*Preparação e Caracterização de Mantas
Colágeno Aniônico: Hidroxiapatita para
Reconstrução de Tecido ósseo*

*Autora: Maria Fernanda do Carmo Gurgel
Orientador: Prof. Dr. Gilberto Goissis
2000*

**BIOENGENHARIA
USP**

Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

*Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

***INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO***

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MANTAS
COLÁGENO ANIÔNICO:HIDROXIAPATITA PARA
RECONSTRUÇÃO DE TECIDO ÓSSEO.**

MARIA FERNANDA DO CARMO GURGEL

*Dissertação apresentada no
curso de Pós Graduação Interunidades
Bioengenharia - Instituto de Química
de São Carlos, Escola de Engenharia
de São Carlos, Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto- Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Bioengenharia.*

***São Carlos
2000***

Class.	TESE-EEYC
Curr.	2623
Tempo	T 0255/00

st 1110251

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

G979p

Gurgel, Maria Fernanda do Carmo

Preparação e caracterização de mantas colágeno
aniômico : hidroxapatita para reconstrução de tecido
ósseo / Maria Fernanda do Carmo Gurgel. -- São Carlos,
2000.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos/Instituto de Química de São Carlos/Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo,
2000.

Área Interunidades: Bioengenharia.
Orientador: Prof. Dr. Gilberto Goissis.

1. Biomateriais. 2. Biocerâmica. I. Título.

Universidade de São Paulo
Curso de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia
Escola de Engenharia de São Carlos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Instituto de Química de São Carlos

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DA ALUNA MARIA FERNANDA DO CARMO GURGEL APRESENTADA AO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC/FMRP/IQSC-USP, EM 21/09/2000.

Prof. Dr. Gilberto Goissis (orientador) – DQFM/IQSC/USP

Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis – DQFM/IQSC/USP

Prof. Dr. Ovídio Richard Crnkovic – SMM/EESC/USP

DEDICATÓRIA

A DEUS pela vida.

Ao meu marido, Fausto e minhas filhas
Fernanda e Isabela por existirem

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. Gilberto Goissis pela valiosa orientação, conhecimento e experiência profissional transmitida.

- Aos Professores, Funcionários e amigos do Instituto de Química de São Carlos- USP.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Bioengenharia de São Carlos.

Aos professores Dr. José Marcos, Dr. Pereira e Dr. Orivaldo pela atenção.

- À Cláudia e Cintia, pelo companheirismo, compreensão e amizade .

- Às secretárias Karina, Janete, Marielza e Sílvia Plepis pelos serviços prestados, gentileza e dedicação.

- À Virginia, pela amizade e colaboração na elaboração deste trabalho.

- Aos técnicos do laboratório de Bioquímica, Ézer Biazin e Glauco D. Broch, pelo apoio técnico e companheirismo na rotina de trabalho de laboratório .

Aos amigos do laboratório de Bioquímica - IQSC: Cláudia, Adriana, Maria Helena, Carolina, Márcio, Marcos, Fátima e Antônio pela amizade, pelo convívio e ótimo ambiente de trabalho.

- Aos amigos do Departamento de Bioengenharia : Lorena, Adriana, Mirian Fernanda, Nelson, Daniela, Juraci pela amizade, pelo convívio e ótimo ambiente de trabalho

- Aos amigos Celso, Marilaine, José Eduardo, Célia, Antônio, Patrícia, Fernando, Rosângela, Joselito e Sílvana pela a amizade e ótimos momentos de descontrações.

- Aos Professores Sérgio Yoshioka e Ana Maria G. Plepis, pelo apoio e atenção.
- À secretária Vera pelos serviços prestados com muita gentileza, amizade e dedicação
- À todas as funcionárias da biblioteca, Sonia, Solange, Sandra, Eliana Lia, Vilneide e Vitória.
- Aos técnicos de laboratório Vânia, Carlos, Mauro e Edson pelos serviços prestados.
- Aos Amigos da Pós-graduação pela amizade, e à todos que diretamente e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os *meus familiares* que colaboram com este trabalho, em especial:

- As minhas avós, *Maria Aparecida* e *Hermelinda* (in memória) pela confiança, amizade, carinho e apoio.
 - Aos meus pais *Layeta* e *Rubéns* (in memória) pelo empenho, dedicação, carinho e por me dar exemplo de perseverança e honestidade .
 - A minha irmã Carolina pelo auxílio na digitação deste trabalho.
 - A minha sogra, Eunice e ao meu sogro, Antônio pela atenção e dedicação.
- A CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRAT.....	vii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 BIOMATERIAIS.....	01
1.2 BIOCERÂMICAS	08
1.3 BASES PARA DESENVOLVIMENTO DE BIOCERÂMICAS	11
1.3.1 <i>Tecido ósseo</i>	11
1.3.2 <i>Colágeno</i>	12
1.3.3 <i>Hidroxiapatita</i>	16
2 OBJETIVO	20
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	21
3.1 SOLVENTES E REAGENTES	21
3.2 EQUIPAMENTOS	21
3.3 GEL DE COLÁGENO ANIÔNICO.....	21
3.3.1 <i>Preparação do Gel</i>	22
3.3.2 <i>Membrana de colágeno</i>	23
3.3.3 <i>Espectroscopia de Infravermelho</i>	23
3.4 PREPARAÇÃO DA HIDROXIAPATITA NÃO ESTEQUEOMÉTRICA	23
<i>Solução I- (de cálcio)</i>	25
<i>Solução II (de fósforo)</i>	25
3.4.1 <i>Caracterização da Hidroxiapatita</i>	26
A) <i>Determinação de Cálcio via absorção atômica</i>	26
B) <i>Determinação da porcentagem de Fósforo</i>	27
3.4.2 <i>Caracterização por Difração de Raio X</i>	28
3.4.3 <i>Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho</i>	28
3.5 COMPÓSITOS.....	28
3.5.1 <i>Preparação dos materiais compósitos</i>	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	31
4.1.1 <i>Determinação da razão Ca/P - via Absorção Atômica para o cálcio e via molibdato por Espectrofotometria de UV – visível para o fósforo</i>	31
A) <i>Determinação de Cálcio</i>	31
B) <i>Determinação de Fósforo</i>	32
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE COLÁGENO POR LIOFILIZAÇÃO.....	33
4.3 CARACTERIZAÇÃO POR INFRAVERMELHO.....	33

4.3.1	<i>Colágeno</i>	33
4.3.2	<i>Cerâmicas e Materiais Compósitos</i>	35
4.4	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	39
4.5	DIFRAÇÃO DE RAIO X (DRX).....	51
5	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

Abreviaturas

DCPD - fosfato dicálcio

DRX –Difração de Raio - X

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

HA – hidroxiapatita comercial

nHA –hidroxiapatita não estequeométrica

IV - Infravermelho

GA – glutaraldeído

JCPDS - Joint Committee on Powder Diffraction Standarts

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PMMA - polimetilmetacrilato

β -TCP - beta fosfato tricálcio

TF- Tampão Fosfato

ST- Sem Tratamento

UV - ultra-violeta

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I. Principais biomateriais utilizados em implantes, suas vantagens e desvantagensl	3
TABELA II. Biomateriais de colágeno e suas aplicações em medicina, odontologia e indústria farmacéutica.....	4
TABELA III Evolução na área de biomateriais após a introdução dos conceitos de assepsia até os anos 70.....	5
TABELA IV. Classificação dos diferentes tipos de biocerâmicas, em função dp tipo de ligação que exercem no implante	10
TABELA V Forma da hidroxiapatita usada em Medicina e Odontologia	16
TABELA VI. Principais bandas observado por espectroscopia no infravermelho para o compósito colágeno aniônico:hidroxiapatita não estequeométrica	37
TABELA VII. Valores da temperatura de transiçãopara os compósitos	50
TABELA VI. Valores obtidos da distância interplanar.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema representativo de atividades biológicas que podem ser substituídas por biomaterial	2
FIGURA 2 Estrutura do colágeno	13
FIGURA 3. Organização do colágeno durante a fibrilogenese	14
FIGURA 4. Fluxograma do processo de síntese da hidroxiapatita não estequeométrica pelo método de JARCHO.e cols.....	24
FIGURA 5 Curva padrão para determinar a porcentagem de cálcio na amostra.....	31
FIGURA 6. Curva padrão para a determinação espectofotométrica de fósforo.....	32
FIGURA 7. Espectro de absorção no infravermelho obtido em membrana de colágeno a partir do gel obtido por extração a pH 3,5	34
FIGURA 8. . Espectro de absorção no infravermelho obtido da amostra de hidroxiapatita comercial (Osteosynt® 40-60 mesh).....	35
FIGURA 9. . Espectro de absorção no infravermelho obtido da hidroxiapatita não estequeométrica.....	36
FIGURA 10. . Espectro de absorção no infravermelho do compósito colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequeométrica (5:2) antes da reticulação.....	37
FIGURA 11. . Espectro de absorção no infravermelho para o compósito colágeno aniônico : hidroxiapatita não estequeométrica (5:2) após a reticulação.....	38
FIGURA 12. . Curva DSC para a hidroxiapatita comercial (Osteosynt® 40-60 mesh).....	39
FIGURA 13. . Curva DSC para a hidroxiapatita não estequeométrica.....	40
FIGURA 14. . Curva DSC do compósito aniônico: hidroxiapatita comercial (Osteosynt® 40-60 mesh).....	41
FIGURA 15. . Curva de análise térmica do compósito colágeno aniônico: Hidroxiapatita não estequeométrica (5:2).....	42
FIGURA 16. . Curva DSC do compósito colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequeométrica: Osteosynt® (40-60 mesh).(5:1:1).	42
FIGURA 17. . Curva DSC do compósito colágeno aniônico: Osteosynt® (40-60 mesh) (5:2) em tampão fosfato 24 horas, pH=7,4.....	44

FIGURA 18. . Curva DSC compósito colágeno aniônico : hidroxiapatita não estequeométrica (5:2) em tampão fosfato 24 horas, pH=7,4.....	45
FIGURA 19. . Curva DSC do compósito colágeno aniônico:hidroxiapatita não estequeométrica:Osteosynt® (40-60 mesh) (5:1:1) após tampão fosfato 24 horas, pH=7,4.....	46
FIGURA 20. . Representação da reação de reticulação com glutaraldeído.....	46
FIGURA 21. . Curva DSC do compósito colágeno aniônico : Osteosynt® (40-60 mesh)(5:2) após a reticulação.....	47
FIGURA 22. . Curva DSC do compósito colágeno aniônico : hidroxiapatita não estequeométrica após a reticulação.....	48
FIGURA 23. . Curva DSC do compósito colágeno aniônico : Osteosynt® (40-60 mesh): hidroxiapatita não estequeométrica após a reticulação.....	49
FIGURA 24. . Difratoograma de raio-X para o Osteosynt® (40-60 mesh).....	51
FIGURA 25. . Difratoograma de raio-X para a amostra de hidroxiapatita não estequeométrica.....	52
FIGURA 26. . Difratoograma de raio-X para o compósito colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequeométrica:Osteosynt® (40-60 mesh)- (a) em tampão fosfato 24 horas pH=7,4 e (b) após a reticulação com glutaraldeído 0,05%....	53

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi a preparação e a caracterização de mantas obtida na mistura de colágeno aniônico e HA particulada para aplicação como biomaterial, com a finalidade de minizar os problemas de espalhamento que ocorre com as biocerâmicas convencionais. Sua principal vantagem é a fácil manipulação para fins de reconstrução de tecido ósseo. Os materiais de partida utilizados foram colágeno aniônico extraído do tendão bovino, hidroxiapatita não estequiométrica (nHA) e Osteosynt (40-60 mesh)- HA e, a partir destes materiais, três tipos de compósitos na forma de mantas foram preparados pela mistura *colágeno aniônico:HA* , *colágeno aniônico:nHA* , *colágeno aniônico:HA:nHA*. A HA e nHA também foram submetidas a análise da razão Ca/P por espectrofotometria de absorção atômica para a determinação de cálcio e espectrofotometria de UV no visível para fósforo.

Análise da razão cálcio/fósforo para nHA e HA indicou que a hidroxiapatita sintetizada é deficiente em cálcio, com razão Ca/P de 1,58 comparada com HA de razão Ca/P de 1,67.

Segundo os resultados de caracterização por IV, DSC e DRX dos materiais de partida e das mantas, no caso, da HA e da nHA, o IV e o DRX mostraram características similares às da literatura e os de DSC indicaram que o processo de mistura para se obter

as mantas não induz a desnaturação da estrutura do colágeno. O DRX e IV mostraram que as características originais da HA e nHA bem como a do colágeno permaneceram.

ABSTRACT

The major aim of this work is the preparation and characterization of composites obtained by mixture of anionic collagen and powdered HA for the use as biomaterial, in order to minimize scattering problems which are common in conventional bioceramics. The main advantage of this composite is the easy handling in the bone reconstruction. The used materials were anionic collagen extracted of bovine tendon, non-stoichiometric hydroxyapatite (n-HA) and Osteosynt® (40-60 mesh)-HA. Using these materials, we obtained three composites by mixing *anionic collagen:HA*, *anionic collagen:n-HA* and *anionic collagen:HA:n-HA*. All materials were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and X-Ray Diffraction (XRD). The Ca/P ratio was obtained for HA and n-HA, using atomic absorption for calcium determination and UV-Vis spectrophotometry for phosphorus.

The Ca/P ratio indicated that synthesized hydroxyapatite is calcium deficient (1.58) as compared with commercial HA Ca/P ratio (1.67).

The characterization results obtained by IV and XRD showed similar characteristics to the literature and DSC data indicated that the process mixing to obtain composites did not induce collagen denaturation. XRD and IV data showed that original characteristics of HA and n-HA were maintained.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomateriais

Muitos dos avanços significativos na medicina estão relacionados com a interação multidisciplinar que é uma atividade que envolve a Engenharia, a Medicina, a Química, a Física e a Biologia. Esta interação deu origem à Ciência dos Biomateriais que tem como objetivo o projetar e desenvolver materiais a serem utilizados para a substituição (completa ou parcial) de funções biológicas¹.

Um biomaterial, do ponto de vista formal, é definido como sendo uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, de natureza sintética ou natural. e pode ser utilizado por um período de tempo, para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, tecidos ou órgãos². Como exemplos, os materiais que substituem ou induzem o crescimento de tecido ósseo, cartilagens, ligamentos, peles, entre outros³ (Figura 1).

De acordo com a sua natureza química, um biomaterial pode ser classificado em duas grandes categorias¹:

- naturais, que incluem o colágeno, a seda, a queratina e o pericárdio bovino,
- sintéticos, que incluem as cerâmicas, os polímeros, metais e ligas metálicas e os materiais compósitos.

A Tabela I apresenta alguns exemplos de biomateriais de origem sintética utilizados em implante. A Tabela II mostra o exemplo de biomaterial natural (colágeno) com sua aplicação em medicina, odontologia e indústria farmacêutica.

FIGURA 1. Esquema representativo de atividades biológicas que podem ser substituídas por biomateriais³.

TABELA I: Principais biomateriais utilizados em implantes, vantagens e desvantagens¹.

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

TABELA II: Biomateriais de colágeno e suas aplicações em medicina, odontologia e indústria farmacêutica ^{4,5}.

Categoria	Forma	Aplicação
Odontologia	Membranas	Membranas periodontais, implantes dentários
	Compósitos	Biocerâmicas do tipo HA: colágeno
Medicina	Membranas protetoras e cicatrizantes	colágeno: elastina, colágeno, com propriedades fibrinolíticas anticoagulantes e antiplaquetárias, colágeno: células (queratinócitos, fibroblastos, condrócitos)
	Esponjas	Agentes hemostáticos
	Reconstrução de tecidos	Colágeno; cerâmicas fosfatadas (preenchimento de cavidades ósseas), materiais para reconstrução plástica (correção de retorno urinário, prevenção precoce de miopia, etc)
	Revestimento	Prótese vasculares
	Preenchimento	Colágeno injetável
	Próteses	Confecção de válvulas cardíacas
Indústria Farmacêutica	Medicamentos de ação retardada	Antibióticos, corticóides, hormônios e hemostáticos, nas formas de películas ou esponjas
	Cosméticos	Agentes hidratantes

O registro histórico da primeira utilização dos biomateriais refere-se a materiais de sutura e data de 4000 anos a.C. Em épocas mais recentes, existem registros de materiais ortopédicos, tais como placas metálicas de ouro utilizados pelos egípcios

para os reparos de lesões cranianas, que datam de cerca de 1000 anos a. C. Membros artificiais também já eram conhecidos desde a época do Império Romano até a Idade Média. Estes dados históricos mostram que, mesmo em tempos remotos havia um grande interesse na substituição de partes danificadas do corpo humano à que a vida fosse prolongada. Entretanto, a era moderna de biomateriais teve início apenas no século XX, com a introdução de conceitos de assepsia e esterilização que tiveram origem com os trabalhos de Louis Pasteur¹ e cuja a evolução é mostrada na Tabela III..

TABELA III: Evolução na área de biomateriais após a introdução dos conceitos de assepsia e esterilização até os anos 1970.

Ano	Desenvolvimento
1886	Placas de aço recobertas com níquel para fraturas
1912	Placas de aço recobertas com ligas de Vanádio, o primeiro material a ser desenvolvido para atendimento específico da área: artefatos de acrílico para substituição de córnea
1946	Primeira prótese biocerâmica de bacia, com o uso de materiais plásticos
1952	Primeira prótese vascular com materiais artificiais: Vinion®, Orlon®, Dácron® e Ivalon®
1960	Primeira válvula cardíaca: silicone
1970	Primeira troca total do coração

Esta evolução levou ao conceito de que a substituição de um tecido doente ou danificado, deve ser feita por uma estrutura funcionalmente semelhante e deve sempre levar em conta a natureza e característica funcionais do tecido a ser substituído⁶. A primeira opção, foi e continua sendo como a situação ideal, o implante de tecido naturais, cujo uso, no entanto, é limitado pela disponibilidade, pelos altos índices de reações imunológicas e dificuldades de obtenção do material em condições estéreis¹. Uma outra

aproximação envolve a utilização de materiais, com características químicas similares às encontradas nos tecidos, incluído-se aqui os polímeros como a seda e o Nylon, algumas ligas metálicas como a Ti-Al-V (resistência mecânica) e cerâmicas como a hidroxiapatita (HA).

Do ponto de vista geral um biomaterial deve apresentar as seguintes características¹:

- 1 – ser biocompatível, isto é, não induzir a respostas teciduais ou imunológicas adversas;
- 2 – não ser tóxico ou carcinogênico;
- 3 – ser quimicamente projetado para suas funções de uso;
- 4 – estabilidade mecânica adequada ao seu uso;
- 5 – peso e densidade adequada;
- 6 – ter custo relativamente baixo, ser reprodutível e de fácil fabricação;
- 7 – estimular reações biológicas favoráveis em relação a sua função de uso.

Entre as características, a biocompatibilidade é ponto de destaque, pois, é a primeira qualidade importante do ponto de vista biológico de um biomaterial. A biofuncionalidade só poderá se manifestar, caso a biocompatibilidade seja adequada. Quando um material estranho entra em contato com o tecido ou com os fluidos biológicos, respostas de proteção são desencadeadas e se manifestam em primeira instância como processos inflamatórios ou imunológicos, visando a eliminação do corpo estranho. Excetuando-se os procedimentos imunológicos, as reações de “eliminação”, incluem processos de reabsorção, encapsulamento ou processos de calcificação³, resultantes finais do processo inflamatório inicial. Portanto, o bom desempenho de um

biomaterial pós implante está associado a um equilíbrio entre a biocompatibilidade e a biofuncionalidade¹⁻³.

Uma das grandes áreas de atividade em ciências de biomateriais é a do desenvolvimento de materiais para a substituição de tecido ósseo^{5,6}. Do ponto de vista funcional podem ser divididos em dois grandes grupos:

- aqueles biomateriais utilizados para substituir funções puramente mecânicas, no caso, as próteses metálicas;
- aqueles destinados ao preenchimento de cavidades ósseas, com fins de reconstrução e estimulação de crescimento de tecido ósseo novo.

O desenvolvimento destes tipos de biomateriais é importante e está relacionado com a recuperação do tecido ósseo nos casos de fraturas com perdas ósseas, infecções ósseas, tumores ósseos, doenças periodontais, implantes dentários e substituição completa de um osso. Materiais para estes fins podem ser metálicos^{3,8}, poliméricos^{1,3,8} sintéticos ou naturais, autólogos⁹, homólogos⁹ ou cerâmicos^{1,3,9-13}.

Para o caso de reconstrução do tecido ósseo, o uso de material autólogo (material retirado do próprio indivíduo), que é a situação ideal, tem as vantagens da sua alta biocompatibilidade, biofuncionalidade e isenção de transmissão de doenças. Sua grande desvantagem, no entanto, é sua indisponibilidade nas qualidades exigidas, é um processo mutilatório e muitas vezes, a reconstrução exige várias etapas. Materiais homólogos (materiais obtidos da mesma espécie), apesar da vantagem de pode obter o material em quantidades necessárias e por isto adaptam-se melhor às necessidades do implante em termos de manipulação e formatação adequadas, têm a desvantagem do alto potencial da transmissão de doenças infecto contagiosas, tais como a AIDS, hepatite B,

associados ao desencadeamento de respostas imunológicas responsáveis pelos elevados índices de insucessos para este tipo de implante.

Respostas a estes problemas foram obtidas com o advento da utilização de biocerâmicas, que não submete o paciente a outras cirurgias, por possibilitar uma melhor adaptação do material de implante ao local a ser implantado e também o risco de rejeição deste material é menor, como no caso de utilização de ossos autógeno⁹. Estas cerâmicas incluem a HA¹⁰, biovidros¹⁰, ou ainda uma combinação destes. Suas funções no estímulo de crescimento do tecido ósseo vão desde materiais osteocondutores¹⁴ (materiais que proporcionam o direcionamento do osso no interior da estrutura do material implantado- poros ou canais) até materiais osteoindutores¹⁵ (materiais que possibilitam a indução da osteogênese). Mais recentemente, sua aplicação estende-se ao recobrimento de materiais metálicos para a promoção de uma maior integração de tecido: metal, visando melhorar a fixação das próteses metálicas, por um mecanismo de osteointegração.

1.2 Biocerâmicas

Datam de 1920, os primeiros dados sobre a utilização de materiais cerâmicos como enxerto ósseo, quando ALBEE¹⁶ utilizou uma cerâmica β -fosfato tricálcico (β -TCP) para regenerar um defeito ósseo e para a formação de osso novo. Entretanto, somente 50 anos depois começaram a aparecer diferentes tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio como materiais implantáveis para aplicação em medicina e odontologia. Em 1969 foi publicada a aplicação de biocerâmicas no tratamento de doenças periodontais^{17,18}; seguindo-se em 1975, pelo trabalho de NERY e cols¹⁹, com β -TCP, com a introdução do

conceito de porosidade como uma característica importante para estes tipos de biocerâmicas.

A grande aceitação das biocerâmicas a base de sais de fosfato de cálcio deve-se, principalmente, ao seu alto grau de biocompatibilidade, que provavelmente está associado à sua similaridade química com os materiais normalmente encontrados no tecido ósseo^{20,21}. Entre as cerâmicas com melhor desempenho¹⁰, estão os biovidros, o β -TCP e a HA.

Quanto à sua ação biológica, as biocerâmicas utilizadas para reparo de tecido ósseo podem ser classificadas como bioativas, reabsorvíveis e bioinertes⁹ (Tabela IV). As cerâmicas bioativas são aquelas utilizadas para preenchimento de cavidades ósseas; neste caso ocorre a interação de tecido adjacente com a superfície do material implantado. Esta interação apresenta várias características que vão desde a formação de uma ligação forte, semelhante à encontrada nos ossos, até a sua completa absorção pelo organismo.

Entre os materiais cerâmicos considerados bioativos encontram-se:

- β -TCP; HA; biovidro entre outros;
- reabsorvíveis, porosos e bioinertes tais como aquelas derivadas de alumina, zircônia e HA densa, que são geralmente utilizados em implantes ortopédicos para substituir funções mecânicas e também para dar suporte mecânico a partes do corpo, sem que suas propriedades estruturais se deterioreem ao longo do tempo.

Quanto às suas características frente à sua interação com o tecido estas podem ser classificadas em¹⁰:

- Cerâmica Bioinerte são subdivididas em porosas e densas. As bioinertes densas referem-se às cerâmicas que se fixam ao osso por meio de irregularidades do tecido (fixação morfológica). Exemplo: a alumina policristalina. As bioinertes porosas se fixam ao osso mecanicamente, é por exemplo o caso da Alumina porosa e HA porosa.
- Cerâmica Bioativa referem-se as cerâmicas densas com superfícies bioativas, que se fixam ao osso por meio de ligação química, exemplo biovidros.
- Cerâmica Reabsorvível pode ser porosa ou densa, são aquelas cerâmicas que são com o tempo lentamente substituída pelo osso, exemplo β fosfato tricálcico.

Na tabela IV está descrita a classificação dos tipos das biocerâmicas quanto os tipos de ligação que exercem pós implante¹⁰.

TABELA IV: Classificação dos diferentes tipos de biocerâmicas, em função do tipo de ligação que exercem pós-implante¹⁰

Tipo de biocerâmica	Tipo de ligação	Exemplos
Bioinerte	A ligação entre o material e o tecido é fraca e é mais utilizado como suporte mecânico para a parte danificada	Óxidos de alumínio
Bioativa	Eles desenvolvem uma interface aderente com o tecido através de ligação química	Vidros bioativos (biovidros)
Reabsorvível	Além de estimularem o desenvolvimento de um novo tecido, este tipo de cerâmica é lentamente consumida pelo organismo	β -TCP

Há ainda outras propriedades importantes para as funções desempenhadas pelas biocerâmicas: a porosidade ^{10,22,23}, relacionada com o desenvolvimento de vasos

sangüíneos, tamanho e forma das partículas^{24,25}, rugosidade de sua superfície¹⁰, e solubilidade^{24,26}

1.3 Bases para desenvolvimento de biocerâmicas

1.3.1 *Tecido ósseo*

O osso é uma estrutura resistente e rígida do corpo humano e serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células sangüíneas, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui um sistema de alavancas ampliando as forças geradas na contração muscular^{9,27}. Além destas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (líquido intersticial, sangue, linfa)²⁷.

O tecido ósseo é de um tipo de tecido conjuntivo formado por células e um material intercelular calcificado. A matriz óssea é constituída de uma parte orgânica, o colágeno, e uma parte mineral correspondente, na sua maioria a HA^{1,3,9,20,27}. Em menor porcentagem são encontrados, também, citrato ($C_6H_5O_7^{-4}$), carbonato (CO_3^{-2}), fluoreto (F^-) e hidróxido (OH^-) de cálcio, responsáveis pelas diferenças funcionais do tecido ósseo.^{1,21}

A relação cálcio/fósforo, no tecido ósseo, pode variar entre 1,5 a 1,67^{3,21} e, essencialmente, é distribuída dentro da matriz orgânica que é o colágeno.

1.3.2 Colágeno

O colágeno é a principal proteína estrutural dos tecidos dos vertebrados, sendo responsável pela modulação das forças externas e internas exercidas dentro do organismo. É a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrada na pele, ossos, tendões e nos dentes. As diferentes propriedades destes tecidos são em parte devidas ao resultado de diferentes organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força elástica. Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno possui também outras características, tais como a função de orientar tecidos em desenvolvimento,^{4,27} que o torna altamente compatível na utilização como biomaterial^{4,5}.

A macromolécula de colágeno é um filamento semiflexível de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, formados por três cadeias polipeptídicas. As cadeias formadoras da maior parte do colágeno existente apresentam-se na forma helicoidal, formando uma tripla hélice, ligadas entre si por pontes de hidrogênio²⁹.

Dentre os vários tipos de colágeno; o colágeno tipo I é formado por duas cadeias idênticas, chamadas α_1 possuindo cerca de 1055 resíduos de aminoácidos cada e uma cadeia diferente chamada α_2 , possuindo cerca de 1029 resíduos. Nas extremidades da estrutura helicoidal dos tropocolágeno, existem pequenas regiões de cadeias polipeptídicas não helicoidais, denominadas telopeptídeos com 16 e 25 aminoácidos nas regiões *N* e *C* terminais, respectivamente³⁰. (Figura 2)

FIGURA 2. Estrutura do colágeno: (a) tropocolágeno; (b) cadeia α e (c) forma de triplete.

Pelas interações entre as moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação das microfibrilas³¹, a menor unidade estrutural do tecido conjuntivo, que podem ser vistas no microscópio eletrônico de varredura como um filamento fino. Com base nos dados obtidos por difração de raios-X e microscopia eletrônica de transmissão, foram propostos alguns modelos para a microfibrila, sendo o mais aceito aquele proposto por SMITH³², que consiste em cinco moléculas de tropocolágeno justapostas ao longo do eixo longitudinal, deslocadas uma da outra de um quarto de seu comprimento sendo, portanto, denominado de modelo de quarto alternado pentafibrilar (Figura 3)

FIGURA 3. Organização do colágeno durante a fibrillogênese

Formadas as microfibrilas, inicia-se o processo de agregação, denominado fibrillogênese³³, para formar fibrilas insolúveis. Esse processo, *in vitro*, mostrou ser dependente da temperatura, força iônica e acidez, e as fibrilas reconstituídas tem características estruturais idênticas àsquelas formadas *in vitro*³⁴.

Como biomaterial, o colágeno possui características importantes que são⁴:

- baixo índice alergenicidade,
- suas aplicações solúveis e fibrilares são capazes de reconstituir-se, isto é, organizar-se estruturalmente da mesma forma que o tecido nativo e com propriedade similares;

Além destas características o colágeno quando utilizado como biomaterial é importante também na aplicação de compósitos com biocerâmicas, como por exemplo, a

HA e por ser o colágeno uma proteína que serve de matriz suporte onde os sais de fosfato de cálcio são distribuídos e também possibilita orientação e o crescimento do tecido ósseo²¹.

Quanto a sua preparação, é obtido na sua forma solúvel, por processos, físico-químicos³⁵, químico³⁶ ou enzimáticos³⁷. Vários processos de solubilização da matriz de colágeno que são empregados com o intuito de aumentar sua biocompatibilidade e propriedades mecânicas.

As resultantes de modificações químicas na matriz de colágeno são matrizes carregadas, sendo que essas modificações fornecem características que melhoram ou modificam as propriedades do colágeno, sejam elas mecânicas ou físico-químicas atendendo às necessidades específicas na área de biomateriais.^{35,38,39}

Estudos recentes têm demonstrado que materiais carregados interagem melhor com o tecido. Por reações químicas específicas podem ser produzidos materiais de colágeno a pH fisiológico, com superfícies carregadas tanto como negativamente como positivamente³⁹

A matriz de colágeno com o tratamento alcalino proporciona uma maior densidade de cargas negativas, superpostas em regiões de cargas negativas preexistentes na molécula nativa. Esta alteração resulta na formação de um centro de carga assimétrico, onde esses centros negativos concentram-se na região central do tropocolágeno, assumindo uma hidrólise completa, as cargas negativas e positivas são uniformes. As matrizes aniônicas a pH fisiológico são menos trombogênicas, quando comparadas com a matriz nativa devido às características negativas das células do sangue³⁸.

1.3.3 Hidroxiapatita

O interesse pela HA como biomaterial, está relacionado ao fato desta ser a principal fase mineral encontrada no tecido ósseo e ter alta biocompatibilidade^{40,41}. Suas aplicações estendem-se à ortopedia e traumatologia para correções buco maxilo faciais; traumatismos raquimedulares e coluna cervical; tumores músculo-esqueléticos, entre outras aplicações¹³ e à odontologia, nos casos de doenças periodontais, implantes preenchimento de cavidades císticas ou mesmo aumentos do rebordo ósseo alveolar, além de outras aplicações⁴² (Tabela V).

A HA faz parte de um grupo de minerais chamados apatitas⁴³, e possui fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Seu difratograma⁴⁴ de Raios - X mostra que as principais distâncias referentes aos picos de maior intensidade são: 2,61, 2,78; 2,72; 3,44; 1,84; 1,94; 2,63; 2,26, sendo caracterizada pela sua baixa solubilidade em sistemas aquosos, e bastante solúvel em soluções de ácidos⁴³.

Como material de implantes pode ser obtida por desproteinização de tecido ósseo¹, ou por tratamento hidrotérmico de corais⁴⁵. Pode ser obtida também por processos sintéticos tais como, precipitação a partir de soluções aquosas^{46,47} ou reações no estado sólido⁴³.

No primeiro caminho para processos sintéticos, a HA é preparada pela mistura de soluções aquosas de PO_4^{3-} , na forma de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ou H_3PO_4 e Ca^{2+} , na forma de CaCO_3 , CaCl_2 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

TABELA V: Formas da hidroxiapatita usada em Medicina e Odontologia¹³

Usos	Formas
Matriz ou suporte para crescimento ósseo	grãos, porosa
Osso artificial	grãos, densa ou porosa
Cimento ósseo	pó com PMMA
Articulações artificiais	metal recoberto com HA
Próteses vasculares	Densa
Próteses traqueais	Porosa ou densa
Terminais percutâneos	Densa
Sistema de liberação lenta	densa, pó

A HA é obtida por este método pode conter não somente quantidade diferentes de H^+ e OH^- , mas também a substituição do íon cálcio por íons estranhos presentes nas soluções aquosas.

No segundo método a HA é preparada por um tratamento térmico (900 - 1300 °C por 1 a 24 h) de uma mistura estequiométrica de fosfato tricálcio (β -TCP) ou $Ca_2P_2O_7$ com $CaCO_3$ com CaO ou DCPC na presença de pressões elevadas.

Métodos convencionais em solução incluem a mistura de soluções aquosas de $Ca(NO_3)_2$ e $NH_4H_2PO_4$ sob condições alcalinas^{46,47}, segundo a reação:

Preparação de HA utilizando-se do ácido fosfórico e hidróxido de cálcio não são viáveis do ponto de vista de biomateriais, pois suas propriedades físicas e químicas não são reprodutíveis, em função da baixíssima solubilidade do hidróxido de cálcio⁴⁶.

Os problemas que ocorrem durante a síntese devem-se a parâmetros como temperatura, agitação, obtendo-se HA com a relação cálcio e fósforo variando entre 1,5 - 1,67.

sendo $0 < x < 1$

A HA é utilizada nas áreas médico-odontológica, na forma particulada e um dos maiores problemas de sua utilização nesta forma. É a sua dispersão das partículas para as zonas de tecidos moles, causando problemas, incluindo perdas das partículas, redução da zona de correção, desconforto para o paciente, podendo até levar a uma nova cirurgia. Deve-se levar em consideração que a estabilização deste material, no implante, requer aproximadamente um mês.

A utilização de cerâmicas de fosfato de cálcio na forma de mantas é uma boa alternativa para se evitar tais problemas. Recentemente, vários autores recomendam a combinação de HA particulada com uma série de materiais, tais como elastina⁴⁸, quitosana⁴⁹, colágeno^{49,50}, entre outros, facilitando o manuseio e a adaptação adequada do material na medida em que minimiza o desalojamento das partículas. Biomateriais do tipo fosfato de cálcio na forma de mantas tem grande interesse, como material reabsorvível em implantes ósseos. De modo particular, o que não ocorre com as biocerâmicas ou qualquer outro material rígido, tais implantes podem ajustar-se

perfeitamente aos defeitos, sem haver necessidade de moldagem prévia, já que podem ser moldados e endurecidos "*in situ*", assegurando um melhor ajuste aos tecidos circundantes.

Vários autores sugerem o colágeno⁵⁰⁻⁵² para este fim, pois este material constitui-se em um agente de união biocompatível e reabsorvível, responsável pela prevenção da migração das partículas cerâmicas, até a incorporação pelos tecidos do paciente. Muitos trabalhos, mostram que o colágeno não é só capaz de promover a proliferação de células do tecido conjuntivo, tais como fibroblastos na confecção de novos tecidos, mas também, SERRE e cols⁵² em testes "*in vitro*", verificou que quando se combinava HA com o colágeno, na forma de manta, na presença de cultura de osteoblastos, estes migravam em direção a manta e induziam a formação de uma matriz de calcificação, com a presença de cristais de HA no interior da matriz.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo a preparação e a caracterização de compósitos hidroxiapatita:colágeno aniônico na forma de mantas. A preparação destas mantas foram obtidas a partir de uma mistura do gel colágeno e o pó hidroxiapatita.

Os materiais utilizados neste trabalho para a preparação dos compósitos são o colágeno extraído de tendão, hidroxiapatita não estequiométrica (nHA) sintetizada em laboratório e hidroxiapatita comercial-Osteosynt (40-60mesh)(HA) e tem como finalidade fazer uma análise comparativa dos três tipos de compósito (*colágeno aniônico:nHA; colágeno aniônico:HA e colágeno aniônico:HA:nHA*) tendo com base os resultados obtidos pelos métodos de caracterização e com intuito de se obter um material que apresente característica de um biomaterial, de baixo custo e de fácil obtenção para ser utilizado na substituição óssea

Estes compósitos foram preparados na forma de mantas com a finalidade de facilitar sua manipulação e adaptação em implantes, bem como a obtenção de um material com alta eficiência na osteocondutividade. A hidroxiapatita e o colágeno além disto são os principais constituintes do tecido ósseo, o colágeno também é capaz de estimular e orientar o crescimento celular.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Solventes e Reagentes

Para a realização deste trabalho foram utilizados solventes e reagentes PA.

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: Centrífuga refrigerada (Hitachi – Himac CR 20b2), Liofilizador EDWARDS modelo FREEZE DRYER modukyo, Espectrofotômetro Infravermelho Bomem MB 102, Espectrofotômetro de UV- visível Hitachi modelo V1100, Espectrofotômetro de Absorção Atômica com polarizador Zeeman – Hitachi modelo Z-8100, Difrátômetro Automático (ânodo rotatório) de raio-X RIGAKU ROTAFLEX modelo RU-200B e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)- 2010 da TA Instruments para caracterizar os materiais e os compósitos.

3.3 Gel de colágeno aniônico

Preparação do tendão: O colágeno utilizado foi extraído do tendão bovino como descrito a seguir: Tendão, após remoção de material membranoso, foi lavado exaustivamente com solução de NaCl 0,9% para remoção completa de sangue. A seguir

foi desfiado e novamente colocado em solução de NaCl 0,9%, em seguida lavado com água destilada e secado em papel de filtro. Este tendão foi colocado a baixa temperatura (freezer).

3.3.1 Preparação do Gel

O tendão foi limpo e desfiado, em seguida descongelado e seco no papel de filtro. Pesou-se a 100g de tendão que foi tratado com 600 mL de uma solução alcalina contendo NaCl, CaSO_4 , KCl, Na_2SO_4 , NaOH, KOH, Ca(OH)_2 por um período de 24 h a temperatura ambiente, com agitação ocasional por 4 vezes ao dia (conservado em recipiente hermeticamente fechado).⁵³

Após este período, o tendão foi removido da solução com auxílio de uma peneira e tratado com 1200 mL de uma solução contendo Na_2SO_4 , KCl, CaSO_4 e NaCl por um período de 24 h. O tendão foi novamente escorrido e adicionado em 700 mL de solução de H_3BO_3 3% permanecendo por um período de 2 h. Repetiu-se este procedimento por três vezes, certificou-se que o pH final estivesse em torno de 8,0 e 8,5. Repetiu-se o procedimento acima, utilizando agora 700 mL de EDTA 3% a pH 11 para a remoção do cálcio. Lavou-se o tendão com água destilada por aproximadamente 6 vezes durante 1 h cada. Certificando-se que o pH final esteja entre 8,8. O colágeno foi extraído numa solução de ácido acético a pH 3,5. A concentração do gel de colágeno obtido foi determinada por liofilização e o gel foi estocado em frascos escuros na geladeira.

3.3.2 Membrana de colágeno

As membranas de colágeno foram preparadas a partir do gel de colágeno e foram colocadas em formas de acrílico com 4,5 cm de diâmetro após secagem do gel ao ar. Os géis foram obtidos neste caso por dissolução de 10 g da solução de colágeno (1,28% determinada por liofilização) e dissolvida em 42,5 mL de ácido acético pH 3,5 seguido de homogeneização e remoção de bolhas com auxílio de vácuo em um dessecador. Estas membranas de colágeno foram utilizadas na caracterização por espectroscopia de infravermelho

3.3.3 Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros foram obtidos de membranas na concentração de $0,44 \text{ mg.cm}^{-2}$ preparadas como descrito anteriormente, em um espectrofotômetro Bomem MB-120 a 20°C com resolução de 4 cm^{-1} . Antes das determinações, todas as membranas foram secas sob vácuo por 72h na presença de pastilhas de KOH.

3.4 Preparação da Hidroxiapatita não estequiométrica (nHA)

A síntese da hidroxiapatita foi feita seguindo o método de JARCHO e cols modificado de acordo com o mostrado na Figura 4 ⁴⁷

FIGURA 4. Fluxograma do processo de síntese da hidroxiapatita não estequiométrica pelo método modificado JARCHO e cols.

A nHA foi obtida pela reação química abaixo:

Solução I- (de cálcio)

A solução de cálcio foi preparada pesando-se 170 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e dissolveu-se em 720 mL de água deionizada. Para ajustar o pH entre 11-12 foi adicionou-se nesta solução 50 mL de $\text{NH}_4(\text{OH})$, concentrado e em seguida completou o volume com 680 mL de água deionizada. O pH foi verificado.

Solução II (de fósforo)

Pesou-se 95g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dissolveu-se em 1200 mL de água deionizada e em seguida ajustou o pH em torno de 11-12 com $\text{NH}_4(\text{OH})$ obtendo a solução II. A solução I permaneceu sob agitação constante para homogeneizar em todo o sistema foi mantido sob fluxo de N_2 , para a eliminação total de CO_2 no sistema. A solução II foi adicionada lentamente por gotejamento controlado na solução I durante aproximadamente 6 h.

Ao término do gotejamento, a solução permaneceu sob agitação constante e fluxo de N_2 , à temperatura ambiente por 40 h, produzindo uma suspensão com precipitado gelatinoso de coloração branca. Em seguida, esta suspensão foi decantada e o sobrenadante foi retirado com o auxílio de um sifão. A suspensão foi lavada com água deionizada, decantada e sifonada até atingir um pH constante de 8,00. A suspensão foi centrifugada a 4000 rpm a 20°C , por duas vezes, durante 15 min; em seguida lavada com água deionizada em funil de Buchner até abaixar mais o pH da água de lavagem. O

precipitado foi colocado em estufa a 90°C durante 15 h para secar. A nHA seca foi triturada em almofariz de porcelana e peneirada em uma peneira de 100 mesh. O rendimento total do processo foi de 94%.

3.4.1 Caracterização da Hidroxiapatita

3.4.1.1 Determinação da relação Ca/P

A) Determinação de Cálcio via absorção Atômica.

O cálcio foi determinado como se segue:

Solução I - Preparação da solução de lantânio: Pesou-se 0.3 g de Cloreto Lantânio (La) diluídos em 300 mL de HCl 1N obtendo uma solução em HCl 1N com 1000 ppm de lantânio.

Solução II - Preparação da solução estoque de CaCO_3 : Diluiu-se 5 mL de solução estoque de CaCO_3 (1000 ppm) para 100 mL com HCl 1N (solução de cálcio 50 ppm). Dessa solução preparou-se solução nas seguintes concentrações: 0; 0.25; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 5.0 e 8.0 mL diluindo para 25 mL com a solução I. Obtendo-se, então as soluções padrões de cálcio.

Preparação da amostra de nHA: A amostra de nHA foi preparada pesando-se 250 mg de nHA e diluindo-se para 250 mL com HCl 1N. Desta solução, pipetou-se 1 mL e diluiu-se para 25 mL com a solução I. Obteve-se uma solução de nHA com cerca de 40 ppm. A concentração de cálcio foi obtida pela interpolação dos valores da absorbância na curva de padronização.

B) Determinação da porcentagem de Fósforo

O método utilizado para determinar a porcentagem de fósforo foi via fosfomolibdato por espectroscopia no UV-visível⁵⁴ e descrito a seguir:

Preparação das soluções e curva de calibração

Solução estoque de molibdato de amônio: Foi dissolvido 0,2g de $(\text{BiO}_2)_2 \text{CO}_3$ em 25 mL de H_2O deionizada e adicionou-se 15 mL de H_2SO_4 concentrado, sob agitação magnética até a completa dissolução. Adicionou-se 2,0g de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dissolvido em 20 mL de H_2O deionizada. O volume foi completado para 100 mL H_2O deionizada e 60 mL desta solução foram diluídos para 200 mL com água deionizada.

Solução Padrão de Fosfato: Pesou-se 27,9 mg de KH_2PO_4 , previamente seco em estufa a 100°C por aproximadamente 2 h, para atingir o peso constante, colocou-se no dessecador para atingir a temperatura ambiente; este procedimento foi repetido até atingir o peso constante. Esta massa foi dissolvida em 100 mL de H_2O deionizada contendo 0,3 mL de H_2SO_4 concentrado e o volume foi completado para 250 mL. Obteve-se uma solução de 25 ug de fósforo por mL. Desta solução prepararam-se as soluções de concentração: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 2,0 e 2,5 mL diluindo sempre para 25 mL com água deionizada, obtendo-se soluções padrões de fosfato (P).

Realizou-se no espectrofotômetro UV-visível leitura para determinar a concentração de fósforo a partir da curva de padronização para o fósforo.

A curva de padronização foi obtida pela mistura de 5 mL da solução I com 2,5 mL da solução padrão de fósforo. Nesta mistura adicionou-se uma pequena quantidade

de ácido ascórbico. Obteve-se um complexo de coloração azul que atingiu sua intensidade máxima após 30 min, sendo então feita a leitura em espectrofotometro. (curva de padronização para a determinação espectrofotométrica de UV-visível HITACHI modelo V1100 em 660nm).

Preparação da amostra de nHA: Pesou-se 37 mg da amostra de nHA dissolveu-se em 2 mL de HCl 3 mol.L⁻¹ e completou-se para 250 mL para obter uma concentração entre 0,25 e 1,25 ug por mL. Desta solução, pipetou-se 1 mL e diluiu-se para 25 mL a fim de obter a solução para a determinação de fósforo a amostra.

3.4.2 Caracterização por Difração de Raio X.

Analizou-se uma pequena quantidade da amostra de HA e de nHA com tamanho de partículas menores do que 100 mesh. Os difratogramas obtidos foram comparados com os difratogramas padrões encontrados no JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) da HA, fosfato tricálcio (β - TCP) e carbonato de cálcio.

3.4.3 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho.

Analizou-se uma pequena quantidade da amostra de HA e de nHA com tamanho de partículas menores que 100 mesh, preparadas na forma de pastilha com KBr para obter o espectro.

3.5 Compósitos

3.5.1 Preparação dos materiais compósitos

A preparação do compósito é descrita a seguir para uma relação de massa (m/m) no caso do compósito colágeno: nHA: HA (5:1:1).

Pesou-se 20 g de uma solução de colágeno de tendão bovino a 1.28%. Foi misturado-se com 4 g de nHA e 4 g de HA (m/m/m), até ficar a mistura totalmente homogênea. Retiraram-se as bolhas da misturas e em seguida colocou-se em no moldes de acrílico com forma circular de 4,5 cm de diâmetro. Em seguida a mistura foi congeladas no freezer e liofilizada.

Prepararam-se-se os outros dois compósitos colágeno aniônico:nHA e :colágeno:aniônico:HA com relação massa (5:2) para ambos.

- 1) Pesou-se 20 g de colágeno de tendão bovino a 1,28% foi misturado-se com 8 g de nHA até total homogeneização. Retirou-se as bolhas da mistura e colocou-se em molde de acrílico com forma circular. Em seguida congelou-se e liofilizou-se.
- 2) O compósito colágeno aniônico:HA (5:2) foi preparado pelo mesmoprocédimento descrito acima

Após a obtenção dos compósitos estes foram cortados em duas partes iguais: a primeira fração foi tratada com solução tampão de fosfato ($0,13 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 7,4 por 24 h (para introduzir na matriz de colágeno uma estrutura mais organizada, fibrilar) e ao término deste procedimento à metade desta última fração foi colocada em solução de glutaraldeído 0,05% por 15 min (com a finalidade de diminuir a biodegradabilidade do

colágeno, partindo da reação de reticulação na matriz de colágeno). Em seguida todas as amostras dos compósitos com tratamento foram congeladas e liofilizadas. As frações dos compósitos tratados e não tratados foram caracterizadas por IV, DRX, DSC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização Química

4.1.1 *Determinação da razão Ca/P - via Absorção Atômica para o cálcio e via molibdato por Espectrofotometria de UV – visível para o fósforo*

A) Determinação de Cálcio

A determinação da porcentagem de cálcio na amostra de HA (Figura 5) foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (AAS) obtendo-se o valor de 34,57%

FIGURA 5. Curva padrão para determinar a porcentagem de cálcio na amostra

B) Determinação de Fósforo

Para a determinação da porcentagem de fósforo contida na amostra foi construída uma curva padrão (Figura 6) que foi obtida via molibdato, por espectroscopia no UV-visível. O valor da porcentagem de fósforo obtida na amostra foi de 16,86%.

FIGURA 6. Curva de padronização para a determinação espectrofotométrica de fósforo

A razão Ca/P foi determinada pela seguinte equação:

$$\frac{\text{Ca}}{\text{P}} = \frac{\% \text{Ca}}{\text{mol de Ca}} \times \frac{\text{mol de P}}{\% \text{P}}$$

$$\frac{\text{Ca}}{\text{P}} = \frac{34,57}{40,07} \times \frac{30,97}{16,86}$$

$$\frac{\text{Ca}}{\text{P}} = 0,8642 \times 1,8327$$

$$\frac{\text{Ca}}{\text{P}} = 1,58 \%$$

Portanto a razão de Ca/P da amostra é 1,58. Este valor permite concluir que a amostra obtida é deficiente em cálcio²⁰.

4.2 Determinação da Concentração da Solução de Colágeno por Liofilização

A concentração da solução de colágeno preparada para a realização deste trabalho foi determinada por liofilização, o valor determinado foi de 1,28%(m/m).

4.3 Caracterização por Infravermelho

4.3.1 Colágeno

A membrana de colágeno foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 7) e os resultados mostraram a presença de bandas típicas para esta proteína.³⁴ Estas bandas foram observadas em 1658 cm⁻¹, correspondente ao estiramento da carbonila (amida I) e em 1551 cm⁻¹, devido às vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento de C-N³⁵ (amida II). A banda larga entre 3682 e 3122cm⁻¹ é devida ao estiramento da ligação N-H, C-H e estiramento do grupo O-H da proteína e da água

presente. Entretanto essas bandas não são indicativas da manutenção da integridade da tripla hélice. A integridade da tripla hélice do colágeno só pode ser identificada através da razão entre as bandas de absorbâncias em 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , que correspondem respectivamente às vibrações no plano do amida III, o estiramento C-N e as vibrações N-H. A banda em 1450 cm^{-1} serve como padrão, já que se mostra invariável em relação a desnaturação, enquanto que a banda em torno de 1234 cm^{-1} pode variar pois é sensível à presença da estrutura terciária do tropocolágeno. Esta relação A_{1230}/A_{1450} para a molécula íntegra é ao redor de 1,0⁵⁵. Para o caso do material estudado, a relação determinada foi de 1,1 sugerindo portanto que a integridade da tripla hélice foi mantida. Materiais de colágeno desnaturados tem relações ao redor de 0,60, como no caso da gelatina⁵⁶.

FIGURA 7. Espectro de absorção no infravermelho obtido em membrana de colágeno preparada a partir do gel obtido por extração a pH 3,5

4.3.2 Cerâmicas e Materiais Compósitos

4.3.2.1 Cerâmicas (HA e nHA)

Para o espectro na região de infravermelho (Figura 8) para a Osteosynt® (40-60 mesh)- HA foram caracterizadas bandas em 3564cm^{-1} , um pico agudo que se refere ao estiramento do grupo OH e outras bandas em 1092, 1038 e 954, 603, 560 cm^{-1} que correspondem deformação da ligação P=O. Estiramento da ligação P-OH foi observado em 870cm^{-1} . A ausência de banda larga entre 3537 e 3324cm^{-1} indica que o material praticamente não apresenta água na sua composição²².

FIGURA 8. Espectro de absorção no infravermelho da amostra de hidroxiapatita comercial (Osteosynt® 40-60 mesh)

Para o caso da hidroxiapatita não estequiométrica (nHA), o espectro na região do IV (Figura 9) desta cerâmica foi muito similar àquele observado para o Osteosynt®

(40- 60 mesh), exceto pela maior intensidade da banda larga em entre 3674 e 3095cm^{-1} sugerindo que neste material ocorre a presença de água.

FIGURA 9. Espectro de absorção na região do infravermelho hidroxiapatita não estequiométrica .

4.3.2.2 *Materiais Compósitos*

Como pode ser observado, o espectro mostrado na Figura 10 foi similar àquele para a cerâmica sozinha, (figura 9) exceto que algumas bandas de menor intensidade puderam ser detectadas na zona característica do colágeno. Após o tratamento com TF $0,13\text{ molL}^{-1}$, não se observou no espectro na região do IV o aparecimento de novas bandas apenas as bandas típicas para a nHA. Estas são bandas característica do pó HA descrito na literatura⁵⁷.

FIGURA 10. Espectro de absorção de infravermelho do composto colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequiométrica (5:2) antes da reticulação com glutaraldeído 0,05%

O espectro no IV para o composto colágeno aniônico:nHA (5:2) é mostrado na Figura 10 sendo caracterizado por bandas como mostrado na Tabela VI.

TABELA VI Principais bandas observadas por espectroscopia no infravermelho para o composto colágeno aniônico:nHA .

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuições
3571	Estiramento do grupo O-H
3500- 3450	H ₂ O adsorvida ou estrutural
1654	Estiramento C=O (amida I)
1564	Deformação N-H e estiramento C-N (amida II)
1458	Deformação N-H e estiramento C-N (amida III) com vibração no plano.
1094	Deformação da ligação do grupo P=O
1035 –960	Deformação da ligação do grupo P-OH
633 – 603 – 565	Vibração da ligação do grupo O-H no plano

Bandas características do colágeno, embora de pequena intensidade podem ser observadas em torno 1650 cm^{-1} (amida I), estiramento da carbonila e em 1560 cm^{-1} vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento de C-N.³⁵

Os espectros de IV para os compósitos colágeno aniônico:HA e colágeno aniônico:nHA:HA equilibrados nas mesmas condições foram similares.

FIGURA 11. Espectro de absorção no infravermelho para o compósito colágeno aniônico:hidroxiapatita não estequiométrica (5:2) após a reticulação com solução de glutaraldeído a 0,05%.

Como mostrado pela Figura 11 não foram observadas modificações significativas no espectro após o tratamento com GA a 0,05%. O espectro para os outros compósitos colágeno aniônico:HA: e colágeno aniônico:nHA:HA mostraram o mesmo espectro após o tratamento com GA.

4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva DSC para a Osteosynt® (40-60 mesh) - HA, que corresponde a uma HA, como esperado não apresentou qualquer transição no intervalo de temperatura entre 40°C e 100°C (Figura 12), em concordância com sua estrutura química inorgânica formada apenas por cálcio e fósforo $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$.

FIGURA 12. Curva DSC para a hidroxiapatita comercial (Osteosynt® 40-60 mesh)

Para o caso da nHA a curva de transição térmica no mesmo intervalo de temperatura (Figura 13), embora não apresentasse qualquer transição típica, foi caracterizada pela absorção contínua de calor desde 40°C e que provavelmente corresponde à perda de água da cerâmica, visto que após a sua preparação o material foi apenas seco na estufa a 90°C. Normalmente hidroxiapatitas⁵⁸ de uso médico são sinterizadas antes de seu uso, como é o caso da HA com razão Ca/P de 1,67. Este material é também um composto inorgânico de estrutura química similar à da HA

estequiométrica, exceto com uma relação molar Ca/P de 1,67, portanto em relação ao HA é deficiente em cálcio como pode ser observado nos valores obtidos pela determinação da razão de cálcio e fósforo.

FIGURA 13. Curva DSC para hidroxiapatita não estequiométrica

Para o caso do compósito colágeno aniônico:HA (5:2) (Figura 14) a curva DSC foi caracterizado por uma transição em 43,7°C (41,6°C- 45,8°C). Esta transição é referente à presença de colágeno na amostra e consistente para este tipo de material, visto que a preparação do compósito foi realizada com um gel de colágeno a pH 3,5. Estruturas microfibrilares de colágeno a pH inferiores a 4,2 se desfazem para dar origem ao colágeno “swollen”, que é significativamente menos estável termicamente quando comparado com a estrutura fibrilar^{38,56,59}. Os compósitos foram preparados com gel de colágeno a pH 3,5 (1,28%). Esta curva no entanto mostra que a estrutura secundária do colágeno foi preservada ao longo do processamento, visto que matrizes de colágeno desnaturado não apresentam qualquer transição neste intervalo de temperatura⁵⁹. Foi

observado também que esta curva é contínua com um máximo em 63,3°C, provavelmente devido ao solvente presente na amostra.

FIGURA 14. Curva DSC do compósito colágeno aniônico: HA comercial (Osteosynt® 40-60mesh)

A curva DSC para o compósito colágeno aniônico: nHA (Figura 15) foi similar àquela observada para colágeno aniônico:HA (Figura 14), a transição para o colágeno aniônico:nHA foi observada em 43,7°C (41,5°C-46,0°C) com uma temperatura em 89,0°C. Para o caso do compósito colágeno aniônico: nHA: HA (Figura 16) a curva foi similar às anteriores, com uma transição para o colágeno:nHA:HA detectada em 43,8 (42,3- 45,3°C)e 74,3°C.

FIGURA 15. Curva DSC do composto colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequiométrica (5:2)

FIGURA 16. Curva DSC do composto colágeno aniônico :hidroxiapatita não estequiométrica :hidroxiapatita comercial (Osteosynt® 40-60 mesh) (5:1:1)

A curva DSC do compósito colágeno aniônico:HA após ter sido equilibrado em TF ($0,13\text{mol L}^{-1}$) 24 h, pH 7,4 (Figura 17a) foi caracterizada por um perfil mais complexo em relação à amostra original (Figura 12) com transição significativas observadas em $49,30^{\circ}\text{C}$ ($44,9^{\circ}\text{C} - 53,7^{\circ}\text{C}$) referentes ao colágeno e uma transição larga centrada em $62,8^{\circ}\text{C}$ indo até $80,0^{\circ}\text{C}$ que possivelmente pode estar relacionada com a presença de grupos fosfato. Este tratamento teve como objetivo a indução da passagem de colágeno swollen para fibrilado, por ser esta a sua estrutura natural, conferindo ao compósito uma morfologia mais próxima àquela encontrada nos tecidos. Portanto o aumento observado em relação ao material inicial sugere que o colágeno passou para uma forma mais ordenada. A transição em $49,3^{\circ}\text{C}$ é devida à presença de colágeno aniônico, formado ao longo do processo de extração⁶⁰. Embora não muito clara, as outras transições observadas entre $62,8^{\circ}\text{C}$ e $86,0^{\circ}\text{C}$ são muito baixas para serem atribuídas à água e muito elevadas para matrizes colagênicas nativas⁵⁶. No entanto, como o compósito formado está entre um sal de fosfato de cálcio e o colágeno, é possível nas condições de preparação que ocorra a formação de sais de cálcio de colágeno ou possivelmente pode estar associada a presença de grupos fosfato na amostra, que devem apresentar transições em temperaturas mais elevadas. De acordo com a série de Hofmeister³⁸, o íon cálcio tipicamente aumenta a estabilidade de estruturas de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos etc.) e portanto sua estabilidade térmica. Em função disto estas transições foram atribuídas a presença de sais de cálcio com colágeno. A confirmação da presença do colágeno no composto foi obtida também pelo “rerun” isto é, uma amostra após ter sido submetida a aquecimento no intervalo de temperatura entre 40°C a 100°C é resfriada e novamente submetida à análise térmica, no mesmo intervalo. No caso deste compósito,

o termograma para o “rerun” é mostrado pela Figura 17b. Como esperado, nenhuma transição ou absorção de calor foi detectada no intervalo, visto que: a)- colágeno desnaturado não apresenta qualquer transição térmica neste intervalo e b) – toda a água presente foi eliminada na corrida original. Estes resultados para o “rerun” de uma certa forma reafirmam a presença do colágeno na amostra original.

FIGURA 17. Curva DSC do composto colágeno aniônico:Osteosynt® (40-60 mesh) (5:2) após tratamento em tampão fosfato ($0,13\text{molL}^{-1}$) 24 h, pH=7,4
(a) corrida inicial e (b) Rerun

A Figura 18a mostra a DSC do composto colágeno aniônico: nHA tratado com TF ($0,13\text{mol L}^{-1}$) 24h, pH 7,4 com pontos de temperaturas de transição em $49,05^{\circ}\text{C}$ ($45,3 - 52,8^{\circ}\text{C}$). Outras transições foram observadas a partir desta temperatura que provavelmente podem ser atribuídas à possível presença de grupos fosfatos na amostra. A transição em $49,05^{\circ}\text{C}$ pode ser a devido à presença do colágeno fibrilado, como já descrito para o caso do composto colágeno aniônico:HA. As demais transições

observadas pelas mesmas justificativas que para o compósito colágeno aniônico:HA foram atribuídas a sais de colágeno com cálcio. Como esperado, o rerun (Figura 18b), assim como no caso do compósito colágeno aniônico:HA, foi caracterizado pela ausência completa de transições no intervalo de temperatura estudado.

FIGURA 18. Curva DSC do compósito colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequiométrica após tratamento em tampão fosfato ($0,13\text{mol.L}^{-1}$) 24 h, pH 7,4(a) corrida inicial e (b) Rerun

Após o tratamento com TF ($0,13\text{mol.L}^{-1}$) 24h, pH 7,4 o compósito colágeno aniônico:HA:nHA (Figura 19a), a curva DSC foi caracterizada pela transição em $49,6^{\circ}\text{C}$ ($47,46 - 51,6^{\circ}\text{C}$) e uma temperatura de transição em $63,0^{\circ}\text{C}$. Estas temperaturas de transições foram atribuídas à presença de colágeno “fibrilado”. A temperatura de transição em $60,0^{\circ}\text{C}$ pode ser atribuída à presença de sais de cálcio de colágeno ou a fosfato presente. Assim como nos compósitos anteriores o rerun (Figura 19b) foi caracterizado pela completa ausência de transições térmicas.

FIGURA 19. Curva DSC do compósito colágeno aniônico: Osteosynt (40-60 mesh):hidroxiapatita não estequiométrica após tratamento em tampão fosfato ($0,13 \text{ mol.L}^{-1}$) 24 h, pH 7,4 (a) corrida inicial e (b) Rerun

Todos os compósitos após terem sido equilibrados em TF ($0,13 \text{ mol.L}^{-1}$) 24h, pH 7,4 foram submetidos à reação de reticulação (figura 20) com uma solução de GA (0,05%) por 15 min.

FIGURA 20. Representação da reação de reticulação com Glutaraldeído

Este tratamento teve como objetivo diminuir a biodegradabilidade do colágeno⁶⁷ em virtude da introdução de ligações cruzadas do tipo base de Schiff promovida pelo GA, que ocorre entre os grupos ϵ - amino das cadeias laterais dos resíduos de lisina e hidroxilisina presente na estrutura primária do colágeno. Esta reação de reticulação é acompanhada por um aumento da estabilidade térmica que é função direta tanto da concentração do GA quanto do tempo de tratamento⁶¹.

FIGURA 21. Curva DSC para o compósito colágeno aniônico: Osteosynt® (40-60 mesh) tratado com solução de glutaraldeído a 0,05% por 15 min (a) corrida inicial e (b) Rerun

Para o compósito colágeno aniônico:HA após o tratamento com solução de GA a 0,05% por 15 min (Figura 21a), transições foram observadas em 64,6°C e várias outras a partir desta temperatura até cerca de 93°C, perfil este muito similar àquele obtido para o mesmo compósito após equilíbrio em TF (Figura 18a). A curva mostra que a reação com GA que possivelmente ocorreu no compósito pode ser estabelecida por duas observações relativas às variações das temperaturas de transição: em primeiro lugar, a transição correspondente ao colágeno aniônico observada para o compósito colágeno

aniônico:HA (Figura 17a) em 49,3 °C antes do tratamento com GA, não foi mais detectada após a reação; em segundo lugar, está relacionado com o aumento do valor da temperatura de transição de 68,8 °C que após o tratamento com GA vai para cerca de 93,0 °C. Antes do tratamento, este valor da temperatura de transição era contrada em 62,2°C com um limite superior em 86,0°C. Como esperado, o perfil do rerun (figura 21b) não mostrou qualquer transição térmica.

A Figura 22a mostra a curva térmica do composto colágeno aniônico:nHA. Após o tratamento com GA mostra a temperatura de transição observada em 63,1°C, as outras transições foram observadas a partir desta temperatura que podem ser atribuídas ao o grupo fosfato ou para sais de fosfato de cálcio com colágeno

FIGURA 22. Curva DSC para o composto colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequiométrica tratado por 15 min na solução de glutaraldeído a 0,05% (a) corrida inicial e (b) Rerun

Em comparação com as transições mostradas pela Figura 18a antes da reação com GA, este perfil, embora heterogêneo mostra um aumento significativo das

transições térmicas, mostrando que a reação de reticulação com GA ocorreu. Nenhuma transição foi detectada no rerun (Figura 22b).

Na curva DSC do compósito colágeno aniônico:HA:nHA após ter sido equilibrado com GA observou-se a temperatura de transição em 63,0°C (Figura 23a), que possivelmente está relacionada com a estrutura reticulada do colágeno na superfície da amostra e também pode ter ocorrido uma interação entre o colágeno, nHA e HA durante o aquecimento.

FIGURA 23. Curva DSC para o compósito colágeno aniônico: Osteosynt® (40-60 mesh):hidroxiapatita não estequiométrica tratado com solução de glutaraldeído a 0,05% por 15 min (a) corrida inicial e (b) Rerun

Para o caso do compósito colágeno aniônico:HA:nHA após o tratamento com GA, muitas transições foram observadas entre 54,7 e 76,0°C, sugerindo que o material é

bastante heterogêneo, o que ficou evidenciado também pelo perfil da curva anterior ao tratamento com GA, exceto que, neste caso, a intervalo de temperatura no qual as transições foram observadas foi entre em 50,0 e 63,0°C, sugerindo portanto que a reação com GA também ocorreu. Com nos caso dos materiais o rerun foi caracterizado pela ausência de qualquer transição. Estas análise de DSC foram feitas para determinar a presença do colágeno nas amostras estudadas.

TABELA VII – Valores da temperatura de transição para os compósitos

-	TEMPERATURA (° C)		
	ST	GA	TF
COMPÓSITO			
COLÁGENO:HA	43,7	49,3	64,6
COLÁGENO:nHA	43,7	49,0	63,1
COLÁGENO:nHA:HA	43,8	49,6	63,0

Pode-se observar pela Tabela VII, que os valores da temperatura de transição para os compósito sem tratamento químico e com o tratamento mostraram um aumento no valor na temperatura de transição após serem submetidos ao tramento químico, isto pode significar que ocorreu a mudança na estrutura do colágeno, de colágeno sowlen (sem tratamento químico) passou para colágeno fibrilar (após o tramento com TF, 24h) e ao serem equilibrados com GA por 15min o colágeno presente pode ter passado para a estrutura reticulada.

4.5 Difração de Raio X (DRX)

O padrão de difração de raio-x do Osteosynt® (HA comercial) (Figura 24) mostrou valor de distância (Å) características em 2,26; 2,62; 2,72; 2,77; 2,81; 3,08; 3,17 e 3,44 e estão de acordo com os valores do difratograma padrão da JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) para a HA, e a resolução apresentada no difratograma sugere que este material é altamente cristalino⁶³.

FIGURA 24. Difratograma de raio-X para o Osteosynt®(40-60 mesh)

O padrão de difração de raios-X para a HA sintetizada neste trabalho (Figura 25), que como indicado por análise por via úmida não é estequiométrica, foi bastante similar, com os valores das distâncias (Å) em 3,44; 3,11; 2,81; 2,79; 2,77; 1,74; 2,71; 2,63; 2,61; 2,26 e 2,25, exceto que os picos foram menos resolvidos, o que está de acordo com o procedimento sintético, pois este material foi apenas seco em estufa a 90°C por 6 h, e portanto sem qualquer grau de cristalinidade^{58,62}.

FIGURA 25. Difratoograma de raio-X para a amostra hidroxiapatita não estequiométrica

O difratograma para o compósito colágeno aniônico: HA:nHA é mostrado pela Figura 26. A Figura 26b é aquela correspondente ao compósito após ter sido equilibrado em $\text{TF } 0,13\text{molL}^{-1}$, pH 7,4 por um período de 24 h.

Picos característicos foram observados nas distâncias (Å) em 2,25; 2,62; 2,70; 2,77; 2,80 e 3,44 e, embora este padrão seja similar ao da HA, ele apresenta menor resolução que, provavelmente, é devida à interação da cerâmica com o tampão e também devido à presença de água. O tratamento com GA aparentemente não muda significativamente o perfil do difratograma, exceto pela presença de ruído mais intenso.

FIGURA 26. Difratoograma de raio-X obtido para os compósito colágeno aniônico: hidroxiapatita não estequeométrica: Osteosynt® (40-60 mesh) – (a) tratado com tampão fosfato ($0,13\text{mol.L}^{-1}$) pH 7,4, 24h e (b) solução de glutaraldeído a 0,05%

Embora não mostrados, os padrões de difração de raios-X dos compósitos colágeno aniônico: nHA e colágeno aniônico HA, nas mesmas condições, foram similares àqueles mostrados pela Figura 26. Pode-se observar na Tabela VIII a comparação dos valores da distância interplanar dos materiais cerâmicos e os compósitos com e sem tratamento químico.

TABELA VIII –Valores obtidos das distancias interplanar

HA literatura	HA comercial	HA sintetizada	Compósito		
d (Å)	d (Å)	d (Å)	colágeno:HA:nHA		
			d (Å)		
			ST	TP	GA
3,44	3,44	3,44	3,44	3,44	3,42
2,81	2,81	2,81	2,81	2,81	2,81
2,77	2,77	2,77	2,77	2,77	2,77
2,72	2,72	2,72	2,70	2,70	2,71
2,63	2,62	2,63	2,63	2,62	2,62
2,26	2,26	2,26	2,26	2,25	2,25

Analisando os valores da distância interplanar (Å) obtidos para os pós cerâmicos e do compósito, no caso colágeno aniônico:HA:nHA pode-se observar uma similaridades entre os valores, isto possivelmente significa que os pós cerâmicos comercial, sintetizados em laboratório, com também a HA presentes nos compósitos apresentaram estrutura cristalinidade semelhantes comparadas com a da literatura.

CONCLUSÃO

A caracterização da cerâmica de fosfato de cálcio sintetizada (nHA) e da hidroxiapatita comercial (HA), segundo as análises feitas mostraram para nHA a relação Ca/P de 1,58, indicando que esta cerâmica é deficiente em cálcio em relação a HA comercial com razão Ca/P de 1,67. Já os resultados da difração de raio-X desses materiais mostraram picos similares aos da hidroxiapatita, como já citado na literatura. Pode-se observar que os picos da hidroxiapatita comercial são mais significativos com relação aos picos da nHA pelo fato da HA ser um pó cerâmico sinterizado e da nHA foi apenas seca a 90°C.

Portanto a estrutura cristalina da nHA possivelmente é mais amorfa ou seja, possui uma estrutura menos ordenada do que a HA. Na caracterização por DSC destes pós cerâmicos observou-se que a nHA apresentou uma curva característica da presença de água na amostra e para HA isto não ocorreu por ser um material sinterizado. Pela análise feita por infravermelho pode-se observar bandas características dos materiais HA e nHA e picos indicando a presença de água na amostra nHA.

O colágeno preparado para ser utilizado na preparação dos compósitos foi caracterizado por infravermelho mostrou bandas características desta proteína.

Os processos de mistura colágeno com HA para preparação dos compósitos⁶⁵ *colágeno aniônico:HA, colágeno aniônico:nHA e colágeno:HA:nHA* sem tratamento

químico mostram que não ocorreu a desnaturação da matriz colagênica. As curvas DSC dos compósitos após terem sido tratados com TF ($0,13 \text{ mol L}^{-1}$) 24h, pH 7,4 mostraram perfis mais complexos em relação aos perfis dos compósitos originais, com valores de transição mais altos. Estes resultados sugeriram que a estrutura do colágeno passou para uma forma mais organizada, isto significa que este tratamento induziu a passagem do colágeno swollen para o colágeno fibrilar (estrutura natural), atribuindo ao compósito uma morfologia mais próxima àquela encontrada nos tecidos.

Os compósitos após terem sido tratados com TF foram submetidos à reação de reticulação com GA (0,05%) por 15 min, com objetivo de diminuir a biodegradabilidade do colágeno em virtude das ligações cruzadas.

Esta reação de reticulação pôde ser observada pelo aumento da estabilidade térmica mostrando um perfil heterogêneo das transições que podem estar relacionado com a estrutura reticulada do colágeno na superfície das amostras e provavelmente também pode ter ocorrido uma interação entre o colágeno e a HA e a nHA.

Referências Bibliográficas

1. PARK, J. ed, (1984). *Biomaterials Science and Engineering*, New York., Plenum Press.
2. WILLIAM, D., F., ed, (1987). *Definitions in Biomaterials*, New York, Elsevier.
- ③ SILVER, F; DOILLON, C. (1989). *Biocompatibility*, Interations and implantable materials, v. 1, VCR, New York.
4. VIIDIK, A.; VUUST, J. (1980) *Biology of collagen*, London, Academic Press, v. 1, p. 313-24.
5. HUC, A. (1985). Collagen biomaterials characteristics and applications. *Am. Leather Chem. Assoc.*, v. 80, p. 195-12.
- ⑥ MARK, J. E.; CALVERT, P. D. (1994). Biomimetic, hybrid and in situ composites, *Materials Science Engineering*, p. 159-174.
- ⑦ CALVERT, P. (1994) Biomimetic mineralization: processes and prospects, *Materials Science Engineering*, p. 69-74.
8. SZYCHER, M. ed. (1983) *Biocompatible Polymers, Metals and Composites*, Lancaster, Technomic.
9. HAM, A. W. *Histologia*. Rio de Janeiro. (1963) Guanabara Koogan.
10. HENCH, L. L., (1991). Bioceramics: From concept to clinic. *J. American Ceramics Society*, v. 74, p. 1487-510.

11. GROOT, K. (1991). *Medical applications of Calcium phosphate bioceramics*.
Biomaterials Research Group, School of Medicine, Leiden University, The Netherlands.
12. SAHA, S. (1989). Ceramics for orthopaedic and dental applications. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, v.8, p. 37-39.
13. AOKI, H. (1991). Science and medical applications of hydroxyapatite, *Japannese Asociacion of Apatite Science*, Tokyo.
14. CHEUNG, H. S.; HAAK, M. H. (1989). Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vitro model for biocompatibility study, *Biomaterials*, v. 10, p. 67-8.
15. BAGAMBISA, F. B.; JOOS U. (1990). Preliminary studies on the phenomenological behaviour of osteoblasts cultured on hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, v. 11, p. 50-6.
16. ALBEE, F. H. (1920). Studies in bone growth triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis, *Ann. Surg.* v. 71, p. 32-6.
17. LEVITT et al. (1969). Forming methods for apatite prosthesis. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 3, p. 683-85.
18. MONROE et al. (1971). New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. *Journal of Dentistry*, v. 50, p. 860-62.
19. NERY, E. B.; LYNCH, K. L.; HIRTHE, W. M.; MUELLER, K. H. (1975) Bioceramics implants surgically produced infrabony defects. *Journal of Periodont.* v. 46, p. 328-39.

20. DAVIES, J. E. (1990) *The bone material interface*, ED., University of Toronto Press.
21. MANN, S.; WEBB, J.; WILLIAMS, R. J. P. ed. (1989) *Biom mineralization: chemical and biochemical perspectives*. Weinheim, VCH.
22. YUBAO, L. et al. (1994) Formation of a bone apatite-like layer on the surface of porous hydroxylapatite ceramics. *Biomaterials*, v. 14, n. 10, p. 835-41.
23. FRAYSSINET, P. et al. (1993) Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*, v. 14, n. 6, p. 423-29.
24. KLEIN, C. P. A. T.; DRIESSEM, A. A.; GROOT, K. (1984). Relationship between the degradation behaviour of calcium phosphate ceramics and their physical-chemical characteristics and ultrastructural geometry. *Biomaterials*, v. 5, p. 157-69.
25. EVANS, E. J. (1991). Toxicity of hydroxyapatite in vitro: The effect of particle size. *Biomaterials*, v. 12, p. 574-6.
26. OHGUSHI, H. et al. (1990). Marrow cell osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: A comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 1563-70.
27. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (1990). *Histologia básica*. 7 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, Cap. 8, p. 101-7.
28. MAYNE, R.; BURGESSON, R. E. (1987). Structure and function of collagen types, London, Academica Press.

29. RAMACHANDRAN, G. N. (1967). *Treatise on collagen*, v.1, London, Academic Press, p. 337-3.
30. FIETZEK, P. P.; KUHN, K. (1975). Informations contained in the amino acid sequence of the $\alpha 1(I)$ -chain of collagen and its consequences upon the formation of the triple helix, of fibrils and crosslinks. *Mol Cell Biochem*, v. 8, p. 141.
31. NIMNI, M. E. (1988). *Collagen*, Florida, CRC, v. 1.
32. SMITH, J. W. (1968). Molecular pattern in native collagen. *Nature*, v. 219, p. 157-63.
33. VEIS, A. (1982). Collagen fibrillogenesis. *Com. Tis. Res.*, v. 10, p. 11.
34. PIEZ, K. A. (1982). Structure and assembly of the native collagen. *Connect. Tissue Res.*, v. 10, p. 25-36.
35. KATO, T. *Collagen fibers for use in medical treatments*. US 4.420339, 1993.
36. GOISSIS, G. e MORIWAKI, C. M. E. Y. (1990). *Processo de solubilização de tecido conjuntivo na presença de dimetilsulfóxido e concentração salina variável*. BR9000972, 02 mar. 1990.
37. CRITESCU, D (1987). Extration of collagen from hides. RO 9190081.
38. ROCHA, J. L. (1996). Efeito da concentração de sais sobre a solubilidade de serosa bovina na presença de dimetilsulfóxido: rendimento e caracterização físico-químico da preparação, p. 61 Dissertação (mestrado) IQSC-USP, São Carlos
39. LACERDA, C. A. (1997). Preparação e caracterização de colágeno aniônico para utilização como biomaterial. Dissertação (mestrado), p. 54. IQSC-USP, São Carlos.

40. DRIESSENS, F. C. M. et al. (1994). Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *J. Mat. Sci. Mat. Medic*, v. 5, p. 164-70.
41. OGUCHI, H. et al. (1995). Long term histological evaluation of hydroxyapatite ceramics in humans. *Biomaterials*, v. 16, p. 33-8.
42. LEGEROS, R. Z. (1988). Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv. Dent. Res.*, v. 2, p. 164-80.
43. VIDEAU, J. J.; DUPUIS, V. (1991). Phosphates and biomaterials. *Eur. J. State Inorg. Chem.*, v. 28, n. 1, p. 303-43.
44. IBERS, J. A.; HAMILTON, W. C. eds. *International Tables for X-ray Crystallography*, v. 1, The Kynoch Press.
45. WHITE, R. A.; SHORS, E. C. (1986). Biomaterial aspects Interpore-200® porous hydroxyapatite. *Dent. Clin. Am.*, v.30, p. 49-67.
46. OSAKA, A. et al. (1991). Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid, *Journal Materials Science*, v. 2, p. 51-5.
47. JARCHO, M. et al. (1976). Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form, *Journal Materials Science*, p. 2027-35.
48. ROVIRA, A. et al. (1993). Preliminary report on a new composite material made of calcium phosphate, elastin peptides and collagens. *Journal Materials Science*, v. 4, p. 372-80.
49. ITO, M. (1991). In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone filling paste. *Biomaterials*, v. 12, p. 41-5.

50. KAZIM, M.; KATOWITZ, J. A.; FALLON, M. (1992). and PIEST, K. L.
Evaluation of a collagen/hydroxylapatite implant for orbital reconstructive surgery. *Ophthal Plast reconstr Surg.*, v. 8, n. 2, p. 94-108.
51. HEMMBERLE, J.; LEIZE, M.; VOEGEL, J. C. (1995). Long term behaviour of a hydroxyapatite/collagen-glycosaminoglycan biomaterial used for oral surgery: a case report. *Journal Materials Science in Medicine*, v. 6, p. 360-6.
52. SERRE, C. M. et al. (1993). In vitro induction of a calcifying matrix biomaterials constituted of collagen and or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison for three types of biomaterials. *Biomaterials*, v. 14, n. 2, p. 97-106.
53. GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M.G.; ROCHA, J.L. *Processo de extração de colágeno com auxílio de solvente orgânico em meio alcalino*, Int.CISCO7K4/12. PI-BR9405043-0A, dezembro 10, 1996.
54. MURPHY, J.; RILEY, J. P. A (1962). modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chimical Acta.*, v. 27, p. 31-6.
55. SILVESTER, M.F.; YANNAS, I.V.; FORBES, M.J. (1989). Collagen bands fibril structure and the collagen platelet reaction. *Thrombus Reaserch*, v.55, p.135-48.
56. PAYNE, K. J., VEIS, A., (1988). FTIRs of collagen and gelatin solution deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers*, v. 27 p.1749-760.
57. FOWLER, B. O. (1994). Infrared studies of apatites: Vibrational Assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. *Inorganic Chemistry*, v. 13, n. 1, p. 194-07.

58. ZHOU, J. et al. High temperature characteristics of synthetic hydroxyapatite. *J. Mat. Med.*, v. 4, p. 83-5, 1993.
59. FERREIRA, J. G. (1996). Geis de colágeno: ransansa. Caracterização e aplicações, p. 102. Tese (doutorado). IQSC-USF, São Carlos.
60. GOISSIS G, MARCANTÔNIO, Jr E.; et al. (1999) Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. *Biomaterials*, v. 20, p. 27-34.
61. YABAO, L. et al. (1994). Formation of bone apatite-like layer on the surface of porous hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, v 15, p. 835-41.
62. SUGAYA, A. et al. (1989). Effects on wound healing of hydroxyapatite-collagen complex implants in periodontal osseous defects in the dog. *Journal of Periodontal* , v. 24, p. 284-8.
63. MURRAY, M.G.S., WANG, J. et al. (1995). An improvement in processing of hydroxyapatite ceramics. *Journal of Materials Science*, v 30, p. 3061-74.
64. GOISSIS G, PICIRILI L, GOES J.C., PLEPIS A.M.G., (1999) Anionic collagen: Polymer composites with improved dielectric and rheological properties. *Artf Organs*, v. 22 p. 215-21.
65. BET, M.R. (1995). Preparação e caracterização de Biocerâmica Composta de colágeno e Sais de Fosfato de Cálcio. Dissertação (mestrado) IQSC-USP, São Carlos