MINERALIZAÇÃO *IN VITRO* DE MATRIZES DE COLÁGENO ANIÔNICO
DERIVADAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS

Thelma Matuura de Batista

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

Orientadora: Prof^a. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2008

Dedicatória

Aos meus pais, Antonio Carlos e Catarina, pelo apoio e dedicação ao longo de toda minha vida.

As minhas irmãs Georgea, Gláucia, Carina e a minha sobrinha Giovanna que mesmo estando longe me apoiaram.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis, pelo apoio à pesquisa e pela confiança em mim depositada.

À Virginia Conceição Amaro Martins, pela amizade, incentivo, otimismo e pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

À Cláudia Bernal e à Profa. Dr. Janice Perussi pelas análises de citotoxicidade in vitro.

À Oxetil e à Acecil pela esterilização das matrizes utilizadas nas análises de citotoxicidade in vitro.

Aos amigos de laboratório em especial à Fabiana e Marília pela amizade, paciência e incentivo.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao pessoal do CAQUI em especial ao Carlos Bento e ao Márcio.

A todo pessoal da biblioteca e da seção de alunos em especial à Sílvia e a Andréia.

A todos aqueles que, porventura, não tenham sido citados nominalmente, e que tenham, de alguma forma, contribuído para este trabalho.

*“Que os esforços desafiem as impossibilidades.
Lembrai-vos de que as grandes proezas da
história foram conquistadas do que parecia
impossível”.*

Charles Chaplin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Biomateriais e engenharia de tecido ósseo	19
1.2. Tecido ósseo	22
1.3. Hidroxiapatita (HA).....	23
1.4. Colágeno	24
1.5. Matrizes de colágeno (MC)	30
1.5.1. Tecidos biológicos como fonte para matrizes de colágeno	31
1.5.1.1. Pele Porcina (PP)	31
1.5.1.2. Pericárdio Bovino	32
1.5.1.3. Serosa Porcina	34
1.6. Mineralização do colágeno	36
2. OBJETIVOS	39
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
3.1. Materiais	40

3.2. Limpeza dos tecidos utilizados.....	40
3.3. Preparação de matrizes de colágeno aniônico (hidrolisadas)	41
3.4. Mineralização das matrizes	42
3.5. Caracterização das matrizes.....	46
3.5.1. Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)	46
3.5.2. Termogravimetria (TG)	46
3.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
3.5.4. Difração de raios X (DRX).....	47
3.5.5. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)	47
3.5.6. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	47
3.5.7. Avaliação do potencial de citotoxicidade <i>in vitro</i>	48
3.5.7.1. Cultura Celular	48
3.5.7.2. Método de difusão em ágar	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Mineralização – Ensaio Piloto.....	52
4.2. Avaliação Macroscópica das matrizes.....	55
4.2.1. Pele Porcina (PP)	55
4.2.2. Pericárdio Bovino	57

4.2.3. Serosa porcina	58
4.3. Caracterização das matrizes.....	60
4.3.1. Potencial de citotoxicidade <i>in vitro</i>	60
4.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial	65
4.3.3. Termogravimetria	72
4.3.3.1. $m_{\text{resíduo}}/m_{\text{orgânica}}$	76
4.3.4. Dispersão de Raios X (EDS)	77
4.3.5. Raios X	79
4.3.5. FT-IR	81
4.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	86
5. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
Apêndice 1- Curvas DSC	106
Apêndice 2 – Curvas Termogravimétricas	109
Apêndice 3 – Espectros no infravermelho.....	112
Anexo I	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização hierárquica do osso.	22
Figura 2. Arranjo atômico da hidroxiapatita.	23
Figura 3. Estrutura da molécula de colágeno.	25
Figura 4. Formação da fibrila de colágeno.	26
Figura 5. Representação da formação intramolecular e intermolecular do colágeno.....	27
Figura 6. Esquema de agregação das moléculas de tropocolágeno para a formação da microfibrila.	28
Figura 7. Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.....	29
Figura 8. Resultante de carga líquida para o tropocolágeno para colágeno nativo (pontilhado) e colágeno aniônico (preto)	29
Figura 9. Pele porcina.....	32
Figura 10. Pericárdio bovino.	33
Figura 11. Diagrama da seção transversal do intestino delgado de suínos.	34
Figura 12. Aspecto macroscópico: (A) SIS desidratada e (B) serosa porcina.....	35
Figura 13. Fotomicrografia por MEV de SIS (A) e serosa porcina (B).	35
Figura 14. Fluxograma da preparação das matrizes.	42
Figura 15. Cella dupla utilizada para mineralização das matrizes.	44
Figura 16. Método de imersão alternada.	45
Figura 17. Suspensão das células.	49
Figura 18. Câmara de Neubauer.....	50

Figura 19. Meio de cobertura com corante vermelho neutro (A) e matriz sendo colocada na placa de petri (B).	51
Figura 20. Curvas termogravimétricas do método 1,5 SBF (—) 5 dias e (—) 10 dias.	52
Figura 21. Curvas termogravimétricas de PP96SC em triplicata, obtida após a mineralização pelo método II.	53
Figura 22. Fotomicrografia por MEV de PP96SC, obtida pelo método da cela dupla termostatzada (aumento de 500 vezes).	54
Figura 23. Curvas termogravimétricas de PP96SC em triplicata obtida após mineralização pelo método III.	54
Figura 24. Fotomicrografia por MEV de PP96SC, obtida pelo método de imersão (aumento de 500 vezes).	55
Figura 25. Foto digital das matrizes (A) PPn, (B) PP96S e (C) PP96S mineralizada.	56
Figura 26. Foto digital das matrizes pré-tratadas com solvente orgânico: (A) PP96 e (B) PP96C.	57
Figura 27. Foto digital das matrizes (A) PBn, (B) PB96 e (C) PB96C.	58
Figura 28. Foto digital das matrizes (A) SPn, (B) SP96 e (C) SP96C.	59
Figura 29. Avaliação macroscópica do controle positivo (A) e negativo (B).	60
Figura 30. Foto digital das células HEp-2 no controle positivo (A) e negativo (B).	61
Figura 31. Foto digital das matrizes derivadas de pericárdio bovino PB24 (A), PB24C (B), PB96 (C) e PB96C (D).	62
Figura 32. Foto digital das matrizes derivadas de serosa porcina SP24 (A) e SP24C (B), SP96 (C) e SP96C (D).	62
Figura 33. Foto digital das matrizes derivadas de pele porcina PP24S (A), PP24SC (B), PP96S (C) e PP96SC (D).	63
Figura 34. Foto digital da avaliação microscópica da matriz PP24S.	64

Figura 35. Foto digital da avaliação macroscópica das matrizes derivadas de pele porcina PP24 (A), PP24C (B), PP96 (C) e PP96C (D).	65
Figura 36. Desnaturação do colágeno.	66
Figura 37. Curva representativa da determinação de Td por DSC.....	67
Figura 38. Curvas DSC dos tecidos com ou sem hidrólise alcalina (96h) e mineralizados, (A) Pele Porcina, (B) Pericárdio Bovino e (C) Serosa Porcina.....	68
Figura 39. Variação da Td de acordo com o tempo de hidrólise das matrizes (A) não mineralizadas e (B) mineralizadas; derivadas de PP (—), PB (—) e SP (—).....	69
Figura 40. Curva TG/DTG das matrizes (—) sem tratamento, (—) hidrolisadas por 96h e (—) mineralizadas, — TG; DTG.	73
Figura 41. Espectro de dispersão de raios X obtido da superfície da matriz PP96C.	78
Figura 42. Difratoograma de raios X das matrizes (A) PP96C, (B) PB96C, (C) SP96C.....	80
Figura 43. Difratoograma de raios X de HA sintética não cristalina	81
Figura 44. Espectros no FTIR das matrizes PPn (A), PBn (B) e SPn (C).....	82
Figura 45. Espectros no FTIR das matrizes PP96C (A), PB96C (B) e SP96C (C).....	84
Figura 46. Fotomicrografias das matrizes PP24 (A), PP48(B), PP72 (C) e PP96 (D), aumento de 500 vezes.....	86
Figura 47. Fotomicrografias das matrizes PB24 (A), PB48(B), PB72 (C) e PB96 (D), aumento de 500 vezes.....	87
Figura 48. Fotomicrografias das matrizes SP24 (A), SP48(B), SP72 (C) e SP96 (D), aumento de 500 vezes.....	88
Figura 49. Fotomicrografia da secção transversal de PP96 (A), PB96(B), aumento de 500 vezes e SP24, aumento de (C) 3500 vezes	89
Figura 50. Fotomicrografia da matriz PP24C (A), PP48C (B), PP72C (C) e PP96C (D) aumento de 5.000x.....	90

Figura 51. Fotomicrografia da matriz PB24C (A), PB48C (B), PB72C (C) e PB96C (D) aumento de 5.000x.....	91
Figura 52. Fotomicrografia da matriz SP24C (A), SP48C (B), SP72C (C) e SP96C (D) aumento de 10.000x.....	92
Figura 53. Fotomicrografia da matriz PP24C, aumento de: (A) 20.000x e (B) 40.000X.	93
Figura 54. Fotomicrografia do interior da matriz PP96C, aumento de: 200x.....	94
Figura 55. Fotomicrografia do interior da matriz PB96C, aumento de 500x.....	94
Figura 56. Fotomicrografia do interior da matriz SP96C, aumento de 1000x.	95
Figura 57. Curvas DSC para as matrizes derivadas de pele porcina hidrolisadas e mineralizadas: (A)24h, (B) 48h e (C) 72h.....	106
Figura 58. Curvas DSC para as matrizes derivadas de pericárdio bovino hidrolisadas e mineralizadas: (A)24h, (B) 48h e (C) 72h.....	107
Figura 59. Curvas DSC para as matrizes derivadas de serosa hidrolisadas e mineralizadas: (A)24h, (B) 48h e (C) 72h.	108
Figura 60. Curvas termogravimétricas das matrizes derivadas de pele porcina hidrolisadas e mineralizadas: (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h.....	109
Figura 61. Curvas termogravimétricas das matrizes derivadas de pericárdio bovino hidrolisadas e mineralizadas: (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h.....	110
Figura 62. Curvas termogravimétricas das matrizes derivadas de serosa porcina hidrolisadas e mineralizadas: (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h.....	111
Figura 63. Espectros no infravermelho das matrizes derivadas de pele porcina (A) PP24C, (B) PP48C e (C) PP72C.	112
Figura 64. Espectros no infravermelho das matrizes derivadas de pericárdio bovino (A) PB24C, (B) PB48C e (C) PB72C.	113
Figura 65. Espectros no infravermelho das matrizes derivadas de serosa porcina (A) SP24C, (B) SP48C e (C) SP72C.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação Ca/P de fosfatos de cálcio.....	23
Tabela 2. Matrizes de colágeno aniônico tipo I obtidas após hidrólise alcalina.....	41
Tabela 3. Concentração iônica dos sais da solução utilizada	43
Tabela 4. Matrizes de colágeno obtidas após mineralização pelo método de imersão alternada	45
Tabela 5. Valores dos diâmetros dos halos formados no controle positivo e negativo	61
Tabela 6. Temperatura de desnaturação do colágeno presente nos tecidos e nas matrizes	71
Tabela 7. Porcentagens de perda de massa das matrizes obtidas através de TG/DTG.....	73
Tabela 8. Relação massa inorgânica por massa orgânica das matrizes mineralizadas	77
Tabela 9. Razão Ca/P dos sais depositados nas matrizes mineralizadas e hidrolisadas	78
Tabela 10. Relação Ca/P dos principais tipos de fosfato de cálcio	79
Tabela 11. Principais valores de d para as matrizes mineralizadas	80
Tabela 12. Principais frequências das bandas para o colágeno presente nas matrizes	83
Tabela 13. Principais frequências das bandas para o colágeno mineralizado	85
Tabela 14 - Composição do meio ISCOVE'S.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

Asn - Asparagina

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

DRX – Difração de raios X

EDS - Espectroscopia por Energia Dispersiva

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.

Gln – Glutamina

Gly – Glicina

HA – Hidroxiapatita

Hyp – Hidroxiprolina

MC – Matriz de Colágeno

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

PB – Pericárdio Bovino

PB24 – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 24h

PB24C – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 24h Mineralizado

PB48 – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 48h

PB48C – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 48h Mineralizado

PB72 – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 72h

PB72C – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 72h Mineralizado

PB96 – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 96h

PB96C – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 96h Mineralizado

PBn – Pericárdio Bovino Nativo (não hidrolisado)

PBS – Tampão Fosfato Salino

PP – Pele Porcina

PP24 – Pele Porcina Hidrolisada por 24h

PP24C – Pele Porcina Hidrolisada por 24h Mineralizada

PP24S – Pele Porcina Hidrolisada por 24h sem Pré-Tratamento Orgânico

PP24SC – Pele Porcina Hidrolisada por 96h Sem Pré-Tratamento Orgânico, Mineralizada

PP48 – Pele Porcina Hidrolisada por 48h

PP48C – Pele Porcina Hidrolisada por 48h Mineralizada

PP72 – Pele Porcina Hidrolisada por 72h

PP72C – Pele Porcina Hidrolisada por 72h Mineralizada

PP96 – Pele Porcina Hidrolisada por 96h

PP96C – Pele Porcina Hidrolisada Por 96h Mineralizada

PP96C – Pericárdio Bovino Hidrolisado por 96h Mineralizado

PP96S – Pele Porcina Hidrolisada por 96h Sem Pré-Tratamento Orgânico

PP96SC – Pele Porcina Hidrolisada por 96h Sem Pré-Tratamento Orgânico, Mineralizada

PPn – Pele Porcina Nativa (não hidrolisada)

Pro – Prolina

SBF – Solução Simuladora de Fluido Corpóreo

SIS – Submucosa Intestinal Porcina

SP – Serosa Porcina

SP24 – Serosa Porcina Hidrolisada por 24h

SP24C – Serosa Porcina Hidrolisada por 24h Mineralizada

SP48 – Serosa Porcina Hidrolisada por 48h

SP48C – Serosa Porcina Hidrolisada por 48h Mineralizada

SP72 – Serosa Porcina Hidrolisada por 72h

SP72C – Serosa Porcina Hidrolisada por 72h Mineralizada

SP96 – Serosa Porcina Hidrolisada por 96h

SP96C – Serosa Porcina Hidrolisada por 96h Mineralizada

SPn – Serosa Porcina Nativa (não hidrolisada)

Td – Temperatura de Desnaturação

TG/DTG – Termogravimetria

RESUMO

A reconstrução de defeitos ósseos é um problema que afeta milhões de pessoas, que a medicina tenta resolver. Uma alternativa para a solução deste problema tem sido o desenvolvimento de biomateriais que atuem no processo de reparação óssea. O colágeno é um polímero de origem natural capaz de promover cicatrização e regeneração óssea e juntamente com a hidroxiapatita são os principais componentes encontrados no tecido ósseo. Vários trabalhos têm sido reportados com matrizes mineralizadas de colágeno tipo I em diferentes formas como em géis, membranas e esponjas, mas a mineralização *in vitro* de matrizes acelulares com maior teor de mineralização obtidas de tecidos biológicos sem a perda da estrutura colagênica não tem sido descrito. Este trabalho teve como objetivo a mineralização *in vitro* e a caracterização de matrizes de colágeno aniônico obtidas de pele porcina, pericárdio bovino e serosa porcina. Os tecidos foram tratados em temperatura ambiente com solução alcalina por períodos variáveis de 0 à 96h e mineralizados pelo processo de imersão alternada. Os materiais obtidos foram caracterizados pela avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro*, termogravimetria (TG/DTG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), dispersão de raios X (EDS), difração de raios X (DRX) e absorção no infravermelho (FTIR). Não foi observada citotoxicidade em nenhuma das matrizes avaliadas, contudo foi necessário um pré-tratamento nas matrizes de pele porcina para remoção de gordura. Os resultados de DSC mostraram a integridade da matriz colagênica após o tratamento alcalino. O aumento no tempo desse tratamento diminui a temperatura de desnaturação sendo observado um efeito maior nas matrizes de pele porcina seguidas por pericárdio bovino e serosa porcina. A mineralização induz a um aumento na temperatura de desnaturação em todos os casos. As curvas TG apresentaram perdas de massa relacionadas à água presente no material, decomposição da proteína e carbonização do material orgânico e um resíduo após 750 °C que foi associado ao material inorgânico presente na forma de hidroxiapatita, sendo as matrizes de serosa porcina as de maior teor de mineralização. As matrizes mineralizadas tendem a um aumento na estabilidade térmica do colágeno quando comparadas com as matrizes hidrolisadas. Os espectros FTIR mostraram a presença de íons fosfatos e a interação de íons cálcio com o colágeno. As relações Ca/P obtidas por EDS foram aquelas esperadas em comparação com o valor teórico para hidroxiapatita (HA) e resultados de DRX confirmaram a obtenção de HA amorfa como principal produto de mineralização. Pelas fotomicrografias obtidas por MEV pôde-se observar que as fibras de colágeno tornam-se mais desestruturadas quando há um aumento no tempo de hidrólise e que a deposição de sais ocorreu de forma heterogênea, disposta em aglomerados esféricos no formato de agulhas por toda a superfície e interior, exceto para matrizes derivadas de pele porcina que não são mineralizadas internamente devido a sua espessura. Os resultados demonstraram que é possível a mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno tipo I obtidas de diferentes tecidos biológicos em diferentes tempos de hidrólise, produzindo um material com potencial de uso para regeneração óssea.

ABSTRACT

The reconstruction of osseous defects is still a problem that affects millions of people and medicine tries to solve it. One alternative to solve these problems has been the development of biomaterials that can be used as inductors in the osseous repair process. Collagen is a natural polymer able to promote healing and bone regeneration, and among hydroxyapatite (HA) is the main component found in bone tissue. Several mineralized collagen scaffolds are described in literature, in the form of gel, membranes and films, however, *in vitro* mineralization of acellular matrices, obtained from biological tissues without the loss of collagenic structure, has not been reported. The objective of this work was the mineralization and characterization of anionic collagen matrices obtained from porcine skin, bovine pericardium and porcine serosa. Biological tissues were treated at room temperature for 0-96h in alkaline solution and mineralized by alternate soaking method. Materials were characterized by preliminary assay of *in vitro* cytotoxicity, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TG/DTG), scanning electronic microscopy (SEM), energy dispersive x-ray analysis (EDS), x-ray diffraction (XRD), and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). No cytotoxicity was observed in any of the evaluated matrices; however, a pre-treatment of porcine skin matrices, for fat removal, was necessary. DSC results showed the integrity of collagen matrices after alkaline treatment. Denaturation temperature is dependent of time of alkaline treatment, and this effect is greater for porcine skin matrix, followed by bovine pericardium and porcine serosa. TG/DTG curves showed weight losses associated with release of water, degradation of protein structure and combustion of residual organic components. Residues were obtained at 750°C and associated to hydroxyapatite, being porcine serosa matrix the most mineralized. All mineralized matrices showed an increase in collagen thermal stability when compared to hydrolyzed matrices. FTIR spectra showed the presence of phosphate ions and the interaction of calcium ions with collagen. Ca/P ratios obtained by EDS were as expected when compared with literature values for HA, and RDX results confirmed amorphous HA as the main mineralization product. MEV analysis showed that collagen fibers were more affected for longer hydrolysis times, and that salt deposition was heterogeneous, with crystals grouped in spherical agglomerates in a needle-like shape throughout surface and inner, except for porcine skin derived matrices that were not internally mineralized due their width. Obtained results demonstrated that *in vitro* mineralization of type I collagen matrices, using different sources of biological tissues and hydrolysis time was possible, producing a material with potential to be used in bone regeneration.

1. INTRODUÇÃO

A perda do tecido ósseo, resultante de doenças ou traumas causados por acidentes é um dos mais importantes e preocupantes problemas da área ortopédica, atingindo um número muito significativo de pessoas em todo o mundo.

Entre os métodos tradicionais para reconstrução dos defeitos ósseos estão a utilização de enxertos autólogos (provenientes do mesmo indivíduo), enxertos homólogos (provenientes de indivíduos da mesma espécie) e heterólogos (provenientes de espécies diferentes).

O enxerto autólogo tem sido considerado o melhor substituto, pois contém na sua estrutura células osteogênicas viáveis e fatores de crescimento adequados à osteogênese (SALGADO; COUTINHO; RUI, 2004), o que faz com que a osteointegração seja rápida. Embora este seja o melhor tratamento, sua utilização é limitada devido à morbididade do sítio doador, que aumenta com a quantidade de osso retirado. Hematoma, infecção e dor crônica são complicações comuns no local da retirada do osso autógeno (KNESER et al., 2006).

Os enxertos homólogos não apresentam as complicações relacionadas com a área doadora, como ocorre com o enxerto autólogo. Contudo, têm a desvantagem da resposta inflamatória que desencadeiam e do alto risco da transmissão de doenças infecto-contagiosas associadas às respostas imunológicas, responsáveis por altos índices de insucesso (ROSE; OREFFO, 2002).

Os enxertos heterólogos, especialmente os de origem bovina, vem sendo usados, pois são de fácil obtenção e disponibilidade, porém oferecem riscos de contaminação e/ou rejeição.

Com o intuito de substituir estes enxertos, biomateriais são utilizados no processo de reparação óssea incluindo os naturais como colágeno, quitosana e os sintéticos, tais como metais, cerâmicas e polímeros.

1.1. Biomateriais e engenharia de tecido ósseo

Biomateriais podem ser definidos como quaisquer substâncias ou combinação de substâncias que podem ser utilizados por um período de tempo para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, qualquer tecido órgão ou função (PARK; BRONZINO, 2003).

Os biomateriais podem ser classificados em dois grupos de acordo com a natureza química: naturais, que incluem o colágeno, elastina, seda, tecidos biológicos, ou sintéticos que incluem as cerâmicas, os polímeros sintéticos, metais e compósitos.

De um modo geral os biomateriais devem apresentar as seguintes características (PARK; BRONZINO, 2003):

- ser biocompatível;
- não ser tóxico ou carcinogênico;
- ter propriedades químicas projetadas para o trabalho de reconstrução;
- estabilidade mecânica apropriada ao uso;
- peso e densidade adequados;
- estimular reações biológicas favoráveis aos processos de remodelagem.

O melhor entendimento das interações biomateriais: tecido:células e das respostas celulares aos implantes tem acarretado em um amplo desenvolvimento dos biomateriais. Esses novos biomateriais não visam apenas o preenchimento de espaço, mas também estimular uma resposta biológica quando implantados. Dentre esses se enquadram:

- os materiais inteligentes que são aqueles que usam a analogia com materiais biológicos sendo capazes de modificar e adaptar sua estrutura, morfologia e outras propriedades para substituir ou melhorar alguma função biológica, quando física e/ou quimicamente estimulados (FURTH; ATALA; DYKE, 2007);
- os biomiméticos que são aqueles que mimetizam as propriedades naturais, tais como estrutura e função dos tecidos ou órgãos que irão substituir (SHIN; JO; MIKOS, 2003);
- as matrizes extracelulares (MEC) que são aqueles materiais destinados à engenharia de tecidos visando substituir, manter ou melhorar uma função de um órgão ou tecido (KIM; MOONEY, 1998).

Para a engenharia de tecido ósseo se propõe que a matriz deva induzir a formação do osso e tecidos circunvizinhos ou que atue como portadora para células ósseas implantadas ou outros agentes. A matriz deve conter características particulares como (JONES; LEE; HENCH, 2006):

- Atuar como modelo para o crescimento ósseo *in vitro* e *in vivo* em três dimensões;
- propriedades mecânicas e físicas apropriadas para aplicação;
- tamanhos médios de poros de 200-400µm;

- ser passível de esterilização sem a perda de suas propriedades;
- não ter efeito prejudicial ao tecido circunvizinho;
- não promover crescimento de tecido mole na interface osso-implante;
- boa justaposição óssea;
- ser absorvida na mesma velocidade em que o osso é reparado, com produtos de degradação não-tóxicos que podem ser facilmente excretados pelo organismo;
- crescimento ósseo máximo através de osteoindução e/ou osteocondução, promovendo crescimento ósseo interno;

Dentre as várias matrizes que vêm sendo estudadas, as naturais, tais como o colágeno através de compósitos com fosfatos de cálcio, tem se destacado. Os compostos contendo hidroxiapatita (HA) e colágeno têm potencial para mimetizar e substituir o tecido ósseo (WAHL; CZERNUSKA, 2006), pois a combinação destes dois componentes apresentou osteogênese acelerada (XIE; BAUMANN; McCABE, 2004).

Estudos com compósitos de matrizes de colágeno aniônico com hidroxiapatita mostraram uma baixa irritabilidade tecidual, permitindo a evolução reparativa do tecido ósseo. A avaliação biológica em ratos mostrou que após sessenta dias de implante o compósito encontrava-se incorporado ao processo de ossificação com as cavidades ósseas quase que totalmente preenchidas por tecido ósseo (MARTINS et al., 1998).

O estudo de nanofibras do compósito colágeno/HA mostrou que este biomaterial tem potencial para a mineralização por osteoblastos sendo um biomaterial promissor para a regeneração de tecidos ósseos (VENUGOPAL et al., 2008).

1.2. Tecido ósseo

O tecido ósseo é constituído por fibras de colágeno reforçado por partículas minerais de poucos nanômetros. Da massa total do tecido ósseo cerca de 70% estão sob a forma de hidroxiapatita (HA) depositadas sobre as fibras colagênicas (Figura 1) e a relação Ca/P pode variar entre 1,50 a 1,67 (HABRAKEN; WOLKE; JANSEN, 2007). Os 30% referentes à parte orgânica são quase que exclusivamente compostos por uma única proteína, o colágeno tipo I, que participa de forma importante no processo de mineralização óssea.

Figura 1. Organização hierárquica do osso. (Adaptada de MEYERS et al., 2008).

Durante a maturação óssea a estrutura cristalina do mineral pode sofrer um rearranjo contínuo sendo possível encontrar intermediários que apresentam estruturas cristalinas de compostos que se assemelham a brushita ou monohidrogeno fosfato de cálcio diidratado, fosfato octacálcico e fosfato tricálcico (KAWACHI, 2002) que têm como relações Ca/P mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação Ca/P de fosfatos de cálcio.

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Razão Ca/P
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Brushita ou DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50

1.3. Hidroxiapatita (HA)

Durante a década de 20 reconheceu-se que o mineral presente nos ossos e dentes era muito similar em sua estrutura ao mineral hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (BOSKEY, 1998) (Fig. 2).

Figura 2. Arranjo atômico da hidroxiapatita (SILVA, 2008).

Por ter composição química semelhante à fase mineral dos ossos e possuir características como biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005), 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 mesenquimais e diferenciação osteogênica (ZHAO et al, 2006).

A HA (sintética ou natural) é um dos poucos materiais bioativos usados em aplicações dentais, ortopédicas e maxilo-faciais. A HA tem aplicações como revestimento de biocerâmicas e preenchedores ósseos. Os revestimentos de hidroxiapatita muitas vezes são aplicados aos implantes metálicos (mais comumente titânio / aços inoxidáveis e de ligas de titânio) para alterar as propriedades superficiais. Para preencher defeitos ósseos, a HA pode ser utilizada em várias formas como em pó, blocos ou esferas porosas.

De modo geral a HA é um material frágil e sua resistência mecânica é pobre, não é bioabsorvível e tem uma baixa taxa de substituição, resultando no afrouxamento ou quebra de implantes de HA *in vivo*, não podendo ser utilizada como dispositivo para substituir grandes defeitos ósseos.

Para melhorar essas características, matrizes de HA com colágeno têm sido desenvolvidas já que a adição desta proteína produz materiais com boas qualidades como por exemplo o aumento da resistência mecânica.

1.4. Colágeno

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante no corpo humano, representando aproximadamente 30% das proteínas do corpo. Tem a função de manter a integridade estrutural do tecido e conferir resistência mecânica a diversos tecidos e órgãos. Mais de 90% das proteínas extracelulares no tendão e ossos e mais de 50% na pele são constituídas por colágeno.

Atualmente, são identificados 29 tipos de colágeno (SÖDERHÄLL et al., 2007), os quais se diferenciam na composição de aminoácidos, nos domínios de cada molécula e nos diferentes arranjos estruturais.

O colágeno tipo I é o mais conhecido química e estruturalmente. É facilmente encontrado na pele, tendão, vasos sanguíneos, intestinos e ossos.

A macromolécula de colágeno (Fig. 3) é formada por uma unidade monomérica denominada de tropocolágeno que é formado por duas cadeias idênticas (α_1), possuindo cerca de 1055 resíduos de aminoácidos cada e uma cadeia diferente (α_2), possuindo cerca de 1029 resíduos. Dando origem a uma hélice tripla com 300nm de comprimento e 1,5nm diâmetro.

As extremidades não helicoidais são denominadas de telopeptídeos N- e C-terminais, que possuem respectivamente 16 e 25 resíduos de aminoácidos (CHAPMAN et al., 1990).

Figura 3. Estrutura da molécula de colágeno.

A sequência desses resíduos de aminoácidos é regular, apresentando-se na forma de unidades repetitivas ou tripletes do tipo: (-Gly-X-Y-), em que cada terceiro resíduo de aminoácido é glicina (Gly). Na posição X existem diferentes aminoácidos; no entanto, a prolina (Pro) é típica nesta posição. Na posição Y, existem aminoácidos diferentes, mas aproximadamente cada sétima posição de Y é ocupada por hidroxiprolina (Hyp), sendo que a sequência Gly-Pro-Hyp representa cerca de 10% da molécula.

Prolina e hidroxiprolina são aminoácidos cíclicos e rígidos. A sua presença no esqueleto da molécula impede um movimento rotativo e, portanto, contribui para a estabilidade da hélice tripla. A Gly é a menor molécula de aminoácido e sua presença entre os

resíduos permite uma maior eficiência da torção da cadeia em uma hélice (KENNEDY; WESS, 2003).

Nos tecidos biológicos, o colágeno organiza-se em estruturas fibrilares que são estabilizadas por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta organização fibrilar tem origem na microfibrila. Através das interações entre cinco moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação das microfibrilas, menor unidade estrutural do tecido conjuntivo.

A Figura 4 mostra a formação da fibrila do colágeno.

Figura 4. Formação da fibrila de colágeno.

Formadas as microfibrilas, inicia-se o processo de agregação denominado de fibrilogênese, para formar fibrilas insolúveis, as quais são mantidas por ligações cruzadas intra (entre a mesma unidade de tropocolágeno) e intermoleculares (entre as unidades de tropocolágeno) e também por ligações eletrostáticas que lhes conferem estabilidade (NIMNI; HARKNESS, 1988; VEIS, 1982). A Figura 5 mostra a representação das ligações intra e intermoleculares no tropocolágeno.

Figura 5. Representação da formação intramolecular e intermolecular do colágeno (KOTCH; RAINES, 2006).

O modelo mais aceito para a organização do tropocolágeno é o quarto alternado pentafibrilar proposto por Smith (1968). Neste modelo, as moléculas de tropocolágeno estão deslocadas um quarto de seu comprimento, ou seja, cerca de 67 nm em relação à molécula adjacente, apresentando também uma região de espaçamento vazio entre duas moléculas alinhadas longitudinalmente (“gap”), seguidas de uma região de sobreposição (“overlap”) destas moléculas (Fig. 6). O conjunto “gap:overlap” é o período **D** da estrutura fibrilar do colágeno tipo I.

Figura 6. Esquema de agregação das moléculas de tropocolágeno para a formação da microfibrila.

As fibras insolúveis têm uma alta capacidade de tensão elástica, tendo ainda a função de orientar tecidos em desenvolvimento, que torna o colágeno altamente compatível na utilização como biomaterial (MAYNE, BURGESSON, 1987; HUC, 1985).

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). A resultante das cargas no colágeno pode ser modificada resultando em uma matriz colagênica carregada positiva ou negativamente. Como por exemplo, as reações podem ser de esterificação (REID, GORHAM, LACKIE, 1993) e succinilação (ZHANG et al., 2007).

Uma outra modificação possível do colágeno é a hidrólise alcalina (Fig. 7) dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes na cadeia α do tropocolágeno (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998).

Grupo carboxiamida

Figura 7. Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.

A hidrólise total dos grupos Asn e Gln tem como resultado, a adição de 130 cargas negativas, superpostas em regiões de carga negativa preexistentes na molécula nativa (BET et al., 2003). Devido à alteração de cargas, há a formação de um centro de carga assimétrico localizada na região central do tropocolágeno (Fig 8). Esta característica é importante para o desenvolvimento de materiais dielétricos a qual pode aumentar as propriedades piezoelétricas existentes no colágeno nativo (PLEPIS, GOISSIS, DAS-GUPTA, 1996).

Figura 8. Resultante de carga líquida para o tropocolágeno para colágeno nativo (pontilhado) e colágeno aniônico (preto) (BET, 2000).

As matrizes de colágeno aniônico preparadas a partir de pericárdio bovino mostraram um aumento na adesão e proliferação celular (BET et al., 2003) e ausência de resposta inflamatória (ROSA et al., 2003).

1.5. Matrizes de colágeno (MC)

Nas últimas décadas, o uso de MC para reparação tecidual tem demonstrado que estas podem induzir a remodelagem construtiva de tecidos danificados (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y., 2001; ROCHA et al., 2006), e que podem ser modificadas por processos químicos ou físicos resultando em matrizes carregadas positiva ou negativamente tornando as propriedades mecânicas e fisiológicas mais adequadas para as aplicações desejáveis. Elas atuam como sítios para ancoragem de células, servem como base para o crescimento e o desenvolvimento do novo tecido. Estas matrizes podem ser utilizadas em diversas formas como esponjas, filmes, géis e matrizes acelulares sem a perda de sua estrutura tecidual, que podem ser obtidas pela remoção dos componentes celulares presentes em tecidos biológicos. Com a ausência de células há pouca inflamação não levando a rejeição do tecido implantado.

Estas matrizes apresentam algumas propriedades como (LEE, C.; SINGLA; LEE, Y., 2001):

- Biocompatibilidade;
- Bioatividade;
- Biodegradabilidade;
- Capacidade de sustentação celular.

Devido aos excelentes resultados obtidos em uma variedade de aplicações biomédicas (FENG et al., 2006, CAIONE et al., 2006, BAHARUDDIN et al., 2002), o

desenvolvimento de matrizes acelulares, que são derivadas de tecidos biológicos submetidos a tratamento para remoção de células e componentes celulares, mas que conservam a estrutura nativa, chamou a atenção em diversos estudos. Entre estes tecidos estão a pele, o pericárdio, a serosa, o tendão e as matrizes ósseas desmineralizadas que podem ser obtidas de fontes diferentes como bovina, suína e avestruz.

Como exemplo de aplicações das MC tem-se sua utilização como substituintes de válvulas cardíacas (MIRNAJAFI et al., 2005), pele (METCALFE; FERGUSON, 2007) e ossos (CUNHA et al., 2008).

1.5.1. Tecidos biológicos como fonte para matrizes de colágeno

1.5.1.1. Pele Porcina (PP)

Anatomicamente a pele mais similar a pele humana é a porcina comparando-se com outros animais. A epiderme do porco tem espessura que varia de 30 a 140 μm , estando assim, dentro de um intervalo semelhante ao do homem que varia de 50 a 120 μm e, além disso, a razão derme/epiderme da pele porcina varia 10:1 para 13:1 sendo estas medidas comparáveis a da pele humana (VARDAXIS et al., 1997).

PP (Fig. 9) começou a ser utilizada na década de 60 (BROMBERG; SONG; MOHN, 1965) e é atualmente uma das fontes heterólogas mais utilizadas, devido a grande quantidade de colágeno (95 %), a sua disponibilidade, seu baixo custo e sua estrutura histológica ser similar a da pele humana (RUSZCZAK, 2003).

Figura 9. Pele porcina.

Devido a estas características citadas, os enxertos heterólogos de pele porcina têm sido utilizados no tratamento de feridas cutâneas (HOYAMA et al., 2005), no tratamento em incontinência urinária (BARRINGTON et al., 2002), na reparação de fístula rectovaginal (MOORE et al., 2004) e na reconstrução de defeitos abdominais crônicos (SHAIKH et al., 2007). Também são utilizados em queimaduras como revestimentos biológicos atuando como substituintes temporários enquanto ocorre a cicatrização espontânea do tecido (CHIU; BURD, 2005; FENG et al., 2006). Permacol® é um biomaterial comercial derivado de derme porcina pela remoção de células por processos químicos e enzimáticos e também tem sido largamente utilizado no tratamento de queimaduras (MACLEOD et al.; 2005).

1.5.1.2. Pericárdio Bovino

O pericárdio bovino (PB) é uma membrana fibro-elástica que envolve o coração (Fig. 10) e é um dos tecidos que vem sendo utilizados no desenvolvimento de biomateriais. É um material biológico de baixo custo e de fácil manipulação. A grande vantagem da utilização de PB é o seu alto teor de colágeno, cerca de 97% (GIGLIOTI, 2005), o qual possui uma grande quantidade de grupos reativos que possibilitam alterações químicas do tecido. A modificação química ou fixação, do tecido biológico aumenta sua resistência à degradação enzimática e diminui a sua antigenicidade (NIMMI et al, 1988).

Figura 10. Pericárdio bovino.

PB tem sido utilizado extensivamente como biomaterial na confecção de bioprótese, durante décadas, especialmente para a reparação de lesões cardíacas (OLMOS et al., 1997) após tratamento com diferentes métodos de reticulação (SUNG et al., 1999, SACKS et al., 2007). As próteses vasculares confeccionadas com PB possuem um bom desempenho hidrodinâmico e baixa trombogenicidade (MAIZATO, 2003).

Além disso, este tecido tem sido utilizado no tratamento de valvulopatias, aneurismas e dissecções arteriais, tratamento de hérnias (GAERTNER; BONSACK; DELANEY, 2007), para o revestimento de implantes orbitais após a enucleação (GAYRE et al., 2001), em enxerto dural (BAHARUDDIN et al., 2002) e no tratamento e reparo de ligamento e deficiências do tendão (ROSSOUW; VILLIERS, 2005).

Com a finalidade de reconstituir o diafragma de cão, foi utilizado pericárdio bovino conservado em solução de glutaraldeído. Os autores verificaram boa vedação do defeito, sendo histologicamente observada presença de uma camada de tecido conjuntivo sobre o implante (GALLO et al., 1982).

Os trabalhos realizados com pericárdio bovino mostraram que este material apresenta baixa antigenicidade e toxicidade, possui grande resistência à tração, ausência de

irritação, e sua permanência no interior dos tecidos provoca uma leve reação inflamatória por tempo limitado (BRAILE et al., 1982).

Alguns estudos também mostram que PB pode ser utilizado no processo de reparação óssea. Rocha et al. mostraram que as matrizes derivadas de PB hidrolisadas são osteocondutivas promovendo rápida recuperação do defeito ósseo (ROCHA et al., 2006).

1.5.1.3. Serosa Porcina

O intestino delgado de suínos é composto de 4 camadas, como mostrado na Figura 11.

Figura 11. Diagrama da seção transversal do intestino delgado de suínos.

Para a obtenção da Submucosa Intestinal Porcina (SIS) é feita a remoção das demais camadas do intestino (serosa, camadas do músculo e mucosa), sendo obtido um tubo translúcido de aproximadamente 80 μm de espessura constituído principalmente de colágeno (cerca de 90%) e algumas células do tecido conjuntivo (LINDBERG; BADYLAK, 2001). E a serosa obtida pela remoção das demais camadas internas do intestino delgado é lavada exaustivamente.

Devido à biocompatibilidade, composição, propriedades biomecânicas, taxa de degradação *in vivo*, interação de matriz-célula e a capacidade para suporte na remodelagem construtiva, a SIS vêm sendo estudada como bioenxerto para reparos de diversas estruturas,

tais como esôfago, intestino delgado, bexiga, ureteres, ossos, tendões e parede abdominal (LEE; CHANG; DUNN, 2008, SOCCOL et al., 2006).

Muitos trabalhos utilizando a SIS como matriz de colágeno têm sido desenvolvidos, mas em literatura pouco tem sido descrito utilizando a serosa porcina que é a camada mais externa do intestino delgado de suínos.

Tanto macro quanto microscopicamente, a SIS é muito semelhante a SP utilizada neste trabalho (Fig. 12 e 13).

Figura 12. Aspecto macroscópico: (A) SIS desidratada (BADLAK et al; 1999) e (B) serosa porcina.

Figura 13. Fotomicrografia por MEV de SIS (A) (BROWN-ETRIS; CUTSHALL; HILES, 2002) e serosa porcina (B).

Girardi (2005) utilizou a membrana de serosa porcina hidrolisada por 24 h e mostrou que esta matriz é uma boa opção no reparo de lesões cutâneas em ratos, pois é um

material de baixo custo, tem um excelente manuseio além de atender às principais exigências mencionadas em literatura para qualquer curativo biológico oclusivo.

Desta forma, a serosa porcina torna-se um material para o desenvolvimento de biomateriais que possam ser utilizados na regeneração de tecidos.

1.6. Mineralização do colágeno

Tendo em vista a composição do tecido ósseo, a mineralização do colágeno *in vitro* torna-se de grande interesse para o entendimento dos mecanismos da mineralização *in vivo* bem como para a síntese de materiais a serem utilizados na regeneração óssea.

Relatos mostram o desenvolvimento de um osso artificial com composição e nanoestrutura química similar a do osso natural. Este material composto por HA e colágeno foi sintetizado sob condições biomiméticas e demonstrou que o eixo-c dos nanocristais de HA está regularmente alinhado juntamente com as fibras de colágeno (KIKUCHI et al., 2004).

A nucleação controlada e o crescimento de cristais, *in vitro*, têm demonstrado que a nucleação ocorre nas superfícies que tenham grupos aniônicos concentrando cátions e criando locais de supersaturação seguidos por orientação e nucleação dos cristais. (HARTGERINK; BENIASH; STUPP, 2001).

O estudo da mineralização de tendão de coelho utilizando o método de imersão alternada mostrou que nanocristais de fosfato de cálcio foram formados na superfície e na região interna do tendão. Os cristais foram formados nas fibras do colágeno com os eixos-c dos cristais alinhados paralelamente com as fibras de colágeno, sugerindo que os íons cálcio interagem com a superfície do tendão, mais provavelmente com os grupos carboxílicos do colágeno e subsequente formação de núcleos dos centros cristalinos (YAMAGUSHI et. al., 2003). Além disso, a mineralização pelo método de imersão alternada de filmes colágeno

aniônico derivado de serosa bovina apresentou uma mineralização 1,24 vezes mais rápida que na superfície de filmes de colágeno nativo (GÓES et al., 2007).

Um dos métodos utilizados de mineralização do colágeno tem sido o uso de solução simuladora de fluido corpóreo (SBF) durante certo período de tempo a fim de induzir a mineralização (LICKORISH et al.; 2004; GIRIJA; YOKOGAWA; NAGATA, 2002). A morfologia dos minerais depositados no colágeno apresentou-se na forma de esferas.

O estudo *in situ* por microscopia de fase contraste do crescimento biomimético de HA na superfície de membrana de colágeno tipo I imersa em SBF, mostrou a formação dos cristais preferencialmente na superfície de colágeno e que grupos carregados da membrana de colágeno são de grande importância no crescimento desses cristais (ZHANG et al., 2004).

Gel de colágeno obtido de tendão de ratos foi mineralizado por imersão em soluções de cálcio e fosfato. Observou-se, por FTIR a interação entre os íons cálcio e os íons carboxilatos do colágeno e por MEV a formação de aglomerados globulares de fosfato de cálcio com cristalinidade similar àqueles da fase inorgânica do osso (BERTRAN; ALLEGRETTI; BERTAZZO, 2007).

Estudo utilizando matriz de colágeno tipo I mineralizada comprovou que o material tem boa biocompatibilidade, a reabsorção e remodelação foram muito semelhantes ao do enxerto ósseo autólogo, quando implantados no fêmur (YOKOYAMA et al., 2005).

O estudo de colágeno aniônico como suporte à reconstrução de tecido ósseo mostrou que este material é capaz de induzir a deposição de sais de fosfato de cálcio, sugerindo assim que mudanças dielétricas na matriz colagênica podem ter sido os indutores do processo de mineralização do colágeno *in vitro*, como um sistema semelhante ao estágio de mineralização do osso (GOISSIS; MAGINADOR; MARTINS, 2003).

Membranas de colágeno aniônico, foram capazes de sustentar o crescimento de osteoblasto por cerca de 8 semanas e a formação de tecido ósseo no interior dessas membranas, sugerindo que as mesmas estimulam a formação de matriz óssea por parte dos osteoblastos (CUNHA, SANTOS, ARNALDO; GENARI, 2005).

Vários trabalhos têm sido reportados com matrizes mineralizadas de colágeno tipo I em diferentes formas como em géis, membranas e esponjas, mas a mineralização *in vitro* de matrizes acelulares como pericárdio bovino, pele e serosa porcina não têm sido descrito.

2. OBJETIVOS

Na área de engenharia de tecido ósseo há uma alta demanda por materiais com potencialidade de uso em regeneração óssea. A combinação de colágeno tipo I com fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita (HA) gera um material com composição e estrutura próximas à da matriz óssea. Assim este trabalho tem como objetivos:

- Preparação de matrizes de colágeno acelulares através da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de asparagina e glutamina presentes na cadeia α do tropocolágeno, com diferentes tempos de hidrólise utilizando como fontes pericárdio bovino, pele e serosa porcina;
- Mineralização *in vitro* das matrizes hidrolisadas;
- Quantificação da mineralização por termogravimetria.
- Teste de citotoxicidade das matrizes.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Os tecidos biológicos utilizados foram:

- pele porcina (PPn), retirada da região ventral. O material foi obtido em açougue;
- serosa porcina (SPn) retirada da parte externa do intestino de suínos, a parte interna é retirada e descartada. Este material foi obtido em açougue, sendo normalmente usado para a fabricação de revestimentos para lingüiças.
- pericárdio bovino (PBn) — fornecido pela Braile Biomédica, SA, São José do Rio Preto (SP). O material é usado para confecção de válvulas cardíacas, sendo obtido em frigorífico, imediatamente após o abate dos animais (machos), que têm idades variando entre 30-60 meses.

3.2. Limpeza dos tecidos utilizados

SPn e PBn foram lavados com solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada. PPn foi limpa mecanicamente com uma faca para retirada do excesso de gordura, lavada em solução salina 0,9% (NaCl) e água destilada.

Devido ao excesso de gordura, foi necessário um tratamento prévio para PPn, que foi colocada em uma mistura clorofórmio/metanol (2/1 v/v) em temperatura ambiente por 2 h e após este período a pele foi lavada exaustivamente com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4 por 6 h (PRASERTSUNG et al., 2007).

3.3. Preparação de matrizes de colágeno aniônico (hidrolisadas)

Após a limpeza PPn, SPn e PBn foram imersas em uma solução alcalina (hidrólise) por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Esta solução contém sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, conforme procedimento usual do laboratório (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS 1998). Após estes períodos de tempo as matrizes foram colocadas em outra solução contendo sulfatos e cloretos dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . O excesso de sais foi removido por lavagens em 3% de solução de ácido bórico, água desionizada, seguida por EDTA 0,3% de solução de pH11, e água desionizada.

Após o procedimento de hidrólise, as matrizes foram mantidas em solução de H_3PO_4 0,01 mol L^{-1} por 24 h para intumescimento e foram liofilizadas em um equipamento da EDWARDS modelo FREEZE DRYER Modulyo e estocadas a 25 °C.

A matriz de pele porcina hidrolisada por 96h sem pré-tratamento orgânico foi nomeada PP96S. As matrizes obtidas após o tratamento orgânico foram nomeadas como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Matrizes de colágeno aniônico tipo I obtidas após hidrólise alcalina

Matrizes	Tempo de Hidrólise (h)				
	0	24	48	72	96
Pele Porcina	PPn	PP24	PP48	PP72	PP96
Pericárdio Bovino	PBn	PB24	PB48	PB72	PB96
Serosa Porcina	SPn	SP24	SP48	SP72	SP96

O fluxograma apresentado na Figura 14 resume a preparação das matrizes:

Figura 14. Fluxograma da preparação das matrizes.

3.4. Mineralização das matrizes

Foram testados três métodos de mineralização a fim de se obter um procedimento mais reprodutível e com uma quantidade de sal mais elevada. Os testes foram feitos com a matriz PP96S e após obtenção do resíduo inorgânico por termogravimetria pôde-se escolher o método mais adequado a ser utilizado para as demais matrizes.

Método I (1,5 SBF)

Este método é bastante utilizado em estudos de mineralização *in vitro* e desta forma foi o primeiro a ser testado. O método consiste da imersão da matriz de colágeno em uma solução simuladora de fluido biológico (SBF) descrita em literatura (KOKUBO et al, 2006). As concentrações iônicas dos sais da solução utilizada estão na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração iônica dos sais da solução utilizada (KOKUBO et al, 2006)

Íons	SBF(mmol L ⁻¹)	1,5SBF (mmol L ⁻¹)
Na ⁺	142,00	213,00
K ⁺	5,00	7,50
Ca ²⁺	2,50	3,80
Mg ²⁺	1,50	2,30
HCO ³⁻	4,20	6,30
Cl ⁻	148,80	223,00
HPO ₄ ²⁻	1,00	1,50
SO ₄ ²⁻	0,50	0,75

Os sais utilizados foram Na₂HPO₄, KHCO₃, KCl, NaHCO₃, NaCl, MgSO₄ 7H₂O, MgCl₂ 6 H₂O e CaCl₂ 2 H₂O e foram dissolvidos em água desionizada. O pH da solução foi ajustado para 7,2 com uma solução HCl 0,01 mol L⁻¹ e Tris 0,05 mol L⁻¹. A taxa de nucleação e crescimento de HA pode ser acelerada pelo uso de 1,5 SBF, que possui uma concentração iônica 1,5 vezes maior que para SBF (TANAHASHI et al.; 1994). Neste trabalho foi utilizada apenas a solução de 1,5 SBF já que o objetivo era conseguir uma maior mineralização.

A matriz PP96S foi cortada em dois pedaços semelhantes e foi colocada na solução 1,5 SBF por 5 e 10 dias a 37 °C, retiradas da solução e lavadas com água desionizada. Em seguida foram congeladas, liofilizadas e analisadas por termogravimetria.

Método II (Cela dupla termostatizada)

A cela dupla consiste de uma câmara com duas partes separadas por um orifício no centro, no qual o material a ser mineralizado pode ser fixado, de modo que as soluções de Ca²⁺ e PO₄³⁻ fiquem separadas pelo material, que permite a difusão dos íons com a conseqüente precipitação de fosfatos de cálcio (Fig.15).

O estudo de mineralização foi feito em cela dupla termostatzada (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2007) a 37 °C e sob agitação, por 24h, com soluções de CaCl_2 0,1 mol L^{-1} e NaH_2PO_4 0,06 mol L^{-1} ambas em pH 7,4. Após a mineralização, PP96SC foi lavada com água desionizada, congelada e liofilizada.

Figura 15. Cela dupla utilizada para mineralização das matrizes.

Método III (Imersão alternada)

Depois da hidrólise e liofilização as matrizes foram colocadas em soluções para mineralização seguindo os seguintes passos:

1- Imersão em 60 mL de uma solução de CaCl_2 0,2 mol L^{-1} em tampão Tris 0,05 mol L^{-1} (pH 7,4) a 37 °C por 30 minutos (YAMAGUSHI et. al., 2003).

2- Lavagem com água desionizada;

3- Imersão em solução Na_2HPO_4 0,12 mol L^{-1} em tampão Tris 0,05 mol L^{-1} (pH 9,0) a 37 °C por 30 minutos;

4- Lavagem com água desionizada;

O ciclo de imersão (Fig. 16) foi repetido por 6 vezes para obtenção das matrizes mineralizadas, que foram então lavadas com água desionizada, liofilizadas e analisadas.

Figura 16. Método de imersão alternada.

Este foi o método escolhido para ser usado para todas as matrizes, pois foi o que obteve uma maior quantidade de resíduo inorgânico e reprodutibilidade.

As matrizes obtidas após a mineralização foram nomeadas como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Matrizes de colágeno obtidas após mineralização pelo método de imersão alternada

Matrizes	Tempo de hidrólise (h)			
	24	48	72	96
PP mineralizada	PP24C	PP48C	PP72C	PP96C
SP mineralizada	SP24C	SP48C	SP72C	SP96C
PB mineralizado	PB24C	PB48C	PB72C	PB96C

3.5. Caracterização das matrizes

3.5.1. Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um equipamento TA Instruments, modelo DSC 2010 calibrado com padrão de índio. A razão de aquecimento foi de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, na faixa de aquecimento de 5 a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, porém foram mostrados apenas na faixa de $30\text{--}80^{\circ}\text{C}$ para mostrar as transições para o colágeno. Foi utilizado fluxo de gás 80 mL min^{-1} em atmosfera de ar sintético. Foram utilizadas massas de cerca de 10 mg, em suportes herméticos de alumínio.

3.5.2. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas utilizando amostras de aproximadamente 10 mg em cadinho de alumina, atmosfera de ar sintético com variação de temperatura de 25 a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$, razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e fluxo de gás 90 mL min^{-1} em um equipamento TGA 2050 (TA Instruments), calibrado com oxalato de cálcio.

3.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias foram obtidas em um equipamento LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltda), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.), utilizando-se feixe de 20 keV. As amostras foram recobertas previamente com 20 nm de liga ouro-paládio em um metalizador Balsers modelo SDC 050.

3.5.4. Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas das matrizes mineralizadas, de aproximadamente 1x1 cm, foram obtidos em um difratômetro automático Rigaku-Rotaflex Ru-200B, com radiação monocromática de CuK α ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) com potência de 50 kV, 100 mA.

3.5.5. Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

A técnica permite a determinação da composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras, a partir de emissão de raios X característicos. A análise de Energia Dispersiva (EDS) foi realizada em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV à 5,9 keV, acoplado a um Microscópio Eletrônico LEO 440 (LEO Electron Microscopy Ltd), com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, “dead time” de 30 %, corrente de 2,82 A e I “probe” de 950 pA. As análises foram realizadas utilizando-se amostras das matrizes mineralizadas na forma de pastilhas que foram prensadas com 8 toneladas e recobertas com carbono. Para a análise semi-quantitativa foi utilizado o ISIS software 3.1.

3.5.6. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido em pastilhas de KBr em um intervalo entre 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} utilizando um espectrofotômetro de FTIR BOMEN MB-120. As matrizes obtidas eram muito rígidas e as partículas de fosfato de cálcio não se desprendiam facilmente, por isso as matrizes foram picotadas para a obtenção das pastilhas.

3.5.7. Avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*

Esta análise foi realizada no Grupo de Cultura Celular e Fotossensibilizadores – DQFM – IQSC/USP por Cláudia Bernal sob coordenação da Profa Dr. Janice Rodrigues Perussi.

As matrizes derivadas de pericárdio bovino e serosa porcina foram esterilizadas previamente com óxido de etileno pela Oxetil Indústria e Comércio de Produtos Esterilizados Ltda – EPP, Santo Anastácio – SP e as matrizes derivadas de pele porcina, também esterilizadas com óxido de etileno, pela Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, Campinas – SP. Foram utilizadas para este teste preliminar as matrizes hidrolisadas por 24 e 96 h e suas respectivas mineralizações, pois as matrizes de 48 e 72h seguem a mesma tendência das outras duas matrizes.

Inicialmente foi feito a cultura das linhagens celulares e em seguida o método utilizado para o ensaio de citotoxicidade foi o de difusão em Agar. Neste método a monocamada celular é sobreposta por uma camada de Agar e os materiais a serem testados são colocados sobre esta camada.

3.5.7.1. Cultura Celular

Todas as manipulações com as células foram realizadas em capela de fluxo laminar. As células utilizadas foram:

- Linhagem celular de laringe humana (HEp-2), depositada no ATCC (American Type Culture Collection) sob o código CCL-23, a qual é obtida a partir de um carcinoma de laringe humana, de morfologia epitelial e crescimento aderente a um substrato sólido;

- Linhagem celular de fibroblastos de rato (McCoy B), depositada no ATCC (American Type Culture Collection) sob o código CRL-1696.

Estas linhagens foram cultivadas separadamente em meio ISCOVE'S (Anexo I) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos ampicilina e estreptomicina. Este ensaio está de acordo com a norma ASTM F895-84 (2006).

Foram feitos subcultivos das células a cada três dias e as células foram mantidas em estufa de cultura a 37 °C, atmosfera de ar 95% e 5% de CO₂ (CARVALHO, 2001).

O meio de cultura foi removido por aspiração e em seguida adicionou-se solução de Tripsina – EDTA 0,02%. Para que as ligações entre as células e a superfície tratada do frasco rompessem e as células se soltassem aguardou-se cerca de cinco minutos. Após este período o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo cônico, centrifugou-se a 1000 rpm durante 40 segundos, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em meio de cultura (Fig. 17).

Figura 17. Suspensão das células.

Para a determinação da viabilidade celular utilizou-se o método da contagem em câmara de Neubauer (Fig. 18) e o teste da exclusão do corante (CARVALHO, 2001). Para a

contagem do número de células retirou-se uma alíquota após a homogeneização. Em seguida, diluiu-se a suspensão de células com meio ISCOVE's com 10% de soro fetal bovino e as células foram plaqueadas novamente em frascos apropriados.

Figura 18. Câmara de Neubauer.

Após a contagem ($3,0 \times 10^5$ células mL^{-1} , valor mínimo aceitável), as células foram utilizadas nos testes de citotoxicidade utilizando o método de difusão em ágar.

3.5.7.2. Método de difusão em ágar

O teste de citotoxicidade foi feito pelo método de difusão em ágar, utilizando como corante o vermelho neutro (ROGERO et al., 2003) que irá corar somente as células intactas. Neste método a linhagem celular foi incubada durante 48 h a 37 °C em placas de Petri em atmosfera de ar com 5% de CO_2 .

Após este período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado um meio de cobertura sólido composto de partes iguais do meio ISCOVE'S (Sigma) e ágar (Sigma) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (JTBaker). No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o meio, ambos a uma temperatura de aproximadamente 44 °C. Fragmentos com cerca de 0,5 cm^2 de área das

matrizes foram colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa (Fig. 19B). As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5 % CO₂ a 37 °C por 24 h.

Figura 19. Meio de cobertura com corante vermelho neutro (A) e matriz sendo colocada na placa de petri (B).

Para controle positivo de citotoxicidade foram utilizados fragmentos de látex estéreis e como controle negativo fragmentos de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica. As placas foram analisadas macroscopicamente quanto à presença de halo e microscopicamente quanto à integridade celular ao redor da amostra (ROGERO et al., 2003).

As amostras foram avaliadas em triplicata em cada um dos experimentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Mineralização – Ensaio Piloto

A matriz PP96S foi escolhida para um teste prévio de mineralização usando-se os três métodos propostos: 1,5 SBF (método I), cela dupla termostatzada (método II) e imersão alternada (método III).

O objetivo deste teste prévio foi observar a reprodutibilidade e a porcentagem de mineralização obtida em cada um dos três métodos de mineralização. Os valores de porcentagem de mineralização foram determinados a partir dos resíduos obtidos a 750 °C nas curvas termogravimétricas (Fig. 20).

Figura 20. Curvas termogravimétricas do método 1,5 SBF (—) 5 dias e (—) 10 dias.

Esta metodologia foi descartada por ser muito baixo o conteúdo de material inorgânico depositado e pelo tempo de imersão ser relativamente longo (5 ou 10 dias), quando comparada com os outros dois métodos.

A Figura 21 mostra as curvas termogravimétricas para as matrizes mineralizadas pelo método II que foram feitas em triplicata. Observa-se que não ocorreu repetitividade na obtenção do resíduo tendo-se uma variação de 5 a 30%, não sendo o método mais adequado a ser usado.

Figura 21. Curvas termogravimétricas de PP96SC em triplicata, obtida após a mineralização pelo método II.

A Fig. 22 mostra a fotomicrografia por MEV da matriz mineralizada onde se vê que a mineralização não ocorre de modo homogêneo, observando-se regiões que não há deposição de sais na superfície (Setas).

Figura 22. Fotomicrografia por MEV de PP96SC, obtida pelo método da cela dupla termostatzada (aumento de 500 vezes).

O método de mineralização que obteve uma porcentagem de resíduo inorgânico com maior repetitividade e em maior quantidade utilizando a termogravimetria foi o método de imersão alternada (método III), que teve uma variação de aproximadamente 18-20% (Fig. 23).

Figura 23. Curvas termogravimétricas de PP96SC em triplicata obtida após mineralização pelo método III.

A Figura 24 mostra a deposição de sais de fosfato por toda a superfície.

Figura 24. Fotomicrografia por MEV de PP96SC, obtida pelo método de imersão (aumento de 500 vezes).

Assim o método de imersão alternada foi o método escolhido neste trabalho para a mineralização dos tecidos pele porcina, pericárdio bovino e serosa porcina, pois foi o método com maior rendimento de mineralização e o mais reprodutível.

4.2. Avaliação Macroscópica das matrizes

Os tecidos hidrolisados possuem espessuras diferentes, sendo que pele porcina é a matriz mais espessa, seguida por pericárdio bovino e serosa porcina. As medidas (n=25) das espessuras foram feitas com um micrômetro (modelo MITUTOYO 0-25 mm) e foram de $4,60 \pm 0,04$, $1,90 \pm 0,05$ e $0,50 \pm 0,03$ mm, respectivamente.

4.2.1. Pele Porcina (PP)

Foram utilizados dois tratamentos na pele porcina com e sem a utilização de solvente orgânico. Após a limpeza e liofilização, a matriz PPn apresentou-se rígida e tinha

uma coloração amarelada (Fig. 25A) devido a presença de gordura na pele. Após limpeza sem o uso de solvente orgânico e hidrólise alcalina, esta matriz ficou mais clara, ou seja, pelo menos parte da gordura presente foi removida neste tratamento (Fig. 25B). Após a mineralização a matriz tornou-se mais rígida e com aspecto esbranquiçado.

Figura 25. Foto digital das matrizes (A) PPn, (B) PP96S e (C) PP96S mineralizada.

Após tratamento com solvente orgânico a matriz hidrolisada também se apresentou mais clara em relação à nativa. A matriz PP96C apresentou-se mais rígida e com sais brancos (fosfato de cálcio) em toda a superfície (Fig. 26B).

Figura 26. Foto digital das matrizes pré-tratadas com solvente orgânico: (A) PP96 e (B) PP96C.

As matrizes com tempos de hidrólise de 24, 48 e 72h tiveram o mesmo comportamento, sem diferenças aparentes entre elas.

4.2.2. Pericárdio Bovino

Após a limpeza e liofilização PBn tinha um aspecto esbranquiçado. A matriz PB96 tornou-se mais transparente após a hidrólise (Fig. 27B) e após a mineralização apresentou-se esbranquiçada perdendo a transparência quando comparada com a matriz

apenas hidrolisada. Além disso, PP96C (Fig. 27C) mostrou-se mais rígida que PP96 (Fig. 27B).

Figura 27. Foto digital das matrizes (A) PBn, (B) PB96 e (C) PB96C.

As demais matrizes hidrolisadas por 24, 48 e 72h apresentaram o mesmo aspecto.

4.2.3. Serosa porcina

Após a hidrólise alcalina a matriz SP96 apresentou-se mais transparente (Fig. 28B) em comparação com a SPn (Fig.28A). Após mineralização, SP96C tornou-se mais esbranquiçada devido à presença de sais de fosfato de cálcio (Fig. 28C).

Figura 28. Foto digital das matrizes (A) SPn, (B) SP96 e (C) SP96C.

As demais matrizes hidrolisadas e suas respectivas mineralizações se comportaram da mesma maneira. Comparando-se os três tecidos biológicos utilizados, observa-se que a pele porcina é a mais gordurosa e a mais espessa. Quando hidrolisada é a mais rígida e pericárdio bovino e serosa porcina são mais maleáveis. Observando-se as Figuras 26B, 27B e 28B a pele porcina é a única que não apresenta um aspecto transparente quando submetida à hidrólise alcalina.

4.3. Caracterização das matrizes

4.3.1. Potencial de citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade é o efeito nocivo ou prejudicial (não desejado) produzido pelo biomaterial. O teste de citotoxicidade *in vitro* é usado como uma avaliação inicial e tem como objetivo detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais no sistema biológico, utilizando técnicas de cultura de células.

Os resultados para o controle negativo e positivo são mostrados na Figura 29. O controle positivo (látex) é uma substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível e controle negativo (papel atóxico) é o material ou substância que não produza efeito citotóxico.

Figura 29. Avaliação macroscópica do controle positivo (A) e negativo (B).

No controle positivo (Fig. 29A) há a presença de um halo (aspecto transparente) ao redor do látex utilizado e para o negativo não se observa formação de halo (Fig. 29B). A avaliação dos resultados do teste de citotoxicidade foi feita pela observação do halo, que é representada pela área não corada pelo corante. Este halo aparece, pois há morte celular e liberação do corante vermelho neutro incorporado nas células. A citotoxicidade foi avaliada

pela medida com uma régua milimétrica do diâmetro do halo formado (ROGERO et al., 2003). A Tabela 5 mostra os valores dos diâmetros dos halos formados para os controles positivo e negativo.

Tabela 5. Valores dos diâmetros dos halos formados no controle positivo e negativo

Amostra	Diâmetro do halo (mm)
Controle negativo	$0,0 \pm 0,5$
Controle positivo	$12,0 \pm 0,5$

Na avaliação microscópica (Figura 30) pode observar-se que no controle negativo há presença de células já para o controle positivo há morte celular com regiões em que não aparecem células (setas).

Figura 30. Foto digital das células HEP-2 no controle positivo (A) e negativo (B).

Os testes foram feitos para as matrizes hidrolisadas por 24 e 96 h e sua respectiva mineralização. As matrizes derivadas de pericárdio bovino e serosa porcina não apresentaram halo ao redor das matrizes não indicando, portanto, nenhum efeito citotóxico (Fig. 31 e 32).

Figura 31. Foto digital das matrizes derivadas de pericárdio bovino PB24 (A), PB24C (B), PB96 (C) e PB96C (D).

Figura 32. Foto digital das matrizes derivadas de serosa porcina SP24 (A) e SP24C (B), SP96 (C) e SP96C (D).

Os primeiros resultados obtidos para as matrizes derivadas de pele porcina hidrolisadas por 96 h e 24 h (não tratadas com solvente orgânico) apresentaram citotoxicidade. Isso pode ser observado pela presença de halo de cerca de $27,0 \pm 0,5$ mm. ao redor das matrizes (Fig. 33). As matrizes mineralizadas também apresentaram o efeito citotóxico.

Figura 33. Foto digital das matrizes derivadas de pele porcina PP24S (A), PP24SC (B), PP96S (C) e PP96SC (D).

Em uma avaliação microscópica da amostra PP24S (Fig. 34) pode-se observar claramente a interface do halo em que se tem a morte celular (região mais escura).

Figura 34. Foto digital da avaliação microscópica da matriz PP24S.

Segundo Rodrigues (2006), esta toxidade está relacionada com a presença de gordura não removida durante a hidrólise alcalina. Optou-se então em fazer um pré-tratamento antes da hidrólise com a finalidade da retirada desta gordura em que as matrizes são lavadas com uma mistura clorofórmio:metanol.

Repetiram-se os testes de citotoxicidade com as matrizes tratadas previamente com clorofórmio:metanol e estas não apresentaram mais o efeito citotóxico, confirmado pela ausência de halo ao redor das matrizes (Fig. 35), tanto para 24 como 96 h de tratamento alcalino.

Os resultados indicaram que a pele porcina é muito mais gordurosa que o pericárdio bovino e a serosa porcina e que é necessário um pré-tratamento dessa matriz antes da hidrólise alcalina.

Figura 35. Foto digital da avaliação macroscópica das matrizes derivadas de pele porcina PP24 (A), PP24C (B), PP96 (C) e PP96C (D).

Os tempos intermediários para as matrizes (48 e 72 h) devem seguir a mesma tendência para os resultados das matrizes hidrolisadas por 24 e 96 h, ou seja, não devem apresentar citotoxicidade. Com isso pode-se dizer que não foram detectados efeitos tóxicos das matrizes mineralizadas e não mineralizadas, pelo contato direto dos materiais com a linhagem das células HEp-2 e McCoy B.

4.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas DSC fornecem um modo sensível de entendimento dos eventos de desnaturação térmica quando o colágeno é aquecido. A desnaturação (Fig. 36) pode ser definida como a transição da hélice tripla para uma forma com distribuição desordenada

devido a muitos fatores tais como aquecimento, ácidos, álcoois e outros agentes (BADEA et al., 2008).

Figura 36. Desnaturação do colágeno.

Quando o colágeno é submetido a altas temperaturas, as ligações intramoleculares são quebradas e a proteína passa de uma estrutura cristalina altamente organizada a um estado aleatório, denominado de gelatina (ARNOCZKY; AKSAN, 2000).

Acredita-se que esta transição é composta por duas etapas: a primeira etapa envolve a ruptura de ligação de hidrogênio entre as três cadeias polipeptídicas da molécula tropocolágeno, a segunda etapa envolve a ruptura intramolecular da ligação hidrogênio da cadeia α (BERNAL; STANLEY, 1987).

Nas curvas DSC a transição aparece como uma descontinuidade na linha de base, que é proporcional à diferença na capacidade de calor antes e depois da desnaturação. Neste trabalho o valor da temperatura de desnaturação (T_d) foi obtido pela inflexão nas curvas DSC, como mostrado na Figura 37.

Figura 37. Curva representativa da determinação de Td por DSC.

As curvas DSC permitiram a determinação da temperatura de desnaturação (Td) das matrizes. A Figura 38 mostra as curvas das matrizes nativas, hidrolisadas por 96 h e as mineralizadas. As curvas para os demais tempos estão apresentados no Apêndice 1.

As matrizes de colágeno hidrolisadas apresentaram uma diminuição da Td após a hidrólise alcalina quando comparadas com o tecido biológico nativo (Tabela 6). Este fato é resultante da quebra das ligações cruzadas (reticulação) pela hidrólise alcalina utilizada para hidrolisar os grupos carboxílicos dos resíduos de amionácidos Asn e Gln. Além disso, a hidrólise altera a distribuição de cargas no tropocolágeno causando uma desorganização das fibras diminuindo assim a sua estabilidade (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). Esta estabilidade é inversamente proporcional ao tempo de hidrólise. Embora haja esta diminuição da temperatura de desnaturação, a hélice tripla do colágeno permanece íntegra, uma vez que para colágeno desnaturado, ou seja, gelatina, não há transição térmica na faixa de temperatura estudada (FLANDIN; BUFLEVANT; HERBAGE, 1984).

Figura 38. Curvas DSC dos tecidos com ou sem hidrólise alcalina (96h) e mineralizados, (A) Pele Porcina, (B) Pericárdio Bovino e (C) Serosa Porcina.

A Figura 39 mostra a variação de Td com o aumento do tempo de hidrólise para as matrizes. Observa-se que a Td para as matrizes obtidas de pele porcina é bem menor que pericárdio e serosa porcina, fato este que pode ser devido à diferença na disposição das fibras dos tecidos e na composição dos aminoácidos. Quando as matrizes são submetidas à hidrólise alcalina a pele porcina é a menos afetada tendendo a uma Td constante. A serosa e o pericárdio bovino são mais afetados com este tratamento.

Figura 39. Variação da Td de acordo com o tempo de hidrólise das matrizes (A) não mineralizadas e (B) mineralizadas; derivadas de PP (—), PB (—) e SP (—).

Quando as matrizes pele e serosa porcina são mineralizadas tendem a um valor constante na Td para maiores tempos de hidrólise, exceto para pericárdio bovino que tem valores decrescentes para maiores tempos de tratamento alcalino.

A Tabela 6 mostra que houve um aumento da Td para todas as matrizes após a mineralização, indicando que a deposição de sais aumenta a estabilidade da hélice tripla (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2008, GELINSKY et al., 2008). Este comportamento pode ser explicado pela interação dos íons cálcio com os grupos carboxílicos do colágeno, que dificulta a desestruturação da hélice tripla. Tal comportamento foi observado em estudos de desmineralização, ou seja, remoção de fosfato de cálcio da matriz óssea que mostra uma diminuição na temperatura de desnaturação do colágeno, sugerindo que a presença de fosfato de cálcio estabiliza a hélice tripla (KRONICK; COOKE, 1996; TREBACZ; WÓJTOWICZ, 2005).

Tabela 6. Temperatura de desnaturação do colágeno presente nos tecidos e nas matrizes

Matrizes		Td (°C)
Pele Porcina	PPn	66,8
	PP24	47,0
	PP24C	48,0
	PP48	44,6
	PP48C	45,2
	PP72	42,2
	PP72C	43,8
	PP96	40,9
	PP96C	45,9
Pericárdio Bovino	PBn	69,9
	PB24	54,6
	PB24C	55,6
	PB48	52,8
	PB48C	55,5
	PB72	44,1
	PB72C	46,4
	PB96	39,1
	PB96C	42,6
Serosa Porcina	SPn	70,1
	SP24	58,9
	SP24C	59,8
	SP48	51,8
	SP48C	54,7
	SP72	47,2
	SP72C	56,0
	SP96	46,1
	SP96C	55,8

4.3.3. Termogravimetria

Para a determinação da estabilidade térmica das matrizes (mineralizadas ou não) e para a obtenção da quantidade de material inorgânico presente, foram feitas curvas termogravimétricas em atmosfera de ar sintético. Vários trabalhos em literatura mostram a mineralização de matrizes de colágeno, no entanto poucos demonstram a quantificação de sais de fosfato por termogravimetria.

A Figura 40 mostra as curvas TG/DTG das matrizes sem tratamento, hidrolisadas (96 h) e hidrolisadas mineralizadas. As curvas para os demais tempos de hidrólise estão no Apêndice 2. Todas as curvas apresentaram três eventos aos quais são relacionados à perda de água, a degradação e a carbonização. O primeiro entre 25 e 200 °C é relacionado ao conteúdo de água presente nas matrizes. O segundo na faixa de 200-400 °C é devido à degradação da estrutura da molécula de colágeno e o terceiro estágio ocorre na faixa de 400-650 °C, relacionado à decomposição dos compostos e carbonização (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2008).

No segundo estágio, em que ocorre a degradação do colágeno, pode ser observado um decréscimo na estabilidade térmica depois da hidrólise alcalina e um aumento quando ocorre a mineralização (Tabela 7), sugerindo que a mineralização estabiliza a estrutura colagênica. Os valores de temperatura de degradação foram obtidos considerando-se o “onset point” nas curvas termogravimétricas. Para determinar o conteúdo de material inorgânico, ou seja, a quantidade de fosfato de cálcio depositada na matriz durante o processo de mineralização, os resíduos foram obtidos a 750°C (Tabela 7), uma vez que a hidroxiapatita (produto mais desejável durante a mineralização) é estável até 1200 °C (MARKOVIC; FOWLER; TUNG, 2004) e que todo o material orgânico presente já se decompõe.

Figura 40. Curva TG/DTG das matrizes (—) sem tratamento, (—) hidrolisadas por 96h e (—) mineralizadas, — TG; DTG.

Tabela 7. Porcentagens de perda de massa das matrizes obtidas através de TG/DTG

Matrizes	Perda de massa (%)			Resíduo (%) em 750°C	Temperatura de degradação do colágeno (°C)
	25-200°C	200-400°C	400-650°C		
PPn	7,7	57,3	34,6	0,4	280,7
PP24	9,7	43,2	45,6	1,5	276,5
PP24C	9,8	33,8	32,0	24,4	288,4
PP48	9,1	42,9	46,4	1,6	274,7
PP48C	11,4	31,5	27,0	30,1	286,1
PP72	8,3	46,4	43,8	1,5	269,1
PP72C	9,7	27,3	24,8	38,2	289,5
PP96	8,8	44,8	44,9	1,4	275,5
PP96C	9,9	23,4	15,5	51,2	280,6
PBn	15,1	42,8	39,9	0,7	273,4
PB24	13,0	42,9	42,2	1,6	261,8
PB24C	14,1	29,2	22,0	34,7	279,9
PB48	12,0	43,7	42,3	1,8	270,1
PB48C	9,4	28,7	24,9	36,7	290,5
PB72	10,3	44,7	43,2	1,8	269,1
PB72C	13,4	25,5	22,8	37,5	288,8
PB96	13,6	41,6	42,8	2,0	270,7
PB96C	12,5	22,3	19,4	45,8	290,4
SPn	15,9	40,8	42,8	0	261,9
SP24	17,6	39,1	41,9	0,8	256,6
SP24C	10,4	32,85	10,3	46,4	271,5
SP48	14,7	40,5	41,9	1,7	256,2
SP48C	12,1	28,9	9,6	49,1	274,9
SP72	17,6	39,7	39,8	0,8	258,5
SP72C	10,2	27,9	9,4	52,5	282,9
SP96	16,7	41,6	41,5	0,1	248,2
SP96C	8,2	28,5	8,9	54,2	277,2

Pode-se observar que a mineralização é maior nas matrizes derivadas de serosa porcina, o que pode ser explicado pela menor espessura da matriz e/ou ainda no diferente arranjo estrutural dos tecidos, ou seja, a disposição das fibras que é diferente em cada tecido.

As matrizes hidrolisadas e não mineralizadas tiveram resíduos menores que 2%. A quantidade de resíduo provavelmente foi em decorrência de sais residuais ainda presentes nas matrizes após hidrólise alcalina.

Pode-se verificar que a quantidade de colágeno é praticamente a mesma em todas as matrizes tanto nativas quanto hidrolisadas exceto para a matriz PPn que apresentou uma quantidade superior relacionado ao colágeno e a gordura presente (200 à 400°C).

As matrizes mineralizadas mostraram valores de resíduo que variaram de 20 a 50%, atribuídos à deposição de fosfato de cálcio nas matrizes. Foi observado que quanto maior o tempo de hidrólise alcalina, maior a quantidade de sal depositada na matriz, independente do tecido biológico utilizado. Além disso, observou-se que a temperatura de degradação das matrizes mineralizadas é maior em relação às não mineralizadas, devido à interação dos íons cálcio com o colágeno.

Estudos mostram que grupos carboxílicos das matrizes são importantes no processo de mineralização óssea (SATO, 2007). Os grupos carregados negativamente dos aminoácidos nas moléculas de tropocolágeno provavelmente têm uma função importante em regular a distribuição de HA, devido à boa afinidade destes por íons cálcio produzindo assim uma distribuição uniforme de partículas na superfície do colágeno (ZHANG et al, 2004; GÓES et al., 2007).

Em trabalhos anteriores do grupo, o estudo do número de incrementos de grupos carboxilatos após a hidrólise alcalina forneceu cerca de 131, 106, 78, 38 cargas adicionadas quando a matriz é submetida por 96, 72, 48 e 24h de hidrólise, respectivamente (BET, 2000). Este resultado está de acordo com aumento do teor de mineralização com o aumento do tempo de hidrólise alcalina.

4.3.3.1. $m_{\text{resíduo}}/m_{\text{orgânica}}$

As matrizes obtidas de pericárdio, pele e serosa porcina possuem espessuras diferentes, o que pode provocar uma mineralização não completa, ou seja, apenas em sua superfície, pela dificuldade de penetração das soluções. Para a análise termogravimétrica é necessária apenas uma pequena quantidade de material, a qual representará a quantidade de mineralização da matriz total. Como a matriz obtida de pele porcina é mais grossa foi necessário um corte transversal da matriz mineralizada, ou seja, pegou-se apenas uma pequena região da superfície enquanto para pericárdio e serosa foi utilizada uma região maior da superfície. A fim de comparar e verificar qual a matriz efetivamente foi mais mineralizada, fez-se uma normalização pela relação $m_{\text{resíduo}}/m_{\text{orgânica}}$ (Tabela 8), obtida na curva termogravimétrica ($M_{\text{total}} = m_{\text{resíduo}} + m_{\text{orgânica}} + m_{\text{água}}$), considerando a $m_{\text{orgânica}}$ a massa decomposta no intervalo 200-650 °C.

A partir dos dados da Tabela 8 é possível observar que a quantidade da deposição de sais de fosfato é maior nas matrizes derivadas de serosa porcina, seguida por pericárdio e pele porcina, independente do tempo de hidrólise.

Tabela 8. Relação massa inorgânica por massa orgânica das matrizes mineralizadas

Matrizes	massa _{resíduo} (mg)/ massa _{orgânica} (mg)
PP24C	0,37
PP48C	0,51
PP72C	0,73
PP96C	1,31
PB24C	0,67
PB48C	0,68
PB72C	0,78
PB96C	1,09
SP24C	1,11
SP48C	1,27
SP72C	1,41
SP96C	1,45

4.3.4. Dispersão de Raios X (EDS)

Para se verificar a relação cálcio e fósforo (Ca/P) nas matrizes mineralizadas foi feita a análise por dispersão de raios X, sendo o espectro da amostra PP96C mostrado na Figura 41. Os principais elementos do sal depositados na matriz foram o carbono (0,2keV), o oxigênio (0,5keV), o cálcio (3,7keV e 4,0keV) e o fósforo (2,0keV). As demais matrizes hidrolisadas e mineralizadas tiveram espectros similares e não serão mostrados.

Figura 41. Espectro de dispersão de raios X obtido da superfície da matriz PP96C.

Foram feitas análises semi-quantitativas das matrizes mineralizadas e obtiveram-se como resultados para a razão Ca/P (Tabela 9) uma variação de 1,54 a 1,67. Esta relação foi obtida pela média dos teores dos elementos cálcio e fósforo presentes nas matrizes em três áreas distintas.

Tabela 9. Razão Ca/P dos sais depositados nas matrizes mineralizadas e hidrolisadas

Matrizes	Ca/P
PP24C	1,59 $\pm$ 0,04
PP48C	1,67 $\pm$ 0,07
PP72C	1,66 $\pm$ 0,06
PP96C	1,66 $\pm$ 0,12
PB24C	1,65 $\pm$ 0,06
PB48C	1,55 $\pm$ 0,03
PB72C	1,65 $\pm$ 0,03
PB96C	1,65 $\pm$ 0,02
SP24C	1,57 $\pm$ 0,11
SP48C	1,64 $\pm$ 0,02
SP72C	1,54 $\pm$ 0,13
SP96C	1,57 $\pm$ 0,02

* média de 3 determinações

As relações Ca/P obtidas para as matrizes são próximas ao valor teórico para hidroxiapatita que é de 1,67, quando comparado com os diversos valores encontrados em literatura para os diversos fosfatos de cálcio (Tabela 10).

Tabela 10. Relação Ca/P dos principais tipos de fosfato de cálcio (HABRAKEN; WOLKE; JANSEN, 2007)

Tipos de Fosfato de Cálcio	Fórmula	Ca/P
Apatita carbonatada	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3$	1,67
HA deficiente em cálcio	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	$1,50 < x < 1,67$
Monolita	CaHPO_4	1,00
Brushita	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,00
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato β tri cálcio	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
Octafosfato de cálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33

4.3.5. Raios X

A estrutura cristalográfica do sal de fosfato de cálcio obtido na mineralização foi estudada por difração de raios X. Como os valores da relação Ca/P obtidos por EDS para todas as matrizes foram próximos aos da hidroxiapatita, optou-se em realizar as análises por raios X apenas das matrizes mineralizadas hidrolisadas por 96h, que apresentaram uma porcentagem maior de resíduo inorgânico. Os resultados (Fig. 42, Tabela 11) para as matrizes PP96C, PB96C e SP96C são similares aos da HA sintética de acordo com o difratograma padrão da JCPDS (9-0432).

Tabela 11. Principais valores de d para as matrizes mineralizadas

Matrizes	Principais valores de d (Å)			
PP96C	2,84	2,68	3,44	1,81
PB96C	2,79	2,63	3,40	1,80
SP96C	2,77	2,62	3,43	1,80
JCPDS (9-0432)	2,81	2,72	3,43	1,84

Figura 42. Difratoograma de raios X das matrizes (A) PP96C, (B) PB96C, (C) SP96C.

Os difratogramas das matrizes hidrolisadas por 96 h e mineralizadas são mostradas na Figura 42. As curvas são similares e mostram um pico intenso e largo em torno de $31^\circ 2\theta$, mostrando que foi formada HA nas matrizes de colágeno. Este alargamento e baixa resolução mostrados nos difratogramas, resulta da baixa cristalinidade da HA formada na superfície das matrizes mineralizadas.

Os difratogramas obtidos para a fase inorgânica nas matrizes mineralizadas foram comparáveis àqueles da HA não cristalina (Figura 43) obtida por Martins et al. (1998) com picos mais largos em comparação com os padrões de difração da HA sintética.

Figura 43. Difratograma de raios X de HA sintética não cristalina (MARTINS et al, 1998).

4.3.5. FTIR

As regiões de amida I, II e III presentes no espectro estão diretamente relacionadas com a conformação das cadeias peptídicas do colágeno. A banda de amida I tem frequência característica na faixa de 1600 a 1660 cm^{-1} e é associada com a deformação axial da ligação C=O. A banda de amida II (1500 - 1550 cm^{-1}) está relacionada à deformação angular N-H e ao estiramento C-N, enquanto a banda de amida III (1320 - 1220 cm^{-1}) é devida aos modos de estiramento C-N e deformação N-H. A banda de amida A do colágeno (associada

Figura 44. Espectros no FTIR das matrizes PPn (A), PBn (B) e SPn (C).

com a frequência de estiramento –NH e grupos -OH) é encontrada frequentemente em 3315-3330 cm^{-1} (PLEPIS; GOISSIS, DAS-GUPTA, 1996).

As principais bandas associadas ao colágeno estão listadas na Tabela 12 e os espectros de absorção na região do infravermelho das matrizes nativas são mostrados na Figura 44.

Tabela 12. Principais frequências das bandas para o colágeno presente nas matrizes

Matrizes	Amida I	Amida II	Amida III
PPn	1645	1560	1239
PP24	1632	1560	1238
PP48	1632	1564	1244
PP72	1634	1564	1244
PP96	1632	1564	1240
PBn	1651	1551	1238
PB24	1637	1562	1236
PB48	1637	1560	1238
PB72	1637	1559	1238
PB96	1636	1561	1237
SPn	1651	1553	1239
SP24	1634	1554	1242
SP48	1632	1554	1240
SP72	1632	1554	1240
SP96	1634	1556	1242

Com os dados da Tabela 12 pôde-se notar que após a hidrólise alcalina houve um deslocamento da banda de amida I para frequências menores, que é independente do tempo de hidrólise e do tecido usado.

A Figura 45 mostra o espectro FTIR para as matrizes hidrolisadas por 96 h mineralizadas.

Figura 45. Espectros no FTIR das matrizes PP96C (A), PB96C (B) e SP96C (C).

Os resultados mostram que independente do tecido usado há a formação de fosfato de cálcio, com a presença de bandas características de íons PO_4^{3-} , ν_3 —1036 e 1095 cm^{-1} , ν_4 —563 e 600 cm^{-1} e na região de 870 cm^{-1} que podem ser atribuídos aos íons CO_3^{2-} . Os espectros para as demais matrizes mineralizadas são mostrados no Apêndice III.

A Tabela 13 mostra as principais regiões de absorção para as matrizes mineralizadas.

Tabela 13. Principais frequências das bandas para o colágeno mineralizado

Matrizes	Amida I	Amida II	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$		CO_3^{2-}
PP24C	1643	1560	1038	602	562	869
PP48C	1647	1556	1036	602	562	870
PP72C	1652	1560	1034	602	561	870
PP96C	1653	1562	1034	602	562	868
PB24C	1647	1560	1035	602	562	870
PB48C	1643	1560	1037	602	562	869
PB72C	1645	1556	1036	602	563	870
PB96C	1653	1556	1034	602	562	868
SP24C	1649	1557	1038	604	562	870
SP48C	1655	1556	1038	604	565	872
SP72C	1654	1554	1037	602	565	872
SP96C	1651	1556	1038	602	563	873

Pôde-se verificar a partir dos dados da Tabela 13, relativo às matrizes mineralizadas, que houve um deslocamento da banda de amida I para maiores valores sugerindo assim a interação química dos íons cálcio com os grupos carboxilatos presentes no colágeno. Este mesmo deslocamento já foi observado para membranas de colágeno mineralizadas (ZHANG et al.; 2004). As bandas de amida II e III não foram modificadas.

4.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

As microestruturas das matrizes hidrolisadas e liofilizadas observadas por MEV são mostradas nas Figuras 46-48. As matrizes de pele porcina (Fig.46) mostram uma estrutura mais porosa na superfície quando comparada com os outros tecidos. As matrizes de pericárdio e serosa têm uma estrutura mais compacta.

Figura 46. Fotomicrografias das matrizes PP24 (A), PP48(B), PP72 (C) e PP96 (D), aumento de 500 vezes.

Figura 47. Fotomicrografias das matrizes PB24 (A), PB48(B), PB72 (C) e PB96 (D), aumento de 500 vezes.

Figura 48. Fotomicrografias das matrizes SP24 (A), SP48(B), SP72 (C) e SP96 (D), aumento de 500 vezes.

O aumento do tempo de hidrólise alcalina provoca uma desestruturação das fibras das matrizes tornando-as mais “amorfas”, ou seja, mais desestruturadas. Este mesmo comportamento foi verificado por Bet (2003) para as matrizes de pericárdio bovino em pH 3,0.

As matrizes de serosa e pericárdio são mais afetadas pela hidrólise, observando-se que a estrutura vai se rompendo com o aumento do tempo de tratamento alcalino, assim o tratamento é mais agressivo para as matrizes mais finas.

A Figura 49 mostra um corte transversal das matrizes PP96 e PB96, em que se observa uma microestrutura de poros interconectados. O tamanho médio dos poros está na faixa de 60 μm para PP96 e 74 μm para PB96.

Figura 49. Fotomicrografia da secção transversal de PP96 (A), PB96(B), aumento de 500 vezes e SP24, aumento de (C) 3500 vezes (MENDES, 2003).

A matriz SP24 não possui uma estrutura de poros e sim uma estrutura constituída de arranjos de fibras randomicamente dispostos com regiões compactas em que as fibras parecem “fundidas” entre si nos locais mais compactos (Fig. 49C).

Após a mineralização, a morfologia das matrizes é mostrada nas Figuras 50, 51 e 52. As matrizes estão recobertas por uma camada mineral que foi analisada por EDS e difração de raios X como sendo fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita.

Figura 50. Fotomicrografia da matriz PP24C (A), PP48C (B), PP72C (C) e PP96C (D) aumento de 5.000x.

A deposição não foi uniforme (Fig. 50), já que foi observado em alguns locais maiores aglomerados esféricos de sais. O tamanho destes aglomerados foi de $3,18 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (PP24C), $3,11 \pm 0,19 \mu\text{m}$ (PP48C), $3,20 \pm 0,13 \mu\text{m}$ (PP72C) e $1,99 \pm 0,09 \mu\text{m}$ (PP96C).

As fotomicrografias das matrizes de pericárdio bovino mineralizadas estão apresentadas nas Figuras 51. Observou-se a deposição de sais por toda a superfície com a formação de aglomerados de tamanhos diferentes sendo de $1,46 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (PB24C), $1,42 \pm 0,11 \mu\text{m}$ (PB48C), $1,23 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (PB72C) e $1,49 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (PB96C).

Figura 51. Fotomicrografia da matriz PB24C (A), PB48C (B), PB72C (C) e PB96C (D) aumento de 5.000x.

As fotomicrografias das matrizes de serosa porcina mineralizadas estão apresentadas nas Figuras 52. Observou-se a deposição de sais por toda a superfície com maiores aglomerados em algumas regiões. Estes aglomerados foram medidos e formam de $1,36 \pm 0,12 \mu\text{m}$ (SP24C), $0,89 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (SP48C), $1,39 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (SP72C) e $1,17 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (SP96C).

Figura 52. Fotomicrografia da matriz SP24C (A), SP48C (B), SP72C (C) e SP96C (D) aumento de 10.000x.

Em um aumento maior (Fig.53) pôde-se observar que a morfologia dos cristais de fosfato de cálcio é no formato de placas que estão agrupadas em agregados esféricos. Esta morfologia é semelhante à deposição dos cristais já encontrados em literatura (WANG et al, 2006), reportados como sendo característicos de HA carbonatada.

Figura 53. Fotomicrografia da matriz PP24C, aumento de: (A) 20.000x e (B) 40.000X.

Foram feitos cortes transversais nas matrizes mineralizadas que tiveram maior resíduo inorgânico, valor obtido por TG, a fim de verificar se havia deposição de sais na parte

interna. A deposição de sais na matriz PP96C ocorre em sua superfície como mostrado anteriormente e na região interior próxima da superfície, como mostrado na Figura 54. Para as matrizes PB96C e SP96C, além de ocorrer na superfície também ocorre em seu interior, em toda a extensão. (Fig. 55 e 56).

Figura 54. Fotomicrografia do interior da matriz PP96C, aumento de: 200x.

Figura 55. Fotomicrografia do interior da matriz PB96C, aumento de 500x.

Figura 56. Fotomicrografia do interior da matriz SP96C, aumento de 1000x.

Nas fotomicrografias por MEV observou-se que a mineralização no interior dos tecidos pode ser afetada pela espessura dos mesmos, pois quanto mais fino o material, mais fácil é a entrada das soluções e a precipitação do sal pelo método de mineralização usado. Além disso, o arranjo estrutural dos tecidos é diferente permitindo ou não a deposição de sais em seu interior.

5. CONCLUSÕES

Os três métodos de mineralização permitiram a obtenção de matrizes de colágeno mineralizadas. Contudo, o método de imersão alternada foi o de maior repetitibilidade.

O colágeno presente nas matrizes derivadas de pericárdio bovino, pele e serosa porcina não sofre desnaturação da hélice tripla após a hidrólise alcalina, apenas ocorre uma diminuição desta temperatura com o aumento do tempo de hidrólise.

As matrizes mineralizadas tornam-se termicamente mais estáveis quando comparadas com as matrizes hidrolisadas, ou seja, a presença de fosfato de cálcio estabiliza a hélice tripla do colágeno.

O tempo de hidrólise alcalina influencia na quantidade de deposição de sais, pois quanto maior o tempo de hidrólise maior a quantidade de grupos carboxilatos obtidos e consequentemente maior o número de sítios para deposição de sais de fosfato depositados nas matrizes.

O sal depositado nas matrizes é hidroxiapatita carbonatada e amorfa, com a relação Ca/P variando entre 1,54 – 1,67.

A deposição de hidroxiapatita, nas condições deste trabalho, é maior nas matrizes de serosa porcina, seguida pelas matrizes derivadas de pericárdio bovino e pele porcina, sendo a matriz derivada de pele porcina mineralizada apenas na superfície.

As matrizes hidrolisadas e mineralizadas não apresentaram citotoxicidade para as duas linhagens de células utilizadas, HEp-2 e McCoy.

Assim, há a possibilidade da preparação de matrizes com diferentes tempos de hidrólise e quantidades diferentes de deposição de hidroxiapatita não cristalina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOCZKY, S. P.; AKSAN, A. Thermal modification of connective tissues: basic science considerations and clinical implications. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 8, p. 305-313, 2000.

BADEA, E.; MIU, L.; BUDRUGEAC, P.; GIURGINCA, M.; MASIC, A.; BADEA, N.; GATTA, G. D. Study of deterioration of historical parchments by various thermal analysis techniques complemented by SEM, FTIR, UV–VIS–NIR and unilateral RMN investigations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, p. 17–27, 2008.

BADYLAK, S.; LIANG, A.; RECORD, R.; TULLIUS, R.; HODDE, J. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. **Biomaterials**, v. 20, p. 2257-2263, 1999.

BAHARUDDIN, A.; GOB, B.T.; FIRDAUS, M.N.A.R.; ABDULLAH, J. Bovine pericardium for dural graft: clinical results in 22 patients. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 104, p. 342-344, 2002.

BARRINGTON, J.W.; EDWARDS, G.; ARUNKALAIVANAN, A.S.; SWART, M. The use of porcine dermal implant in a minimally invasive pubovaginal sling procedure for genuine stress incontinence. **BJU International**, v. 90, p. 224-227, 2002.

BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal behavior of *in vitro* mineralized anionic collagen matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2008. No prelo.

BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Efeito do pH na calcificação *in vitro* de pele porcina. **Polímeros**, v. 17, p. 289-293, 2007.

BERNAL, V.M.; STANLEY, D.W. Stability of bovine muscle connective tissue. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 876-878, 1987.

BERTRAN, C.A; ALLEGRETTI, L. J. M.; BERTAZZO, S. Synthesis of calcium phosphate nanoparticles in collagen medium. **Macromolecular Symposia**, v. 253, p. 77-81, 2007.

BET, M.; GOISSIS, G.; VARGAS, S.; SELISTRE-de-ARAUJO, H. S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, v. 24, p. 131-137, 2003.

BET, Marcos Roberto. **Colágeno aniônico: propriedades físico-químicas, estruturais e comportamento biológico**. 2000. 107f. Tese (Doutorado em Química Analítica) –Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BRAILE, D. M.; BILAQUI, A.; ARDITO, R. V.; GRECO, O. T.; GARZON, S. A.; NICOLAU, J. C.; JACOB, J. L.; AYOUB, J. C.; FEDOZZI, N. M.; ANGELONI, M. A.; LORGA, A. M. Bovine pericardium cardiac prosthesis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 39, p. 247-257, 1982.

BROMBERG, B. E.; SONG, I. C.; MOHN, M. P. The use of pigskin as a temporary biological dressing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 36, p. 80-90, 1965.

BROWN-ETRIS, M.; CUTSHALL, W. D.; HILES, M. C. A new biomaterial derived from small intestine submucosa and developed into a wound matrix device. **Wounds**, v. 14, p. 150-166, 2002.

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

CARVALHO, Valéria Cardoso de Melo. **Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais HEp-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer**. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

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. **Electron Microscopy Reviews**, v. 3, p. 143-82, 1990.

CHIU, T.; BURD, A. Xenograft dressing in the treatment of burns. **Clinics in Dermatology**, v. 23, p. 419-423, 2005.

CUNHA, M. R.; SANTOS JUNIOR, A.R.; GENARI, S. C. Cultura de osteoblastos sobre membranas de colágeno polianiónico: avaliação preliminar do potencial de indução da formação de tecido ósseo visando reparação tecidual. **Boletim Médico Veterinário**, v. 1, p. 73-85, 2005.

CUNHA, M. R.; SANTOS JUNIOR, A.R.; GOISSIS, G.; GENARI, S. C. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. **Journal of Materials Science: Materials Medicine**, v. 19, p. 1341–1348, 2008.

FENG, X.; TAN, J.; PAN, Y.; WU, Q.; RUAN, S.; SHEN, R.; CHEN, X.; DU, Y. Control of hypertrophic scar from inception by using xenogenic (porcine) acellular dermal matrix (ADM) to cover deep second degree burn. **Burns**, v. 32, p. 293-298, 2006.

FLANDIN, F.; BUFFEVANT, C.; HERBAGE, D. Differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 791, p. 205-211, 1984.

FURTH, M. E.; ATALA, A.; DYKE, M. E. V. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 28, p. 5068–5073, 2007.

GAERTNER, W. B.; BONSACK, M. E.; DELANEY, J. P. Experimental evaluation of four biologic prostheses for ventral hernia repair. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 11, p. 1275–1285, 2007.

GALLO, J.I.; ARTIÑANO, E.; VAL, F.; DURAN, C. G. Glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the repair of diaphragmatic defects. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.83, p.905-908, 1982.

GAYRE, G. S.; DEBACKER, C.; LIPHAM, W.; TAWFIK, H. A.; HOLCK, D.; DUTTON, J.J. Bovine pericardium as a wrapping for orbital implants. **Ophthalmic Plastic Reconstructive Surgery**, v.17, p.381-387, 2001.

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. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p. 84–96, 2008.

GIGLIOTI, A. F. **Matrizes acelulares de colágeno: elastina a partir da desvitalização do pericárdio bovino: caracterização química, físico-química e estrutural**. 2005. 80 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GIRARDI, Raquel Cecília. **Eficácia do colágeno na cicatrização de feridas**. 2005. 101f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GIRIJA, E. K.; YOKOGAWA, Y.; NAGATA, F. Bone-like apatite formation on collagen fibrils by biomimetic method. **Chemistry Letters**, v. 31, p. 702-703, 2002.

GÓES, J. C.; FIGUEIRÓ, S. D.; OLIVEIRA, A. M.; MACEDO, A. A. M. SILVA, C. C.; RICARDO, N. M. P. S.; SOMBRA, A. S. B. Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 773-778, 2007.

GOISSIS, G.; MAGINADOR, S.V.S.; MARTINS, V.C.A. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: *in vitro* and *in vivo* study. **Artificial Organs**, v. 27, p. 437-443, 2003.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 234-248, 2007.

HARTGERINK, J. D.; BENIASH, E.; STUPP, S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. **Science**, v. 294, p. 1684, 2001.

HOYAMA, E.; SCHELLINI, S. A.; PELLIZON, C. H.; MARQUES, M. E. A.; PADOVANI, C. R.; ROSSA, R. Porcine acellular dermal graft with and without impermeable dressing to treat extensive wounds. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 369-374, 2005.

INTERNATIONAL CENTRE FOR DIFFRACTION DATA. Powder diffraction file 1994: PDF-2 Database Sets 1-44. Newtown Square : ICDD, 1994. 9-0432.

JONES, J. R.; LEE, P. D.; HENCH, L. L. Hierarchical porous materials for tissue engineering. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 364, p. 263-281, 2006.

KAWASHI, Elizabete Yoshie. **Síntese de Nanopartículas de Fosfatos de Cálcio em Ambientes Confinados no Sistema Renex-100® /Cicloexano/"brine"**. 2002. 107f. Tese (Doutorado em Química) –Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2002.

KENNEDY, C. J.; WESS, T. J. The Structure of collagen within parchment – a review. **Restaurator**, v. 24, p. 61-80, 2003.

KIKUCHI, M.; IKOMA, T.; ITOH, S.; MATSUMOTO, H. N.; KOYAMA, Y.; TAKAKUDA, K.; SHIZUKO I., SHINOMIYA K., TANAKA J. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. **Composites Science and Technology**, v. 64, p. 819-825, 2004.

KIM B. S.; MOONEY, D. J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **TIBTECH**, v. 16, p. 224-230, 1998.

KNESER, U.; SCHAEFER, D. J.; POLYKANDRIOTIS, E.; HORCH, R. E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, p. 7-19, 2006.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, p. 2907-2915, 2006.

KOTCH, F. W.; RAINES, R. T. Self-assembly of synthetic collagen triple helices. **PNAS**, v. 103, p. 3028-3033, 2006.

KRONICK, P. L.; COOKE, P. Thermal Stabilization of collagen fibers by calcification. **Connective Tissue Research**, v. 33, p. 275-82, 1996.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, p. 267-271, 1998.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, p. 1-22, 2001.

LEE, M.; CHANG, P. C. Y.; DUNN, J. C. Y. Evaluation of small intestinal submucosa as scaffolds for intestinal tissue engineering. **Journal of Surgical Research**, v. 147, p. 168–171, 2008.

LICKORISH, D.; RAMSHAW, J. A. M.; WERKMEISTER, J. A.; GLATTAUER, V.; HOWLETT, C. R. Collagen–hydroxyapatite composite prepared by biomimetic process. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 68, p. 20-27, 2004.

LINDBERG, K.; BADYLAK, S. F. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting *in vitro* primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. **Burns**, v. 27, p. 254-266, 2001.

MACLEOD, T. M.; WILLIAMS, G.; SANDERS, R.; GREEN, C. J. Histological evaluation of permacol as a subcutaneous implant over a 20-week period in the rat model. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 58, p. 518–532, 2005.

MAIZATO, Marina Junko Shiotsu. **Avaliação das propriedades do pericárdio bovino liofilizado**. 2003. 120f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, Campinas, 2003.

MARKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S. J. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 109, p. 553-568, 2004.

MARTINS, V. C. A.; GOISSIS, G.; RIBEIRO, A. C.; MARCANTÔNIO JÚNIOR., E.; BET, M. The controlled release of an antibiotic by hydroxyapatite: anionic collagen composites. **Artificial Organs**, v. 22, p. 215-221, 1998.

MAYNE, R.; BURGESSON, R. E. **Structure and function of collagen types**, London: Academic Press, 1987. 317p.

MENDES, Isekiel dos Santos. **Preparação e caracterização de matriz colagênica derivada de serosa**. 2003. 47f. Monografia – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

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

MEYERS, M. A.; CHEN, P. Y.; LIN, A. Y. M.; SEKI, Y. Biological materials: Structure and mechanical properties. **Progress in Materials Science**, v. 53, p. 1-206, 2008.

- MIRNAJAFI, A.; RAYMER, J.; SCOTT, M. J.; SACKS, M. S. The effects of collagen fiber orientation on the flexural properties of pericardial heterograft biomaterials. **Biomaterials**, v. 26, p. 795-804, 2005.
- MOORE, R. D.; MIKLOS, J. R.; KOHLI, N. Rectovaginal fistula repair using a porcine dermal graft. **Obstetrics & Gynecology**, v. 104, p. 1165-1167, 2004.
- MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Crystallographic study of hydroxyapatite bioceramics derived from various sources. **Crystal Growth & Design**, v. 5, p. 111–112, 2005.
- NIMNI, M.E.; HARKNESS, R.D. Molecular structure and function of collagen. In: NIMNI, M.E. (Ed.). **Collagen: biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 1-77.
- PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. **Biomaterials - principles and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2003, 250p.
- PLEPIS, A. M. D.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D. K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. **Polymer Engineering and Science**, v. 36, p. 2932–2938. 1996.
- PRASERTSUNG, I.; KANOKPANONT, S.; BUNAPRASERT, T.; THANAKIT, V.; DAMRONGSAKKUL, S. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 85, p. 210-219, 2007.
- 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. Materials Science Letter**, v. 4, p. 201-209, 1993.
- ROCHA, L. B.; ADAM, R. L.; LEITE, N. J.; METZE, K., ROSSI, M. A. Biomineralization of polyanionic collagen-elastin matrices during cavariar bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 79, p. 237-245, 2006.
- RODRIGUES, Fabiana Tessari. **Pele porcina como fonte de matrizes tridimensionais de colágeno**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.
- ROSA, F. P.; LIA, R. C. C.; SOUZA, K. O. F.; GOISSIS, G.; MARCANTONIO JÚNIOR, E. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvaria. **Biomaterials**, v. 24, p. 207-212, 2003.

- ROSE, F. A. J.; OREFFO, R. O. C. Bone tissue engineering: hope vs hype. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 1-7, 2002.
- ROSSOUW, P.; VILLIERS, M. Bovine pericardial ligament and tendon augmentation: a new and revolutionary ligament. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 87, p. 277, 2005.
- RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1595-1611, 2003.
- SACKS, M. S.; HAMAMOTO, H.; CONNOLLY, J. M.; GORMAN, R. C.; GORMAN III, J. H.; LEVY, R. J. *In vivo* biomechanical assessment of triglycidylamine crosslinked pericardium. **Biomaterials**, v. 28, p. 5390-5398, 2007.
- SALGADO, A J.; COUTINHO, O. P.; RUI, L. R. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 743-765, 2004.
- SATO, K. Mechanism of hydroxyapatite mineralization in biological systems. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 115, p. 124-130, 2007.
- SHAIKH, F. M.; GIRI, S. K.; DURRANI, S.; WALDRON, D.; GRACE, P. A. Experience with porcine acellular dermal collagen implant in one-stage tension-free reconstruction of acute and chronic abdominal wall defects. **World Journal of Surgery**, v. 31, p. 1966-1972, 2007.
- SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials** v. 24, p. 4353-4364, 2003.
- SIGMA-ALDRICH, 2008. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/imdm.Par.0001.File.tmp/imdm.pdf>; <<http://www.sigmaaldrich.com>> Acesso em: 15 set. de 2008.
- SILVA, M. H. P. Apostila de biomateriais. Disponível em:
<http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriaias.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2008.
- SMITH, J.W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**, v. 219, p. 157-63, 1968.
- SOCCOL, A. T.; BETTEGA, S. B.; NORONHA, L.; SASS, S.; SOCCOL, V. T.; SCHOLZ, M. R.; MOCELLIN, M. Comparação entre os bioenxertos de hidroxiapatite de cálcio e submucosa de intestino delgado porcino no preenchimento de defeitos ósseos criados em mandíbula de ratos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 195-199, 2006.
- SÖDERHÄLL, C; MARENHOLZ, I; KERSCHER, T; RÜSCHENDORF, F; ESPARZA-GORDILLO, J; WORM, M; GRUBER, C; MAYR, G; ALBRECHT, M; ROHDE, K;

SCHULZ, H; WAHN, U; HUBNER, N; LEE, Y. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. **PLoS Biology**, v. 5, p. 1952-1961, 2007.

SUNG, H. W.; CHANG, Y.; CHIU, C. T.; CHEN, C. N.; LIANG, H. C. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 47, p. 116-126, 1999.

TANAHASHI, M.; YAO, T.; KOKUBO, T.; MINODA, M.; MIYAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process. **Journal of the American Ceramic Society**, v.77, p. 2805–2808, 1994.

TREBACZ, H., WÓJTOWICZ, K. Thermal stabilization of collagen molecules in bone tissue. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 257-262, 2005.

VARDAXIS, N. J.; BRANS, T. A.; BOON, M. E.; KREIS, R. W.; MARRES, L. M. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. **Journal of Anatomy**, v. 190, p. 601–611, 1997.

VEIS, A. Collagen fibrillogenesis. **Connective Tissue Research**, v. 10, p. 11, 1982.

VENUGOPAL, J.; LOW, S.; CHOON, A. T.; KUMAR T. S. S. RAMAKRISHNA, S. Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers. **Journal Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, p. 2039–2046, 2008.

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

WANG, Y.; YANG, C. Biomimetic formation of hydroxyapatite/collagen matrix composite. **Advanced Engineering Materials**, v. 8, p. 97-100, 2006.

XIE, J.; BAUMANN, M. J.; McCABE, L. R. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 71, p. 108-117, 2004.

YAMAGUSHI, I.; KOGURE, T.; SAKANE, M.; TANAKA, S.; OSAKA, A.; TANAKA, J. Microstructure analysis of calcium phosphate formed in tendon. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14 p. 883-889, 2003.

YOKOYAMA, A.; GELINSKY, M.; KAWASAKI, T.; KOHGO, T.; KONIG, U.; POMPE, W.; Watari, F. Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen—an animal study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 75, p. 464-472, 2005.

ZHANG, L. J.; FENG, X. S.; LIU, H. G.; QIAN, D. J.; ZHANG, L.; YU, X. L.; CUI, F. Z. Hydroxyapatite/collagen composite materials formation in simulated body fluid environment. **Materials Letter**, v. 58, p. 719-722, 2004.

ZHANG, Z.; LIU, W.; LI, D.; LI, G. Physicochemical properties of succinylated calfskin pepsin-solubilized collagen. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 71, p. 2057-2060, 2007.

ZHAO, F.; GRAYSON, W. L.; MA, T.; BUNNELL, B.; LU, W. W. Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan–gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. **Biomaterials**, v. 27, p. 1859–1867, 2006.

Apêndice 1- Curvas DSC

Figura 57. Curvas DSC para as matrizes derivadas de pele porcina hidrolisadas e mineralizadas: (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h.

Figura 58. Curvas DSC para as matrizes derivadas de pericárdio bovino hidrolisadas e mineralizadas: (A)24h, (B) 48h e (C) 72h.

Figura 59. Curvas DSC para as matrizes derivadas de serosa hidrolisadas e mineralizadas:
(A)24h, (B) 48h e (C) 72h.

Apêndice 2 – Curvas Termogravimétricas

Figura 60. Curvas termogravimétricas das matrizes derivadas de pele porcina hidrolisadas e mineralizadas: (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h.

Figura 61. Curvas termogravimétricas das matrizes derivadas de pericárdio bovino hidrolisadas e mineralizadas: (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h.

Figura 62. Curvas termogravimétricas das matrizes derivadas de serosa porcina hidrolisadas e mineralizadas: (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h.

Apêndice 3 – Espectros no infravermelho

Figura 63. Espectros no infravermelho das matrizes derivadas de pele porcina (A) PP24C, (B) PP48C e (C) PP72C.

Figura 64. Espectros no infravermelho das matrizes derivadas de pericárdio bovino (A) PB24C, (B) PB48C e (C) PB72C.

Figura 65. Espectros no infravermelho das matrizes derivadas de serosa porcina (A) SP24C, (B) SP48C e (C) SP72C.

Anexo I**Tabela 14** - Composição do meio ISCOVE'S.

Componentes	g L ⁻¹	Componentes	g L ⁻¹
CaCl ₂ (anidro)	0,1653	L-Fenilalanina	0,066
MgSO ₄ (anidro)	0,09767	L-Prolina	0,04
KCl	0,33	L-Serina	0,042
KNO ₃	0,000076	L-Treonina	0,0095
NaCl	4,505	L-Triptofano	0,016
Selenito de sódio	0,0000173	L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	0,10379
L-Alanina	0,025	L-Valina	0,094
L-Arginina.HCl	0,084	D-Biotina	0,000013
L-Asparagina.H ₂ O	0,0284	Cloreto de Colina	0,004
L-Ácido Aspártico	0,03	Ácido Fólico	0,004
L-Cisteína.2HCl	0,09124	Mio-Inositol	0,0072
L-Ácido Glutâmico	0,075	Niacinamida	0,004
L-Glutamina	0,584	Ácido D-Pantotenico (hemicálcio)	0,004
Glicina	0,03	Piridoxina.HCl	0,004
L-Histidina.HCl.H ₂ O	0,042	Riboflavina	0,0004
L-Isoleucina	0,105	Tiamina.HCl	0,004
L-Leucina	0,105	D-Glucose	4,5
L-Lisina.HCl	0,146	Sal de Sódio de Vermelho de Fenol	0,016
L-Metionina	0,03	Piruvato de Sódio	0,11
HEPES	5,958		

Fonte: SIGMA-ALDRICH.