Mauricio Bordini do Amaral

**Citotoxicidade *in vitro* e
biocompatibilidade *in vivo* de
compósitos a base de hidroxiapatita,
colágeno e quitosana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientadora: Profa. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

**SÃO CARLOS
2006**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos. Em especial aos laboratórios de Bioquímica e de Cultura Celular do IQSC-USP, laboratório de Oncopatologia da FMRP-USP, laboratório da Bioengenharia de São Carlos-USP e Secretaria de Pós-Graduação do Programa.

Ao fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Atenciosamente agradeço a orientação da Prof.^a Ana Plepis.

Muito obrigado a minha esposa Aline pelo companheirismo, minha mãe Vera Lúcia e meu pai Joaquim pela dedicação e ensinamentos.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e, em especial, a proteção de Deus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
	1.1. Biomateriais.....	13
	1.2. Osso.....	21
	1.3. Hidroxiapatita.....	24
	1.4. Colágeno.....	27
	1.5. Quitosana.....	32
	1.6. Testes de biocompatibilidade.....	38
2	OBJETIVOS.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
	3.1. Material.....	42
	3.1.1. Hidroxiapatita (HA).....	42
	3.1.2. Gel de colágeno.....	43
	3.1.3. Quitosana.....	43
	3.1.4. Mantas ósseas.....	44
	3.2. Avaliação biológica.....	44
	3.2.1. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	44
	3.2.1.1. Método de difusão em ágar.....	45
	3.2.1.2. Método difusão de extrato em solução.....	47
	3.2.2. Biocompatibilidade <i>in vivo</i>	49
	3.2.2.1. Preparo dos animais e procedimento de implantação.....	49
	3.2.2.2. Biópsias e processamento histológico.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
	4.1. Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	57
	4.1.1. Método de difusão em ágar.....	57
	4.1.2. Método de difusão de extrato em solução.....	60
	4.2. Biocompatibilidade <i>in vivo</i>	63
5	CONCLUSÃO.....	81
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
	ANEXO A.....	89

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do osso longo.....	22
Figura 2: Representação esquemática da estrutura do tropocolágeno e da microfibrila.....	29
Figura 3: Hidrólise alcalina dos grupos carboxamidas dos resíduos de Asn e Gln..	30
Figura 4: Número de publicações científicas sobre quitina e quitosana obtidas a partir do Sciencedirect®	33
Figura 5: Representação esquemática da quitina e quitosana.....	34
Figura 6: Fotomicroscopia (aumento de 200x) da linhagem celular VERO (CCL-81 ATCC-USA).....	46
Figura 7: Manipulação das culturas celulares dentro da capela de fluxo laminar....	46
Figura 8: Retirada do meio de cultura.....	46
Figura 9: Colocação de meio de cultura com corante vermelho neutro.....	46
Figura 10: Colocação dos biomateriais.....	46
Figura 11: Microscopia de fluorescência de linhagem celular não tumoral (VERO).....	47
Figura 12: Microscopia de fluorescência de linhagem celular tumoral (HEp).....	47
Figura 13: Diagrama esquemático do ensaio citotóxico.....	49
Figura 14: Tricotomia da região dorsal.....	50
Figura 15: Assepsia da área cirúrgica com PvPi.....	50
Figura 16: Campo operatório.....	51
Figura 17: Incisão e exposição do tecido subcutâneo.....	51
Figura 18: Espaço subcutâneo divulsionado para colocação do biomaterial.....	51
Figura 19: Colocação do biomaterial.....	52
Figura 20: Sutura e assepsia pós-operatória.....	52
Figura 21: Tecido fixado ao isopor com alfinetes.....	53
Figura 22: Avaliação macroscópica do biomaterial B1 após 24h.....	58
Figura 23: Avaliação macroscópica do biomaterial B2 após 24h.....	58
Figura 24: Avaliação macroscópica do biomaterial B3 após 24h.....	58
Figura 25: Microscopia do biomaterial B1 (200x).....	58
Figura 26: Foto microscopia do biomaterial B2 (200x).....	59
Figura 27: Foto microscopia do biomaterial B3 (200x).....	59
Figura 28: Avaliação macroscópica do controle negativo.....	59
Figura 29: Foto microscopia do Controle negativo (200x).....	59
Figura 30: Avaliação macroscópica do controle positivo.....	59
Figura 31: Foto microscopia do controle positivo (200x).....	59
Figura 32: Ensaio citotóxico com linhagem celular HEp.....	61
Figura 33: Ensaio citotóxico com linhagem celular VERO.....	62
Figura 34: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 50x.....	63
Figura 35: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 50x.....	63
Figura 36: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 50x.....	63
Figura 37: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 50x.....	63
Figura 38: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 50x.....	63
Figura 39: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 50x.....	63
Figura 40: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 100x.....	64
Figura 41: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 100x.....	64
Figura 42: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 100x.....	64
Figura 43: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 100x.....	64
Figura 44: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 100x.....	64

Figura 45: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 100x.....	64
Figura 46: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 200x.....	65
Figura 47: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 200x.....	65
Figura 48: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 200x.....	65
Figura 49: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 200x.....	65
Figura 50: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 200x.....	65
Figura 51: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 200x.....	65
Figura 52: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 500x.....	66
Figura 53: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 500x.....	66
Figura 54: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 500x.....	66
Figura 55: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 500x.....	66
Figura 56: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 500x.....	66
Figura 57: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 500x.....	66
Figura 58: Biomaterial 1 (3dias). Aumento: 50x.....	67
Figura 59: Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 50x.....	67
Figura 60: Biomaterial 1 (28 dias). Aumento: 50x.....	67
Figura 61: Biomaterial 1 (3dias). Aumento: 100x.....	67
Figura 62: Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 100x.....	67
Figura 63: Biomaterial 1 (28 dias). Aumento: 100x.....	67
Figura 64: Biomaterial 1 (3dias). Aumento: 200x.....	68
Figura 65: Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 200x.....	68
Figura 66: Biomaterial 1 (28 dias). Aumento: 200x.....	68
Figura 67: Biomaterial 1 (3dias). Aumento: 500x.....	68
Figura 68: Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 500x.....	68
Figura 69: Biomaterial 1 (28 dias). Aumento: 500x.....	68
Figura 70: Biomaterial 2 (3dias). Aumento: 50x.....	69
Figura 71: Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 50x.....	69
Figura 72: Biomaterial 2 (28 dias). Aumento: 50x.....	69
Figura 73: Biomaterial 2 (3dias). Aumento: 100x.....	69
Figura 74: Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 100x.....	69
Figura 75: Biomaterial 2 (28 dias). Aumento: 100x.....	69
Figura 76: Biomaterial 2 (3dias). Aumento: 200x.....	70
Figura 77: Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 200x.....	70
Figura 78: Biomaterial 2 (28 dias). Aumento: 200x.....	70
Figura 79: Biomaterial 2 (3dias). Aumento: 500x.....	70
Figura 80: Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 500x.....	70
Figura 81: Biomaterial 2 (28 dias). Aumento: 500x.....	70
Figura 82: Biomaterial 3 (3dias). Aumento: 50x.....	71
Figura 83: Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 50x.....	71
Figura 84: Biomaterial 3 (28 dias). Aumento: 50x.....	71
Figura 85: Biomaterial 3 (3dias). Aumento: 100x.....	71
Figura 86: Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 100x.....	71
Figura 87: Biomaterial 3 (28 dias). Aumento: 100x.....	71
Figura 88: Biomaterial 3 (3dias). Aumento: 200x.....	72
Figura 89: Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 200x.....	72
Figura 90: Biomaterial 3 (28 dias).Aumento: 200x.....	72
Figura 91: Biomaterial 3 (3dias). Aumento: 500x.....	72
Figura 92: Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 500x.....	72
Figura 93: Biomaterial 3 (28 dias). Aumento: 500x.....	72
Figura 94: Imuno controle s/ biomaterial (7dias). Aumento: 100x.....	73

Figura 95: Imuno controle s/ biomaterial (7dias). Aumento: 200x.....	73
Figura 96: Imuno controle s/ biomaterial (7 dias). Aumento: 500x.....	73
Figura 97: Controle sem biomaterial (28dias). Aumento: 100x.....	73
Figura 98: Controle sem biomaterial (28dias). Aumento: 200x.....	73
Figura 99: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 500x.....	73
Figura 100: Imuno Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 100x.....	74
Figura 101: Imuno Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 200x.....	74
Figura 102: Imuno Biomaterial 1 (7 dias). Aumento: 500x.....	74
Figura 103: Imuno Biomaterial 1 (28dias). Aumento: 100x.....	74
Figura 104: Imuno Biomaterial 1 (28dias). Aumento: 200x.....	74
Figura 105: Imuno Biomaterial 1 (28 dias). Aumento: 500x.....	74
Figura 106: Imuno Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 100x.....	75
Figura 107: Imuno Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 200x.....	75
Figura 108: Imuno Biomaterial 2 (7 dias). Aumento: 500x.....	75
Figura 109: Imuno Biomaterial 2 (28dias). Aumento: 100x.....	75
Figura 110: Imuno Biomaterial 2 (28dias). Aumento: 200x.....	75
Figura 111: Imuno Biomaterial 2 (28 dias). Aumento: 500x.....	75
Figura 112: Imuno Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 100x.....	76
Figura 113: Imuno Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 200x.....	76
Figura 114: Imuno Biomaterial 3 (7 dias). Aumento: 500x.....	76
Figura 115: Imuno Biomaterial 3 (28dias). Aumento: 100x.....	76
Figura 116: Imuno Biomaterial 3 (28dias). Aumento: 200x.....	76
Figura 117: Imuno Biomaterial 3 (28 dias). Aumento: 500x.....	76
Figura 118: Espectro de difração de Raios-X de HAn.....	89
Figura 119: Espectro FT-IR de HAn.....	90
Figura 120: Curva termogravimétrica de HAn e sua respectiva derivada.....	91
Figura 121: Espectro FT-IR do colágeno.....	92
Figura 122: Curva termogravimétrica de colágeno e sua respectiva derivada.....	93
Figura 123: DSC do colágeno.....	93
Figura 124: Espectro FT-IR de quitosana.....	94
Figura 125: Curva termogravimétrica de quitosana e sua respectiva derivada.....	95
Figura 126: Curvas termogravimétricas das mantas 1 e 2 e suas respectivas derivadas.....	96
Figura 127: Espectro FT-IR da manta 2, colágeno e HAn.....	97
Figura 128: Espectro FT-IR da manta 1 e quitosana.....	97
Figura 129: Fotomicrografias obtidas por MEV para as mantas: 2(A) e 1(B).....	98

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Medida do halo de inibição celular.....**57**

Tabela 2 - Resultados da avaliação da resposta tecidual.....**77**

Tabela 3 - Valores de d para HAn obtida comparado com HA padrão.....**90**

Lista de abreviaturas ou siglas

Arg - Arginina

Asn - Asparagina

Asp - Ácido Aspártico

B1 - Biomaterial 1

B2 - Biomaterial 2

B3 - Biomaterial 3

BMP - Proteína óssea morfogenética

β -TGF - Fatores de crescimento e transformação

Col - Colágeno

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

Gly - Glicina

Gln - Glutamina

Glu - Ácido Glutâmico

HA - Hidroxiapatita

HAn - Hidroxiapatita natural

ISO - International Organization for Standardization

IV - Espectroscopia de absorção no infravermelho

MEC - Matriz extra-celular

MEM - Meio de mínimo de Eagle

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MOD - Matriz óssea desmineralizada

MTT - (4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio

PBS - Tampão fosfato salino (phosphate buffer saline)

PMN - Polimorfonucleares

PvPi - Iodo Povidine

Qui - Quitosana

SFB - Soro fetal bovino

TCP - Fosfato tricálcio

TG - Termogravimetria

RESUMO

Amaral, M. B. (2006). Citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade *in vivo* de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

Na engenharia de tecidos os biomateriais são usados tanto para induzir a formação óssea no tecido adjacente quanto agir como matriz temporária de células e outros agentes. Compósitos biodegradáveis a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana foram preparados como arcabouços para permitir a regeneração óssea. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade celular *in vitro* de novos compósitos de substituição óssea e o seu comportamento biológico após implantação subcutânea no processo de remodelação e cicatrização tecidual. Foram confeccionadas mantas a base de hidroxiapatita (HA), obtida por desproteinização e calcinação do osso bovino, colágeno (Col), obtido por tratamento alcalino do tendão bovino e quitosana (Qui), extraída do gládio de lula, nas seguintes proporções: B1) HA (mistura de partículas <0,2mm e entre 0,2 e 1,18mm, proporção 1:1) + Blenda (Col 1% + Qui 0,5%, proporção 1:1), proporção HA:Blenda 1:5; B2) HA (mistura de partículas <0,2mm e entre 0,2 e 1,18mm, na proporção 1:1) + Col 1%, proporção HA:Col 1:5; B3) HA (partículas <0,2mm) + Col 1%, na proporção 1:5. O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado pelo método de difusão de extrato em solução (brometo de tetrazolio - MTT). Os biomateriais descritos acima foram avaliados juntamente com o controle positivo (látex), sendo que todos foram submetidos a procedimentos de extração de acordo as normas da ISO10993-5. O meio de cultura foi utilizado como controle negativo. Foram

utilizadas duas linhagens celulares: células tumorais de laringe humana HEp (ATCC-CCL-23) e células normais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) VERO (n=3). A citotoxicidade foi avaliada em um espectrofotômetro (absorbância de 570nm). No teste de biocompatibilidade as amostras foram implantadas no subcutâneo da região dorsal de 51 ratos Wistar. Histomorfometria de espessura e qualidade da cápsula fibrosa, interface implante-tecido, infiltrado inflamatório e crescimento celular interno foram realizados aos 3, 7 e 28 dias após cirurgia (n=5). Imunohistoquímica foi realizada para caracterizações adicionais do infiltrado de macrófagos. No teste de citotoxicidade as linhagens celulares mostraram resultados semelhantes. Não houve diferença entre os compósitos e o controle negativo. Foi demonstrado que os compósitos avaliados não apresentaram efeitos tóxicos em comparação ao controle positivo. No teste subcutâneo a qualidade e a espessura da cápsula não apresentaram diferenças significantes entre os biomateriais e os períodos de implantação. A resposta celular inflamatória aos 7 dias foi mais intensa no biomaterial B1, seguido pelo biomaterial B2 e B3. Uma baixa reação de corpo estranho foi observada em todos os biomateriais, caracterizada pela presença de poucos macrófagos. Ocorreu um intenso crescimento celular no interior do biomaterial B3 aos 28 dias. A análise histológica sugere que esses biomateriais são bem tolerados com baixa reação tecidual inflamatória. Concluímos que os três biomateriais avaliados não apresentaram evidências de citotoxicidade *in vitro* e, *in vivo*, mostraram uma boa biocompatibilidade. Esses materiais mostraram-se bons candidatos a matrizes para engenharia de tecidos e enxertos para regeneração óssea.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Colágeno, Quitosana, Citotoxicidade *in vitro*, Biocompatibilidade *in vivo*.

ABSTRACT

Amaral, M. B. (2006). *In Vitro* Cytotoxicity and Subcutaneous Biocompatibility Evaluation of Hydroxyapatite/ Collagen/ Chitosan Composites. Dissertation - Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

The biodegradable hydroxyapatite/ chitosan/ collagen composites of similar composition of the normal human bone were prepared as a biomimetic scaffold for bone replacement and regeneration. The aim of the present study was to evaluate the in vitro cytotoxicity of three new bone grafts and the influence of these synthetic grafts on the inflammatory response and remodeling of connective tissue during wound-healing process. Three biomaterials were developed: B1= hydroxyapatite (particles size <0,2mm + between 0,2 and 1,18mm)/ collagen 1%/ chitosan 0.5%; B2= hydroxyapatite (particles size <0,2mm + between 0,2 and 1,18mm)/ collagen 1% and B3= hydroxyapatite (particles size <0,2mm)/ collagen 1%. These biomaterials were investigated using a tetrazolium-based calorimetric assay (MTT assay). Latex was used as positive control and the culture medium as a negative control. Two cell lines were used to evaluate the effect of cell type on the toxicity results: human tumor cells HEp-2 (ATCC-CCL23) and monkey normal cells (VERO). Extracts from the biomaterials were obtained according to ISO 10993-12 standards. The cytotoxicity was assessed in a spectrophotometer (the absorbance was read at 570nm). There were two independent experiments in triplicates. All values were expressed as mean values $\pm$ standard deviation. In the biocompatibility test the samples were implanted subcutaneously in the dorsal lumbar region of 51 Wistar rats. Histomorphometric evaluation of capsule thickness, capsule quality, implant-tissue interface, infiltrate/

inflammation and cellular growth within implant was performed 3, 7 and 28 days post-operatively (n=5). Immunohistochemistry was performed for further characterization of the macrophages infiltrate. In cytotoxicity test the cell lines showed similar results. There is no difference in values between the composites and negative control. The values of composites were significant different than the positive control. It was showed that none of the tested composites presents toxic effects for the cell lines evaluated in comparison with positive control. In the subcutaneous test the capsule thickness and capsule quality didn't show significant differences between the biomaterials and time of implantation. The biomaterial B1 showed significant difference in inflammatory cellular response than B2 and B3 at 7 days. A low ongoing foreign body reaction was observed in all biomaterials characterized by infiltration of few macrophages. A significant cellular growth within the B3 was observed at 28 days. Histological analysis suggested that the biomaterials were well tolerated with low inflammatory response. According to this study, the three bone grafts evaluated showed no evidence of cytotoxicity and good biocompatibility which makes them suitable candidates to design of bone replacement graft material.

Keywords: Hydroxyapatite, Collagen, Chitosan, *In vitro* cytotoxicity, Subcutaneous implant test.

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOMATERIAIS

Biomaterial compreende uma substância pura ou composta, de natureza sintética ou natural, que pode ser utilizada temporária ou definitivamente, com finalidade de melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou totalmente, tecido ou órgãos (WILLIAM, 1987). O critério para escolha de um biomaterial passou a ser feito de acordo com a similaridade química e física deste, em relação ao tecido a ser substituído (OGAWA, 2002).

Há muitas razões clínicas para o desenvolvimento dos biomateriais, principalmente quando se trata de tecido ósseo onde se tem, por exemplo, que obter preenchimento de defeitos ósseos extensos (BURG et al, 2000), desenvolvimento de implantes que serão submetidos a forças mecânicas com finalidade ortopédica (ITOH et al, 2002), odontológica (TAYLOR et al, 2002) e bucomaxilofacial (GABRIELLI et al, 2001). Com o avanço da ciência houve o desenvolvimento, desde sua fabricação, até o entendimento das respostas celulares obtidas (OGAWA, 2002). Contudo, hoje, biomateriais não se destinam apenas a preencher espaço, mas também devem estimular uma resposta biológica específica em função das propriedades, como distribuição eletrônica, conformação molecular, estado de agregação e outras propriedades físico-químicas específicas (LANGER, VACANTI, 1993).

Os biomateriais devem seguir alguns requisitos básicos para seu emprego, como: não causar danos locais ou sistêmicos, isto é, não devem ser tóxicos, carcinogênicos ou radioativos. A biocompatibilidade é outro fator de suma importância para o sucesso dos implantes e pode ser definida da seguinte forma: um material é biocompatível quando provoca no organismo reações desejadas, controladas e toleradas fisiologicamente (SPIEKERMANN et al, 1995). Também devem exibir compatibilidade mecânica semelhante, ou melhor, que o material substituído (ASCENZI, BASCHIERI, BENVENUTI, 1994).

Os biomateriais podem ser classificados em relação a sua origem, como:

Autógenos (provenientes do próprio organismo): Sua principal vantagem é a possibilidade da manutenção da viabilidade celular (GOLDBERG, STEVENSON, 1987), que depende da rápida revascularização do enxerto e da espessura do mesmo (KUSIAK, ZINS, WHITAKER, 1985). As desvantagens são: dificuldades de se obter material suficiente para o preenchimento total do defeito (MARX, 1992), possibilidade de danos ao leito doador (MISCH, 1996), inconveniência do ato cirúrgico na área doadora, necessidade de anestesia geral, maior risco de infecção, hematomas, maior período de convalescença e maior custo (TAGA, 1996).

Alógenos (provenientes de outros indivíduos da mesma espécie): Pode ser obtido em cadáveres, processado e armazenado em bancos de ossos (BUCK et al, 1994). Suas principais desvantagens são as infecções virais, bacterianas e fúngicas que podem ser transmitidas (KAYAIGA, MILLER, GUDINO, 1991).

Xenógenos (provenientes de indivíduos de outra espécie). Têm sido amplamente empregados em substituição ao osso autógeno em regeneração óssea guiada (YOUNG, 1999), na cirurgia bucomaxilofacial (MERKX et al, 1999), em cirurgias cardíacas de tecidos moles (LANGDON et al, 1999) e em cirurgias

ortopédicas na reconstituição de tendões (JOHNSON et al, 1999). Esses materiais podem ser de origem bovina e até de corais (OLIVEIRA et al, 1999).

- *Aloplásticos* (substâncias sintéticas fabricadas em laboratórios). São biomateriais exclusivamente sintéticos e biocompatíveis. Estão disponíveis no mercado em grande variedade de texturas, tamanhos, formas e composição (BEZERRA, 2002). As cerâmicas bioativas compõem a maior família dos aloplastos. Entre eles estão incluídos: Fosfato Tricálcio (TCP), hidroxiapatita; sulfato de cálcio, carbonato de cálcio; polímeros a base de hidróxido de cálcio; cerâmicas de vidro bioativo (NAGAHARA et al, 1992).

Os materiais de enxerto podem atuar através de três mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. A osteogênese refere-se a materiais orgânicos capazes de formar osso diretamente a partir de osteoblastos (MARX, SAUDERS, 1986). O material osteoindutor é capaz de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, aumentando o crescimento ósseo ou até mesmo formar osso onde não era esperado (URIST, 1965). A osteocondução caracteriza um material que permite a aposição de novo tecido ósseo, a partir de um osso pré-existente, funcionando como um arcabouço para as células osteoprogenitoras fixarem-se (MASTERS, 1988).

Geralmente é aceito que biocerâmicas de fosfato de cálcio natural e sintético são osteocondutivas (têm a habilidade de servir de arcabouço para o crescimento e formação óssea), mas não osteoindutivas (habilidade de formar osso quando implantadas em locais não ósseos). As aplicações ortopédicas e odontológicas das biocerâmicas de fosfato de cálcio são: reparos de defeitos ósseos, reparo de defeitos periodontais, aumento de rebordo alveolar, implantes auriculares e oftalmológicos, reconstrução maxilofacial, fusão espinhal,

preenchimento de espaço ósseo, cimentos ósseos, compósitos e recobrimento de implantes. Enxertos ósseos são geralmente utilizados em cirurgia em defeitos de diáfise, não união, preenchimento de defeito metáfise e reconstrução mandibular, que é um dos maiores desafios da ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial. Defeitos ósseos extensos devido a traumas, tumores, remodelação periprotética, osteólise induzida e infecções representam um desafio clínico comum para o qual existem opções terapêuticas limitadas.

Numerosos trabalhos científicos têm buscado materiais que promovam a cicatrização e união óssea, no sentido de escolha da fonte e do enxerto ósseo, carga local exigida, biomecânica, métodos de fixação e fatores inerentes ao paciente (idade, condição de saúde sistêmica, tabagismo, etc.) e também em relação às condições socioeconômicas.

Enxerto ósseo autógeno pode ser osteogênico (capacidade de formar osso), osteocondutivo e osteoindutivo. Não há substituto ideal para o enxerto autógeno, apenas algumas alternativas sintéticas e/ou naturais. Enquanto o enxerto autógeno permanece como “padrão ouro”, podem ocorrer muitas situações em que o osso apresenta-se em quantidade limitada e qualidade inapropriada. A retirada do enxerto autógeno leva ao aumento da morbidade, tempo cirúrgico e perda de sangue; o que acaba sendo uma desvantagem clínica significativa.

Enxerto alógeno tem sido usado como uma alternativa, mas ele apresenta baixa ou nenhuma capacidade osteogênica (formação de um novo osso a partir de células provenientes do enxerto), imunogenicidade aumentada e taxa de reabsorção maior que o autógeno. Na prática clínica, apesar dos enxertos alógenos frescos apresentarem uma resposta imune desfavorável e riscos de transmissão de doenças, eles ainda são utilizados como enxertos ósseos.

O enxerto alógeno congelado e o congelado-seco são osteocondutivos, porém fracamente osteoindutivo. O processo de liofilização diminui a resistência estrutural, o que o impede de ser utilizado em situações em que esforços são requeridos. Enxertos alógenos em blocos podem ser utilizados para o tratamento de defeitos ósseos segmentados. A sua incorporação biológica é um processo lento e incompleto. Seu uso é relatado em reconstruções seguidas de retirada de tumores, entretanto não é comum após trauma, quando o alongamento é necessário (ENNEKING, W.F. & MINDEL, E.R., 1991).

Matriz óssea desmineralizada (MOD) foi primeiramente utilizada em 1965 para a indução óssea heterotópica. Dentre os componentes ativos da MOD há uma série de glicoproteínas que pertencem a um grupo da família dos fatores de crescimento e de transformação (TGF- β). Os membros dessa família são responsáveis pelos eventos morfogênicos envolvidos no desenvolvimento de tecidos e órgãos. Essas proteínas, obtidas a partir da matriz óssea, foram chamadas de proteínas morfogênicas ósseas (BMPs). A MOD é utilizada no tratamento de fraturas não unidas, porém não é hábil para suportar cargas.

Colágeno bovino misturado com hidroxiapatita é considerado como um bom substituto ósseo, que pode ser combinado com o osso medular aspirado do local da fratura. Nenhuma transmissão de doença foi relatada por esse método, porém seu uso ainda encontra algumas restrições devido ao desconhecimento e medo. Esse tipo de enxerto é osteogênico, devido à presença do osso autógeno, osteoindutivo e osteocondutivo, porém não apresenta resistência estrutural alta.

Atualmente a engenharia de tecidos busca o desenvolvimento de um biomaterial que tenha composição, nano estrutura e resposta biológica semelhante ao tecido ósseo natural (KIKUCHI et al, 2001). Também deve apresentar

características semelhantes ao osso como: forma, tamanho, topografia, rugosidade, propriedades biomecânicas e bioquímicas (PULEO, NANJI, 1999).

Muitos compostos a base de hidroxiapatita e colágeno foram desenvolvidos com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas (ITOH et al, 2002). Mehlisch et al (1990) implantaram uma mistura de partículas de hidroxiapatita e colágeno e reportaram boa biocompatibilidade. Miyamoto et al (1998) prepararam cimento de hidroxiapatita reforçado com colágeno indicando alta biocompatibilidade e uma melhora das propriedades mecânicas. Tenhuisen et al (1995) prepararam nano compósitos de hidroxiapatita/colágeno usando a cristalização da hidroxiapatita na fibra de colágeno, através da reação de ácido-base com CaHPO_4 . Entretanto, nenhum compósito de hidroxiapatita/colágeno demonstrou nano estrutura bastante semelhante ao osso, pois o osso apresenta o eixo-c da hidroxiapatita regularmente alinhado ao longo das fibras de colágeno (SASAKI, SUDOH, 1997).

Em função dessas dificuldades de se obter um material sintético semelhante ao osso natural e o alto custo na sua fabricação, tem-se usado enxertos xenógenos, normalmente de origem bovina, que apresentam características ultra-estruturais semelhantes ao osso natural quando analisados na microscopia eletrônica de transmissão (ROSEN, HOBBS, SPECTOR, 2002).

Uma série de materiais de origem sintética tem sido utilizada na área de engenharia de tecidos, como por exemplo, os polímeros e copolímeros obtidos a partir do ácido lático e glicólico. A grande desvantagem da utilização de polímeros de origem sintética é o desencadeamento de respostas inflamatórias e também a falta de sinais de reconhecimento celular. Estes problemas podem ser resolvidos pela utilização de polímeros extraídos de fontes naturais, como, por exemplo, o colágeno

e a hidroxiapatita natural, sendo que o colágeno já possui em sua estrutura primária sítios de reconhecimento celular, como a sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD - Rat Genome Database).

Compósitos de hidroxiapatita não-estequiométrica com colágeno polianiónico na forma de pasta mostraram uma baixa irritabilidade tecidual, permitindo assim a evolução reparadora do tecido ósseo. 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, 1998).

Muitos compósitos a base de hidroxiapatita e colágeno foram desenvolvidos com o intuito de melhorar suas propriedades mecânicas e biológicas. Tem-se mostrado também que o osso bovino inorgânico apresenta um terço da resistência à compressão em relação ao osso fresco, provavelmente devido às diferenças físico-químicas, processos de esterilização como radiação gama, apresentação macroscópica, ou seja, na forma de bloco ou fragmentos, entre outros fatores.

As biocerâmicas são consideradas biomateriais biocompatíveis, duras e claras com propriedades de tração pobres, porém com excelente força de compressão, alta resistência ao carregamento e baixas propriedades friccionais. A baixa resistência friccional é aumentada pelo fato das cerâmicas serem hidrofílicas e poderem ser bem polidas, o que promove uma capacidade da superfície receber cargas de outros materiais ou do próprio organismo (BEN-NISSAN, B., 2003).

Enquanto materiais sintéticos são amplamente utilizados no campo médico com sucesso, materiais estruturais naturais ainda enfrentam grande dificuldade de aceitação, porém, podem ser uma abundante fonte com novas

aplicações biomédicas. Biocerâmicas naturais, como esqueletos animais (hidroxiapatita e carbonato de cálcio) são conhecidos por apresentarem um arcabouço que pode prover um suporte físico que viabiliza a manutenção de várias funções do tecido. Durante as últimas décadas, o aumento no entendimento da biomineralização tem estimulado a melhoria dos métodos biomiméticos e o desenvolvimento de uma nova geração de biomateriais. Reações interfaciais ocorridas em monocamadas surfactantes e polímeros revelaram uma grande analogia com o processo de biomineralização natural (TANG, Z. et al., 2003).

Quando um material sintético é colocado no corpo humano, o tecido reage frente ao implante de várias formas dependendo do tipo de material, principalmente a característica superficial, e da carga funcional aplicada. No geral três termos descrevem ou classificam um biomaterial com respeito à reação tecidual: bioinerte, bioreabsorvível/ biodegradável e bioativo. Quando se diz que o material é inerte ou bioinerte significa que o material não apresenta reação com os tecidos vizinhos, porém essa definição parece ser errônea, pois os tecidos adjacentes ao implante sempre apresentarão uma resposta frente ao biomaterial, por menor que essa possa parecer. Desta forma, podemos classificar algumas reações teciduais características: biodegradação, que é uma diminuição gradual do material mediada por atividade biológica ou bioquímica específicas; bioreabsorção, que é um processo de remoção do material mediada por atividade celular, diretamente por fagocitose ou indiretamente por ação enzimática e/ou através de dissolução por difusão iônica contínua do material quando colocado em meios biológicos; bioatividade, que é o comportamento do material bioativo capaz de induzir uma reação biológica específica, podendo se integrar intimamente com o tecido ósseo (RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A., 1992; HENCH, L.L., 1991).

A síntese de formas inorgânicas complexas, as quais são baseadas na estrutura natural mimética ao arcabouço ósseo, onde as células são semeadas, oferece um amplo e excitante caminho para a construção de uma nova geração de substitutos ósseos para a engenharia de tecidos. O osso contém macro e micro poros que são interconectados para permitir o transporte de fluidos e nutrientes para as células. Muitos tentaram mimetizar essa estrutura óssea única, porém é quase impossível copiá-la perfeitamente. Vários aspectos devem ser considerados na produção de materiais sintéticos ósseos, como, propriedades físico-químicas, morfologia, estrutura, tipo e volume dos poros, estado da interface e taxa de degradação (BEN-NISSAN, B., 2003).

1.2- OSSO

A atividade anabólica do osso (formação) é mediada pelos osteoblastos, que derivam das células-tronco do tecido conjuntivo, as quais são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos do osso (fibras colágenas e mucopolissacarídeos) e, conseqüentemente, pela calcificação da matriz osteóide. A atividade catabólica (reabsorção) é mediada pelos osteoclastos, que são células gigantes multinucleadas da linhagem dos macrófagos - derivadas de monócitos circulantes - e que possuem grande número de enzimas. Os osteócitos são conhecidos como moduladores da atividade celular, já que modulam a atividade óssea através da transmissão de impulsos mecânicos, elétricos e hormonais.

O osso é um tecido extremamente complexo, com três componentes principais: matriz orgânica, componente mineral e componente celular (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) (SODEK et al, 2000). Este tecido de sustentação está em constante remodelação, através de um processo de desmineralização e remineralização, os quais são mediados basicamente pelos osteoblastos e os osteoclastos.

O esqueleto é composto por dois tipos de ossos: o cortical e o trabecular. O osso cortical é responsável por 80% da massa esquelética, está presente nas epífises dos ossos longos e é encontrado como revestimento de todos os ossos do organismo (Figura 1). É formado por séries de estruturas que estão muito próximas, chamadas osteons. O arranjo desse tipo de osso torna-o efetivamente resistente a curvaturas.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do osso longo.

O osso trabecular constitui cerca de 20% da massa esquelética e é encontrado nos corpos vertebrais, nas epífises dos ossos longos e nos ossos chatos. Na sua superfície o número de células por unidade de volume é maior do

que no osso cortical, o que determina sua maior atividade metabólica. É formado por uma rede de trabéculas interconectadas, que lhe confere maior resistência à compressão. Tem relação superfície/volume consideravelmente maior do que a do osso cortical e, mesmo que contribua com apenas 20% na formação do esqueleto, possui cerca de 80% da superfície disponível - local onde ocorre a remodelação. O processo metabólico varia bastante entre sítios compostos por esse mesmo tipo de osso. Assim, o osso trabecular do corpo vertebral tem maior índice de remodelação do que o fêmur ou o rádio.

Microscopicamente, os ossos são formados por nanocristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tamanho dos cristais é de 20-40nm no eixo-c) de cálcio e fibras de colágeno (uma molécula de colágeno tem aproximadamente 300nm de comprimento), com o eixo c de cada hidroxiapatita regularmente alinhada ao longo da fibra de colágeno, as quais estão embebidas em uma substância amorfa que contém mucopolissacarídeos (proteoglicanos: condroitinos sulfato e ácido hialorônico, cuja função está relacionada à deposição de sais de cálcio) (RIEGGER, 1993). Atualmente sabe-se que a HA óssea pode ser descrita como carbonato hidroxiapatita (CHA), cuja fórmula aproximada é a seguinte: $(\text{Ca,Mg,Na})_{10}(\text{PO}_4,\text{CO}_2)_6(\text{OH})_2$ (LEGEROS, R.Z., 1988).

1.3- HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HA) faz parte de um grupo de minerais chamados apatitas e possui a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sendo caracterizada pela baixa solubilidade em sistemas aquosos ($\text{pKs} = 147$), e bastante solúvel em soluções de ácidos halogenídricos (VIDEAU, J.J. & DUPUIS, V, 1991; BET, M.R., 1995).

A hidroxiapatita pode ser obtida por desproteinização do tecido ósseo (PARK, J., 1984) ou por tratamento hidrotérmico de corais (WHITE, R. A. & SHORS, E. C., 1986). Pode ser obtida também por processos sintéticos tais como, precipitação a partir de soluções aquosas ou reações de estado sólido (OSAKA, A., 1991) No processo sintético através da precipitação em soluções aquosas 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 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. A HA obtida por este método pode conter quantidades diferentes de H^+ e OH^- e também ocorrer a substituição do íon Cálcio por íons estranhos presentes nas soluções aquosas. No método de reação no estado sólido a HA é preparada por um tratamento térmico ($900 - 1300^\circ\text{C}$ por 1 a 24 horas) de uma mistura estequiométrica de fosfato tricálcio (β -TCP) ou $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ com CaCO_3 ou DCPD com CaO na presença de pressão de vapor. Métodos convencionais em solução incluem a mistura de soluções aquosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sob condições alcalinas.

A preparação da HA utilizando-se do ácido fosfórico e hidróxido de Cálcio não é viável do ponto de vista de biomateriais, pois suas propriedades físicas e químicas não são reprodutíveis em função da baixíssima solubilidade do hidróxido de Cálcio (OSAKA, A., 1991). Os problemas que ocorrem durante a síntese devem-se a parâmetros como temperatura, agitação e umidade no processo de calcinação, obtendo-se HA com relação Cálcio e fósforo variando entre 1,5-1,67:

Defeitos e doenças do tecido ósseo como, osteoporose, osteoartrite e má formação são apenas alguns de muitos problemas que acometem o tecido e para serem regenerados dependem dos biomateriais. Biomateriais sintéticos para o reparo tecidual apresentam-se em íntimo contato físico e biológico com os tecidos vivos, necessitando dessa forma manterem uma ligação efetiva com o tecido hospedeiro. Cerâmicas bioativas como Bioglass™, fosfato β-tricálcio sinterizado, cerâmicas vítreas e hidroxiapatita sinterizada (HA) são os únicos materiais que levam a uma integração entre tecido e material *in situ* (HENCH, L.L., 1991; KOKUBO, T; KIM, H.M.; KAWASHITA, M., 2003).

A hidroxiapatita densa, porosa, particulada e de revestimento tem sido um importante biomaterial de reparo e preenchimento de tecido duro, tendo sido reportada com sucesso em numerosos casos clínicos nas três últimas décadas (KIM, H.M., 2001). De fato, na clínica, observamos que as aplicações da HA direcionam as pesquisas ao desenvolvimento de novos compostos com características físico-químicas mais adequadas no sentido de suportar cargas funcionais e desempenhar uma resposta biológica controlada (HENCH, L.L., 1998).

Através dos avanços na aplicação clínica da HA existiram muitos estudos que se focaram na análise química superficial *in vitro* e *in vivo*, o que tem inspirado

estratégias de mudanças para o desenvolvimento de novos biomateriais bioativos com melhores propriedades físicas, químicas e biológicas. Entre as estratégias mais inovadoras estão os processos biomiméticos e modeladores acelulares livres de proteínas que imitam o mecanismo de biomineralização de nano cristais de fosfato de Cálcio sobre a HA nos tecidos biológicos (KIM, H.M., 2003).

Materiais sintéticos são geralmente isolados dos tecidos vivos por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo não aderente. A integração da hidroxiapatita ou das biocerâmicas em geral ao tecido ocorre através da biomineralização na interface tecido / biocerâmica. O processo é normalmente independente do tipo de biocerâmica (densa ou porosa/ bloco ou particulada/ compósitos/ fosfatos ou silicatos/ vitrocerâmicas e HA), e revela a presença de uma fina camada de fosfato de Cálcio (NEO, M. et al., 1992). Achados histológicos em modelos animais revelam que esta camada de fosfato de Cálcio é formada na superfície das biocerâmicas num período de implantação curto, e posteriormente integra-se a matriz óssea como parte do metabolismo tecidual (OHURA, K. et al., 1991).

Estudos de caracterização têm especificado que o fosfato de Cálcio da interface consiste em nano cristais de apatita que diferem da HA sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) na composição e estrutura. A apatita é uma HA de baixa cristalinidade deficiente em cálcio contendo sódio, magnésio, cloro, carbonato e com defeitos estruturais (KITSUGI, T.; YAMAMURO, T.; KOKUBO, T., 1990). Especificamente, o fosfato de cálcio sobre as biocerâmicas exibe uma semelhança com a fase mineral do tecido ósseo. Esse tipo de camada de fosfato de cálcio não é observada ao redor de metais, polímeros e outros materiais não cerâmicos em defeitos teciduais, levando a crer que a superfície de biomineralização de fosfato de cálcio semelhante ao osso é um pré-requisito para a bioatividade (DALCUSI, G. et

al, 1990). O fosfato de cálcio pertencente a superfície da HA recruta células produtoras de osso, como, osteoblastos que proliferaram-se e diferenciaram-se produzindo matriz extra celular composta de fosfato de cálcio e colágeno biológicos. Assim a HA apresenta uma fase mineral superficial semelhante a fase mineral óssea, o que, espontaneamente, estabelece uma integração química bastante íntima com o osso diminuindo a energia de interface (KIM, H. M., 2003).

1.4 - COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrada em quase todo o corpo humano. As propriedades do tecido conjuntivo diferem devido as diferentes organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis, com alta força elástica. O colágeno é responsável pela modulação das forças externas e internas exercidas no organismo. Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno apresenta também as funções de orientar tecidos em desenvolvimento (MAYNE, BURGESSON, 1987), fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial (LEE, SINGLA, LEE, 2001).

A molécula de colágeno é um filamento semiflexível de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, sendo sua estrutura fundamental formada por uma unidade monomérica denominada tropocolágeno, que é caracterizado por uma massa molecular média de 280.000 Da, consistindo de três cadeias polipeptídicas

denominadas (α). As cadeias de tropocolágeno apresentam-se na forma helicoidal, graças à presença freqüente dos resíduos de Glicina, e enrolam-se umas nas outras, formando as hélices triplas, sendo ligadas entre si por pontes de hidrogênio ($-C=O^K H-N-$).

Outro fator de estabilização da hélice tripla é a periodicidade de distribuição de resíduos de aminoácidos polares carregados e hidrofóbicos nas cadeias α que são responsáveis pela formação de aglomerados de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Estas forças também são importantes para a interação entre as moléculas de tropocolágeno para formar a microfibrila (Figura 2), que é a menor unidade estrutural do tecido conjuntivo, que podem ser vistas em microscópio eletrônico de varredura como um filamento fino de 4nm (NIMNI, 1988).

Atualmente são conhecidos 27 tipos de colágeno que apresentam estrutura e composições diferentes. O mais conhecido química e estruturalmente é o tipo I, encontrado em grande quantidade na pele, tendões, ossos, dentes, vasos sangüíneos e intestinos (VIIDIK, VUUST, 1980). O colágeno tipo I é formado por duas cadeias idênticas denominadas 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 do tropocolágeno, existem pequenas regiões de cadeias polipeptídicas não helicoidais denominadas telopeptídeos com 16 e 25 aminoácidos nas regiões **N** e **C**-terminais, respectivamente. Através das interações entre as moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação das microfibrilas (NIMNI, 1988).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura do tropocolágeno e da microfibrila.

Vários modelos foram propostos a partir de estudos por microscopia eletrônica para explicar como o tropocolágeno organiza-se para formar a microfibrila. O modelo mais aceito é o proposto por Smith (1968), que é descrito como quarto alternado pentafibrilar, que apresenta uma periodicidade denominada **D**, cuja origem está relacionada à interação entre as cadeias laterais projetadas externamente quando duas moléculas encontram-se em justaposição paralela. Cada período **D** é composto de “bandas” ou zonas, uma contendo mais moléculas na seção transversal do que a outra, ou seja, para cada cinco moléculas na zona "Overlap" do período **D**, há quatro na zona "Gap".

Com essa distribuição periódica de resíduos de aminoácidos carregados ocorre uma maior interação entre as moléculas de tropocolágeno a pH 7,4. Porém, a distribuição de cargas na molécula de colágeno pode ser modificada por reações químicas específicas nos aminoácidos carregados, para produzir matrizes carregadas negativa ou positivamente.

Como biomaterial o colágeno possui importantes características como: baixo índice de irritabilidade ou alergenicidade (2%); biodegradabilidade; biocompatibilidade; interação com plaquetas, ativando o processo de coagulação do sangue (é um agente hemostático); habilidade em promover crescimento celular e ainda é susceptível a modificações químicas.

Em virtude dessas propriedades o colágeno possui uma posição privilegiada como biomaterial em diversas aplicações como, reconstrução de tecidos moles, revestimento de queimaduras e outras lesões, suporte para crescimento de nervos periféricos e como agente hemostático. Biomateriais de colágeno podem ser utilizados sob diversas formas como, membranas, esponjas, géis, pó, filmes, tubos, etc.

A grande vantagem da utilização do colágeno, além de sua alta biocompatibilidade, como já mencionado, é a possibilidade da alteração de suas propriedades superficiais por modificações químicas do colágeno resultando em matrizes colagênicas carregadas positiva ou negativamente. Neste trabalho foi utilizado a hidrólise seletiva dos grupos carboxamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) presentes nas cadeias α do tropocolágeno (Figura 3).

Figura 3 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxamidas dos resíduos de Asn e Gln.

Esta modificação produz uma matriz carregada negativamente, ao pH 7,4, com um aumento total de até 125 cargas negativas por unidade de tropocolágeno (GOISSIS,1994). A adição de cargas negativas, na molécula de colágeno, altera suas propriedades físico-químicas e a principal característica deste aumento de cargas negativas é a formação de um centro de carga assimétrico, sendo um aspecto importante para o desenvolvimento de materiais dielétricos, conseqüentemente melhorando as propriedades dielétricas em relação aquelas encontradas no colágeno nativo. Estudos das propriedades dielétricas realizadas em membranas de colágeno polianiónico mostraram propriedades dielétricas comparáveis ao fluoreto de polivinilideno, polímero sintético mais piezelétrico que se conhece (GOISSIS,1999)

Portanto, estas modificações químicas nas matrizes colagênicas constituem-se em alternativas de elevado potencial para melhorar ou modificar as propriedades do colágeno, sejam elas mecânicas, estruturais ou físico-químicas. A adição de cargas sobre estas matrizes modifica sua energia de superfície, as propriedades piro e piezelétricas, estruturais, entre outras. Estas propriedades estão intimamente relacionadas com a adsorção de proteínas (albumina, fibronectina), adsorção de fatores de crescimento, fatores de coagulação, com a adesão celular (plaquetas, fibroblastos, macrófagos, etc.), portanto com a hemocompatibilidade e biocompatibilidade.

Todos esses fatores mostram por que o colágeno vem sendo amplamente estudado como matriz extracelular (MEC) natural, ou seja, atuando como sítios de ancoragem e servindo como um suporte tridimensional para crescimento do novo tecido.

1.5-QUITOSANA

Em 1811, ocorreu a descoberta da quitina em cogumelos, pelo professor francês Henri Braconnot, sendo denominada primeiramente como fungina. Odier, em 1823 isolou um resíduo insolúvel de inseto, chamando-o de quitina, sendo este nome derivado da palavra grega *Chiton*, que significa carapaça ou caixa protetora. A quitina contém nitrogênio em sua estrutura, o que foi descoberto somente em 1843 por Payen. Roget descobriu em 1859 a quitosana através da ebulição de uma solução de hidróxido de potássio com quitina (SHAHIDI, et al, 1999; KUMAR, 2000).

Desde a década de 1960, uma considerável quantidade de pesquisas foi realizada com a quitina e quitosana, principalmente no Japão. As pesquisas na época eram direcionadas para um melhor entendimento do material no que diz respeito aos métodos de produção e purificação, derivados químicos e algumas aplicações. Atualmente as pesquisas estão direcionadas para a aplicabilidade dos materiais no cenário biomédico.

Analisando-se as publicações da década de 1990 acerca da quitina e quitosana obtidas a partir do ScienceDirect[®], observamos um aumento gradual no número de artigos, com um pico de 264 artigos em 1998 (Figura 4)(KHOR, 2002). A relevância da quitosana e quitina na área biomédica têm mostrado um grande avanço e desponta como um promissor biomaterial empregado na engenharia de tecidos, sistemas de liberação controlada de drogas, recobrimento de feridas, regeneração tecidual e outras aplicações médicas.

Figura 4: Número de publicações científicas sobre quitina e quitosana obtidas a partir do Sciencedirect® (KHOR, 2002).

A quitosana é um polímero natural proveniente da reação de desacetilação da quitina, um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza. A quitina é proveniente principalmente de exoesqueletos de crustáceos, moluscos e insetos. Esse polissacarídeo de cadeia linear é constituído por unidades de 2-acetamina-2-deoxi-D-glicopirranose. As unidades de 2-deoxi-D-glicopirranose são unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4). A quitina e a quitosana têm basicamente a mesma estrutura química, séries de copolímeros lineares, 2-acetamino-2-deoxiglicose e 2-amino-2-deoxi-D-glicose, porém as diferenças são que a quitosana é solúvel em solução ácida diluída e a quitina não, e o grau de acetilação, ou seja, quando esse for maior do que 60%, a quitina passa a ser chamada de quitosana (TONHI 1999).

Segundo, Khor & Lim, 2003, quando o número de unidades N-acetil-glicosamino é maior que 50%, o biopolímero é denominado quitina (Figura 5). Quando o número de unidades de N-glicosamino é maior, o termo quitosana é utilizado. A quitosana é a versão mais bem estudada do biopolímero devido a sua pronta diluição em soluções ácidas, o que facilita sua utilização em reações químicas.

Figura 5) Representação esquemática da quitina e quitosana (KHOR, 2003).

A quitina ocorre em três formas diferentes denominadas α , β e γ , as quais diferem no arranjo de suas cadeias. A forma α , encontrada principalmente em crustáceos, insetos e fungos apresenta um arranjo alternado de cadeias paralelas e antiparalelas. A forma β é menos comum, sendo encontrada exclusivamente em organismos marinhos como lulas e algas microscópicas, e possui um arranjo de cadeias paralelas. A forma γ ainda não foi completamente caracterizada, mas sugeriu-se um arranjo de duas cadeias paralelas e uma antiparalela (ROBERTS, G; RATHKE, T.D. and HUDSON, S.M.). A forma α é dominante e mais estável que as outras duas β e γ , mas estas últimas podem ser convertidas à forma α através de tratamentos adequados (SIGNINI, 1998).

Todas as propriedades físico-químicas apresentadas pela quitosa, como solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólítico e outras dependem do grau de acetilação, da distribuição de cargas ao longo da cadeia e da massa molar do polímero, que são propriedades que podem ser controladas durante a reação de desacetilação. As propriedades de retenção de água e a biodegradabilidade da

quitosana podem ser controladas também por ligações cruzadas entre suas cadeias. Nas cadeias de quitosana os átomos de nitrogênio estão na forma de grupos amino alifáticos primários e, assim, sofrem reações típicas de aminas. Os grupos amino desacetilados, quando protonados ($\text{pH} < 6$), são os responsáveis pelas cargas positivas que tornam a quitosana um polícatión (Oliveira, 2004).

A versatilidade de poder ser transformada em filmes, membranas, fibras, gel, pasta, tabletes, microesferas, floco, pó ou soluções tem possibilitado as inúmeras aplicações comerciais, industriais, ambientais e biomédicas da quitosana. Há alguns anos, as principais aplicações da quitosana eram na remoção de sedimentos de água, quelação de íons metálicos e na indústria de alimentos. Atualmente a quitosana vem sendo bastante utilizada na produção de cosméticos, medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais para medicina e odontologia. (REBEA, 2003).

O uso da quitosana como biomaterial é baseado em inúmeras propriedades, como:

- Biocompatibilidade e atoxicidade;
- Biodegradabilidade, hidrólise enzimática por quitosanase e lisozima;
- Bioadesividade;
- Agente bacteriostático e antimicrobiano;
- Hemostático;
- Capacidade de formar barreiras;
- Arcabouço para proliferação celular;
- Capacidade de ser suporte para a liberação de fármacos, BMP's e células.

A união da quitosana com mineral cria um compósito com força e flexibilidade do polímero e resistência e dureza do mineral. Nos últimos anos, a comunidade científica adotou esses parâmetros para a criação de diversos compósitos baseados no sistema de ligação entre uma matriz polimérica e uma fase mineral com o intuito de substituição óssea. As vantagens desses compósitos provem da melhora da capacidade osteogênica dos derivados do Cálcio e da característica de ligação da matriz polimérica. Por exemplo, a combinação da quitosana com a HA tem mostrado uma maximização da capacidade osteogênica *in vivo*, permitindo o crescimento interno no compósito com a reabsorção acelerada da matriz (ITO, 1991). Portanto, a quitosana agregada a derivados do fosfato de cálcio tem liderado as pesquisas na área de ortopedia, periodontia e substituições ósseas em geral.

Em uma série de estudos Wan et al tem investigado a interação da quitina com espécies de cálcio, combinando quitina com HA para a produção de compósitos do tipo blenda. Resultados de testes mecânicos preliminares revelaram uma redução da resistência do preenchimento com manutenção das propriedades plásticas do polímero, o que é favorável para a substituição óssea (WAN et al, 1997).

Também foi investigada a indução da mineralização *in situ* da quitosana. Determinou-se que a quitina fosse modificada quimicamente por grupos carboximetil aniônico, o que levaria a superfície da matriz de quitina a apresentar resíduos ácidos, o que poderia atrair íons cálcio e fosfato. Os resultados desses estudos preliminares indicaram que quanto maior conteúdo ácido, melhor os prospectos de calcificação sobre a matriz de quitina (WAN et al, 1996)

Wang et al (2001) relataram o uso direto de quitosana em combinação com fosfato mono-cálcio e óxido de cálcio para a produção de uma mistura que melhoraria as propriedades mecânicas, indicando-a assim como um cimento de

fosfato para o preenchimento de cavidades ósseas. Em estudos com modelo animal, nenhum efeito adverso foi atribuído ao cimento de quitosana e fosfato de cálcio, com evidências histológicas de biocompatibilidade, bioabsorção e osteocondutividade (WANG et al, 2002; WANG et al, 2002).

Ito et al (1999) prepararam membranas de quitosana e HA e avaliaram suas propriedades físicas e efeitos *in vivo*. A razão entre quitosana e HA 11:4 foi encontrada para prover um desempenho mais apropriada da membrana, como, elasticidade, propriedades de tração, liberação de íons cálcio, morfologia e comportamento *in vivo*. Um estudo similar foi realizado com membranas de quitina e quitosana e resultados *in vivo* similares foram encontrados (HIDAKA et al, 1999). Os autores verificaram que, quanto maior o conteúdo de quitina na membrana, maior a resposta inflamatória atribuída ao caráter de cargas negativas dos grupos acetil.

Yokoyama et al (2002) usaram quitosana como um componente da fase líquida, que incluía também, ácido cítrico e glicose em combinação com α -fosfato-tricálcio e fosfato-tetracálcio para a produção de um cimento de fácil aplicação e moldagem. O cimento era transformado em HA em 3-6 semanas *in vitro*. Foram encontradas boas ligações entre o cimento e o osso em modelos animais.

Ramesh et al (2002) relataram a preparação de microesferas de HA-quitosana como material potencial para o preenchimento de cavidades ósseas e periodontais. Pó de HA foi misturado com solução de quitosana seguido de óleo parafina, hexano e surfactante e o processo de produção de micro esferas começava. Subseqüentemente, glutaraldeído era adicionado para realizar a reticulação na quitosana e formar as esferas de 125 a 1000 μ m.

A presente geração de pesquisa em engenharia de tecidos é baseada na cultura de células em matrizes poliméricas porosas biodegradáveis, tanto para fins *in*

vitro como *in vivo*. Esses biomateriais devem ser capazes de serem preparados na forma porosa para oferecer um canal para a migração de células do hospedeiro para dentro da matriz, permitindo o completo crescimento e maturação do tecido análogo e também a biodegradação em produtos não tóxicos. Para tal, a quitosana tem se mostrado útil e com características muito favoráveis, continuando, dessa forma, como um ótimo biomaterial para regeneração tecidual e engenharia de tecidos.

1.6. TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE.

Por aproximadamente dez anos o Comitê Técnico 194 da International Organization for Standardization (ISO) e vários outros grupos desenvolveram um documento conhecido como ISO 10993, o qual é composto por uma série de normas e padrões que organizam a avaliação biológica de dispositivos médicos. Esta é dividida em até 16 partes, observando-se sua interação, desde a fabricação, esterilização, caracterização e sua resposta biológica local e sistêmica.

Uma das primeiras considerações sobre a avaliação dos dispositivos médicos é a caracterização dos mesmos, quanto às propriedades físico-químicas, toxicológicas, elétricas, morfológicas e mecânicas. Dessa forma a caracterização dos biomateriais é claramente identificada como o primeiro passo da sua avaliação, a qual avaliará o tipo de material, presença de resíduos, aditivos e contaminantes, substâncias nocivas, produtos de degradação e característica final do produto.

Várias técnicas são utilizadas na caracterização dos materiais, os quais podem ser avaliados diretamente sobre as amostras ou através de extratos preparados sob condições especiais. A análise por espectroscopia no infravermelho, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura são alguns testes usados para a caracterização dos materiais.

Após a realização da caracterização o teste de citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5) deve ser realizado para a observação dos efeitos biológicos adversos agudos provenientes dos materiais. Normalmente para este teste são usadas células cultivadas sob condições padrões e submetidas à ação do material. Os testes podem ser realizados com extratos dos materiais, que são colocados na cultura de células. Uma alternativa para esse método é o cultivo em um meio nutritivo semi-sólido, como o ágar, onde o material é colocado em íntimo contato com as células. O teste de citotoxicidade é um método rápido, padronizado, sensível e com baixo custo para determinar a existência de extratos biologicamente nocivos.

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente àqueles de aplicação clínica, como os biomateriais (ROGERO, O. S. et al, 2003).

Vários métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de biomateriais foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Esses testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes

mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO, S. O., et al, 2000).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas, resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI, G., et al, 1996; ROGERO, O. S. et al, 2003).

O teste de efeitos locais após implantação (ISO 10993-6) é realizado com a implantação do biomaterial no organismo do animal de laboratório e avaliam-se, posteriormente, os efeitos no tecido vivo adjacente. Observa-se o efeito celular local que ocorre em resposta à presença do material que pode ser quase inerte, com pouquíssima mobilização celular, até uma resposta celular aguda severa com necrose prolongada por semanas.

A norma ISO 10993-6 menciona o uso de ratos, camundongos, porquinhos da índia e coelhos devido ao tamanho reduzido e ao fácil manuseio. Normalmente utiliza-se o leito subcutâneo como sitio cirúrgico, mas também podem ser utilizados tecidos específicos como osso, músculo, tecido nervoso, etc.

Após intervalo de tempo variável de dias a meses, o material e o tecido adjacente é biopsiado e uma avaliação histológica é realizada para a observação da resposta tecidual frente ao material como presença de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, plasmócitos, cápsula fibrosa, vasos sanguíneos e lise celular, entre outros.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como proposta desenvolver, caracterizar e estudar o comportamento biológico de compósitos a base de colágeno polianiónico, hidroxiapatita natural e quitosana, voltadas para a reconstrução de tecido ósseo.

Levando-se em conta os dados acima descritos, o objetivo do trabalho foi avaliar a biocompatibilidade de biomateriais constituídos de osso inorgânico de origem bovina, conjuntamente com colágeno aniônico e quitosana para a formação de mantas para reconstrução de tecido ósseo.

A avaliação biológica foi realizada através de testes de citotoxicidade *in vitro* e de efeitos teciduais após implantação *in vivo*.

Esses métodos são fundamentais na avaliação da biocompatibilidade de biomateriais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Os biomateriais usado neste trabalho foram preparados e caracterizados no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do IQSC/USP pela aluna Daniela Toma no seu trabalho de monografia de conclusão do curso de Bacharelado em Química (TOMA, D., 2005). A metodologia encontra-se em anexo A.

Os biomateriais foram esterilizados por Óxido de Etileno pela empresa OXETIL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS ESTERILIZADOS LTDA-EPP, sob supervisão da Dra. Rita Gisele Biffi Medeiros (CRF: 26.334).

3.1.1. Hidroxiapatita (HA)

A hidroxiapatita foi obtida por desproteinização de osso bovino. Após remoção de resíduos e de tecido o osso foi cortado em cubos de 1 cm³ (parte correspondente ao osso trabecular) e foi lavado com H₂O₂ para remoção da albumina livre, seguido de etanol. A seguir, o osso foi deixado em contato com H₂O₂ à temperatura ambiente e depois autoclavado. O processo foi repetido até que a massa orgânica residual chegasse ao redor de 12%. A seguir o osso foi lavado com

água, seco a 100°C e calcinado a 800 °C. Esses cubos foram utilizados na forma de pó com o tamanho das partículas variando de 0,20mm a 1,18mm.

3.1.2. Gel de Colágeno

A matéria prima utilizada para a obtenção do gel de colágeno foi o tendão bovino, que após lavagem com solução salina 0,9% para remoção de sangue, foi desfiado e tratado com uma solução alcalina contendo DMSO/H₂O e sais (cloretos e sulfatos) de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ (GOISSIS,1994). Após 24 horas e estabilização em solução alcalina, os sais residuais foram removidos por lavagens sucessivas com H₃BO₃ 3%, EDTA 3% e finalmente extraído com uma solução de ácido acético pH 3.5. Esta solução foi desaerada e estocada em à temperatura de 4°C.

3.1.3. Quitosana

A quitosana utilizada foi obtida pelo grupo de biomateriais a partir de gládio de lula, também conhecido como pena de lula, da espécie *Loligo*. O processo de obtenção de quitosana de β -quitina foi baseado no processo de Kurita (KURITA, 1993) que consiste em desmineralização em meio ácido (HCl 0,55molL⁻¹), desproteinização em meio alcalino (NaOH 0,30molL⁻¹) e desacetilação em NaOH 40% (m/m). A quitosana obtida teve grau de acetilação de 16,3% (HORN, 2005).

A solução de quitosana 0,5% foi preparada pela dissolução de quitosana em solução de ácido acético 1% em água deionizada.

3.1.4. Mantas Ósseas

Foram preparadas 3 matrizes, denominadas manta 1(B1), manta 2 (B2) e manta 3 (B3), descritas a seguir:

A manta 1 (B1) foi formada por uma mistura de HAn na forma de pó e blenda colágeno:quitosana, na proporção 1:5 (m/m). Essa blenda foi obtida por mistura do gel de colágeno 1% e solução de quitosana 0,5% na proporção 1:1 (m/m). A HAn utilizada foi uma mistura de partículas de tamanho 0,20mm e entre 0,25 e 1,18mm, na proporção 1:1.

A manta 2 (B2) foi formada por HAn na forma de pó e gel de colágeno 1% na proporção 1:5 (m/m). A HAn utilizada foi uma mistura de partículas de tamanho de 0,2mm e entre 0,25 e 1,18mm, na proporção 1:1.

A manta 3 (B3) foi formada por HAn na forma de pó e gel de colágeno 1%, na proporção 1:5 (m/m). A HAn utilizada foi uma mistura de partículas de tamanho menor que 0,2mm .

3.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

3.2.1. CITOTOXICIDADE *IN VITRO*.

Os testes de avaliação da toxicidade celular foram realizados no Laboratório de Cultura Celular do Instituto de Química de São Carlos, sob orientação da Profa. Dr. Janice Rodrigues Perussi e colaboração da química Cláudia Bernal.

3.2.1.1 Método de difusão em Agar.

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado pelo método de difusão em ágar com linhagem celular VERO (CCL-81 ATCC-USA) (Fig.06). As células na concentração 3×10^5 células/mL foram semeadas em placa de Petri (15 x 60 mm), no volume de 5 mL e incubada durante 48h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Na capela de fluxo laminar (Fig. 07) após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado (Fig. 08) e adicionado 5 mL do meio “overlay” em cada placa de Petri (Fig. 09). Este meio é composto de partes iguais de mínimo de Eagle (MEM) e ágar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o MEM, ambos a uma temperatura de 44°C. Fragmentos, com cerca de 0,25 cm² de área superficial das mantas B1, B2 e B3, foram colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa (Fig. 10). As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 24h (ROGERO, S.O., 2003).

Foram utilizados como controle positivo fragmentos de látex e como controle negativo, discos de papel de filtro de natureza atóxica, com área superficial de 0,25 cm². As amostras foram avaliadas em triplicata.

Figura 6: Microscopia (aumento de 200x) da linhagem celular VERO (CCL-81 ATCC-USA).

Figura 9: Colocação de meio de cultura com corante vermelho neutro.

Figura 7: Manipulação das culturas celulares dentro da capela de fluxo laminar.

Figura 10: Colocação dos biomateriais nas placas de Petri.

Figura 8: Retirada do meio de cultura.

3.2.1.2 Método de difusão de extrato em solução.

Foram utilizados dois tipos de linhagens celulares: células tumorais de laringe humana HEp (ATCC-CCL-23) (Fig. 12) e células normais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) VERO (Fig. 11).

Figura 11) Microscopia de fluorescência de linhagem celular não tumoral (VERO).

Figura 12) Microscopia de fluorescência de linhagem celular tumoral (HEp).

Os biomateriais descritos acima foram avaliados juntamente com o controle positivo (látex), sendo que ambos foram submetidos a procedimentos de extração de acordo as normas da ISO10993-5. Cada material foi devidamente seccionado em pedaços com dimensões de 3mm x 4mm x 6mm e submersos em 2mL DMEM por 24 horas em condições estáticas a 37°C.

1×10^5 células/mL em meio DMEM para células VERO e Eagle para células HEp-2, com 10% de SFB, foram plaqueadas em placa com 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 h, removeu-se o meio por aspiração e lavou-se a monocamada de células com PBS. Preparou-se a solução dos extratos em meio com 3% de SFB e sem vermelho de fenol nas seguintes concentrações:

100; 90; 75; 60; 50; 25; 10%. Estas soluções foram preparadas utilizando-se os extratos dos biomateriais. As células foram incubadas por 24h com os extratos em triplicata na placa de 96 poços a 37° C e 5% de CO₂ (MOAN, J.; RIMINGTON, C.; MALIK, ZVI., 1988).

Após esse tempo de incubação, as células foram tratadas com 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT), para o desenvolvimento de uma cor azul. Este método de contagem das células baseia-se na redução do MTT, composto amarelo, a um produto formazan, de coloração violeta, que absorve em 570nm. A redução é feita pelas desidrogenases mitocondriais, presentes somente nas células vivas (TAYLOR, L.R.; PAPP, R.B.; POLLARD, B.D., 1994). Após 3 h de incubação, o meio com MTT é retirado e 50µL de etanol puro são adicionados. Após diluição completa, adiciona-se 150µL de PBS com isopropanol na proporção 1:1. A placa é lida em leitor de Elisa BIO-RAD em 550nm (Fig.13).

Os resultados são apresentados por meio de gráficos de absorbância em função da concentração do extrato do biomaterial (CHOU, T-C. and HAYBALL, M., 1996).

Figura 13: Diagrama esquemático do ensaio citotóxico.

3.2.2 BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO*.

3.2.2.1.Preparo dos animais e procedimentos de implantação

Um total de 51 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos adultos (aproximadamente 70 dias de vida / peso aproximado de 250g / provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista - campus II – Araraquara / acondicionados no Biotério da Bioengenharia da Universidade de São Paulo – São Carlos), foram divididos aleatoriamente em três grupos de 17 animais correspondentes aos três diferentes biomateriais testados. Esses grupos foram

divididos então em relação ao período pré-sacrifício: 3, 7 e 28 dias ($n = 5$ animais). Para cada grupo foram utilizados dois animais controle: o primeiro sem procedimento cirúrgico e o segundo com procedimento cirúrgico, porém sem introdução do biomaterial. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CETEA).

Em todos os animais a mesma seqüência operatória foi seguida, sendo que, inicialmente, os animais foram anestesiados com uma mistura 1:1 de cloridrato de cetamina (Ketalar injetável – Achê Laboratórios Farmacêuticos S.A.) na dosagem de 75 mg/kg de massa corporal e relaxante muscular e sedativo de uso animal Ropun (Bayer S.A.) na dosagem de 1,5 mL/kg de peso, aplicados via intramuscular. Quando os animais permaneciam imóveis, eram colocados sobre um campo esterilizado para o procedimento operatório.

Na área dorsal dos animais, seguindo a linha sagital, foi realizada a tricotomia, expondo a pele (Fig. 14), seguida da assepsia com gaze embebida no Iodo Povidine (PvPi) (Fig. 15).

Figura 14: Tricotomia da região dorsal.

Figura 15: Assepsia da área cirúrgica com PvPi.

Figura 16: Campo operatório.

Figura 17: Incisão e exposição do tecido subcutâneo.

Utilizando-se bisturi com lâmina número 15 (Fig. 16) foi realizada uma incisão reta de 1,5cm de comprimento no flanco direito, paralela à linha sagital mediana, expondo o tecido subcutâneo (Fig. 17).

Foi realizado então o divulsionamento do espaço subcutâneo para a confecção de uma bolsa para a colocação do biomaterial (Fig. 18).

Figura 18: Espaço subcutâneo divulsionado para colocação do biomaterial.

Após a obtenção da bolsa, as margens da incisão foram afastadas e o biomaterial foi introduzido no espaço subcutâneo aproximadamente 1cm distante da incisão (Fig. 19). Os biomateriais tinham a dimensão de 1x10x10mm. As bordas da incisão foram aproximadas e suturadas com fio de seda 4.0 Ethicon (Johnson &

Johnson). Após o término da sutura foi realizada assepsia pós-operatória com PvPi (Fig. 20). Foi colocado um biomaterial por animal seguindo a distribuição por grupos previamente descritos.

Figura 19: Colocação do biomaterial.

Figura 20: Sutura e assepsia pós-operatória.

Por todo o período do experimento os animais permaneceram nas dependências do biotério da Bioengenharia – São Carlos – Universidade de São Paulo, recebendo dieta composta de ração e água *ad libitum*.

3.2.2.2. Biópsias e processamento histológico.

Decorrido os períodos experimentais particulares a cada grupo, os animais foram novamente anestesiados e sacrificados com infiltração intramuscular de Cloreto de Potássio, seguida pelos procedimentos de tricotomia da região dorsal e assepsia com PvPi, semelhante ao descrito anteriormente.

Após a localização dos biomateriais através de palpação, foram realizadas incisões com margem de segurança para a retirada cuidadosa do material com o tecido adjacente.

Imediatamente após a remoção do material e fixação em isopor com alfinetes para evitar alterações morfológicas no tecido (Fig. 21), esse foi imerso em solução de formol a 10% em tampão fosfato (pH 7) por um período de 72 horas para a fixação do tecido. Os cortes histológicos receberam a coloração HE (hematoxilina/ eosina). Imunohistoquímica foi realizada para a avaliação da presença de macrófagos.

Figura 21: Tecido fixado ao isopor com alfinetes.

Os cortes lâminas foram avaliadas e fotografadas em um Microscópio Leica Leitz DM RX com sistema de análise de imagem acoplada.

Para a análise histológica, a reação tecidual aos implantes recebeu uma escalonamento semi-quantitativo de acordo com os seguintes critérios: - nenhuma reação; + reação mínima; ++ reação moderada; +++ reação bem estabelecida e ++++ reação intensa.

Foram observados os seguintes aspectos da reação tecidual:

- INFILTRADO INFLAMATÓRIO: Presença de células inflamatórias, como linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares (PMN):

(-) Ausência de células inflamatórias.

(+) Resposta inflamatória mínima com presença de uma ou poucas células.

(++) Resposta inflamatória moderada com poucos grupos de células presentes.

(+++) Resposta inflamatória marcante com presença de vários conglomerados de células inflamatórias.

(++++) Resposta inflamatória intensa com intensa presença de células inflamatórias por todo o tecido.

- FIBRINA: Presença da rede de fibrina ao redor do implante:

(-) Ausência de fibrina.

(+) Rede de fibrina muito fina.

(++) Rede de fibrina pequena.

(+++) Rede de fibrina média.

(++++) Rede de fibrina intensa.

- NEOVASCULARIZAÇÃO: Presença de capilares sanguíneos ao redor dos implantes:

(-) Ausência de capilares sanguíneos.

(+) Presença de poucos capilares sanguíneos.

(++) Presença moderada de capilares sanguíneos.

(+++) Presença de vários capilares sanguíneos.

(+++++) Presença de muitos capilares sanguíneo ao redor dos implantes.

- CÁPSULA FIBROSA: Espessura e qualidade de cápsula fibrosa.

(-) Ausência da cápsula fibrosa.

(+) Presença de poucas células inflamatórias com pouco ou nenhum tecido conjuntivo organizado.

(++) Tecido da cápsula é granulomatoso e denso, contendo fibroblastos e algumas células inflamatórias.

(+++) Tecido da cápsula é fibroso, porém imaturo, apresentando fibroblastos e pouco colágeno.

(+++++) Cápsula fibrosa madura, densa e bem estabelecida.

- CRESCIMENTO CELULAR INTERNO:

(-) Ausência de células dentro das fendas (“cracks”) do implante.

(+) Presença mínima de células dentro das fendas (“cracks”) do implante.

(++) Presença moderada de células nas fendas do implante.

(+++) Presença marcante de células nas fendas do implante e formação de tecido fibrosa ao redor dos fragmentos do implante.

(+++++) Degradação abundante do implante com quase completa fragmentação dos mesmos.

- MACRÓFAGOS:

(-) Ausência de macrófagos.

(+) Presença moderada de macrófagos.

(++) Presença de uma camada de macrófagos.

(+++) Presença de crateras com macrófagos nos biomateriais.

(++++) Presença intensa de macrófagos e células gigantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

4.1.1. MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

As placas foram analisadas macroscopicamente quanto à presença do halo e microscopicamente quanto à integridade celular ao redor da amostra. A característica de toxicidade foi constatada pela presença de um halo claro ao redor do material testado. Este halo é observado quando há morte celular e liberação do corante vermelho neutro incorporado as células, dando um aspecto transparente ao local. A toxicidade foi avaliada pela medida do diâmetro do halo de inibição formado, medido com uma régua milimétrica (Tabela 1).

Tabela 1: Medida do halo de inibição celular.

Amostras	Diâmetro do halo (mm)
Controle negativo	0,0
Controle positivo	13,0
B1	0,0
B1	0,0
B1	0,0
B2	0,0
B2	0,0
B2	0,0
B3	0,0
B3	0,0
B3	0,0

Nenhum dos biomateriais analisados pelo método de difusão em ágar apresentou efeito tóxico. Não foi observado halo de toxicidade ao redor ou sob as amostras (Fig. 22 a 24) e as células mostraram-se integras sem nenhuma alteração morfológica (Fig. 25 a 27), apresentando comportamento idêntico ao controle negativo (Fig. 28 e 29). Quanto ao controle positivo foi observado um halo com diâmetro de 13mm ao redor do látex (Fig. 30), confirmando a toxicidade inerente ao material com lise celular (Fig. 31). Foi realizado um controle da vitalidade celular sem presença de materiais.

Figura 22: Avaliação macroscópica do biomaterial B1 após 24h.

Figura 24: Avaliação macroscópica do biomaterial B3 após 24h.

Figura 23: Avaliação macroscópica do biomaterial B2 após 24h.

Figura 25: Microscopia do biomaterial B1 (200x).

Figura 26: Microscopia do biomaterial B2 (200x).

Figura 29: Microscopia do Controle negativo (200x).

Figura 27: Microscopia do biomaterial B3 (200x).

Figura 30: Avaliação macroscópica do controle positivo.

Figura 28: Avaliação macroscópica do controle negativo.

Figura 31: Microscopia do controle positivo (200x).

Nesse ensaio de toxicidade foram avaliados os efeitos dos componentes de difusão provenientes dos materiais, quando esses se encontravam em contato indireto com as células. Uma pequena camada de ágar separava as células dos materiais, o que contribuía para o alívio da tensão citotóxica dos materiais sobre o sol-gel, provendo uma barreira adicional para a difusão. Essa investigação pode mimetizar os efeitos da resposta celular próxima, mas não adjacente aos materiais (NABLO, B.J. SCHOENFISCH, M.H., 2005). Devido às características não tóxicas dos biomateriais avaliados, as células muito próximas das amostras apresentavam-se íntegras e vitais.

4.1.2. Método de difusão de extrato em solução.

O ensaio citotóxico através do uso de extratos provenientes dos biomateriais apresentou resultados semelhantes ao método de difusão em ágar. Os três biomateriais avaliados e o controle negativo apresentaram ausência de toxicidade celular, independente da concentração utilizada. Apenas o controle positivo mostrou efeito tóxico sobre as linhagens celulares avaliadas, principalmente com o aumento da concentração do mesmo.

Figura 32: Ensaio citotóxico com linhagem celular HEp.

Figura 33: Ensaio citotóxico com linhagem celular VERO.

Cimentos de fosfato de Cálcio são não-tóxicos devido aos seus componentes individuais e seus produtos de reação (CAREY, L.E. et al, 2005). Muitos compósitos de fosfato de Cálcio mostraram adesão e proliferação celular (YUASA, T. et al, 2004). Essas características não tóxicas desses biomateriais são decorrentes principalmente aos constituintes inorgânicos semelhantes aos ósseos (HING, K.A. et al, 1999). O mesmo pode ser dito para os compósitos de hidroxiapatita/quitosana porque a quitosana e seus derivados são biopolímeros naturais e não tóxicos (MUZZARELLI, R.A.A., 1989).

4.2. BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO*

Figura 34: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 50x. H.E.

Figura 37: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 50x. H.E.

Figura 35: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 50x. H.E.

Figura 38: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 50x. H.E.

Figura 36: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 50x. H.E.

Figura 39: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 50x. H.E.

Figura 40: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 100x. H.E.

Figura 43: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 100x. H.E.

Figura 41: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 100x. H.E.

Figura 44: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 100x. H.E.

Figura 42: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 100x. H.E.

Figura 45: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 100x. H.E.

Figura 46: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 200x. H.E.

Figura 49: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 200x. H.E.

Figura 47: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 200x. H.E.

Figura 50: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 200x. H.E.

Figura 48: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 200x. H.E.

Figura 51: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 200x. H.E.

Figura 52: Controle sem cirurgia (3dias). Aumento: 500x. H.E.

Figura 55: Controle sem biomaterial (3dias). Aumento: 500x. H.E.

Figura 53: Controle sem cirurgia (7dias). Aumento: 500x. H.E.

Figura 56: Controle sem biomaterial (7dias). Aumento: 500x. H.E.

Figura 54: Controle sem cirurgia (28 dias). Aumento: 500x. H.E.

Figura 57: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 500x. H.E.

Figura 58: Biomaterial 1 (3dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 61: Biomaterial 1 (3dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 59: Biomaterial 1 (7dias)
Aumento: 50x. H.E.

Figura 62: Biomaterial 1 (7dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 60: Biomaterial 1 (28 dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 63: Biomaterial 1 (28 dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 64: Biomaterial 1 (3dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 67: Biomaterial 1 (3dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 65: Biomaterial 1 (7dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 68: Biomaterial 1 (7dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 66: Biomaterial 1 (28 dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 69: Biomaterial 1 (28 dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 70: Biomaterial 2 (3dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 73: Biomaterial 2 (3dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 71: Biomaterial 2 (7dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 74: Biomaterial 2 (7dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 72: Biomaterial 2 (28 dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 75: Biomaterial 2 (28 dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 76: Biomaterial 2 (3dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 79: Biomaterial 2 (3dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 77: Biomaterial 2 (7dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 80: Biomaterial 2 (7dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 78: Biomaterial 2 (28 dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 81: Biomaterial 2 (28 dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 82: Biomaterial 3 (3dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 85: Biomaterial 3 (3dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 83: Biomaterial 3 (7dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 86: Biomaterial 3 (7dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 84: Biomaterial 3 (28 dias).
Aumento: 50x. H.E.

Figura 87: Biomaterial 3 (28 dias).
Aumento: 100x. H.E.

Figura 88: Biomaterial 3 (3dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 91: Biomaterial 3 (3dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 89: Biomaterial 3 (7dias)
Aumento: 200x. H.E.

Figura 92: Biomaterial 3 (7dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 90: Biomaterial 3 (28 dias).
Aumento: 200x. H.E.

Figura 93: Biomaterial 3 (28 dias).
Aumento: 500x. H.E.

Figura 94: Imuno controle s/ biomaterial (7dias). Aumento: 100x.

Figura 97: Controle sem biomaterial (28dias). Aumento: 100x.

Figura 95: Imuno controle s/ biomaterial (7dias). Aumento: 200x.

Figura 98: Controle sem biomaterial (28dias). Aumento: 200x.

Figura 96: Imuno controle s/ biomaterial (7 dias). Aumento: 500x.

Figura 99: Controle sem biomaterial (28 dias). Aumento: 500x.

Figura 100: Imuno Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 100x.

Figura 103: Imuno Biomaterial 1 (28dias). Aumento: 100x.

Figura 101: Imuno Biomaterial 1 (7dias). Aumento: 200x.

Figura 104: Imuno Biomaterial 1 (28dias). Aumento: 200x.

Figura 102: Imuno Biomaterial 1 (7 dias). Aumento: 500x.

Figura 105: Imuno Biomaterial 1 (28 dias). Aumento: 500x.

Figura 106: Imuno Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 100x.

Figura 109: Imuno Biomaterial 2 (28dias). Aumento: 100x.

Figura 107: Imuno Biomaterial 2 (7dias). Aumento: 200x.

Figura 110: Imuno Biomaterial 2 (28dias). Aumento: 200x.

Figura 108: Imuno Biomaterial 2 (7 dias). Aumento: 500x.

Figura 111: Imuno Biomaterial 2 (28 dias). Aumento: 500x.

Figura 112: Imuno Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 100x.

Figura 115: Imuno Biomaterial 3 (28dias). Aumento: 100x.

Figura 113: Imuno Biomaterial 3 (7dias). Aumento: 200x.

Figura 116: Imuno Biomaterial 3 (28dias). Aumento: 200x.

Figura 114: Imuno Biomaterial 3 (7 dias). Aumento: 500x.

Figura 117: Imuno Biomaterial 3 (28 dias). Aumento: 500x.

TABELA 2: Resultados da avaliação da resposta tecidual.

Parâmetro		B1	B2	B3
INFILTRADO INFLAMATÓRIO (Rico em neutrófilos)	3 dias	++++	+++	++
	7 dias	+++	++	+
	28 dias	+	+	-
FIBRINA	3 dias	+++	+++	+++
	7 dias	+++	++	++
	28 dias	++	+	-
NEOVASCULARIZAÇÃO	3 dias	-	-	-
	7 dias	-	-	+
	28 dias	+	++	+++
CAPSULA FIBROSA	3 dias	-	-	-
	7 dias	-	-	-
	28 dias	++	++	+
CRESCIMENTO CELULAR INTERNO (infiltração)	3 dias	-	-	-
	7 dias	-	+	++
	28 dias	+	++	+++
MACRÓFAGOS (CD68)	3 dias	-	-	-
	7 dias	-	-	-
	28 dias	++	++	+

Para o biomaterial B1 no período de três dias observamos presença de infiltrado inflamatório agudo com grande número de linfócitos e PMN's. A cápsula fibrosa apresentava um tecido conjuntivo frouxo com presença moderada de fibroblastos e poucos vasos sanguíneos.

Com sete dias no grupo B1 houve a permanência do infiltrado inflamatório rico em linfócitos. A cápsula fibrosa apresentava-se um pouco mais densa, com maior número de fibroblastos e poucos vasos sanguíneos.

Aos 28 dias, ocorreu uma diminuição acentuada no número de linfócitos, aumento dos fibroblastos no interior do biomaterial e presença de vasos sanguíneos importante.

O biomaterial B2 apresentou infiltrado inflamatório aos três dias com presença moderada de linfócitos e PMN's. Ausência de cápsula fibrosa e fibroblastos do tecido conjuntivo adjacente em íntimo contato com o biomaterial. Aos sete dias

ocorreu uma diminuição acentuada no número de células inflamatórias. Aos 28 dias, presença de poucos linfócitos e macrófagos, grande número de vasos sanguíneos e integração do biomaterial ao tecido.

O Biomaterial B3 apresentou pouco infiltrado inflamatório aos três dias. Aos sete, havia apenas uma pequena quantidade de linfócitos e já podíamos observar capilares sanguíneos adjacentes ao biomaterial. Aos 28 dias, o biomaterial apresentava-se em íntimo contato com o tecido adjacente, com grande presença vascular sanguínea.

No período de três dias houve reação inflamatória aguda em todos os cortes observados, com presença abundante de neutrófilos e linfócitos, sendo mais intensa no grupo B1.

A reação inflamatória aguda é comum ainda aos sete dias, valendo enfatizar que os três materiais apresentam reações dentro de padrões normais, o que validam sua aplicabilidade como biomateriais.

No período de 28 dias observou-se presença de linfócitos e macrófagos, mais intensamente no grupo B1. Essa diferença que ocorre no grupo B1, tanto nos sete como nos vinte e oito dias deve-se provavelmente ao remanescente de grupos acetil da quitosana.

A neovascularização e crescimento interno tecidual mostraram-se mais presentes no grupo B3, seguido por B2 e menos intensa em B1. A aplicabilidade como arcabouço para o crescimento tecidual dos biomateriais pode ser observado na grande presença de vasos sanguíneos ao redor e dentro dos mesmos. A vascularização mais acentuada no grupo B3 é decorrente provavelmente do tamanho das partículas de HA, as quais são menores e favorecem a assimilação do organismo.

Arcabouços para engenharia de tecido ósseo necessitam de poros interconectados para proliferação celular e transporte de nutrientes. Tamanhos de poros ao redor de 50-100µm possibilitam o crescimento celular interno. Compósitos com constituições distintas podem apresentar porosidades diferentes. A precipitação dos fosfatos de cálcio sobre matrizes poliméricas naturais como o colágeno e a quitosana pode ser semelhante a dos tecidos naturais, o que pode favorecer a biocompatibilidade e o crescimento celular interno.

A fragmentação do material implantado foi acentuada em todos os cortes observados, sendo que nos grupos de 28 dias nota-se aparente reabsorção de parte do material. A fragmentação é de suma importância para a neoformação tecidual, e isso é, em grande parte, estimulado pela matriz polimérica de colágeno e/ou quitosana, as quais apresentam uma reabsorção mais rápida que o constituinte mineral.

A presença de poucos linfócitos e ausência de granulomas aos 28 dias denota uma baixa antigenicidade mostrando que o material não apresenta antígeno ou remanescentes orgânicos no seu interior. Isso também denota um rigoroso controle e sucesso no processo de síntese dos biomateriais, desde a extração na suas fontes até o manuseio laboratorial.

A discreta presença de infiltrado polimorfonuclear aos 28 dias denota a não persistência de estímulos inflamatórios, ou seja, a maior parte da inflamação dos primeiros dias é decorrente do próprio ato operatório.

A presença de muitos vasos neoformados entremeados com o composto denota um estímulo vasculogênico importante nos biomateriais. Provavelmente esses estímulos provêm da HA de origem bovina, a qual, juntamente com o

colágeno ou a quitosana, apresenta características que favorecerem o crescimento tecidual e osteocondução (BEM-NISSAN,2003).

O pequeno número de macrófagos (ausência de granulomas) indica que o compósito não estimula inflamação crônica, o que é um bom parâmetro de biocompatibilidade e também mostra que os compostos apresentam uma reabsorção facilitada em decorrência da matriz orgânica e da HA em partículas pequenas.

O pequeno número de fibroblastos indica que o composto tende a ser bem reabsorvido, sem formação de fibrose importante, sendo que o tecido adjacente sofre pequenas alterações. As células teciduais em muitos casos aderem-se diretamente aos materiais.

5. CONCLUSÃO

Concluimos no presente estudo que os biomateriais avaliados não apresentaram toxicidade celular *in vitro*, tanto pelo método de difusão em ágar como pelo método de difusão de extrato em solução nas duas linhagens celulares utilizadas.

Da mesma forma, quando avaliada a resposta do tecido subcutâneo frente aos biomateriais, observou-se ausência de respostas inflamatórias adversas a sua aplicabilidade clínica como substituinte tecidual.

Os biomateriais avaliados suscitaram uma resposta inflamatória bastante discreta, permitindo um bom crescimento tecidual no seu interior. Observou-se uma resposta tecidual mais favorável em relação à amostra B3, seguida pela B2 e B1, porém todas apresentaram resultados bastante satisfatórios.

Os biomateriais à base de hidroxiapatita natural, colágeno e quitosana avaliados nesse estudo apresentam características bastante favoráveis para seu emprego como biomateriais de substituição tecidual.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASCENZI, A.; BASCHIERI, P.; BENVENUTI, A. The torsional properties of single selected osteons. **J Biomechanics**, 27: 874-84, 1994.
2. BEN-NISSAN, B. Natural bioceramics: from coral to bone and beyond. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 7: 283-288, 2003.
3. BEZERRA, F. J. **Terapia clínica avançada em implantodontia**. Ed. Artes Médicas, cap.02, p.21. São Paulo, 2002.
4. BET, M. R. **Preparação e caracterização de biocerâmicas compostas de colágeno e sais de fosfato de Cálcio**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos-USP – São Carlos, 1995.
5. BUCK, B.E. et al. Human bone and tissue allografts. **Clin Orthop**, 303: 8-17, 1994.
6. BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.L. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 21: 2347-2359, 2000.
7. CAREY, L.E. et al. Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. **Biomaterials** 26: 5002-14, 2005.
8. CHOU, T-C. and HAYBALL, M.: **CalcuSyn: Windows software for dose effect analysis**. Biosoft, Cambridge, 1996.
9. CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D. **Biomaterials**, 17: 1259-1264, 1996.
10. DACULSI, G. et al. Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium-phosphate ceramics. **Calcif Tissue Int**, 46: 20-7, 1990.
11. ENNEKING, W.F.; MINDEL, E.R. Observations on massive retrieved bone allografts. **J Bone Joint Surg**, 73: 1123-42, 1991.
12. FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3.ed. New York, Wiley-Liss, 1994, 486p.
13. GABRIELLI, M.A.C. et al. Hydroxyapatite implants with or without collagen in zygomatic arch of rats. Histological study. **Braz Dent J**, 12(1): 9-15, 2001.

- 14.GOISSIS, G; PLEPIS, A. M. G; ROCHA, J. L; Processo de extração de colágeno de tecidos animais com auxílio de solvente orgânico em meio alcalino. Patente Industrial nº 9.405.043-0/1994
- 15.GOISSIS, G.; PICCIRILLI, L.; PLEPIS, A.M.G.; Das-GUPTA, D.K. - "Preparation and characterization of anionic collagen:P(VDF-TrFE) composites - **Polymer Engineering and Science** 39(3): 474-482 , 1999
- 16.GOLDBERG,V.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clin Orthop**, 225: 7-16, 1987.
- 17.HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. **J Am Ceram Soc**; 74, 1487-510, 1991.
- 18.HENCH, L.L. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. **J Biomed Mater Res**; 15: 511-8, 1998.
- 19.HING, K.A. et al. Characterization of porous hydroxyapatite. **J Mater Sci: Mater Med** 10: 135-45, 1999.
- 20.HORN, M. M. Utilização de quitosana derivada de β -quitina para a preparação de esponjas quitosana:colágeno, 2005. **Monografia** (Bacharelado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- 21.HYDAKA, Y, et al. Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. **J Biomed Mater Res**, 46: 418-23, 1999.
- 22.ITO, M. In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone-filling paste. **Biomaterials**, 12: 41-45, 1991.
- 23.ITO, M. et al. effect of hydroxyapatite content on physical properties and connective tissue reactions to a chitosan-hydroxyapatite composite membrane. **J Biomed Mater Res** 45: 204-8, 1999.
- 24.ITOH, S. et al. Developments of an artificial vertebral body using a novel biomaterial hydroxyapatite / collagen composite. **Biomaterials**, 23: 3919-3926, 2002.
- 25.ITOH, S. et al. Implantation study of a novel hydroxyapatite / collagen composite into weight-bearing sites of dogs. **Int J Biomed Mat Res**, 63: 507-15, 2002.
- 26.JOHNSON, K.A. et al. Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts crosslinked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation. **Biomaterials**, 20: 1003-15, 1999.

- 27.KAYAIGA, R.; MILLER, W.V.; GUDINO, M.D.L. Tissue transplant transmitted infections. **Transfusion**, 31: 277-84, 1991.
- 28.KIKUCHI, M. et al. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite / collagen nanocomposites synthesised in vitro and its biological reaction in vivo. **Biomaterials**, 22: 1705- 11, 2001.
- 29.KIM, H.M. Bioactive ceramics: challenges and perspectives. **J Ceram Soc Jpn**; 109: S49-57, 2001.
- 30.KIM, H.M. Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 7: 289-299, 2003.
- 31.KITSUGI, T.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T. Analysis of A-W glass-ceramic surface by micro-beam X-ray diffraction. **J Biomed Mater Res**, 24: 259-73, 1990.
- 32.KOKUBO, T.; KIM, H.M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, 24: 2161-75, 2003.
- 33.KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science** 6: 313-317, 2002.
- 34.KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, 24: 2339-2349, 2003.
- 35.KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & functional polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
- 36.KUSIAK, J.; ZINS, J.; WHITAKER, L. The early revascularization of membranous bone. **Plast reconstr Surg**, 76: 510-14, 1985.
- 37.LANGDON, S.E. et al. Biaxial mechanical / structural effects of equibiaxial strain during crosslinking of bovine pericardial xenograft material. **Biomaterials**, 20: 137-153, 1999.
- 38.LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, 260: 920-25, 1993.
- 39.LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int J Pharm**, 221:1-22, 2001.
- 40.LEGEROS, R.Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Adv Dent Res**, 2: 164-80, 1988.
- 41.MARTINS, V.C.A, GOISSIS, G., RIBEIRO, A C., MARCANTÔNIO JR, E., BET, M.R. The Controlled Release of Antibiotic by Hydroxyapatite: Anionic Collagen Composites. **Artificial Organs**, 22(3):215 -221, 1998

42.MARX, R.E.; SAUDERS, T.R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: FONSECA, R.J.; DAVIS, W.H. **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery**. Philadelphia, Saunders, p. 347-428, 1986.

43.MARX, R.E. The science of reconstruction. In: BELL, W.H. **Modern practice in orthognathic and reconstructive surgery**. Philadelphia: Saunders, p. 1449-1452, 1992.

44.MASTERS, D.H. Implants bone and bone substitutes. **Calif Dent Ass J**, 16(1): 56-65, 1988.

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

46.MEHLISCH, D.R.; LEIDER, A.S.; ROBERTS, W.E. Histologic evaluation of bone/ grafts interface after mandibular augmentation with hydroxyapatite/ purified fibrillar collagen composite implants. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 70 (6): 685-92, 1990.

47.MERKX, M.A.W. et al. Incorporation of three types of bone block implants in facial skeleton. **Biomaterials**, 20 (7): 639-47,1999.

48.MISCH, C.M. Ridge augmentation using mandibular ramus bone grafts for placement of dental implants: presentation of a technique. **Pract Periodontcs Aesthet Dent**, 8: 127-135, 1996.

49.MIYAMOTO, Y. et al. Basic properties of calcium phosphate cement containing atelocollagen in its liquid or powder phases. **Biomaterials**, 19: 707-15, 1998.

50.MUZZARELLI, R.A.A., et al. Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan in dental surgery. **Biomaterials**, 14: 39-43, 1993.

51.NAGAHARA, K. et al. Osteogenesis of hydroxyapatite and trcalcium phosphate used as bone substitute. **Int j Oral Maxillof Implants**, 7: 72-9, 1992.

52.NEO, M.; KOTAMI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T.; OHTSUKI, C. KOKUBO, T. A comparative study of ultrastructure of the interface between four kinds of surface active ceramic and bone. **J Biomed Mater Res**, 26: 1419-32, 1992.

53.NIMNI, M.E. Collagen, **Florida**, CRC, v.01, 1988, p. 3-23.

54.NABLO,B.J.; SCHOENFISCH, M.H. In Vitro cytotoxicity of nitic oxide-releasing sol-gel derived materials. **Biomaterials**, 26: 4405-4415, 2005.

55.OGAWA, C.A. **Compósitos Hidroxiapatita : Colágeno. Preparação, caracterização e estudos em liberação controlada de ciprofloxacina.**

Dissertação de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2002.

56.OHURA, K. et al. Bone-bonding ability of P_2O_5 – free $CaOSiO_2$ glasses. **J Biomed Mater Res**, 25: 1363-70, 1991.

57.OLIVEIRA, R.C. et al. Effect of deproteinization temperature on the preparation of microgranular bovine cortical bone. Microscopic and biochemical analysis in rat subcutaneous tissue. **Rev Fac Odontol Bauru**, 7 (3-4): 85-93, 1999.

58.OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre Streptococcus mutans**. Dissertação (Mestrado) Programa de pós-graduação Interunidades em Bioengenharia – São Carlos – Universidade de São Paulo.

59.OSAKA, A. et al. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. **J Mat Sci**, v. 2, p. 51-55, 1991.

60.PARK, J. **Biomaterials Science and Engineering**, Plenum Press, New York, 1984.

61.PULEO, D.A.; NANJI, A. Understanding and controlling the bone- implant interface. **Biomaterials**, 20: 2311-21, 1999.

62.RATHKE, T.D.; HUDSON, S.M. Review of chitin and chitosan as fiber and films formers. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v.C34, n.3, p.375-437, 1994.

63.RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics- Materials, Properties and Applications**. Chapman & Hall, 1992, 422 p.

64.REBEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Reviews. **Biomacromol**, v.4, n.6, p. 1457-1465, Nov/Dec 2003.

65.RIEGGER, C.L. Propriedades mecânicas do osso. In: GOULD, J.A. **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte**. São Paulo, Manole, cap. 03, p. 47, 1993.

66.ROBERTS, G. **Chitin Chemistry**. The Macmillan Press, 349p, 1992. London.

67.ROGERO, S. O., et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, 6 (3): 317-320, 2003.

68.ROGERO, S. O. et al, **Toxicology in vitro**, 14 (6): 497-504, 2000.

69.ROSEN, V.B.; HOBBS, L.W.; SPECTOR, M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. **Biomaterials**, 23: 921-28, 2002.

- 70.SASAKI, N.; SUDOH, Y. X-ray pole figure análise of apatite crystals and collagen molecules in bone. **Calcif Tissue Int**, 60 (4): 361-7, 1997.
- 71.SHAHIDI, F.; ARACHICHI, J.K.V.; JEON, Y-J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, v.10, p. 37-51, 1999.
- 72.SIGNINI, R. **Estudo de obtenção, purificação e caracterização de quitosana**. São Carlos, 1998. 110p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.
- 73.SMITH, J.W. Molecular pattern in native collagen. **Nature**, 219: 157-163, 1968.
- 74.SODEK, K.L.; TUPY, J.H.; SODEK, J.; GRYNPAS, M.D. Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. **Bone**, 26 (2): 189-98, 2000.
- 75.SPIEKERMANN, H. et al. **Implantology**. George Thieme Verlag, Stuttgart, cap. 01, p. 11, 1995.
- 76.SUNNY, M.C.; RAMESH, P.; VARMA, H.K. Microstructured microspheres of hydroxyapatite ceramics. **J Mater Sci Mater Med**, 13: 623-32, 2002.
- 77.TAGA, E.M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. **Rev Bras Cir Implantodontol**, 3: 30-9, 1996.
- 78.TANG, Z. et al. Nanostructured artificial nacre. *Nature Mater*, 2(6): 413-8, 2003.
- 79.TAYLOR, J.C. et al. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 17: 321-330, 2002.
- 80.TAYLOR, L.R.; PAPP, R.B.; POLLARD,B.D. **Instrumental Methods for Determining Elements**, New York, VCH Published, 1994.
- 81.TENHUISEN, K.S. et al. Formation and properties of a synthetic bone composite: hydroxyapatite/ collagen. **J Biomed Mat Res**, 29(7): 803-10, 1995.
- 82.TOMA, D. – **Obtenção e caracterização de compósito hidroxiapatita natural, colágeno e quitosana. Estudo preliminar de liberação de ciprofloxacina**. Monografia (Bacharelado em química)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2005, 44p.
- 83.TONHI, E. **Obtenção e caracterização de blendas colágeno:quitosana para utilização como biomaterial**. Dissertação de mestrado. Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo – 1999.

- 84.URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, 150 (698): 893-99, 1965.
- 85.VIDEAU, J. J.; DUPUIS, V. Phosphates and biomaterials. **Eur J State Inorg Chem**, v.28, n.1, p.303-343, 1991.
- 86.VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen**. London, Academic Press, v.01, 1980, p. 313-24.
- 87.WAN, A.C.A., KHOR,E., HASTINGS, G.W. Hydroxyapatite modified chitin as potential hard tissue substitute material. **J Biomed Mater Res** 38: 235-41, 1997.
- 88.WAN, A.C.A., KHOR,E., WONG, J.M., HASTINGS, G.W. Promotion of calcification on carboxymethylchitin discs. **Biomaterials** 17: 1529-34, 1996.
- 89.WANG, X, MA, J, WANG, Y, HE, B. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. **Biomaterials** 22: 2247-55, 2001.
- 90.WANG, X, MA, J, WANG, Y, HE, B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, 23: 4167-76, 2002.
- 91.WANG, X, MA, J., FENG, Q, CUI, F. Skeletal repair in rabbits with calcium phosphate cements incorporated phosphorylated chitin. **Biomaterials**, 23: 4591-4600, 2002.
- 92.WILLIAM, D.F. **Definitions in biomaterials**. New York, Elsevier, 61 p., 1987.
- 93.WHITE, R. A.; SHORS, E. C. Biomaterials aspects Interpore-200[®] porous hydroxyapatite. **Dent Clin Am**, v. 30, p. 40-67, 1986.
- 94.YOKOYAMA, A, et al. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. **Biomaterials**, 23: 1091-1101, 2002.
- 95.YOUNG, C. et al. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. **Int J Oral Maxillofac implants**, 14 (1): 72-76, 1999.
- 96.YUASA, T. et al, Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Biomaterials** 25: 1159-66, 2004.

ANEXO A

1. CARACTERIZAÇÃO.

O material usado neste trabalho foi caracterizado no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do IQSC/USP pela aluna Daniela Toma no seu trabalho de monografia de conclusão do curso de Bacharelado em Química (TOMA, D., 2005)

1.1. Hidroxiapatita

a) Difração de Raios-X

A difração de Raios-X da Han (Figura 118) mostra o mesmo padrão em relação a HA.

Figura 118: Espectro de difração de Raios-X de HAn.

Tabela 3. Valores de d para HAn obtida comparado com HA padrão.

HA [JCPDS9-0432]		HAn (obtida)	
I/lo	d	I/lo	d
100	2,814	100	2,812
60	2,720	68	2,712
60	2,778	56	2,774
40	3,440	41	3,431
40	1,841	39	1,840
30	1,943	32	1,943
25	2,631	28	2,627
20	2,262	28	2,260

b)Espectroscopia no Infravermelho (IV)

O espectro de absorção na região do IV de HAn mostra bandas características em 3568 e 634cm^{-1} (Figura 119) devido ao grupo OH^- e à 1095 , 1031 , 961 , 603 , 563cm^{-1} que são referentes a absorção do grupo PO_4^{3-} .

Figura 119: Espectro FT-IR de HAn.

c) Análise Termogravimétrica (TG)

A curva termogravimétrica obtida para a HAn bem como sua derivada (Figura 120) mostram perdas de 0,51% de massa relacionadas à água presente na HAn na faixa de 25 a 200°C e no intervalo de 200 a 400°C mostram a degradação de matéria orgânica ainda presente na HAn, da ordem de 0,48% e entre 400 a 700°C mostram que houve a carbonização de 0,45% do material, deixando um resíduo de 98,6%.

Figura 120: Curva termogravimétrica de HAn e sua respectiva derivada.

1.2. Colágeno

a) Liofilização

Amostras de colágeno de massa de aproximadamente de 2,0g foram liofilizadas até peso constante. A concentração de colágeno foi determinada pela média de duas determinações obtendo-se o valor de $1,08\% \pm 0,01$.

b) Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Espectro de absorção na região do IV de colágeno (Figura 121) mostra bandas em 1658 e 1550cm^{-1} , correspondentes à amidas I e II referentes a deformação axial $\text{C}=\text{O}$ e angular NH , a região entre $600\text{--}800\text{cm}^{-1}$ devido a deformação angular NH . A integridade da estrutura da hélice tripla da estrutura colagênica pode ser mostrada pelas relações de absorbância medida a 1235 e 1450cm^{-1} , relacionadas à amida III (estiramento C-N e deformação NH), e a ligação CH do anel pirrolidínico respectivamente e próximo a 3450 cm^{-1} , devido ao estiramento OH . Enquanto a primeira é sensível à presença de estrutura secundária do colágeno, a segunda independe da estrutura ordenada do tropocolágeno.

Figura 121: Espectro FT-IR do colágeno.

c) Análise Termogravimétrica (TG)

A curva termogravimétrica obtida para o colágeno bem como sua derivada (Figura 122) mostram perdas de $15,1\%$ de massa relacionadas à água presente no colágeno na faixa de 25 a 200°C e no intervalo de 200 a 400°C a degradação da estrutura colagênica da ordem de 42% e entre 400 a 700°C mostram que houve a carbonização de $41,8\%$ do material, deixando um resíduo de $0,09\%$.

Figura 122: Curva termogravimétrica de colágeno e sua respectiva derivada.

d) Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva DSC (Figura 123) mostra a transição térmica do colágeno em 41,6°C, indicando que durante a obtenção do colágeno não ocorreu a desnaturação da estrutura colagênica, pois para o material desnaturado não se observa a transição.

Figura 123: DSC do colágeno.

1.3. Quitosana

a) Espectroscopia no Infravermelho (IV)

O espectro de absorção na região do IV para a quitosana (Figura 124) mostra picos em: 1070 e 1030cm^{-1} devido ao estiramento CO, banda à 3450cm^{-1} devido ao estiramento OH, e 1314cm^{-1} ao grupo CON, 1650cm^{-1} , corresponde a amida I; 1560cm^{-1} , relacionada a amida II. A banda intensa entre 800 e 1200cm^{-1} refere-se aos anéis piranosídicos (HORN, 2005).

Figura 124: Espectro FT-IR de quitosana.

b) Análise Termogravimétrica (TG)

A curva termogravimétrica obtida para a quitosana bem como sua derivada (Figura 125) mostram perdas de 12,1% de massa relacionadas à água presente na quitosana na faixa de 25 a 200°C e no intervalo de 200 a 400°C mostram a degradação térmica das cadeias poliméricas da quitosana da ordem de 41,8% e entre 400 a 700°C mostram que houve a carbonização de 46,1% do material, não havendo resíduo.

Figura 125: Curva termogravimétrica de quitosana e sua respectiva derivada.

1.4. Mantas

a) Análise Termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas obtidas para as mantas bem como suas derivadas (Figura 126) mostram perdas de 2,1% de massa relacionadas à água presente na manta B1 e de 1,5% na manta B2 na faixa de 25 a 200°C, no intervalo de 200 a 400°C mostram a degradação de matéria orgânica ainda presente na manta da ordem de 3,5% para manta B1 e de 4,2% para manta B2 e entre 400 a 700°C mostram que houve a carbonização de 1,7% para a manta B1 e 2% para a manta B2 do material, deixando um resíduo de 92,2% para manta B2 e de 92,5% para manta B1. As perdas em temperaturas menores para a manta B1 é devido à presença de quitosana como caracterizado anteriormente.

Figura 126: Curvas termogravimétricas das manta B1 e B2 e suas respectivas derivadas.

b) Espectroscopia no Infravermelho (IV)

O espectro de absorção na região do IV da manta B2 (HAN:colágeno) mostra bandas características da HAN e outras referentes à estrutura colagênica, porém com intensidade menor entre $1700\text{-}1400\text{cm}^{-1}$. No caso da manta B1 (HAN:blenda) as mesmas bandas foram observadas, no entanto com um alargamento da banda na região de 3000cm^{-1} devido a presença de quitosana.

Figura 127: Espectro FT-IR da **manta B2**, colágeno e **HAn**.

Figura 128: Espectro FT-IR da **manta B1** e quitosana.

Ambos os espectros mostram bandas características dos materiais utilizados, mostrando que não foi obtido um novo material, mas apenas a mistura dos materiais devido à ausência de novas bandas e a preservação da intensidade e forma daquelas já existentes nos materiais isoladamente.

c)Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias com aumento de 200x para as mantas obtidas por MEV, (Figura 129) mostram partículas de HAn com dois tamanhos diferentes ($<0,2\text{mm}$ e entre $0,25$ e $1,18\text{mm}$) aglomeradas homogeneamente.

Figura 129: Micrografias obtidas por MEV para as mantas: B2(A) e B1(B).