineralization suitable for biomimetic bone tissue engineering. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.**, v. 1, p. 252-260, 2008.
- [14] LIU, G.; ZHAO, D.; TOMSIA, A.P.; MINOR, A.M.; SONG, X.; SAIZ, E. Three-dimensional biomimetic mineralization of dense hydrogel templates. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, p. 9937-9939, 2009.
- [15] AL-MUNAJJED, A.A.; PLUNKETT, N.A.; GLEESON, J.P.; WEBER, T.; JUNGREUTHMAYER, C.; LEVINGSTONE, T.; HAMMER, J.; O'BRIEN, F.J. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique. **J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.**, v. 90, p. 584-591, 2009.

- [16] SENA, L.A.; CARABALLO, M.M.; ROSSI, A.M.; SOARES, G.A. Synthesis and characterization of biocomposites with different hydroxyapatite–collagen ratios. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, 2009. In press
- [17] KIM, B.; MOONEY, D. J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends Biotechnol.**, v.1 6, p. 224-230, 1998.
- [18] MAYNE, R.; BURGESSON, R. E. **Structure and function of collagen types**. London: Academic Press, 1987. p. 317.
- [19] HUC, A. Collagen biomaterials characteristics and applications. **Am. Leather Chem. Assoc.**, v. 80, p.195-212, 1985.
- [20] SÖDERHÄLL, C.; MARENHOLZ, I.; KERSCHER, T.; RÜSCHENDORF, F.; ESPARZA-GORDILLO J.; et al. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. **PLoS Biol.**, v. 5, p. 1952-1961, 2007.
- [21] LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharm.**, v. 221, p. 1-22, 2001.
- [22] DE PAULA, M.; GOISSIS, G.; MARTINS, V.C.A. Compósitos de colágeno aniônico: ramsana como géis injetáveis para correção plástica: preparação, caracterização e propriedades reológicas. **Rev. Bras. Eng. Biomed.**, v. 18, p. 113-122, 2002.
- [23] SONG, E.; KIM, S.Y.; CHUN, T.; BYUN, H-J.; LEE, Y.M. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 27, p. 2951-2961, 2006.
- [24] LIGHT, N.; BAYLEI, A. J. Molecular structure and stabilization of the collagen fiber. In: VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen**. London: Academic Press, 1980. p. 15-38.
- [25] CHAPMAN, J.A.; TZAPHLIDOU, M.; MEEK, K.M.; KADLER, K.E. The collagen fibril – a model system for studying the staining and fixation of a protein. **Elec. Microsc. Rev.**, v. 3, n. 1, p. 143-82, 1990
- [26] NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2000. p. 1200. Disponível em: < <http://www.biog1105-1106.org/demos/105/unit1/media/collagen.jpg>>. Acesso em: 01 set. 2009.
- [27] GALLOP, P.M.; BLUMENFELD, O.O.; SEIFTER, S. Subunits and special structural features of tropocollagen. In: RAMACHANDRAN, G.N. (Ed.). **Treatise of collagen**. London: Academic Press, 1967. v. 3, p. 339.
- [28] CHAPMAN, J.A.; TZAPHILIDOU, M.; MEEK, K.M.; KADLER, K.E. The collagen fibril – a model system studying the staining and fixation of a protein. **Electron. Microsc. Rev.**, v. 3, p. 143-182, 1990.
- [29] KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. **Biomaterials**, v. 18, p. 471-484, 1996
- [30] TEDDER, M.E.; LIAO, J.; WEED, B.; STABLER, C.; ZHANG, H.; SIMIONESCU, A.; SIMIONESCU, D.T. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. **Tissue Eng. Part A**, v. 15, p. 1257-1268, 2009.

[31] REID, G.G.; GORHAM, S.D.; LACKIE, J.M. The attachment, spreading, and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. **J. Mater. Sci. Lett.**, v. 4, p. 201-209, 1993.

[32] HADASSAH, J.; PRAKASH, D.; SEGHAL, P.K.; AGARWAL, A.; BHUVANESWARI, N. Clinical evaluation of succinylated collagen bandage lenses for ophthalmic applications. **Ophthalmic Res.**, v. 40, p. 257-266, 2008

[33] KASAI, S. Enhanced effect of chemically modified collagen substratum on attachment and growth of fibroblasts in serum-free medium **Biomed. Res.**, v. 2, p. 147-157, 1983.

[34] MARTINS, V. C. A.; GOISSIS, G.; RIBEIRO, A. C.; MARCANTÔNIO JR., E.; BET, M. "The controlled release of a antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites" **Artif. Organs**, v. 22, n. 3, p. 215-221, 1998.

[35] BET M.R.; GOISSIS G.; LACERDA C.A., Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chain. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1074-1079, 2001.

[36] PACHENCE, J.M. Collagen-based devices for soft tissue repair. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 33, p. 35-40, 1996.

[37] CAIONE, P.; CAPOZZA, N.; ZAVAGLIA, D.; PALOMBARO, G.; BOLDRINI, R. *In vivo* bladder regeneration using small intestinal submucosa: experimental study. **Ped. Surgery Int.**, v. 22, p. 593-599, 2006.

[38] LIU, Y.; BHARADWAJ, S.; LEE, S.J.; ATALA, A.; ZHANG, Y. Optimization of a natural collagen scaffold to aid cell-matrix penetration for urologic tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 3865-3873, 2009.

[39] METCALFE, A.D.; FERGUSON M.W.J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **J. R. Soc. Interface**, v. 4, p. 413-437, 2007.

[40] CEMIL, B.; TURE, D.; CEVIRGEN, B.; KAYMAZ, F.; KAYMAZ, M. Comparison of collagen biomatrix and omentum effectiveness on peripheral nerve regeneration. **Neurosurg Rev.**, v. 32, p. 355-362, 2009.

[41] KEENEY, M.; COLLIN, E.; PANDIT, A. Multi-channelled collagen-calcium phosphate scaffolds: their physical properties and human cell response. **Tissue Eng. Part C: Methods**, v. 15, p. 265-273, 2009.

[42] YAYLAOGLU, M. B.; YILDIZ, C.; KORKUSUZ, F.; HASIRCI, V. A novel osteochondral implant. **Biomaterials**, v. 20, n.16, p.1513-1520, 1999.

[43] DU, C.; CUI, F. Z.; ZHU, X. D.; DE GROOT, K. Three-dimensional nano-Hap/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 44, n. 4, p. 407-415, 1999.

[44] CHANG, S.H.; HSU, Y.M.; WANG, Y.J.; TSAO, Y.P.; TUNG, K.Y.; WANG, T.Y. Fabrication of pre-determined shape of bone segment with collagen-hydroxyapatite scaffold and autogenous platelet-rich plasma. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 20, p. 23-31, 2009.

[45] MA, Z.; KOTAKI, M.; INAI, R.; RAMAKRISHNA S. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. **Tissue Eng.**, v. 11, p. 101-109, 2005.

- [46] LIU, Y.K.; WANG, G.C.; CAI, Y.R.; JI, H.J.; ZHOU G.S.; ZHAO X.L.; TANG R.K.; ZHANG M. *In vitro* effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J. Biomed. Mat. Res. Part A**, v. 90A, p. 1083-1091, 2008.
- [47] LEBOURG, M.; ANTÓN, J.S.; RIBELLES, J.L. Hybrid structure in PCL-HAp scaffold resulting from biomimetic apatite growth. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, 2009. In press
- [48] SONG, E.; KIM, S.Y.; CHUN, T.; BYUN, H-J.; LEE, Y.M. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 27, p. 2951-2961, 2006.
- [49] BOOT-HANDFORD, R.P.; TUCKWELL, D.S.; PLUMB, D.A.; ROCK, C.F.; POULSOM, R. A novel and highly conserved collagen (pro α 1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 31067-31077, 2003.
- [50] NGIAM, M.; LIAO, S.; PATIL, A.J.; CHENG, Z.; CHAN, C.K.; RAMAKRISHNA, S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. **Bone**, v. 45, p. 4-16, 2009.
- [51] BERTRAN, C.A.; ALLEGRETTI, L.J.M.; BERTAZZO S. Synthesis of calcium phosphate nanoparticles in collagen medium. **Macromol. Symp.**, v. 253, p. 77–81, 2007.
- [52] YOKOYAMA, A.; GELINSKY, M.; KAWASAKI, T.; KOHGO, T.; KÖNIG U.; POMPE, W.; WATARI, F. Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen - an animal study. **J. Biomed. Mat. Res. Part B: Applied Biomaterials**, v. 75B, p. 464-472, 2005.
- [53] DESHPANDE, A.S.; BENIASH, E. Bio-inspired synthesis of mineralized collagen fibrils. **Cry. Growth Des.**, v.8, p. 3084-3090, 2008.
- [54] PRICE, P.A.; TOROIAN, D.; LIM, J.E. Mineralization by inhibitor exclusion: the calcification of collagen with fetuin. **J Biol Chem.**, v. 284, p. 17092-17101, 2009.
- [55] KALAMAJSKI, S.; ASPBERG, A.; LINDBLOM, K.; HEINEGÅRD, D.; OLDBERG, A. Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium, and promotes collagen mineralization. **Biochem. J.**, 2009. In press.
- [56] BATISTA, T.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Thermal behavior of *in vitro* mineralized anionic collagen matrices. **J. Therm. Anal. Calor.**, v. 95, p. 945-949, 2009
- [57] DA SILVA JÚNIOR, C.; SASSON, S. **Biologia**. São Paulo: Saraiva, 2002. v. 2.
Disponível em:
<http://biologiacesaresezar.editorasaraiva.com.br/navitacontent_/userFiles/File/Biologia_Cesar_Sezar/BIO2_344.jpg>. Acesso em: 25 ago. 2009.
- [58] BOSKEY, A.L. Matrix protein and mineralization: an overview. **Connect. Tissue Res.**, v. 35, p. 357–363, 1996.
- [59] NATIONAL SPACE BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE. Disponível em : <<http://www.nsbri.org/HumanPhysSpace/focus6/f6-264.jpg>>. Acesso em 11 set. 2009.

- [59] LANDIS, W.J.; HODGENS, K.J.; ARENA, J.; SONG, M.J.; McEWEN, B.F. Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. **Microsc. Res. Tech.**, v. 33, p. 192–202, 1996.
- [60] KANNUS P., Structure of the tendon connective tissue. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 10, p. 312-320, 2000.
- [61] KJÆR, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 649-698, 2004.
- [62] GOISSIS, G.; MAGINADOR, S.V.S.; MARTINS, V.C.A. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: *In vitro* and *in vivo* study. **Artif. Org.**, v. 27, p. 437-443, 2003
- [63] MARKOVIC, M.; FOWLER, B.O.; TUNG, M.S. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. **J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.**, v. 109, p. 553-568, 2004.
- [64] GELINSKY, M.; WELZEL, P.B.; SIMON, P.; BERNHARDT, A.; KÖNIG, U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralized collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. **Chem. Eng. J.**, v. 137, p. 84–96, 2008.
- [65] WANG Y.; YANG C.; CHEN X.; ZHAO N. Biomimetic formation of hydroxyapatite/collagen matrix composite. **Adv. Eng. Mater.**, v. 8, p. 97-100, 2006.
- [66] CHANG; M.C.; TANAKA, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v. 23, p. 4811-4818. 2002.