



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Físico-Química

***Estudo da formação de fosfatos de cálcio pela
mineralização de matrizes de colágeno.***

Dissertação de Mestrado

Mestrando: Lauter José Marques Allegretti.

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

AL52e	<p>Allegretti, Lauter José Marques. Estudo da formação de fosfatos de cálcio pela mineralização de matrizes de colágeno / Lauter José Marques Allegretti. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Celso Aparecido Bertran.</p> <p style="text-align: center;">Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Hidroxiapatita. 2. Colágeno. 3. Mineralização. 4. Matriz óssea. I. Bertran, Celso Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Study of calcium phosphate precipitation by mineralization of collagen matrix

Palavras-chaves em inglês: Hydroxyapatite, Collagen, Mineralization, Bone matrix

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (orientador), Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Elizabete Yoshie Kawachi (IEFQ-ITA)

Data de defesa: 18/02/2009

*Este trabalho é dedicado com muito amor e carinho a **Alice** Xavier de Carvalho, minha irmã **Silmara**, minha querida **Iracema**, meus familiares e, em especial, aos meus queridos e amados pais, **Olinda e Lauter**, que se dedicaram durante toda a vida em função da criação e educação dos filhos. Muito obrigado!*

Agradecimentos

Um agradecimento mais que especial ao Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran, com quem aprendi muito mais do que Química e que, ao longo desses anos, se tornou muito mais que um orientador, sem desistir jamais de mim e desse trabalho. Muito Obrigado!

A Tica, pelo incentivo de sempre e pela ajuda a todo o tempo.

À minha irmã Silmara, pelo exemplo, dedicação, força e competência.

A todos os meus colegas e amigos das escolas, trabalho e em especial aos amigos do Lab: Dani (esquila), Helder, Gabi, João, Ju, Lucila, Thiago(s), Mara, Paulão, Sérgio e Stella.

A todos os técnicos do Instituto de Química da UNICAMP, cujas análises realizadas permitiram com que esse trabalho fosse realizado.

Aos amigos especiais: Ernestão, Flávia (Gorditcha), Gustavo (Cebola), Júlio, Combi, Renatão, Marcelleza, Chiquinho e Cesolda.

Ao Prof. Dr. José Ângelo Camilli e seus alunos.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho e seus alunos, pela grande ajuda com as extrações e informações sobre colágeno.

Ao Departamento de Parasitologia, que cedeu as caudas dos ratos e espaço para as extrações e centrifugações de colágeno.

Aos membros e suplentes da banca, pela disponibilidade e atenção.

Ao Instituto de Química que disponibiliza todas as condições necessárias para a formação e realização de pesquisa neste país.

Súmula Curricular

Formação:

Bacharel em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Conclusão – Dezembro/1998

Licenciado em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Conclusão – Dezembro/2002

Atividades Acadêmicas:

Iniciação Científica

Projeto: “Métodos de separação de corantes artificiais em cromatografia de camada delgada”.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luís Pires Valente.

Período: Junho/1997 – Dezembro/1998

Atividades Profissionais:

Professor de Química - Colégio Integral Campinas

Agosto de 1997 – Março de 2000

Abril de 2002 - Atualmente trabalhando

Professor de Química - Colégio Integral Paulínia

Abril de 2002 - Atualmente trabalhando

Assistente Pedagógico e Coordenador do

Curso pré-vestibular-Colégio Integral Campinas

Abril de 2002 - Março 2003

Professor de Química - Colégio e Curso Universitário Jundiaí

Fevereiro de 2003 - Dezembro de 2007

Professor de Química - Escola Salesiana São José - Campinas

Março de 2005 - Atualmente trabalhando

Congressos Científicos, Simpósios e Reuniões Científicas Nacionais:

- 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Poços de Caldas, MG
Maio de 2002.
- 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Salvador, BA - Maio
de 2004.
- XVI CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais -
Porto Alegre, RS – Novembro de 2004.

Congressos Científicos, Simpósios e Reuniões Científicas Internacionais:

- III COLAOB - Congresso Latino Americano de Biomateriais - Campinas, SP -
Julho de 2004.
- International Conference BIOMATERIALS IN REGENERATIVE MEDICINA-
Viena - Áustria - Outubro de 2006.
- 21st International Symposium of Ceramics in Medicine - Bioceramics 21 - Búzios
RJ - Outubro de 2008.

Artigos Publicados:

- Synthesis of Calcium Phosphate Nanoparticles in Collagen Medium
C. A. Bertran, L.J.M. Allegretti and S. Bertazzo
MACROMOLECULAR SYMPOSIA, (2007) Vol.253, p77-81
- The Effect of Collagen Matrix on Calcium Phosphate Mineralization
Allegretti L. J. M, Bertran C. A.
KEY ENGINEERING MATERIALS, (2009) Vol. 396-398 p195-198.

RESUMO

A matriz óssea é um nanocompósito formado basicamente de fosfato de cálcio (70% m) e colágeno (30% m), responsável pela resistência mecânica dos ossos, e, portanto, pela função mais importante do esqueleto. A perda de qualidade de vida que pode ser causada por enfermidades e traumas dos ossos aumenta a importância em estudar e compreender este material fantástico. O crescimento da expectativa de vida da população torna mais comum os problemas com os ossos. Desta forma, entendermos as características e propriedades dos ossos, ou seja, conhecê-las melhor, pode contribuir para a solução destes problemas.

Neste trabalho nos propusemos a estudar a influência de matrizes de colágeno tipo I no processo de mineralização de fosfato de cálcio no interior delas.

Pela permeação de vapor de amônia em soluções de colágeno em pH 2 contendo íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- , foram obtidos géis de colágeno que foram estruturados, simultaneamente com a formação de fosfato de cálcio em seu interior. Além do colágeno estruturado, sob condições especiais, foram obtidas fibras (fibrilogênese) de colágeno, mineralizadas pela precipitação de fosfato de cálcio.

Para avaliar a influência de uma matriz de colágeno anisotrópica sobre a organização das partículas de fosfato de cálcio, fibras *in natura* de colágeno foram parcialmente intumescidas em solução de íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- em pH 4,8 e mineralizadas pela permeação de amônia gasosa.

Os resultados deste trabalho mostraram que: matrizes de colágeno que sofrem estruturação simultaneamente com a formação de partículas de fosfato de cálcio alteram a morfologia destas partículas nucleadas e crescidas no seu interior. Quando a estruturação resulta em fibrilogênese, além da morfologia, observa-se um efeito de orientação sobre as partículas formadas.

O colágeno interage tanto com os íons cálcio dispersos no gel, antes da estruturação, como com as partículas de fosfato de cálcio, estabilizando o gel. A morfologia, cristalinidade e tamanho de cristalitos das partículas formadas nos géis estruturados são semelhantes às observadas para as partículas de fosfato de cálcio que constituem a matriz inorgânica dos ossos.

O método proposto para precipitação de fosfato de cálcio em meio à matriz de colágeno é inovador e tem potencial para produção de biomaterial sintético de boa qualidade em condições de assepsia, que apresenta similaridades com diversas propriedades observadas para a matriz óssea.

ABSTRACT

Bone matrix is a nanocomposite basically formed by calcium phosphate (70% wt) and collagen (30% wt), which is responsible for bone mechanical resistance, and therefore, for the most important function of the skeleton. The life quality loss that can be caused by diseases and injuries of bones increases the importance of studying and understanding this amazing material. With the growth of the population life expectancy the problems with bones become more common. Thus, to understand these diseases and to learn more about bone's characteristics may contribute to solving these problems.

In this work we have studied the influences of collagen matrices of type I in the mineralization of calcium phosphate within the collagen.

Through permeation of gaseous ammonia in the collagen solutions containing Ca^{2+} and H_2PO_4^- ions in pH 2, structured collagen gels were obtained, while the precipitation of calcium phosphate occurred inside the gels. Besides the collagen structured, under special conditions, collagen fibers (fibrilogenesis) were obtained while (simultaneously) calcium phosphate precipitation mineralized these fibers.

To assess the influence of an anisotropic collagen matrix on the organization of particles of calcium phosphate, collagen fibers *in natura* were partially solubilized after soaked in a solution with Ca^{2+} and H_2PO_4^- ions, in pH 4.8 and mineralization was carried out by adsorption of gaseous ammonia.

The results of this study showed that the collagen matrix that undergoes structure organization while (simultaneously) calcium phosphate particles are formed changes the morphology of the particles nucleated and grown inside the matrix. When the structure results in fibrilogenesis, besides the morphology, there is an orientation effect on the formed particles.

The collagen interacts with both calcium ions dispersed in the gel, before the structuring, and the particles of calcium phosphate, stabilizing the gel. The morphology, crystallinity and particle size of crystallites formed in structured gels are similar to the calcium phosphate particles observed, which are present in the inorganic matrix of bone.

The proposed method for precipitation of calcium phosphate in the middle / within of the collagen matrix is innovative and has the potential to produce good quality synthetic biomaterial in conditions of asepsis, which has similarities with several properties observed for the bone matrix.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	xiii
Índice de Tabelas	xiv
Índice de Figuras	xv
1.1 Introdução	1
1.2. Os Ossos	4
1.2.1. Componentes celulares do tecido ósseo e osteogênese.	5
1.2.2. Componentes da matriz óssea.	6
1.2.2.1. Colágeno.	6
1.2.2.2. Síntese de colágeno.	10
1.2.2.3. Fase óssea inorgânica.	11
1.3. Formação de Matriz Óssea – Biomineralização.	12
2. Objetivos	16
3. Equipamentos, Materiais e Reagentes Utilizados	17
3.1. Equipamentos.	17
3.2. Materiais e Reagentes.	17
4. Procedimentos Experimentais	18
4.1. Extração do colágeno.	18
4.2. Precipitação de fosfato de cálcio na matriz de colágeno.	19
4.2.1. Precipitação de fosfato de cálcio em colágeno não dialisado.	19
4.2.2. Precipitação de fosfato de cálcio em colágeno dialisado.	21
4.2.3. Precipitação de fosfato de cálcio pela permeação de amônia em colágeno contido dentro do saco de diálise.	24
4.3. Precipitação de fosfato de cálcio sobre feixes (tendões) de colágeno <i>in natura</i> .	25
4.4. Eliminação da matriz protéica para determinação das características das partículas de fosfato de cálcio.	27
4.4.1. Tratamento dos materiais com papaína	27
4.4.2. Tratamento com hidrazina	27
4.5. Composição e determinação da razão Ca/P para amostras de fosfatos de cálcio precipitados na matriz de colágeno.	29

4.6. Técnicas e métodos de caracterização dos materiais.	29
4.6.1. Difração de raios-X (DRX).	29
4.6.2. Espectroscopia de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP/OES).	30
4.6.3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV).	31
4.6.4. Microscopia ótica utilizando polarizadores de luz e máquina fotográfica Nikon FDX-35.	32
4.6.5. Espectroscopia na região do infravermelho (IV).	32
4.6.6. Calorimetria de Varredura Diferencial – DSC.	32
5. Resultados e Discussões	33
5.1. Colágeno estruturado, fibrilogenese e precipitação de fosfato de cálcio.	33
5.2. Estruturação de soluções de colágeno simultaneamente com a precipitação de fosfato de cálcio. A Influência na morfologia das partículas.	34
5.2.1. Estruturação do colágeno pela permeação de vapor de amônia.	34
5.2.2. Formação de partículas de fosfato de cálcio em géis de colágeno estruturado. O efeito da concentração de colágeno.	35
5.2.3. Formação de partículas em géis com diferentes concentrações de colágeno dialisado.	38
5.3. Tratamento do gel de colágeno.	41
5.3.1. Partículas formadas no gel de colágeno após tratamento com papaína.	41
5.3.2. Partículas formadas no gel de colágeno após tratamento com hidrazina.	43
5.4. Partículas formadas em diferentes concentrações de géis de colágeno dialisado e isoladas após sedimentação dos cristais.	47
5.5. Partículas de fosfato de cálcio precipitadas em géis de colágeno contidos no saco de diálise.	53
5.5.1. Partículas formadas pela precipitação de fosfato de cálcio dentro do saco de diálise, em pH próximo de 2.	53
5.5.2. Partículas formadas pela precipitação de fosfato de cálcio dentro do saco de diálise, em pH próximo de 5.	54
5.6. Precipitação de fosfato de cálcio em feixes de fibras (tendões) de colágeno.	57

5.7. Cristalinidade e Composição.	61
5.8. Determinação do tamanho médio de partícula.	64
5.9. Composição.	66
5.10. Interação fosfato-colágeno: espectros no infravermelho.	67
5.11. Fosfatos de cálcio: espectros no infravermelho.	69
5.12. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).	71
5.13. Considerações Finais.	72
6. Conclusões	74
7. Referências Bibliográficas	75

LISTA DE ABREVIATURAS

- HAp: Hidroxiapatita
- MEC: matriz extracelular
- NCP: (do inglês) proteínas não colaginosas
- cos: cosseno
- SBF: (do inglês) fluido corpóreo simulado
- M: unidade de concentração: número de mols de soluto por litro de solução
- Gly: aminoácido Glicina
- Pro: aminoácido prolina
- Leu: aminoácido leucina
- Arg: aminoácido arginina
- Hyp: aminoácido hidroxiprolina
- Asp: aminoácido ácido aspártico
- Ala: aminoácido alanina
- Lys: aminoácido lisina
- nm: nanômetro e m: micrômetro
- rpm: rotações por minuto e g: unidade de força gravitacional
- FTIR: (do inglês) espectroscopia na região do infravermelho, com transformada de - Fourier
- MeV: microscopia eletrônica de varredura
- DRX: difratometria de raios-X
- DSC: (do inglês) calorimetria diferencial de varredura
- EDS: (do inglês) espectroscopia de energia dispersiva
- ICP/OES: (do inglês) Espectroscopia de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado
- Ca/P: razão cálcio fósforo
- IV: infravermelho
- ATR: (do inglês) refletância total atenuada
- DCPD: fosfato dicálcio dihidratado (bruxita)
- OCP: fosfato octacálcio
- TCP: fosfato tricálcio

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Amostras de materiais em diversas situações de precipitação, analisadas por microscopia eletrônica de varredura.	31
Tabela 2: Tamanhos aproximados de cristalitos dos fosfatos de cálcio sintéticos e da fase óssea inorgânica, obtidos por Debye-Scherrer.	65
Tabela 3: Valores de concentração relativos de cálcio e fósforo obtidos pela técnica de ICP/OES para amostras de materiais obtidos pela precipitação de fosfato de cálcio em meio à matriz de colágeno por permeação de vapor de amônia.	66
Tabela 4: Atribuição das bandas dos espectros no Infravermelho.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Seqüência de aminoácidos presente nas fibras de colágeno (A) e representação da tripla-hélice da molécula de colágeno (B).	7
Figura 2: Diagrama esquemático de arranjo das moléculas que promove o aparecimento da estrutura estriada, visível ao microscópio eletrônico. Cada seta representa uma molécula de colágeno em tripla hélice.	9
Figura 3: Representação da seqüência de acontecimentos que representam a síntese de colágeno.	11
Figura 4: Fluxograma representativo da extração e obtenção do colágeno tipo I.	19
Figura 5: Desenho esquemático do sistema de precipitação de fosfato de cálcio.	20
Figura 6: Fluxograma representativo da seqüência de precipitação de fosfato de cálcio em colágeno não dialisado e precipitação sem colágeno (branco).	21
Figura 7: Fluxograma representativo da seqüência de precipitação de fosfato de cálcio em colágeno dialisado.	23
Figura 8: Desenho esquemático do sistema de precipitação de fosfato de cálcio após diálise.	24
Figura 9: Desenho esquemático do sistema de precipitação dentro do saco de diálise.	25
Figura 10: Fluxograma representativo da seqüência de precipitação de fosfato de cálcio em fibras de colágeno.	26
Figura 11: Fluxograma representativo da seqüência de procedimentos para tratamento e eliminação da matriz protéica.	28
Figura 12: (A) micrografia de colágeno estruturado (0,05g/mL) obtido pela permeação de vapor de amônia. (B) representa ampliação de outra região de (A).	34
Figura 13: Micrografias de partículas de fosfato de cálcio precipitadas em colágeno sem diálise. (A) com concentração 0,05g/mL de colágeno, (B) micrografia de mapeamento de cálcio de (A). (C) e (D) micrografias das partículas precipitadas na concentração de 0,15g/mL de colágeno.	37
Figura 14: Partículas de fosfato de cálcio precipitado por permeação de amônia sobre solução iônica de Ca^{2+} e H_2PO_4^- , na ausência de colágeno (A) e mapeamento de cálcio das partículas (B).	38

Figura 15: Micrografias das partículas de fosfato de cálcio em meio ao colágeno após precipitação pela permeação de amônia. (A) 0,10g/mL de colágeno e (B) ampliação de (A). (C) 0,15g/mL de colágeno e (D) ampliação de outra região da (C) com partículas (pontos mais claros) de fosfato de cálcio em meio à matriz de colágeno.	39
Figura 16: (A) EDS da região da Figura 15 ^a e (B) EDS da região da Figura 15C, respectivamente.	41
Figura 17: Micrografia das partículas de fosfato de cálcio do material globular de colágeno após tratamento com papaína.	42
Figura 18: Micrografias do material globular obtido pela ação de vapor de amônia sobre a matriz de colágeno dialisado, após tratamento com hidrazina. Aglomerados de fosfato de cálcio em meio a matriz de colágeno com seqüência crescente de desproteínação com hidrazina. (A) e (B) sob tratamento com hidrazina por 30min. (C) e (D) sob tratamento com hidrazina durante 12 horas. (E), (F), (G) e (H), apresentam partículas expostas após tratamento prolongado com hidrazina e aquecimento.	46
Figura 19: Espectro de EDS referente às micrografias mostradas na Figura 18.	46
Figura 20: Micrografias das partículas de fosfato de cálcio obtidas após sedimentação em meio a matriz de colágeno. (A) e (B) com concentração de 0,025 g/mL, (C) e (D) com concentração de 0,05 g/mL e (E) a (H) com concentração de 0,10g/mL.	50
Figura 21: Espectros de EDS referentes às micrografias mostradas nas Figuras 20A, 20C e 20E, respectivamente.	51
Figura 22: Micrografia (A) das partículas de fosfato de cálcio e (B) e (C) são, respectivamente, os mapeamentos de Ca e P das partículas na mesma região da Amostra.	52
Figura 23: Partículas de fosfato de cálcio precipitadas pela permeação de amônia em soluções contidas dentro do saco de diálise. (A), solução na presença de colágeno e (B), solução na ausência de colágeno.	54
Figura 24: (A) representa micrografia de fibras de colágeno mineralizadas com aglomerados de fosfato de cálcio. (B) representa micrografia eletrônica das fibras de colágeno junto ao fosfato de cálcio no modo “point-and-shoot”.	56

Figura 25: Espectros de EDS no modo “point-and-shoot”. Os três espectros são os mais representativos; cujos pontos são 3, 4 e 5, respectivamente.	56
Figura 26: Micrografias de fibras de colágeno e fosfato de cálcio formado ao longo das fibras.	57
Figura 27: Micrografia ótica dos materiais de colágeno. (A) para a solução de colágeno e (B) solução após diálise e fibrilogênese e (C) para o tendão (feixe) de colágeno <i>in natura</i> .	58
Figura 28: Micrografia ótica para a fibra de colágeno parcialmente intumescida pela ação da solução contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} em pH 4,8, após permeação de vapor de amônia.	59
Figura 29: Micrografias de fibra de colágeno e fosfato de cálcio precipitado. (A) representa a fibra e (B) representa o mapeamento de cálcio na fibra.	60
Figura 30: Difractogramas de raios-X para os géis de colágeno; géis de colágeno sob ação de vapor de amônia; géis de colágeno contendo fosfato de cálcio e fosfato de cálcio sem colágeno.	62
Figura 31: Difractogramas de raios-X para os fosfatos de cálcio de ossos do crânio e fêmur de rato, fosfato após tratamento com papaína, fosfato cálcio após tratamento com hidrazina, fosfato de cálcio sedimentado.	64
Figura 32: Difractograma de raios-X dos fosfatos de cálcio precipitados em colágeno após tratamento com hidrazina e fase mineral óssea.	65
Figura 33: Espectro no infravermelho dos géis de colágeno e géis de colágeno na presença de Ca^{2+} e PO_4^{3-} (FT-IR).	67
Figura 34: Ampliação do espectro no infravermelho da Figura 33.	68
Figura 35: Espectros no IV da fase óssea inorgânica de crânio e fêmur de ratos e do fosfato de cálcio precipitado após tratamento com hidrazina.	69
Figura 36: DSC: (A) Colágeno estruturado e (B) Colágeno mineralizado com fosfato de cálcio.	72

1 - Introdução.

Fosfatos de cálcio são provavelmente uma das substâncias inorgânicas mais estudadas no mundo, pois estão presentes em muitos compostos como: fertilizantes, medicamentos e, especialmente, por serem essenciais para a vida dos vertebrados, constituindo a matriz inorgânica dos ossos.

Não há dúvida de que a relevância principal dos fosfatos de cálcio é compor a matriz inorgânica do composto que forma a matriz óssea, responsável pela estrutura do esqueleto dos vertebrados.

A descoberta da composição da parte inorgânica dos tecidos duros formadores dos ossos, feita por De Jong em 1926, contribuiu para desencadear o crescimento do estudo sobre fosfatos de cálcio e a maneira como são produzidos nos sistemas biológicos. ^[1 e 2]

O organismo dos vertebrados produz tecidos (bio) mineralizados, como ossos e dentes que apresentam propriedades mecânicas e funcionalidades estruturais específicas e ilustram a beleza e complexidade dos materiais biológicos ^[3].

No caso específico dos ossos e dentes, os tecidos biomineralizados são considerados como biocompósitos e nanocompósitos, uma vez que os componentes estão em escala nanométrica e são produzidos por organismos vivos, formados por uma matriz organizada de colágeno, impregnada (mineralizada) com cristais de fosfato de cálcio orientados sobre ela. ^[4,5,6,7]

Infelizmente, os vertebrados, e em particular o Homem, são suscetíveis a apresentarem problemas de várias naturezas com relação à estrutura da matriz óssea. Traumas, fraturas, acidentes e doenças (osteoporose como a mais conhecida), causam danos graves à matriz dos ossos e prejudicam seriamente a qualidade de vida das vítimas em qualquer período da vida. ^[2]

Com isso, o estudo dos fosfatos de cálcio, do colágeno e da biomineralização se torna de fato, alvo de interesse da comunidade científica, já que estes materiais formam a base da matriz óssea e conhecê-los melhor pode

contribuir para a solução destes problemas pela substituição e reconstituição óssea ^[4].

Como se não bastasse, nos últimos anos o número de casos envolvendo enfermidades com o tecido ósseo aumentou por motivos diversos, mas que estão associados à vida moderna nas grandes cidades e ao aumento da expectativa de vida da população em todo o mundo. ^[2] Juntamente com os problemas, cresce o número de cirurgias de implantes totais ou parciais, usando as técnicas disponíveis e bem sucedidas ^[8], por outro lado, cresce também, a procura por novas terapias envolvendo o tratamento ósseo.

Não há dados estatísticos no Brasil, mas a título de contextualização, apenas nos Estados Unidos e Europa, estima-se que 500 mil casos de cirurgias, envolvendo colocação de próteses e reparos na estrutura óssea, realizadas em 2005, das quais em média 15% usaram material sintético. No ano de 2002, o mercado de próteses ósseas vendeu aproximadamente 1,16 milhões de dólares, com cifras que dobraram até 2006. ^[4] Estima-se que, anualmente, são realizadas mais de dois milhões de cirurgias ortopédicas, nas quais se colhe material de algum outro lugar do corpo, o que chamamos de substituição autóloga (auto-enxerto). ^[8]

Em função das dificuldades na obtenção de fontes naturais abundantes, seguras e menos invasivas ou traumáticas (auto-enxerto) para material de implante, surgiu como grande opção a partir de 1960-1970 a utilização e produção mais efetiva de materiais sintéticos de qualidade para tal finalidade. ^[4, 8]

Dentre as tentativas mais recentes e com certo sucesso, foram usados diversos materiais: cronologicamente, metálicos, cerâmicos, poliméricos, híbridos de materiais orgânicos/metálicos e compósitos Inorgânicos/orgânicos.

Atualmente, há uma busca mais intensa voltada à utilização de materiais que unam mais propriedades desejadas para a substituição óssea. ^[4] Propriedades como funcionalidade adequada, biocompatibilidade, osteointegração, osteocondução, osteoindução e possivelmente regeneração óssea. Neste foco estão os estudos sobre engenharia de tecidos. ^[4]

Um trabalho de revisão extenso e informativo em biomateriais baseados em hidroxiapatita sugere que o nanocompósito HAp/Colágeno é provavelmente o sistema com a maior potencialidade para substituição óssea ou terapias regenerativas. [9]

As características que resultam nesta potencialidade são a biocompatibilidade, a bioatividade, a similaridade química com a HAp, além da associação do colágeno, que aumenta a similaridade química e estrutural do compósito com os ossos e o torna ainda mais osteocondutivo, biocompatível, biodegradável, não tóxico e de baixa imunogenicidade, fatos que, por si só, já justificam as pesquisas e a exploração do nanocompósito HAp/Colágeno. [10, 11]

O objetivo desta Dissertação não foi o de preparar ou trabalhar com enxertos e substitutos ósseos e sim com o processo de mineralização da matriz de colágeno com fosfato de cálcio.

A maior parte dos trabalhos sobre mineralização de colágeno deseja apenas preparar um material com propriedades de substituinte da matriz óssea. Pouco se faz para entender os mecanismos de mineralização da matriz. Os materiais preparados são em grande maioria uma mistura de um pó de HAp e colágeno dissolvido ou fibroso, formando uma pasta que pode ser usada em ensaios *in vivo*.

Também se prepara, com grande freqüência, misturas de uma solução contendo íons PO_4^{3-} e uma contendo íons Ca^{2+} em meio básico, que se difundem por lados opostos através de membranas ou géis de colágeno e precipitam após alguns dias, por estarem em situação de supersaturação. [12]

Muitos trabalhos recorrem a métodos de precipitação em sistemas heterogêneos. Sabe-se que para enxertos ósseos, é necessária uma mineralização homogênea. [10]

O primeiro procedimento que tentou uma precipitação mais homogênea foi realizado por Bradt et al [10] que dissolveu o colágeno em meio ácido contendo íons Ca^{2+} e, em outra solução, íons PO_4^{3-} na presença de solução tamponada. Ao misturar a solução tamponada à solução ácida, a precipitação ocorre enquanto o pH da solução resultante sobe lentamente.

No trabalho que realizamos e que constitui o corpo desta dissertação de Mestrado, a precipitação ocorre de maneira ainda mais homogênea. Dissolvemos o colágeno em solução ácida, contendo íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- e lentamente elevamos o pH através da permeação com amônia gasosa. A grande diferença entre os demais métodos refere-se ao processo como um todo. Além de precipitar fosfato de cálcio em colágeno, estamos induzindo um processo de estruturação do colágeno e/ou formação de fibras (fibrilogênese), simultaneamente à formação dos cristais e conseqüente mineralização da matriz.

Foram estudadas basicamente duas situações: em uma das precipitações, o colágeno se estrutura pela elevação do pH e os cristais se formam simultaneamente à estruturação. Na outra situação, em condição de neutralização, o colágeno forma fibras, também se estrutura e simultaneamente os cristais se formam. Nestes processos de estruturação o colágeno provavelmente perde água de hidratação, perde carga pela neutralização protônica, perde ligações de hidrogênio entre água-colágeno e as troca por ligações colágeno-colágeno.

Este trabalho não tem como objetivo estudar osso, mas sim usar os conhecimentos sobre eles, como subsídios para comparações com o estudo de processos de mineralização do colágeno com fosfato de cálcio *in vitro*. Como a mineralização é um fenômeno que resulta, de alguma maneira, na matriz óssea, será apresentado a seguir um resumo tratando de osso, células do tecido ósseo e constituição da matriz óssea.

1.2 - Os Ossos.

Sabe-se que o osso é considerado um tecido conectivo complexo e muito especializado, exemplo único de tecido dinâmico, que é capaz de se auto-regenerar e se remodelar por toda a vida e sem deixar cicatrizes.^[4]

Em relação à composição dos ossos, sabe-se que são formados por células, uma matriz orgânica extra celular (MEC) e uma matriz inorgânica mineralizando a MEC.^[13]

A matriz extracelular é formada majoritariamente por colágeno tipo I, que representa aproximadamente 30% da massa dos ossos, enquanto a matriz inorgânica é formada por uma apatita (hidroxiapatita biológica), semelhante a este composto mineral e que corresponde aos 70% da massa restante.^[14]

Formados por materiais que, ao longo do processo evolutivo, foram otimizados pela presença da matriz de colágeno, os ossos apresentam grande resistência mecânica, com a menor massa. A resistência mecânica está associada a certa flexibilidade e resistência à tensão e isso garante uma performance muito especial. A hidroxiapatita é responsável pela resistência e dureza, enquanto a flexibilidade é função do colágeno, no entanto, as propriedades são cooperativas.
[4, 7, 15, 16]

Em relação à sua funcionalidade, os ossos promovem sustentação estrutural ao esqueleto e proteção a alguns órgãos essenciais (pulmão, coração e cérebro), servem também como reservatório mineral, que são trocados com o fluido biológico, assim como, esta função está relacionada aos processos de formação e regeneração do tecido ósseo^[4, 16]

1.2.1 - Componentes celulares do tecido ósseo e osteogênese.

Ao nível biológico, os componentes celulares dos ossos são essenciais para ativação e controle do metabolismo ósseo. A formação do tecido é acompanhada pela ação multicelular sincronizada. Existem alguns tipos de células ósseas, associadas à formação do tecido, as células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as “bone-lining cells”.^[17, 18]

Ossos, assim como outros tecidos conectivos em embriões, são derivados de células mesenquimais, que apresentam a capacidade de se dividirem em células ósseas, conhecidas como células osteoprogenitoras. Os osteoblastos são responsáveis pela formação de novos ossos, que começam por secretar colágeno e depois os recobrem com as “non collagen proteins” (NCP) que apresentam

habilidades especiais de “segurar” minerais (principalmente Ca^{2+} e PO_4^{3-}) da corrente sangüínea e do próprio osteoblasto, promovendo a formação óssea.^[4]

Os osteoclastos são células maduras derivadas dos osteoblastos e são encontradas na superfície dos ossos ou próximos dela. São responsáveis pela reabsorção óssea, que ocorre com uso de ácidos ou enzimas para dissolver os minerais e também o colágeno do osso maduro. Os osteócitos são células localizadas em cavidades no interior da matriz mineralizada e controlam a atividade celular. “Bone-lining cells” são responsáveis pelo controle da entrada e saída de minerais através do tecido ósseo. Essas células são conjuntamente responsáveis pela construção da matriz óssea, auto-organização hierárquica, manutenção e remodelamento. Todos esses processos necessitam estar em equilíbrio para garantir a saúde dos ossos. ^[17, 18]

1.2.2 - Componentes da matriz óssea.

1.2.2.1 - Colágeno.

O colágeno é a proteína estrutural básica do reino animal e corresponde a 25% do total de proteínas nos mamíferos e ocorre em todos os organismos multicelulares, sendo extracelular e organizada em fibras insolúveis, com grande resistência a tensão. Esta característica propicia ao colágeno estar presente em praticamente todos os tecidos, principalmente aqueles que exigem maior resistência estrutural como ossos, dentes, cartilagens, tendões, ligamentos e a matriz fibrosa da pele e/ou vasos sangüíneos. ^[15, 19, 20]

Sua estrutura é composta por três cadeias proteicas, denominadas α , que em 95% de sua massa estão arranjadas em tripla-hélice. Em poucos casos, o colágeno pode apresentar estrutura β -pregueada, como nos olhos e nos tecidos de girinos ^[5]. Sob aquecimento (acima de 42°C), pressão ou após grandes variações de pH, o colágeno sofre desnaturação e perde a estrutura molecular tri-helicoidal. ^[20]

Existem vários tipos de colágeno, sendo o tipo I o mais abundante, constituindo 90% do colágeno do corpo. [4, 20]

As moléculas de colágeno apresentam aproximadamente 1000 aminoácidos, 338 repetições de trincas, sendo que cada cadeia apresenta seqüências monótonas de aminoácidos (Gly-X-Y), como mostrada na Figura 1A. Esta seqüência permite a conformação tri-helicoidal das moléculas (Figura 1B), já que a glicina é o menor aminoácido existente, e isso possibilita o encaixe entre as três cadeias, estando a glicina sempre voltada para dentro do eixo da hélice, pois não há espaço para as cadeias laterais de nenhum outro aminoácido [15, 19, 21].

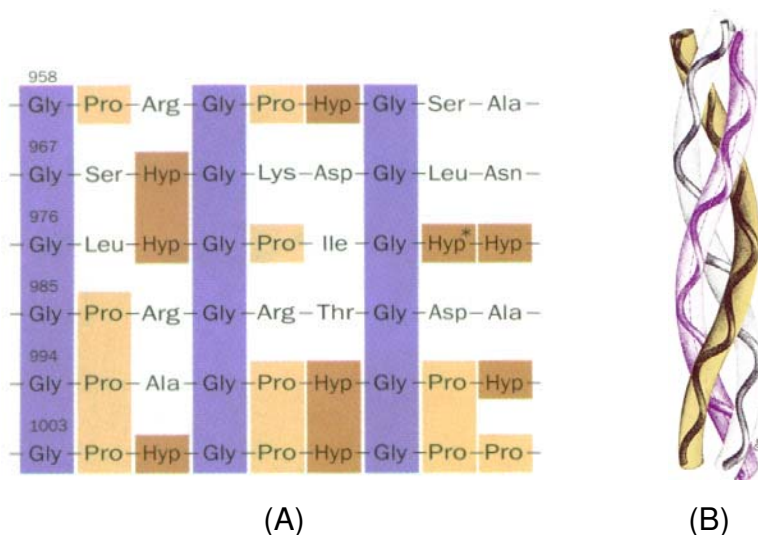


Figura 1 - Seqüência de aminoácidos presente nas fibras de colágeno (A) e representação da tripla-hélice da molécula de colágeno (B). [15]

Prolina e hidroxiprolina (pouco comuns em outras proteínas) são outros aminoácidos abundantes (20%) e estruturalmente importantes para a estabilização tri-helicoidal [15, 19]. A estrutura helicoidal baseada em três hélices não co-axiais é estabilizada por pontes de hidrogênio intra e intercadeias entre os polipeptídios. A hidroxiprolina provavelmente confere maior estabilização ao colágeno, formando pontes de hidrogênio intramoleculares que envolvem moléculas de água. [15, 19]

Outra forma de estabilização se faz quando a cada trinca de aminoácidos, temos a glicina fazendo ponte do N - H terminal com o oxigênio do resíduo X da cadeia vizinha ^[4]. As moléculas de colágeno apresentam 280-300nm de comprimento e 1,23-1,5nm de largura ^[1, 19, 22]. Estas moléculas se auto-organizam de maneira especial, assim como representado na Figura 2 e formam as fibrilas que podem ser vistas ao microscópio eletrônico. Por sua vez, as fibrilas se organizam em fibras que apresentam 50nm de espessura e podem ser visualizadas em microscópio óptico. As uniões de fibras formam os feixes ou fascículos que são vistos a olho nu. ^[19]

Em função da complexidade da auto-organização das fibras, foram estudados ensaios *in vitro relacionados* à reconstrução do arranjo das moléculas de colágeno dissolvida em solução ácida. Sob condições apropriadas nas quais ocorre à neutralização da solução, as moléculas de colágeno lentamente perdem as cargas positivas fruto da desprotonação e começam a organizar as fibras. O sistema é muito sensível e a reprodutibilidade é baixa. Caso os fatores físico-químicos não estejam ajustados, principalmente a velocidade da neutralização, as moléculas de colágeno não se auto-organizarão e apresentarão arranjos desordenados e aleatórios. ^[20]

Os fatores cinéticos parecem ser muito importantes durante a formação das fibras de colágeno. Pensando na mineralização do colágeno para formação da matriz óssea e no fato de que a matriz de colágeno supostamente atua como molde da precipitação de fosfato de cálcio, essa matriz precisa se organizar antes da mineralização das fibras de colágeno. ^[10, 20]

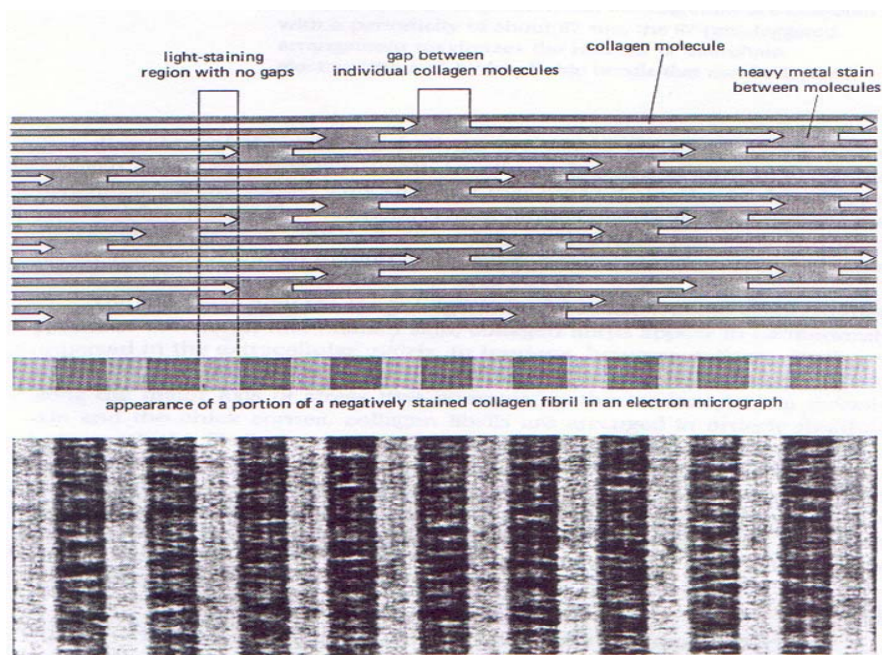


Figura 2 - Diagrama esquemático de arranjo das moléculas que promove o aparecimento da estrutura estriada, visível ao microscópio eletrônico. Cada seta representa uma molécula de colágeno em tripla hélice.

Ainda com relação à estabilidade, as cadeias laterais apresentam aminoácidos ácidos em pequena quantidade, representados pelos ácidos glutâmico e ácido aspártico ^[10], que também ajudam a estabilização da estrutura do colágeno através de interações entre seus carboxilatos e os grupos amino de outras proteínas ^[15].

Alguns grupos de pesquisa atribuem aos amino ácidos das cadeias laterais uma importância ímpar para a mineralização óssea e exploram de várias maneiras a presença dessas cadeias laterais de aminoácidos para tentar respostas mais definitivas na seqüência de acontecimentos que explicam a mineralização da matriz óssea. ^[4, 10, 11, 23, 24] Com intenção de contribuir com esse entendimento, conhecer a síntese do colágeno, possivelmente elucidará o processo de mineralização.

1.2.2.2 - Síntese de colágeno.

A síntese do colágeno, representada de forma esquemática a seguir (Figura 3), ocorre dentro das células, assim como as demais moléculas por elas secretadas, mais especificamente nos ribossomos associados ao retículo endoplasmático. No caso da formação da matriz óssea, a principal célula responsável é o osteoblasto, nos demais tecidos, os fibroblastos. ^[19]

À medida que a síntese da cadeia de aminoácidos acontece, várias modificações vão ocorrendo, como reações de hidroxilação da prolina e lisina. Ao mesmo tempo, as cadeias denominadas α associam-se, dando origem à estrutura trimérica do procolágeno. Assim que a molécula de procolágeno esteja no espaço extracelular, reações especiais clivam terminações, permitindo que se formem as moléculas de colágeno, ocorram às ligações cruzadas entre elas e sua estruturação e auto-ordenamento ocorram naturalmente.

A associação das moléculas obedece a uma seqüência estabelecida pela própria composição das cadeias alfa (α), que no caso do colágeno tipo I é $(\alpha 1)_2 \alpha 2$. As moléculas de colágeno se ordenam e formam na seqüência: microfibrilas, fibrilas, fibras e finalmente feixes (tendões). ^[19]

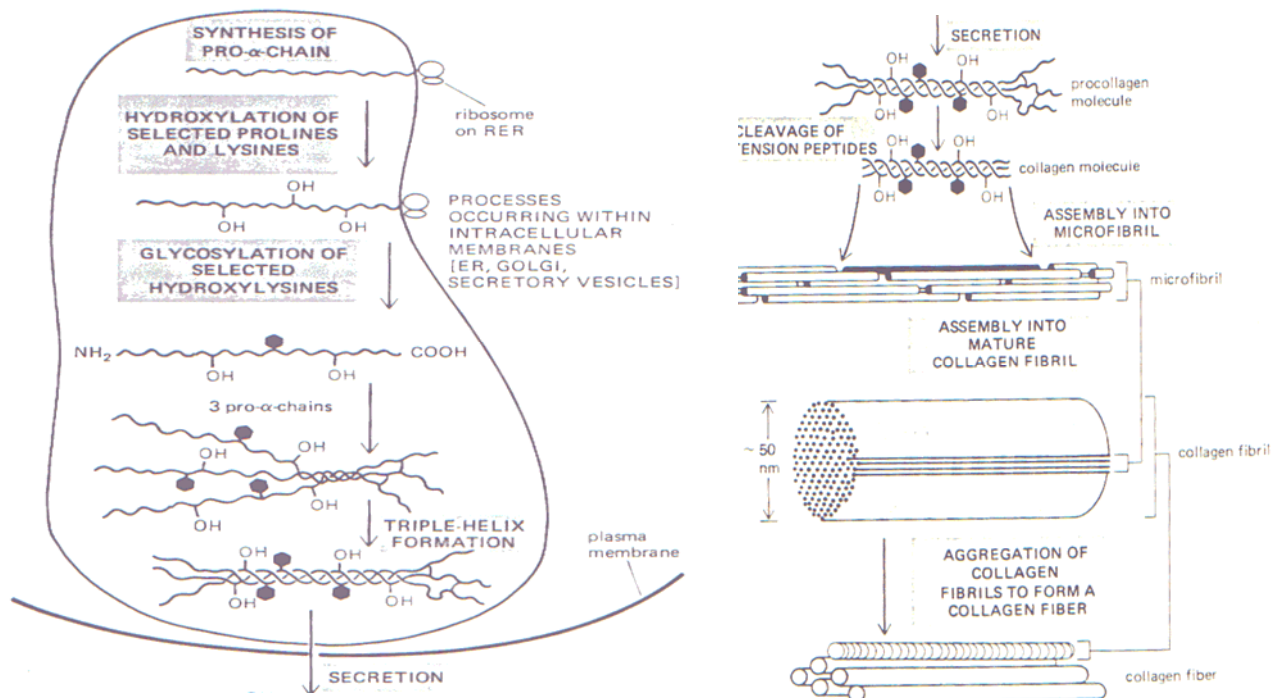


Figura 3 – Representação da seqüência de acontecimentos que representam a síntese de colágeno. [19]

1.2.2.3 - Fase óssea inorgânica.

A HAp compõe a fase sólida inorgânica e representa aproximadamente 5% da massa corporal de um indivíduo adulto [25]. De Jong, como dissemos anteriormente, foi o primeiro a observar a semelhança nos padrões de difração de raios-X entre os ossos e a hidroxiapatita, em 1926 [1, 2].

Apesar do conhecimento atual, a fase mineral dos ossos ainda não foi completamente compreendida. A HAp biológica não apresenta estequiometria muito bem definida, além de mostrar variações de solubilidade e cristalinidade durante os processos de maturação e envelhecimento do tecido ósseo. [4] Sua estrutura cristalina e razão Ca/P são muito semelhantes às da HAp mineral - $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, mas apresentam substituições de íons Na^+ , Mg^{2+} , especialmente CO_3^{2-} , citratos e, em menores quantidades, F^- , Cl^- e K^+ . [26]

As modificações e substituições interferem na performance dos ossos e mudam suas características, como solubilidade e resistência mecânica. Considerando apenas os elementos principais e os defeitos de vacâncias iônicas, podemos representar a composição da fase mineral como:

$\text{Ca}_{8,3-x}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{OH},\text{CO}_3)_{0,3-x}$, em que x representa uma vacância. [27]

Estudos relativos à matriz inorgânica são realmente muito importantes e mostram que na fase de mineralização óssea os cristais de fosfato de cálcio apresentam baixa cristalinidade devida, provavelmente, à pequena dimensão dos cristalitos e a presença de defeitos. [2, 14]

Durante a maturação, os cristais apresentam tamanhos variados (ainda muito reduzidos), aumento progressivo na razão Ca/P e diminuição da solubilidade. Alguns intermediários formados durante a maturação óssea se assemelham ao fosfato dicálcio dihidratado ou brushita (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Ca/P=1,00), ao fosfato octacálcio (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Ca/P=1,33) e ao fosfato tricálcio (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca/P=1,50). No fim do processo de maturação, a fase mineral é majoritariamente semelhante à forma cristalina do fosfato mais estável termodinamicamente, representado pela hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, Ca/P =1,67), cuja estrutura também apresenta defeitos e deficiência em cálcio, como já foi dito anteriormente [21, 28]. Para tentarmos entender melhor a formação da matriz óssea, que passa pela mineralização, devem-se fazer algumas considerações sobre sua formação.

1.3 - Formação de Matriz óssea – Biomineralização.

O mecanismo de biomineralização dos ossos ainda não foi elucidado e permanece pobremente entendido devido a sua alta complexidade, mesmo com os avanços em biociência. [4]

A formação óssea é motivo de estudo há muitos anos [24]. Pode-se dizer que o estudo da biomineralização iniciou com a invenção do microscópio.

Tecidos biomineralizados foram um dos materiais examinados por van Leeuwenhoek e seu microscópio ^[24]. Biomineralização é um campo que foi construído para entendimento de estruturas, da fase mineral, das várias macromoléculas que formam o arcabouço onde os minerais são formados e, particularmente, das interfaces que ligam as duas partes. ^[24]

A mineralização de colágeno *in vitro* apresenta grande interesse para entendimento dos mecanismos que as governam *in vivo*, assim como é importante para o desenvolvimento de métodos que mimetizem os sistemas biológicos e permitam a síntese de materiais para enxertos ou substituintes ósseos que apresentem alguns diferenciais em relação aos materiais de implante que já são utilizados, os quais apresentam algumas limitações, como diferenças na composição, performance e na estrutura em relação aos ossos naturais. ^[4, 10]

Uma das hipóteses iniciais mais simplificadas para a formação da matriz óssea assemelha-se, em muitos aspectos, à formação de sólidos inorgânicos por precipitação a partir de uma solução supersaturada. Os sólidos inorgânicos em soluções aquosas têm uma formação que segue alguns passos físico-químicos fundamentais: supersaturação, nucleação e crescimento do cristal ou maturação. ^[3]

Apenas esta primeira hipótese, atualmente, é improvável, pois sabidamente os materiais preparados em solução são morfologicamente e funcionalmente muito diferentes dos materiais produzidos biologicamente. Sabemos que em soluções saturadas, cristais nucleiam e crescem, mas isso não ocorre necessariamente *in vivo*. ^[24] O estudo de minerais em biologia e o produto desses processos têm produzido surpresas segundo Olszta et al ^[29], sendo que uma delas foi detectada ao perceber que a fase cristalina de vários biominerais não foi obtida diretamente a partir da solução supersaturada, mas sim de uma fase transitória como precursora que subsequente se transforma na fase madura. ^[24]

Curiosamente, a biologia parece ter escolhido outra seqüência para formar seus materiais: formam uma fase coloidal desordenada e instável, que depois sofre nucleação e crescimento. Essas observações foram feitas primeiramente em rádulas (“dentes”) de moluscos, passando por espículas de equinodermos e,

finalmente Olszta et al ^[29], evidenciou *in vitro* que colágeno mineraliza após a formação de uma fase amorfa de fosfato de cálcio, sugerindo a existência dessa fase precursora, também nos vertebrados. Onde exatamente essa fase é formada, ainda não se sabe. ^[24, 29, 30]

Em função da complexidade dos processos de produção de materiais biológicos, uma seqüência cada vez mais elaborada de informações se propõe a explicar o fenômeno da osteogênese.

Sabe-se que nos ossos, os cristais que se tornarão HA biológica são nucleados e crescidos sobre as fibras de colágeno em orientações preferenciais através da deposição de íons encontrados no fluido biológico. Isso significa que existe uma interação química especial entre as fibras de colágeno e a HAp ^[1, 3, 10, 14, 22, 31, 32, 33], informação que interessa muito a este trabalho.

Na literatura, é muito difundida a idéia de que, preferencialmente, o eixo-c da hidroxiapatita se orienta paralelamente ao eixo longitudinal das fibras proteicas, posicionando-se majoritariamente nos vazios delas ^[1, 6]. No entanto, não há dados que comprovem a presença de HAp apenas nesses vazios e sim ao longo de toda a fibra e entre elas ^[6].

Acredita-se, portanto, que o elemento essencial para o controle biológico da mineralização óssea se dê pela localização e confinamento espacial que ocorrem, na maioria das vezes, associados à presença das macromoléculas de proteínas. ^[10]

Como grande diferencial aos processos *in vitro*, foi proposto recentemente que a mineralização *in vivo* seja controlada por algumas proteínas encontradas nos ossos, as "noncollagen proteins" (NCP) ^[10, 22]. Esta matriz de macromoléculas não colagínica estaria envolvida no controle da nucleação e crescimento da fase mineral ^[34]

Complementarmente, reporta-se que a formação óssea acontece em alguns estágios: crescimento do molde de colágeno, formação e organização das "noncollagen proteins"(NCP) e, finalmente, cristalização organizada de fosfato de cálcio ^[22].

A hipótese mais recente propõe que os cristais de fosfato de cálcio não estão ligados diretamente ao colágeno e sim intermediados pelas “noncollagen proteins”. As NCP correspondem a aproximadamente 3-5% da massa dos ossos, o que promove sítios ativos para a biomineralização e para o ancoramento celular. A biomineralização se inicia tipicamente dez dias após a matriz orgânica ser formada. [4]

Finalmente, com relação à estabilidade do compósito, a associação física entre os constituintes orgânicos e inorgânicos dos ossos tem sido atribuída, em parte, às interações eletrostáticas interfaciais. Esta interação é devida à forte afinidade de adsorção entre a hidroxiapatita e a fase orgânica. Essa adsorção envolve interações eletrostáticas entre sítios catiônicos do mineral (cálcio) e domínios aniônicos da proteína (principalmente grupos carboxilatos). Outros tipos de interação também estão associados ao mecanismo de formação dos compósitos orgânico/HAp, como forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas [10]. As forças hidrofóbicas são responsáveis por grande parte da estabilização de proteínas, inclusive do colágeno [7, 15]. Já que estamos nos reportando à mineralização, é importante pensarmos no sistema HAp e colágeno como simulação simplificada da mineralização.

2 - Objetivos

Este trabalho tem como objetivo estudar a influência de uma matriz de colágeno tipo I (estruturado em glóbulos ou organizado em fibras) no processo de mineralização e formação simultânea de partículas de fosfatos de cálcio, assim como investigar as interações entre as partículas de fosfato de cálcio e a matriz de colágeno.

3 - Equipamentos, Materiais e Reagentes Utilizados.

3.1 - Equipamentos.

- Banho Termostático - Dubnoff - Quimis
- Difratorômetro Shimadzu DRX- 6000.
- Centrífuga refrigerada Beckman 2-21.
- Espectrofotômetro FT-IR Nicolet 520 e Bomen da série MB-100
- Espectrômetro de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido Optima 3000 DV (ICP-OES).
- JSM6360 – LV – Noran System Six (EDS).
- Metalizador Bal-Tec Med 020
- Microscópio Eletrônico de Varredura – Jeol-jsm T-300 e Jeol-jsm 6283-LV.
- Microscópio Ótico: Nikon Eclipse E800, utilizando polarizadores de luz e máquina fotográfica Nikon FDX-35.
- Universal V2.3C TA instruments (DSC).

3.2 - Materiais e Reagentes

- Caudas congeladas de ratos *Wistar* (fonte de colágeno Tipo I)
- Fase óssea inorgânica de ratos *Wistar* desproteinada.
- Sacos de diálise – InLab
- KH_2PO_4 e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – Synth
- HCl – Nuclear P.A.
- Hidrazina – Aldrich 60%
- Etanol absoluto – Synth
- NH_4OH – Merck
- NaCl – Mallinckrodt.
- H_3PO_4 – Synth P.A.
- Ácido Acético Glacial - Synth
- HNO_3 – Synth
- Tampão fosfato pH 7,5
- Isopropanol – Merck

4 - Procedimentos Experimentais.

4.1 - Extração do colágeno.

Colágeno tipo I foi obtido a partir de caudas congeladas de rato *Wistar*, fornecidas pelo CEMIB da UNICAMP. A pele foi retirada através de um corte longitudinal, expondo os feixes (tendões) de colágeno junto ao tecido interno, que foram retirados. O colágeno foi lavado em água destilada e dissolvido em solução de ácido acético 3% (0,5M). Após dois dias sob refrigeração, a solução ácida estava muito viscosa e apresentava impurezas formadas por restos de tecidos, pequenos vasos e outras proteínas insolúveis em ácido acético. [35]

A solução foi filtrada sob vácuo, para a eliminação das impurezas utilizando-se um funil de Büchner e um tecido de algodão com trama não muito fina, como filtro. À solução filtrada foi adicionado igual volume de solução de NaCl (1,4M) sob agitação, ocorrendo precipitação de colágeno.

Em seguida, a mistura com colágeno foi centrifugada sob refrigeração à temperatura máxima de 10°C e velocidade de 7.500 rpm (10.400g). O sobrenadante foi descartado, água destilada foi adicionada ao material precipitado e centrifugou-se novamente. Como resultado, foi obtida uma massa branca e compacta de colágeno tipo I. Pequenas alterações na velocidade de centrifugação não alteram as características do colágeno precipitado. O colágeno tipo I, obtido segundo este procedimento, não apresenta terminações com ligações cruzadas em grande quantidade e apresenta grande parte da proteína em tripla-hélice [15, 19, 35].

Além da massa de colágeno, obtido segundo o procedimento descrito acima, foi utilizado também em alguns experimentos (item 4.3), feixes de fibras retirados *in natura*.

Para resumir os procedimentos, a seguir está representado na Figura 4 um fluxograma desta parte experimental.

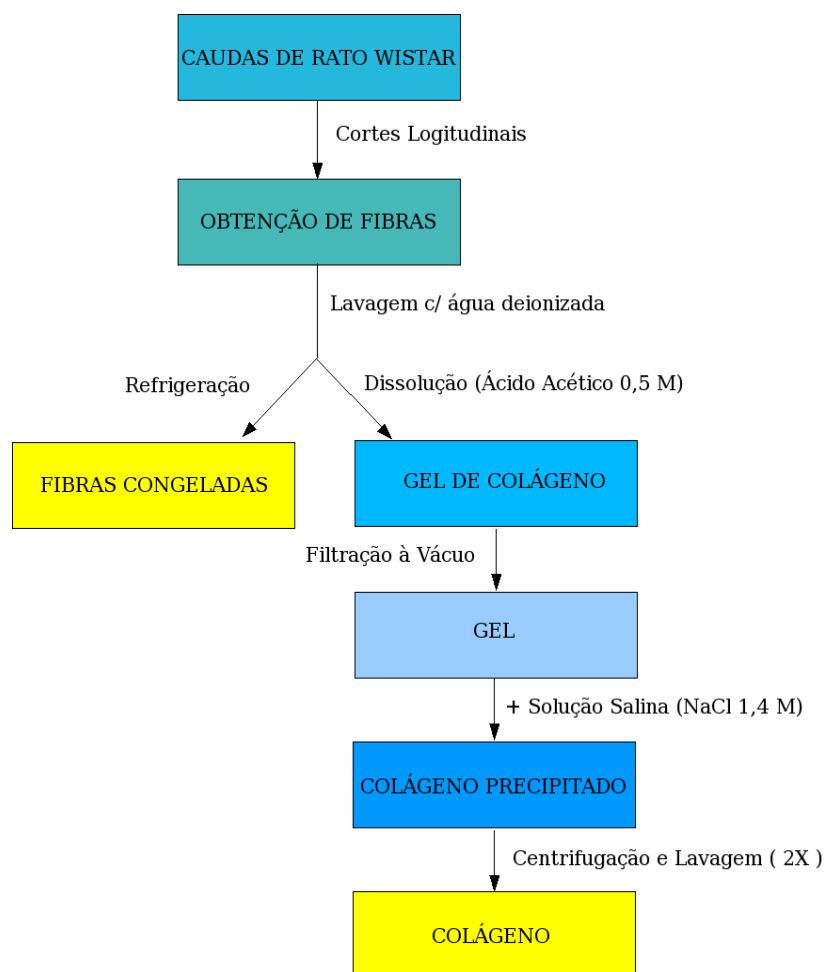


Figura 4 - Fluxograma representativo da extração e obtenção do colágeno tipo I.

4.2 - Precipitação de Fosfato de Cálcio na matriz de colágeno.

4.2.1 - Precipitação de fosfato de cálcio em colágeno não dialisado.

Soluções de colágeno foram preparadas em concentrações entre 0,025 e 0,15 g/mL, pela dissolução de colágeno em solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KH_2PO_4 e H_3PO_4 em pH 2. A solução foi preparada pela dissolução de $2,5 \times 10^{-2}$ mol de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1×10^{-1} mol de H_3PO_4 e $4,74 \times 10^{-3}$ mol de KH_2PO_4 em 1L de água deionizada, sob refrigeração a 10°C . Dessa forma, a $[\text{Ca}^{2+}] = 2,50 \times 10^{-2}$ mol/L e $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 1,47 \times 10^{-2}$

mol/L, ou seja, razão molar $\text{Ca/P} \cong 1,7$. Durante todo o trabalho, os experimentos realizados sempre usaram a mesma concentração da solução iônica acima. Houve apenas algumas adaptações, KH_2PO_4 foi substituído por $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e o pH em alguns sistemas foi ajustado pela adição de NH_4OH .

O fosfato de cálcio foi precipitado pela elevação do pH através da permeação por difusão de vapor de amônia até pH 10. Para realizar a permeação de maneira controlada, usou-se uma camisa térmica acoplada ao banho térmico (37°C) e sempre um volume constante de hidróxido de amônio gotejado na parede da camisa antes do fechamento do sistema. O frasco contendo o gel para precipitação era previamente termostaticado antes que a base fosse adicionada. Com a adição da base, ocorre a vaporização de amônia, que permeia o gel e promove aumento de pH durante sua difusão pelo meio. Para ilustrar mais claramente o sistema de precipitação, está representado a seguir (Figura 5) um desenho esquemático na presença de equações simplificadas que exemplificam a estruturação do colágeno e a precipitação simultânea de fosfato de cálcio.

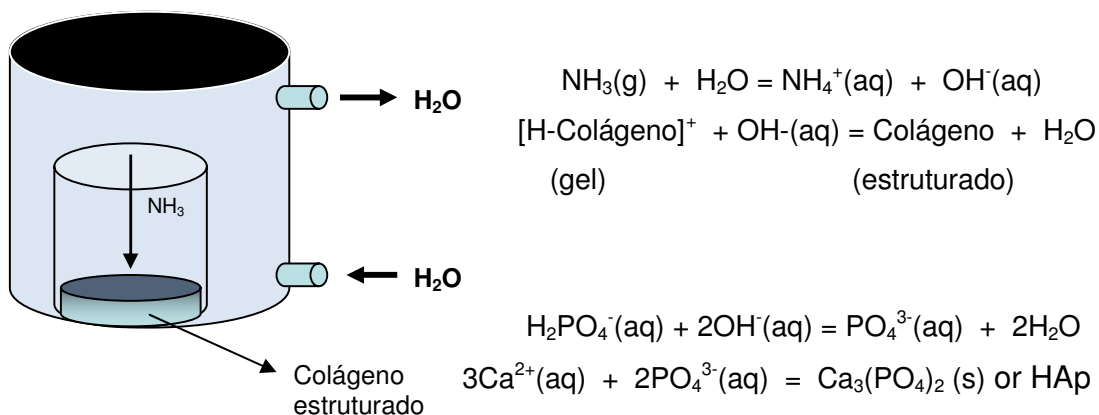


Figura 5 – Desenho esquemático do sistema de precipitação de fosfato de cálcio.

Para efeito de comparação foram realizadas precipitações semelhantes, mas na ausência de colágeno, ou seja, apenas a solução iônica contendo apenas H_3PO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e KH_2PO_4 , em pH 2 e razão $\text{Ca/P} \cong 1,7$ que foram submetidas à difusão de vapor de amônia, de maneira semelhante, até pH próximo de 10. Para resumir os procedimentos, a seguir, está representado na Figura 6 um fluxograma desta parte experimental.

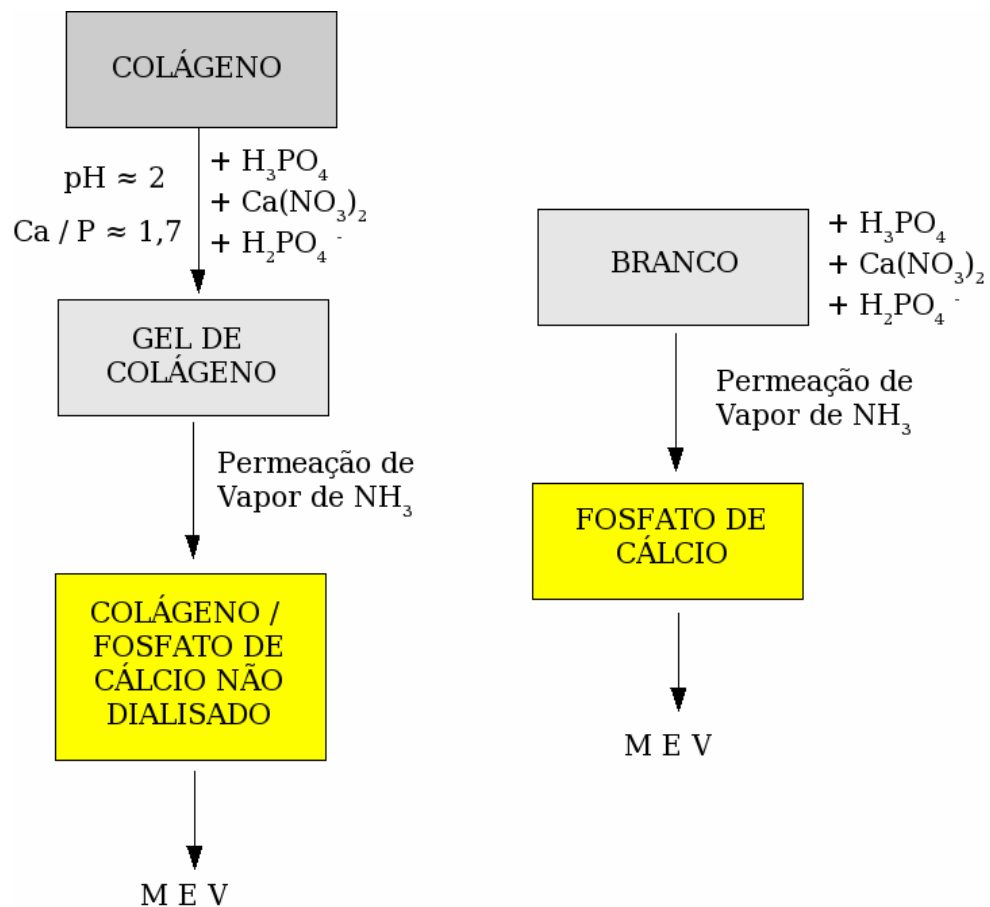


Figura 6 - Fluxograma representativo da seqüência de precipitação de fosfato de cálcio em colágeno não dialisado e precipitação sem colágeno (branco).

4.2.2 - Precipitação de fosfato de cálcio em colágeno dialisado.

Apesar das etapas de centrifugação e lavagem realizadas na separação do colágeno a partir das fibras extraídas de caudas de rato, o procedimento foi insuficiente para eliminar todo cloreto de sódio da matriz protéica. Para eliminação do NaCl restante, o colágeno foi dialisado em solução ácida de H_3PO_4 em pH 2 [35].

A solução de colágeno foi preparada nas concentrações descritas no procedimento anterior, dissolvendo-o na solução iônica de Ca^{2+} H_2PO_4^- e razão

molar $\text{Ca/P} = 1,7$, em seguida foi feita a diálise do gel de colágeno a 4°C , duas vezes contra solução ácida de H_3PO_4 em pH 2 (24h, duas trocas).

Para mudar a concentração do colágeno (0,025 a 0,150 g/mL), foram alterados os volumes iniciais das soluções iônicas que dissolviam o colágeno antes de introduzi-lo no saco de diálise.

Após a diálise contra a solução ácida, que retira as impurezas como também os íons de interesse, é necessário incluir novamente os íons Ca^{2+} e os íons H_2PO_4^- .

Com o colágeno dialisado e bem intumescido dentro do saco de diálise, trocou-se a solução externa ao saco de diálise pela solução de $[\text{Ca}^{2+}] = 2,50 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ e $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 1,47 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ e razão molar $\text{Ca/P} \cong 1,7$ usada na preparação do item 4.2.1, mantendo-se a diálise por 24h. Repetiu-se a troca da solução iônica por mais duas vezes a cada 12h. Com a diálise, foi feita a difusão dos íons Ca^{2+} e os íons H_2PO_4^- para o gel de colágeno contido no saco de diálise.

Nesta etapa, substituiu-se o KH_2PO_4 , que é um sal básico, por $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ que é praticamente neutro e com isso, após permeação de amônia há apenas íons NH_4^+ e NO_3^- em solução, além do fosfato de cálcio precipitado. Enfim, após dois dias de diálise, o gel de colágeno formado no saco de diálise foi retirado, submetido ao processo de permeação de vapor de amônia por difusão, analogamente ao processo de precipitação do item 4.2.1. Na Figura 8 está representado o sistema de precipitação usado.

Nota-se que em alguns casos (mais diluídos em colágeno), após as precipitações, as partículas formadas em meio ao colágeno sofrem sedimentação e aglomeração. As sedimentações em alguns casos são perceptíveis em função da mineralização da matriz de colágeno ser feita em sistema sem agitação e isso tem como vantagem a clara visualização do processo de separação das partículas caso ele ocorra.

Foi realizada também a estruturação apenas do colágeno dialisado apenas com as soluções contendo os íons fosfatos, mas na ausência de íons cálcio pela elevação do pH próximo de 10, por permeação de vapor de amônia. Este gel, sem íons cálcio, foi preparado pela dissolução do colágeno e diálise em meio ácido de H_3PO_4 em pH 2, exatamente como as demais preparações de géis, mas não

houve diálise contra a solução íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- . Este experimento teve como objetivo avaliar a ação da variação do pH apenas sobre a matriz de colágeno.

Obs: Durante os procedimentos que envolveram a formação do gel de colágeno nos sacos de diálise, o saco de diálise foi fechado por presilhas usadas em sistema de diálise, de forma que, o volume interno fosse controlado. O controle do volume do saco de diálise permitiu desta maneira preparar géis com concentração de colágeno conhecida.

Para resumir os procedimentos, a seguir, está representado na Figura 7 um fluxograma desta parte experimental.

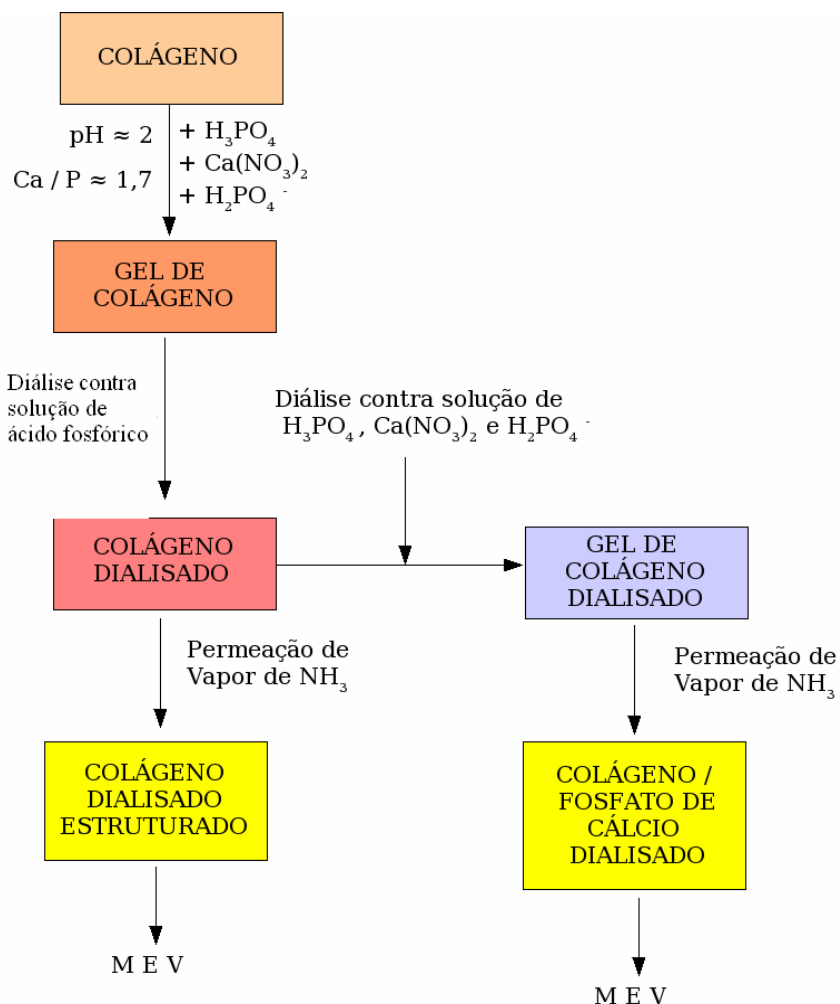


Figura 7 - Fluxograma representativo da seqüência de precipitação de fosfato de cálcio em colágeno dialisado.

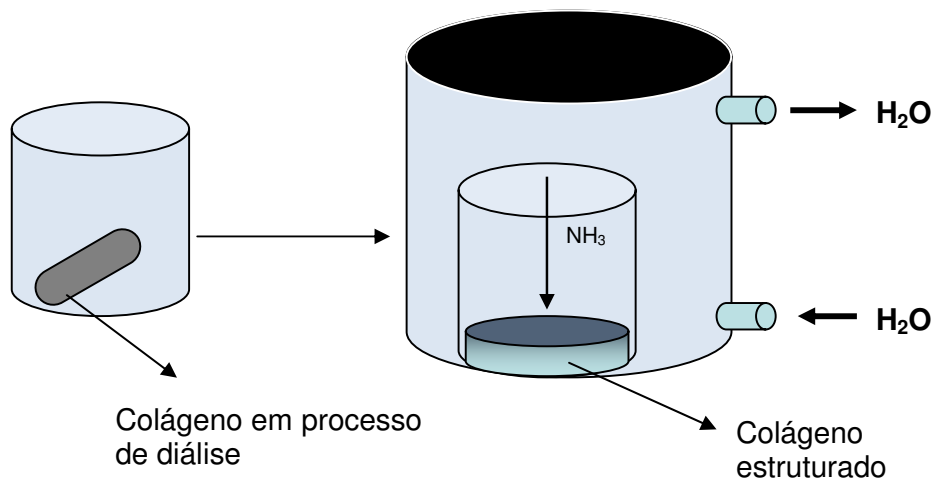


Figura 8 - Desenho esquemático do sistema de precipitação de fosfato de cálcio após diálise.

4.2.3 - Precipitação de fosfato de cálcio pela permeação de amônia em gel colágeno contido dentro do saco de diálise.

Com intenção de induzir uma precipitação ainda mais homogênea e possivelmente mais lenta, algumas precipitações foram feitas pela permeação de vapor de amônia através do próprio saco de diálise contendo o gel de colágeno. Todo o processo de solubilização do colágeno, até preparação do compósito foi feita mais rapidamente, sem manuseio do colágeno e sem perda de material.

Duas situações distintas de diálise foram realizadas:

- Diálise contra solução ácida de H_3PO_4 , seguida de diálise contra a solução de nitrato de cálcio e fosfato diácido de amônio em pH 2.
- Diálise contra solução ácida de H_3PO_4 , seguida de diálise contra a solução de nitrato de cálcio e fosfato diácido de amônio parcialmente neutralizada em $pH \cong 5$, sem precipitação de fosfato de cálcio. O PH foi ajustado com adição de NH_4OH a solução iônica de pH 2.

Ao invés de retirarmos o colágeno do saco de diálise, idêntico ao procedimento 4.2.2, optou-se por precipitar o fosfato de cálcio dentro dele. O saco de diálise contendo o gel foi retirado da solução de diálise, lavado com água deionizada e

colocado na camisa térmica para a precipitação por permeação com amônia. Após termostatização, fez-se a permeação de amônia. A Figura 9 representa o sistema de precipitação usado.

Para avaliarmos o efeito do material preparado no saco de diálise, algumas precipitações foram feitas apenas com a solução de Ca/P, mas na ausência de colágeno.

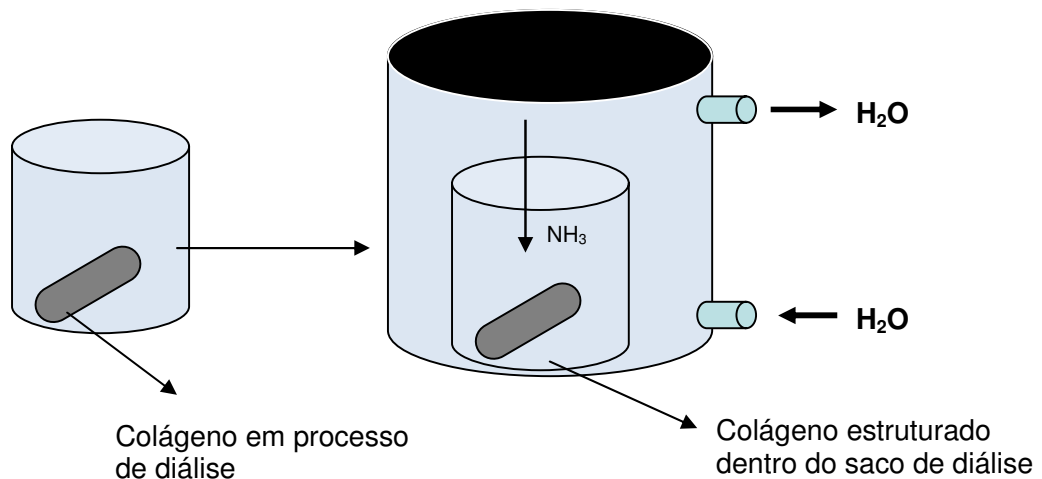


Figura 9 - Desenho esquemático do sistema de precipitação dentro do saco de diálise.

4.3 - Precipitação de fosfato de cálcio sobre feixes (tendões) de colágeno *in natura*.

Sobre fibras de colágeno extraídas de ratos *Wistar* do item 4.1, foi adicionada a solução preparada de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, e $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ e H_3PO_4 na mesma concentração de $[\text{Ca}^{2+}] = 2,5 \times 10^{-2} \text{ M}$ e $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 1,47 \times 10^{-2} \text{ M}$, mas em pH 4,8, na mesma razão $\text{Ca/P} = 1,7$. A mudança de pH foi realizada apenas ajustando-o com adição de NH_4OH .

As fibras ficaram embebidas nessa solução por um dia, sofrendo certo intumescimento, resultado da desespiralização parcial do tendão ^[19, 20] e possível parte da capa externa tenha se dissolvido na solução. Posteriormente as fibras foram lavadas com água deionizada e com o auxílio de uma tesoura, cerca de

1cm da fibra foi cortada e posicionada em uma lâmina de microscópio ótico (MO). Outra parte da fibra com aproximadamente 0,5cm foi posicionada sobre um porta-amostra de microscópio eletrônico (MeV). As duas partes da fibra foram submetidas ao processo de permeação de vapor de amônia dentro da camisa térmica a 37°C, elevando o pH até próximo de 10 de maneira análoga aos procedimentos anteriores. As amostras preparadas foram respectivamente analisadas por MO (luz polarizada) e MeV. Para resumir os procedimentos, a seguir, está representado na Figura 10, um fluxograma desta parte experimental.

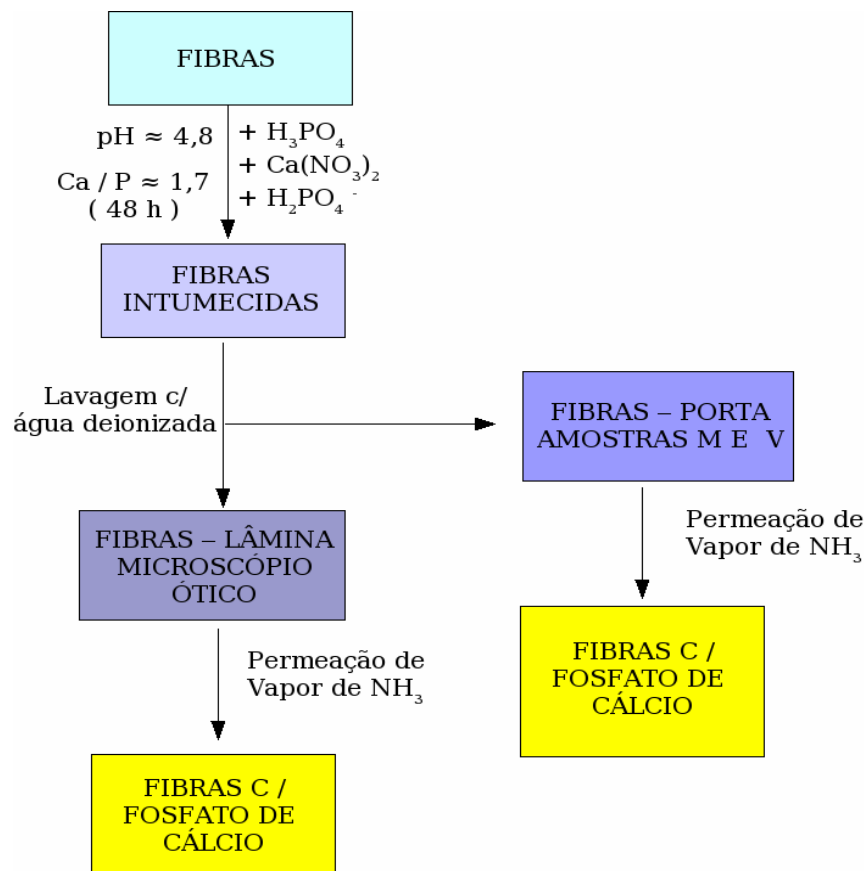


Figura 10 - Fluxograma representativo da seqüência de precipitação de fosfato de cálcio em fibras de colágeno.

4.4 - Eliminação da matriz protéica para determinação das características das partículas de fosfato de cálcio

4.4.1 - Tratamento dos materiais com papaína.

Os compósitos de fosfato/colágeno obtidos a partir da exposição dos géis de colágeno dialisado ao vapor de amônia, foram tratados com 20mg de papaína em pó, na presença de um tampão de fosfato pH 7,5, a 20°C , por duas horas.

4.4.2 - Tratamento com Hidrazina.

Os compósitos de fosfato/colágeno obtidos a partir da exposição dos géis de colágeno dialisado ao vapor de amônia, também foram tratados com Hidrazina. Inicialmente o compósito fosfato/colágeno foi tratado com 1mL de hidrato de hidrazina (60%), pelo período de 12 horas a 20°C. Após a retirada do líquido restante, a amostra foi tratada sucessivamente com 1mL de hidrazina por mais seis dias consecutivos e com trocas diárias da hidrazina, sob aquecimento a 60°C. Após tratamento com hidrazina, as amostras foram lavadas com etanol 96% em meio básico (NH₄OH), centrifugadas durante vinte minutos a 3500rpm (892g), descartando-se o sobrenadante.

A amostra foi ressuspendida em etanol e centrifugada. Ao final do processo, a amostra foi lavada mais duas vezes com etanol 96% para eliminar a hidrazina. Para preparação de amostras para o MeV, o material resultante do tratamento com hidrazina e lavagem com etanol 96% foi suspenso em isopropanol com adição de NH₄OH e gotas dessa suspensão foram depositadas sobre os suportes para microscopia eletrônica. Para algumas amostras foram usadas pequenas variações neste procedimento.

Este procedimento de desproteínação também foi usado em outro trabalho do grupo para isolar matriz óssea inorgânica a partir de fêmures e crânios de ratos

Wistar ^[36]. Estas fases inorgânicas serão usadas para efeito de comparação com os fosfatos preparados nesse trabalho.

Para avaliar a extensão da desproteínização causada pelo tratamento com hidrazina, o procedimento foi realizado também com períodos de 30 minutos e 12 horas a 20°C.

Para resumir os procedimentos, a seguir, está representado na Figura 11, um fluxograma desta parte experimental.

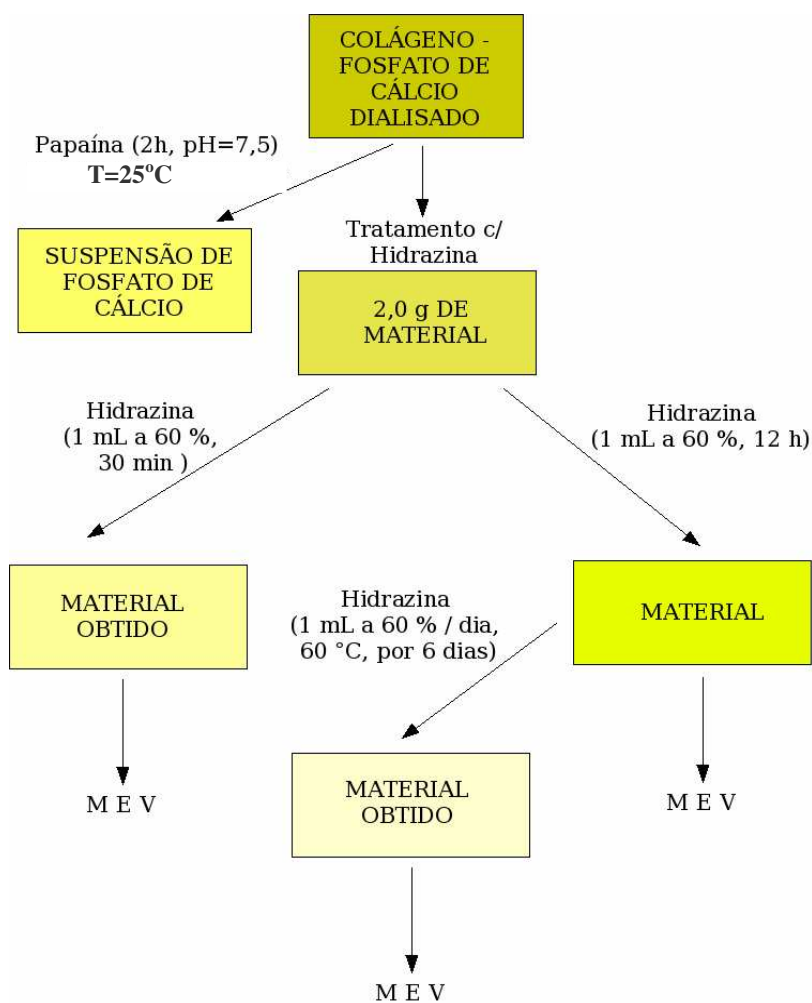


Figura 11 - Fluxograma representativo da seqüência de procedimentos para tratamento e eliminação da matriz protéica.

4.5 - Composição e determinação da razão Ca/P para amostras de fosfatos de cálcio precipitados na matriz de colágeno.

Para determinar a razão Ca/P dos materiais precipitados e da fase óssea inorgânica de ratos *Wistar*, algumas amostras foram analisadas e a razão Ca/P determinadas por ICP/OES. Para a preparação da amostra dos precipitados de fosfato de cálcio, o material resultante da ação da amônia foi imerso em água por 24h, depois dissolvido em HNO₃ e aquecido. Dessa maneira o material orgânico foi oxidado, restando apenas uma solução aquosa de Ca²⁺ PO₄³⁻ originados da fase mineral de interesse. A solução foi evaporada até secar resultando em um sólido de fosfato de cálcio.

Foram realizadas medidas de razão Ca/P para cinco grupos de amostras: amostra 1 (fosfato de cálcio precipitado em meio à matriz de colágeno não dialisado e com concentração de 0,05g/mL), amostra 2 (fosfato de cálcio precipitado em meio à matriz de colágeno dialisado e com concentração de 0,05g/mL), amostra 3 (fosfato de cálcio precipitado em meio à matriz de colágeno dialisado com concentração de 0,15g/mL após tratamento com hidrazina), amostras 4 e 5 (fosfato de cálcio precipitado em meio à matriz de colágeno dialisado, com concentração de 0,05 e 0,10 g/mL, após sedimentação).

4.6 - Técnicas e métodos de caracterização dos materiais.

Os materiais obtidos, tanto na forma de géis como na forma de partículas isoladas da matriz protéica, foram analisados pelas técnicas de DRX, MEV, MO, FTIR, DSC e ICP-OES; utilizando os equipamentos citados no item 3.1.

4.6.1 - Difração de Raios-X (DRX).

Os difratogramas foram obtidos a 40 kV e 30 mA, usando um filtro de níquel para a radiação α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) de CuK.

Os difratogramas para a caracterização dos fosfatos de cálcio sintéticos foram obtidos com velocidade de varredura de 2°/min. O tamanho médio dos cristais de alguns fosfatos de cálcio foi determinado pela equação de Debye-Scherrer diretamente dos picos 25.8° 2θ (plano 002).

Os difratogramas foram obtidos diretamente do gel de colágeno nas várias condições de precipitação, dispostos diretamente no porta-amostra. Quando este gel apresentava alta viscosidade, usava-se um bisturi para cortar uma fatia paralelamente ao plano superior do gel estruturado.

Para os materiais após tratamento e em forma de pó, usava-se o procedimento padrão de disposição das amostras.

A equação de Debye-Scherrer utilizada para a determinação dos tamanhos de cristais da fase mineral pode ser escrita na forma: [37, 38, 39, 40]

$$D_{khl} = \frac{57,3.K.\lambda}{\beta_{1/2} \cdot \cos \theta}$$

sendo o tamanho (D) do cristalito determinado em um plano cristalográfico, 57,3 é o fator de conversão de graus para radianos, (K) é uma constante dependente do cristal (com valor de 0,9), λ é o comprimento de onda da radiação raios-X com o valor de 1,5418 Å proveniente do equipamento utilizado, ($\beta_{1/2}$) é a diferença entre a largura à meia altura do pico da amostra e do pico de um padrão (hidroxiapatita cristalina foi utilizada como padrão) e ($\cos \theta$) é o cosseno do ângulo do pico do difratograma da amostra escolhido para determinar o tamanho do cristal

4.6.2 - Espectroscopia de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP/OES).

Para a obtenção da razão Ca/P, os fosfatos de cálcio secos foram dissolvidos em aproximadamente 100 mL de água com adição de HCl (36%) até a dissolução completa.

As curvas de calibração necessárias para a determinação da razão Ca/P foram feitas a partir de soluções que continham simultaneamente os íons Ca^{+2} e PO_4^{3-} .

4.6.3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As micrografias mostradas neste trabalho foram obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura com voltagem de aceleração do feixe de elétrons a 20kV. As amostras foram recobertas com carbono e metalizadas com ouro. Antes da metalização as amostras sólidas foram presas no porta-amostra empregando-se fita de carbono. As amostras na forma de gel foram preparadas por pequenos esfregaços diretamente no porta-amostra. Já as amostras aquosas e sedimentadas foram depositadas no porta-amostra usando micropipetas e as sólidas (em pó) por deposição direta ou dispersão em isopropanol.

Tabela 1 - Amostras de materiais em diversas situações de precipitação, analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

Amostra	[Colágeno]	Característica
Colágeno	0,05 g/mL	Gel estruturado com diálise
Compósito	0,05 g/mL	Partículas precipitadas sem diálise
Compósito	0,15 g/mL	Partículas precipitadas sem diálise
Fosfato de Cálcio	-	Partículas precipitadas sem colágeno
Compósito	0,10 g/mL	Partículas precipitadas com diálise
Compósito	0,15 g/mL	Partículas precipitadas com diálise
Compósito	0,15 g/mL	Partículas após tratamento com papaína
Compósito	0,15 g/mL	Partículas após tratamento com hidrazina
Compósito	0,025 g/mL	Partículas precipitadas e sedimentadas
Compósito	0,05 g/mL	Partículas precipitadas e sedimentadas
Compósito	0,10 g/mL	Partículas precipitadas e sedimentadas
Compósito	0,15 g/mL	Partículas precipitadas dentro do saco de diálise
Compósito	0,15 g/mL	Partículas precipitadas - fibrilogenese
Compósito	-	Precipitação sobre os feixes de colágeno

4.6.4 - Microscopia ótica utilizando polarizadores de luz e máquina fotográfica Nikon FDX-35.

4.6.5 - Espectroscopia na região do infravermelho (IV) utilizando a técnica de ATR para os géis de colágeno e pastilha de KBr para os sólidos (proporção KBr e material de 100:1), na região de 4000 a 400 cm^{-1} : Espectrofotômetro FTIR Nicolet 520 e Bomem série MB-100, respectivamente.

4.6.6 – Calorimetria de Varredura Diferencial - DSC.

As análises dos DSC foram realizadas na faixa de 25° a 120° C, atmosfera inerte e taxa de aquecimento padrão de 10°C/min. As amostras de géis de colágeno estruturado e géis de colágeno estruturado com fosfato de cálcio foram pesadas e dispostas diretamente no aparelho.

5 - Resultados e Discussões.

5.1 - Colágeno estruturado, fibrilogênese e precipitação de fosfato de cálcio.

Os feixes contendo fibras de colágeno extraídos das caudas de rato *Wistar* são solúveis em soluções ácidas com pH próximo de 2, pois não apresentam muitas ligações cruzadas e podem ser reconstituídos em fibras por neutralização.^[10, 20]

Em condições de neutralização, as fibras de colágeno se formam a partir da auto-organização das moléculas de colágeno, pois perdem os hidrogênios de protonação ou cargas positivas, e ocorre aumento na viscosidade que está associada em alguns casos à formação de uma rede tridimensional de fibras de colágeno com características de gel.^[10, 20]

A formação das fibras e estruturação do sistema, assim como observado por Bradt et al, Fan et al e Gobeaux et al^[10, 41, 42] está vinculada ao aspecto turvo do gel, uma vez que a solução de colágeno é transparente ou ligeiramente translúcida, dependendo da concentração proteica.^[42] É possível notar visualmente o aumento gradual na opacidade durante a fibrilogenese ou estruturação em glóbulos do colágeno. A fibrilogênese e a estruturação aleatória competem e parecem depender da concentração do colágeno, das condições e da velocidade de neutralização, como observado por Fan et al e Gobeaux et al.^[41, 42]

Como, neste trabalho, soluções de colágeno foram preparadas inicialmente em pH próximo de 2, cujo solvente era formado por uma solução contendo os íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- , a neutralização através da permeação de amônia gasosa, como descrito no item 4.2 do capítulo experimental, resultou em um processo no qual a estruturação da solução de colágeno e a formação de partículas de fosfato de cálcio ocorriam simultaneamente. Assim, para melhor compreensão destes fenômenos simultâneos e da influência de um sobre o outro, iremos inicialmente mostrar o efeito da neutralização de soluções de colágeno na ausência de íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- .

5.2 - Estruturação de soluções de colágeno simultaneamente com a precipitação de fosfato de cálcio. A Influência na morfologia das partículas.

5.2.1 - Estruturação do colágeno pela permeação de vapor de amônia.

Para avaliarmos o efeito da neutralização das soluções de colágeno no processo de estruturação, soluções deste material com concentração igual a 0,05 g/mL, foram preparadas por diálise, conforme descrito no experimental, item 4.2.2, e submetidas à permeação de amônia.

As Figuras 12A e 12B mostram micrografias dos géis formados após a permeação do vapor de amônia. As micrografias mostram que a permeação da amônia e conseqüente aumento do pH estruturam o colágeno, que contrai de volume, e provavelmente desnatura, formando glóbulos de cerca de 3µm.

A formação de glóbulos como mostrados na Figura 12, indica a neutralização da solução de colágeno ocorreu rapidamente não permitindo que as moléculas de colágeno se organizassem a partir da solução viscosa do material, resultando na organização aleatória das moléculas. [20, 41]

No item 5.4.2 deste trabalho mostraremos que a neutralização lenta da solução de colágeno leva à formação de fibras.

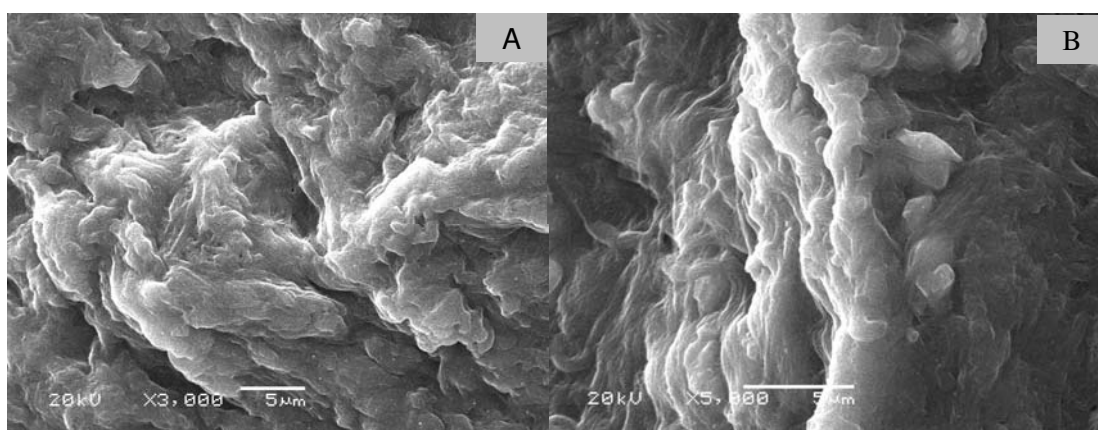


Figura 12 - (A) micrografia de colágeno estruturado (0,05g/mL) obtido pela permeação de vapor de amônia. (B) representa ampliação de outra região de (A).

5.2.2 - Formação de partículas de fosfato de cálcio em géis de colágeno estruturado. O efeito da concentração de colágeno.

Para avaliar o efeito da estruturação de soluções de colágeno sobre as propriedades de partículas de fosfato de cálcio formadas simultaneamente com a estruturação, assim como avaliar o efeito da concentração de colágeno sobre essas propriedades, foram feitas precipitações pela permeação de amônia em soluções de colágeno contendo diferentes concentrações deste material.

A Figura 13A mostra a micrografia do gel de colágeno, no qual partículas de fosfato de cálcio foram formadas simultaneamente pelo processo de neutralização através da permeação com amônia. A solução de colágeno foi preparada com concentração de 0,05 g/mL pela dissolução de colágeno em solução de íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- , conforme descrito no item 4.2.1. A Figura 13B representa o mapeamento de cálcio obtido por EDS da mesma região da amostra mostrada na da Figura 13A.

As Figuras 13C e 13D mostram as micrografias do material obtido da mesma forma como descrito para o material mostrado na Figura 13A, porém neste caso a concentração de colágeno na solução inicial era igual a 0,15g/mL.

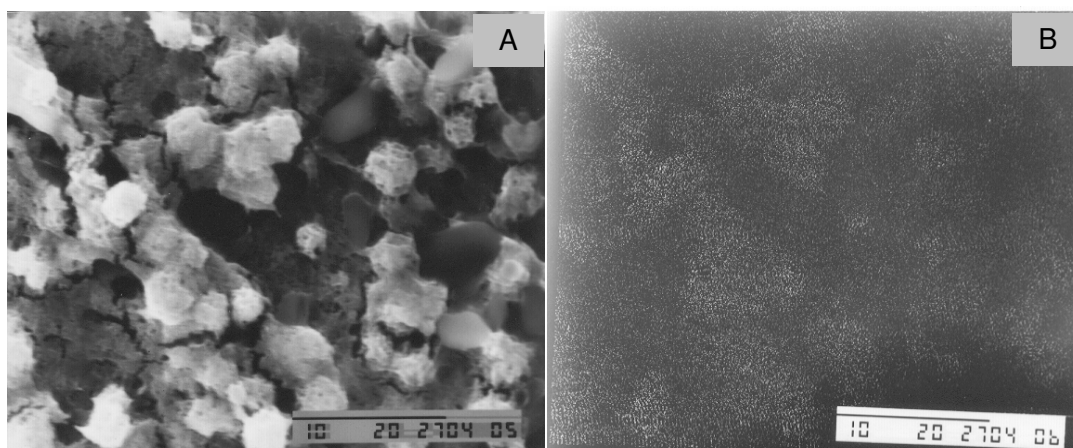
Na Figura 13A as partículas de fosfato de cálcio obtidas no interior da matriz estão parcialmente expostas e formam aglomerados com tamanho médio aproximado de $3\mu\text{m}$, ou seja, mesmo tamanho dos aglomerados de colágeno estruturado mostrado na Figura 12. É possível perceber que na Figura 13A há pequenas fibras junto aos aglomerados de partículas de fosfato de cálcio, ou seja, os glóbulos de colágeno nesta situação mais diluída permitiram a formação de fibras. O mapeamento de cálcio mostrado na Figura 13B mostra que este elemento está disperso nos glóbulos mostrando que as partículas de fosfato de cálcio são contidas pelos glóbulos de colágeno.

A precipitação de fosfato de cálcio na presença de um gel contendo maior concentração de colágeno resultou em partículas com estruturas bastante distintas das partículas mostradas na Figura 13A.

Na Figura 13 (C e D) as estruturas globulares de colágeno apresentam tamanhos médios de 1 a 2 μ m, formas bem arredondadas, contendo fosfato no seu interior. A micrografia da Figura 13D representa uma região mais exposta do gel, que demonstra a estrutura globular do colágeno e, conseqüentemente, do fosfato no seu interior. As regiões mais claras são tipicamente representações do fosfato de cálcio.

As Figuras 13C e 13D mostram que a maior concentração do colágeno dificulta a visualização das partículas de fosfato de cálcio incluídas no gel de colágeno. Ao compararmos as Figuras 13C e 13D percebemos que a permeação da amônia estrutura o colágeno de maneira semelhante à estruturação mostrada na Figura 12, indicando que a elevação do pH atua sobre a matriz de colágeno. A comparação com a Figura 13A, mostra a diferença causada pela variação da concentração do colágeno na morfologia e tamanho dos glóbulos, assim como na inclusão das partículas de fosfato de cálcio no gel de colágeno.

As partículas obtidas para a Figura 13A são semelhantes às partículas obtidas por Rhee et al ^[14], para precipitações em fibras de colágeno.



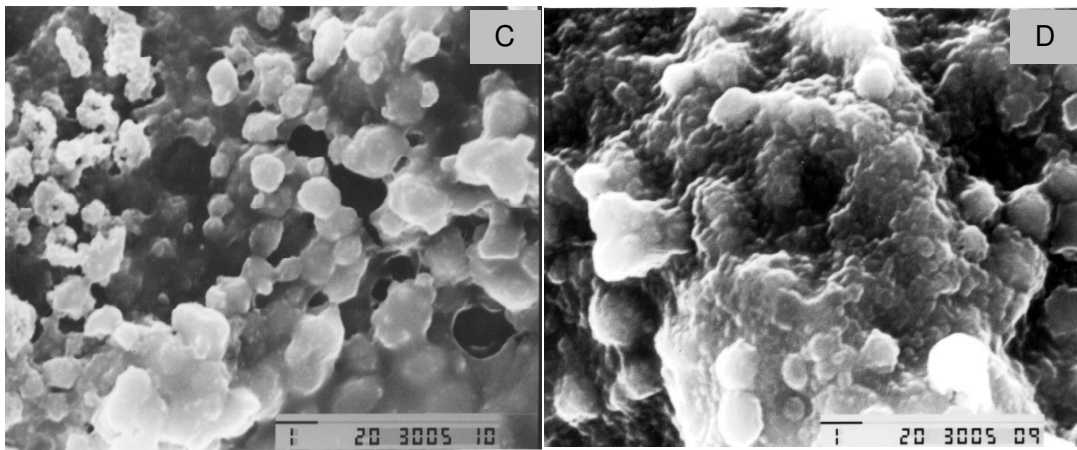


Figura 13 - Micrografias de partículas de fosfato de cálcio precipitadas em colágeno sem diálise. (A) com concentração 0,05g/mL de colágeno, (B) micrografia de mapeamento de cálcio de (A). (C) e (D) micrografias das partículas precipitadas na concentração de 0,15g/mL de colágeno.

Com objetivo de mostrar a influência do colágeno no processo de formação das partículas de fosfato de cálcio, foram obtidas micrografias de fosfatos de cálcio precipitados pela permeação de amônia a partir da mesma solução de íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- , usada para dissolver o colágeno, porém, sem o colágeno, conforme descrito no item 4.2.1.

A Figura 14A mostra a micrografia de partículas de fosfato de cálcio precipitado e a Figura 14B mostra a micrografia resultante do mapeamento de cálcio obtido por EDS da mesma região da Figura 14A. A micrografia (Figura 14A) mostra que as partículas apresentam formato de placas com tamanho médio de aproximadamente $20\mu\text{m}$. A micrografia mostrando o mapeamento de cálcio (Figura 14B) reproduz a mesma morfologia da micrografia mostrada na Figura 14A, confirmando a composição e morfologia das partículas.

As partículas precipitadas em solução aquosa apresentam dimensões que dependem das condições de precipitação, mas são normalmente maiores e morfologicamente diferentes do que as formadas em ambientes que controlam sua formação, confirmando que o colágeno atua na formação de partículas de fosfato de cálcio.

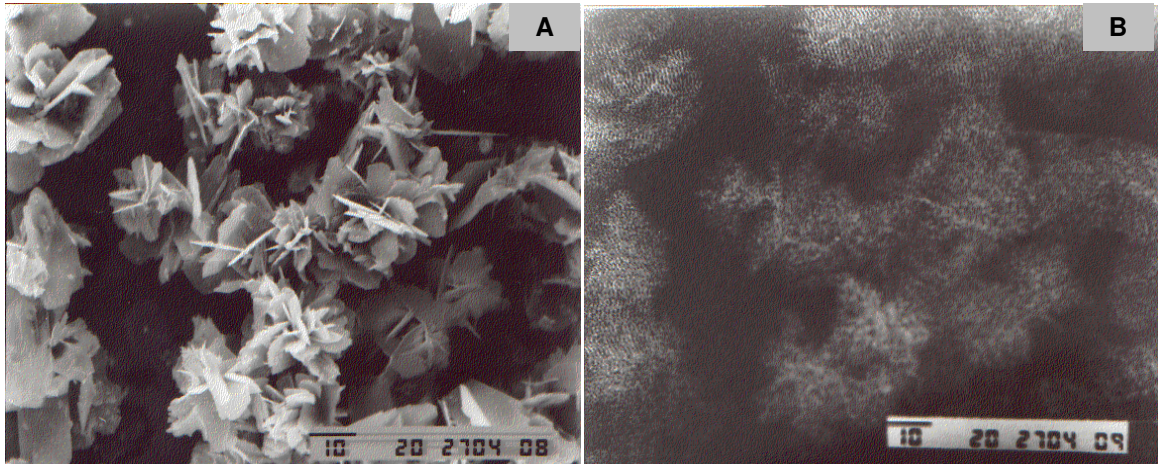


Figura 14 - Partículas de fosfato de cálcio precipitado por permeação de amônia sobre solução iônica de Ca^{2+} e H_2PO_4^- , na ausência de colágeno (A) e mapeamento de cálcio das partículas (B).

5.2.3 - Formação de partículas em géis com diferentes concentrações de colágeno dialisado.

A precipitação das partículas de fosfato de cálcio mostradas no item 5.2.2 podia sofrer a influência da presença de pequena quantidade de NaCl retida no colágeno após sua preparação. Para eliminar esta possibilidade do processo de preparação das amostras para posterior permeação por amônia gasosa, foi modificada como descrito no item 4.2.2, dialisando o colágeno contra uma solução ácida de H_3PO_4 e posterior diálise contra solução de íons Ca^{+2} e H_2PO_4^- . A diálise contra a solução de íons Ca^{+2} e H_2PO_4^- se constituiu em uma forma elegante, criativa e inovadora de preparar os géis de colágeno, pois ao mesmo tempo que o purificava, permitia melhor controle do volume do gel de colágeno e conseqüentemente de sua concentração, através do volume do saco de diálise.

A Figura 15A mostra a micrografia do gel obtido a partir da solução de colágeno de concentração de 0,10 g/mL, obtida por diálise e após a permeação com amônia. A micrografia mostra a formação das partículas de fosfato de cálcio contidas pelo gel de colágeno e a Figura 15B representa uma ampliação da Figura 15A e mostram em detalhe os cristais de fosfato de cálcio parcialmente recobertos

pelo gel de colágeno. As partículas parecem placas aglomeradas aleatoriamente, no entanto, respeitam os limites da matriz protéica. A presença de fosfato de cálcio na amostra é comprovada pela microanálise de raio-X e emissão de Ca e P no espectro de EDS da Figura 16A.

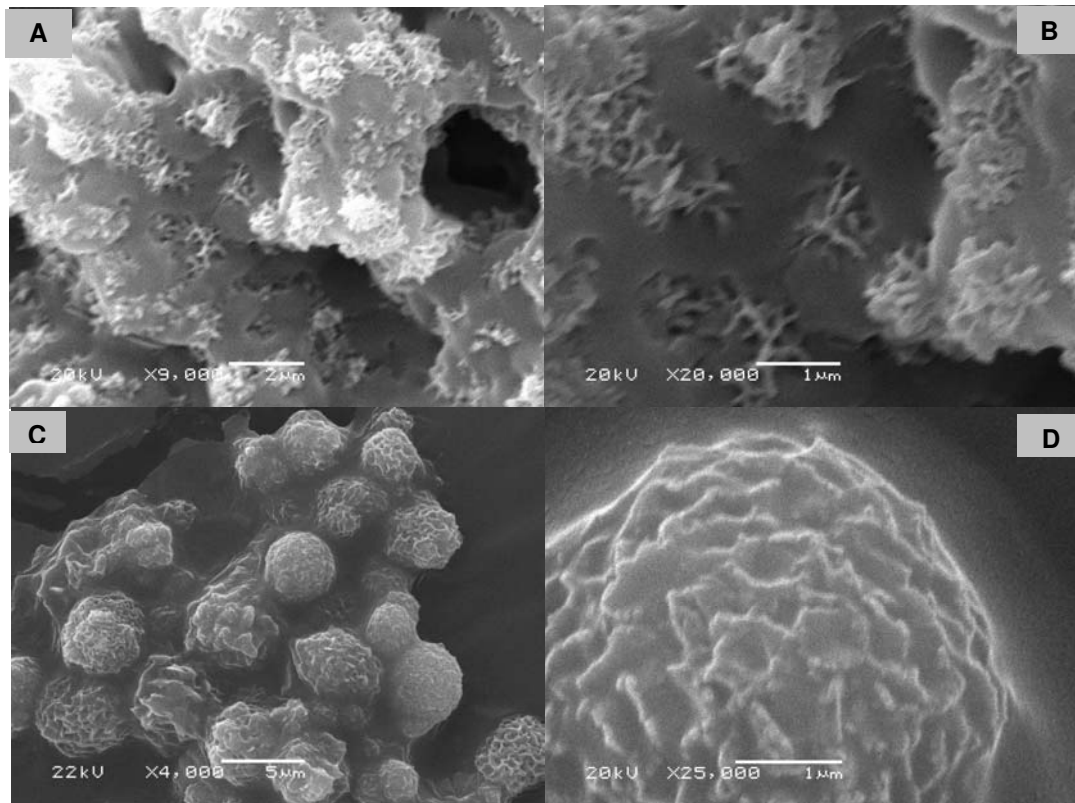


Figura 15 – Micrografias das partículas de fosfato de cálcio em meio ao colágeno após precipitação pela permeação de amônia. (A) 0,10g/mL de colágeno e (B) ampliação de (A). (C) 0,15g/mL de colágeno e (D) ampliação de outra região da (C) com partículas (pontos mais claros) de fosfato de cálcio em meio à matriz de colágeno.

A Figura 15C mostra a micrografia do gel obtido pela permeação da amônia da mesma forma como a descrita para a amostra mostrada na Figura 15A, mas a partir de solução de colágeno com concentração 0,15 g/mL. A Figura 15D representa ampliação de região mais exposta da Figura 15C. As micrografias apresentam o material com colágeno em estrutura globular, desta vez, um pouco mais compactado em função da maior concentração de colágeno, contendo fosfato

de cálcio distribuído por toda matriz. Os glóbulos têm dimensões aproximadas de 3 μ m e apresentam estruturas semelhantes às observadas anteriormente nos experimentos realizados sem diálise.

A Microanálise de raios-X do espectro de EDS mostrada na Figura 16B, garante a presença de Ca e P nas amostras das micrografias. A preparação da amostra a partir de uma solução de colágeno com concentração alta resulta no quase completo encobrimento das partículas de fosfato de cálcio pelo gel de colágeno formado a partir delas, como ocorreu para as amostras das Figuras 13C e 13D de mesma concentração, no entanto, nas Figuras 15C e 15D foi selecionada uma região que mostra de maneira mais evidente as partículas em relação as Figuras 13C e 13D

Como pode ser observado, o colágeno forma glóbulos, com aumento do pH e organiza a formação dos fosfatos de cálcio no interior das estruturas globulares.

A formação de glóbulos como mostrados nas figuras, indica que o processo de neutralização da solução de colágeno ocorreu rapidamente, não permitindo que as moléculas de colágeno se organizassem a partir da solução viscosa do material, resultando na organização aleatória das moléculas.^[20,42]

O uso de aumentos maiores para obter as micrografias como a apresentada na Figura 15D, mostrou a formação de aglomerados e dentro dele, como se estivessem atravessando o colágeno, pontos mais claros da ordem de 0,1 μ m em média, que representam a presença de pequenas partículas de fosfato de cálcio sólido distribuídas pela matriz, confinada e morfologicamente modificada pela presença do colágeno.

O resultado mostrado na Figura 15B e 15D, apesar da visualização parcial, ainda apresenta a observação de partículas incluídas e recobertas em meio à matriz de colágeno.

Na tentativa de isolar as partículas do gel de colágeno que as envolve e melhor caracterizar sua morfologia, foram realizados experimentos procurando remover o gel de colágeno sem, contudo, modificar a morfologia, a aglomeração e a composição das partículas de fosfato de cálcio, como exposto no item 4.4 do experimental.

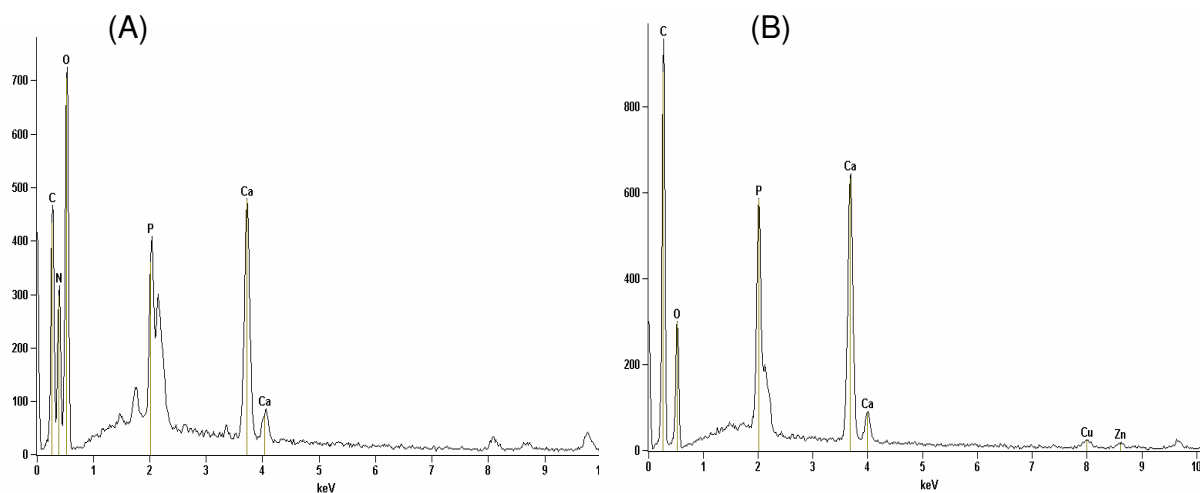


Figura 16 – (A) EDS da região da Figura 15^a e (B) EDS da região da Figura 15C, respectivamente.

5.3 - Tratamento do gel de colágeno.

Para remover o gel de colágeno e permitir melhor observação da morfologia e aglomeração das partículas formadas nos géis de colágeno, foram testadas duas abordagens experimentais: o tratamento do gel de colágeno com papaína e com hidrazina.

A papaína degrada enzimaticamente o colágeno e a hidrazina hidrolisa a proteína sem modificar a morfologia e composição de partículas de fosfato de cálcio disseminadas nesta matriz, como o mostrado por Bertazzo et al e Termine et al [36, 43] em processos de desproteínização óssea.

5.3.1 - Partículas formadas no gel de colágeno após tratamento com papaína.

A Figura 17 mostra a micrografia do gel obtido pela permeação da amônia a partir de solução de colágeno com concentração 0,15g/mL, após tratamento com papaína conforme descrito no item 4.4.1. Na Figura há uma distribuição de partículas que se aglomeram como se estivessem contidas no interior das

estruturas globulares de colágeno observadas anteriormente, mantendo semelhança com a distribuição dos glóbulos no material após ação da amônia.

O tamanho das estruturas é reduzido, apresentando em média $1\mu\text{m}$, condizente com as estruturas globulares de colágeno e com as estruturas observadas na Figura 13D e 15A. As agulhas formando os aglomerados são com certeza bem menores que $1\mu\text{m}$ e podem ser comparadas às estruturas que estão parcialmente mostradas nas Figuras 15 (A e B).

Optou-se pela papaína para uma destruição mais controlada da matriz em oposição a outros métodos mais oxidantes (Calcinação), o que conserva melhor a morfologia das partículas e não elimina totalmente as estruturas globulares.

A papaína não apresentou uma performance excelente, pois é uma enzima e necessita de condições específicas para atuação máxima dos seus sítios catalíticos.

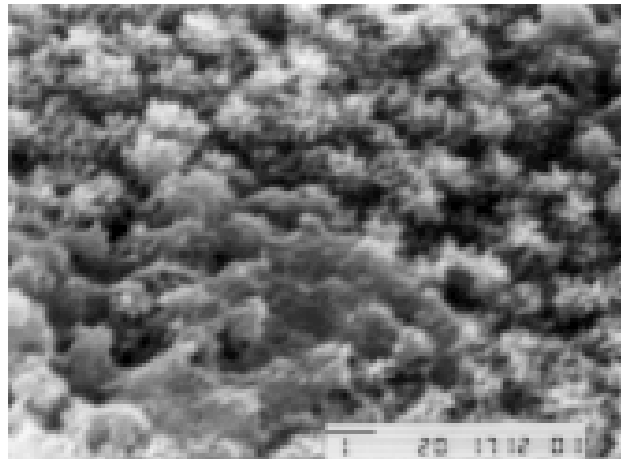


Figura 17 - Micrografia das partículas de fosfato de cálcio do material globular de colágeno após tratamento com papaína.

5.3.2 - Partículas formadas no gel de colágeno após tratamento com hidrazina.

A Figura 18 mostra a micrografia do gel obtido pela permeação da amônia a partir de solução de colágeno com concentração 0,15g/mL após tratamento seqüencial com hidrazina, conforme descrito no item 4.4.2. A Figura 18A representa a micrografia obtida para amostras do gel de colágeno após ataque superficial com hidrazina por trinta minutos. A Figura 18B, que representa uma ampliação da micrografia 18A, mostra os glóbulos mais claros, contendo fosfato de cálcio em detalhe. A micrografia 18A mostra a presença de aglomerados de partículas de fosfato de cálcio, com tamanho médio de 0,5- μ m dos pontos mais claros, mais evidentes após o ataque, e que guardam bastante semelhança com as dimensões já observadas anteriormente. O tratamento sobre a matriz de colágeno não expõe totalmente o fosfato de cálcio, mas mostra claramente a presença dos aglomerados de colágeno contendo partículas de tamanho reduzido no seu interior.

As Figuras 18C e 18D são micrografias que representam o resultado do tratamento com hidrazina por um período de doze horas, e que expõe ainda mais o fosfato de cálcio em meio ao colágeno. A micrografia da figura 18C guarda semelhança com as imagens dos aglomerados de colágeno vistos anteriormente e a imagens da micrografia 18D em aumento maior, já destacam a presença de partículas de fosfato de cálcio no seu interior, com dimensões muito semelhantes aquelas já observadas. Na micrografia, fica claro que o tratamento ao colágeno foi insuficiente para retirá-lo totalmente, mas apresenta uma desproteinação gradual sem que houvesse destruição e descaracterização do fosfato de cálcio, uma vez que esse é nosso alvo principal. É possível observar na ampliação que o fosfato de cálcio cresce de fato seguindo certa orientação ao longo da matriz, obedecendo os limites do colágeno, como acontece normalmente com materiais crescidos em matrizes organizadas em nível molecular, como proposto por Landis ^[1].

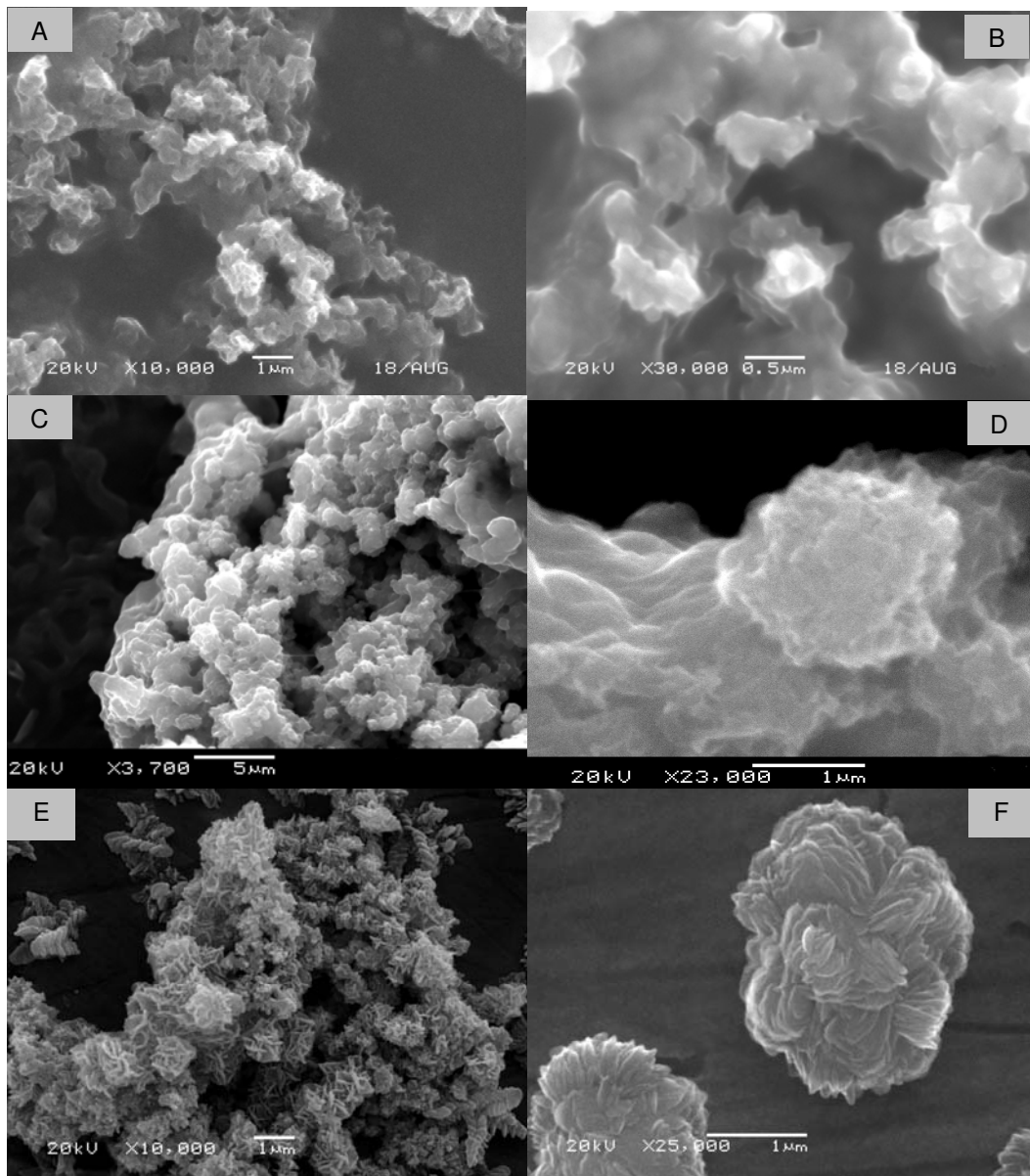
As Figuras 18E a 18H representam o efeito da ação exaustiva do tratamento com hidrazina sobre a matriz de colágeno contendo fosfato de cálcio, que resulta na eliminação da proteína. A hidrazina atua de maneira eficiente para eliminar o gel de colágeno, sem a mudança da fase mineral e expõe as partículas de fosfato de cálcio, sem alterar a morfologia, assim como proposto por Bertazzo et al e Termine et al.^[36,43]

A micrografia da Figura 18E mostra a existência de uma distribuição de partículas muito pequenas em forma de placas e agulhas que se aglomeram como se ainda estivessem contidas no interior das estruturas globulares observadas anteriormente, mantendo semelhança com a distribuição dos glóbulos de colágeno estruturados após permeação da amônia.

Finalmente, é possível observar os aglomerados de fosfato de cálcio, contendo placas e agulhas de dimensões reduzidas, organizadas sob a matriz que antes estava presente. O tamanho dessas estruturas é tipicamente o tamanho dos cristais de hidroxiapatita observados por Walsh et al, Du et al e Combes et al^[33, 44, 45] que é em média entre 20 a 100nm.

A microanálise por raios-X apresenta espectro de EDS (Figura 19) dessas amostras com as intensidades dos picos de Ca e P bastante pronunciadas, o que garante a composição da amostra. A Figura 18F mostra a possível atuação da matriz de colágeno proporcionando o crescimento organizado do fosfato de cálcio e dentro dos aglomerados podem-se observar partículas bem menores, na forma de placas que representam as formações em meio protéico. A Figura 18G representa outra região da micrografia com partículas também bastante pequenas em que os aglomerados são ainda menores. A Figura 18H é ainda mais marcante, pois permite observar estruturas em forma de agulha, formadas junto às placas das outras partículas, que pode representar misturas de fases. O tamanho das partículas neste caso é em média de 0,3 μ m, tipicamente o tamanho de aglomerados de cristais formados em colágeno.^[1] O hábito em forma de agulha sugere que uma das fases cristalinas é a hidroxiapatita, que é a fase preferencialmente formada em pH elevado, assim como proposto por Rhee et al e Zhang et al^[32, 46].

A matriz de colágeno não permite controlar a morfologia de todas as partículas, uma vez que os géis de colágeno, por mais homogêneos que sejam, podem apresentar domínios com maior concentração de proteína e organização aleatória das estruturas, pois para mineralização organizada, supõe-se que as fibras sirvam como molde de mineralização e precisam se organizar antes da precipitação de fosfato de cálcio, assim como proposto por Bradt et al e Fan et al. [10, 41] Apesar das diferentes morfologias e tamanhos, a matriz apresenta-se modificadora das estruturas, sendo que em nenhuma amostra há tamanhos e morfologias semelhantes às precipitações em fase aquosa, assim como mostrado na Figura 14.



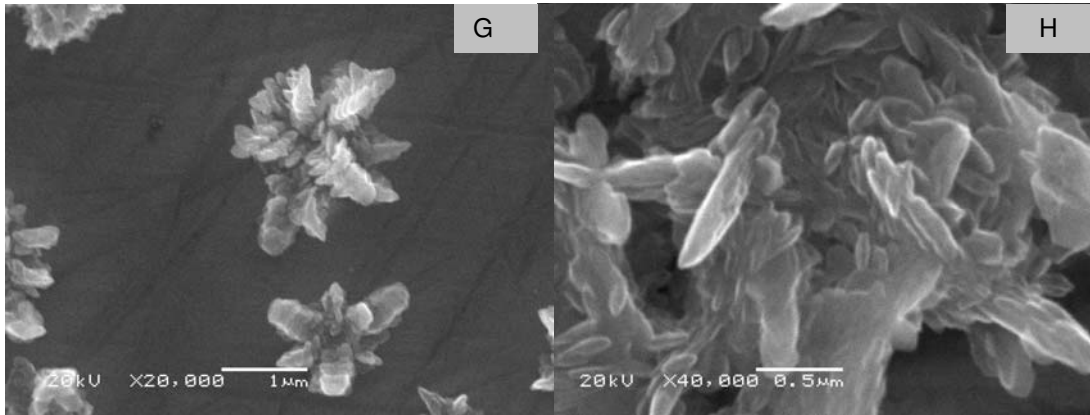


Figura 18 - Micrografias do material globular obtido pela ação de vapor de amônia sobre a matriz de colágeno dialisado, após tratamento com hidrazina. Aglomerados de fosfato de cálcio em meio a matriz de colágeno com seqüência crescente de desproteínação com hidrazina. (A) e (B) sob tratamento com hidrazina por 30min. (C) e (D) sob tratamento com hidrazina durante 12 horas. (E), (F), (G) e (H), apresentam partículas expostas após tratamento prolongado com hidrazina e aquecimento.

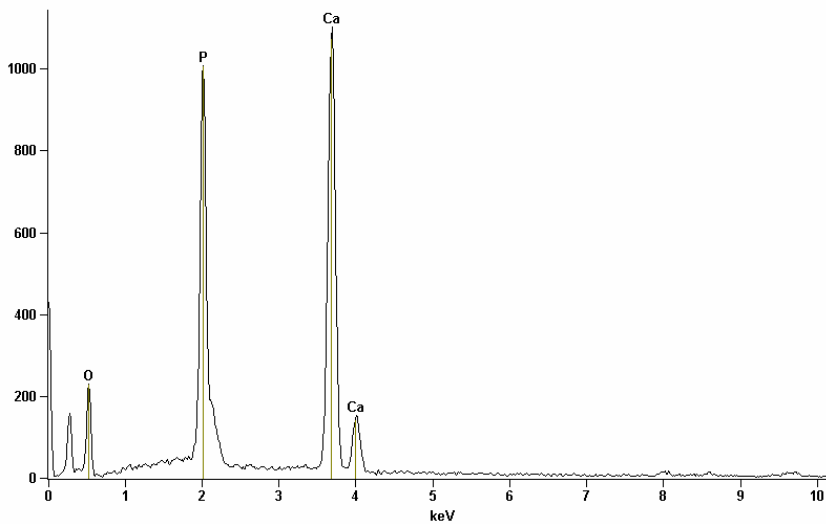


Figura 19 - Espectro de EDS referente às micrografias mostradas na Figura 18.

5.4 - Partículas formadas em diferentes concentrações de géis de colágeno dialisado e isoladas após sedimentação dos cristais.

A seguir, serão apresentados os resultados das partículas de fosfato de cálcio que sedimentaram após precipitação em colágeno, em função da permeação de amônia gasosa, conforme também descrito no experimental do item 4.2.2.

Importante salientar que as partículas foram formadas dentro da matriz de colágeno, assim como todos os demais ensaios em meio protéico e, portanto, sofreram a mesma ação desse meio. Durante todo o processo, as partículas formadas estiveram em contato direto com o colágeno, mas em função da permeação, estruturação do colágeno e precipitação simultânea dos cristais que se formavam, alguns sedimentaram e se concentraram, facilitando seu isolamento.

Em função da sedimentação, as partículas ficam parcialmente agregadas, não havendo necessidade de técnicas de eliminação da matriz para sua melhor visualização.

Para avaliarmos o efeito da concentração na morfologia das partículas sedimentadas, serão apresentadas micrografias obtidas com concentração crescentes de colágeno.

A Figura 20A mostra micrografias das partículas precipitadas e sedimentadas após a permeação com amônia a partir de solução de colágeno preparada com concentração de 0,025 g/mL. A solução foi preparada pela dissolução de colágeno em solução de íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- conforme descrito em 4.2.2. A Figura 20A mostra micrografia que representa um aglomerado com formas arredondadas de muitas partículas de fosfato de cálcio de tamanho reduzido. A Figura 20B representa ampliação da Figura 20A, mostrando claramente a presença de aglomerados de partículas menores.

As formas arredondadas dos aglomerados sempre estão presentes e guardam com bastante fidelidade as formas globulares do colágeno estruturado pela permeação da amônia, no entanto, as dimensões nem sempre são muito

semelhantes, em função da variação da concentração de colágeno. A microanálise de raios-X do espectro de EDS da amostra (Figura 20A), garante a composição das partículas em função da presença de emissão intensa de Ca e P.

A Figura 20C mostra a micrografia das partículas precipitadas e sedimentadas após a permeação com amônia, da mesma forma como a descrita para a amostra mostrada na Figura 20A, mas a partir de solução de colágeno com concentração 0,05 g/mL. As partículas se mostram muito semelhantes às da Figura 20A.

A Figura 20D mostra ampliação da micrografia 20C e apresenta novamente aglomerados arredondados de partículas de fosfato de cálcio semelhantes às observadas por Combes et al ^[45], só que neste caso, ainda mais organizadas, contendo muitas partículas no interior.

É possível sugerir que na maior concentração da matriz protéica, há maior organização e as partículas são mais organizadas também. A natureza da matriz de colágeno influencia e controla a formação mineral. ^[1]

A microanálise de raios-X do espectro de EDS da amostra (Figura 20C) garante a composição do precipitado em função da presença de emissão intensa de Ca e P.

A Figura 20E mostra novamente a micrografia das partículas precipitadas e sedimentadas após permeação com amônia da mesma forma como a descrita para as amostras mostradas na Figura 20A e 20C, mas a partir de solução de colágeno com concentração 0,100 g/mL. A micrografia representa um aglomerado com formas arredondadas muito mais definidas e de muitas partículas em cada aglomerado, de tamanhos muito reduzidos. As Figuras 20F, 20G, 20H representam ampliações, mostrando claramente a presença de aglomerados de partículas muito menores.

Neste caso, os aglomerados se mostram ainda mais simétricos e organizados, provavelmente resultado da maior concentração de colágeno que organiza a mineralização. Formações de aglomerados de partículas como estas, são muito parecidas com as formações de aglomerados de partículas produzidas sobre fibras de colágeno mergulhadas em fluido corpóreo simulado (SBF), como obtidas por Rhee et al. ^[14]

Podemos sugerir que os glóbulos de colágeno que usualmente apresentavam 3 μ m estariam agora sem a casca de colágeno que os circundava e as partículas de fosfato estão expostas. Não podemos dizer que as amostras estejam livres de colágeno, mesmo porque esta não era nossa intenção.

A micrografia 20H mostra na superfície da amostra, regiões mais claras, e sem dúvida, mais ricas em fase mineral, que possivelmente estavam em contato com a superfície de colágeno e que delinearam sua formação. É como se, finalmente, estivéssemos vendo a Figura 13D, 15A, 15B, 15C e 15D, sem o colágeno recobrando as partículas e sem tratamento.

Importante salientar a semelhança em tamanho e morfologia entre as partículas sedimentadas com as partículas observadas após tratamento com hidrazina. Este resultado reforça a manutenção das morfologias após o tratamento, como proposto por Bertazzo et al.^[47]

Concentrações de colágeno maiores que 0,10g/mL não sedimentam suas partículas uma vez que são viscosas demais para segregarem as partículas em períodos não muito longos, por isso não foram realizadas.

A seguir, a Figura 21 mostra os resultados da microanálise de raios-X dos espectros de EDS das Figuras 20A, 20C e 20E, respectivamente, representando emissões de Ca e P bastante intensas, o que garante a composição dos aglomerados de partículas de fosfato de cálcio.

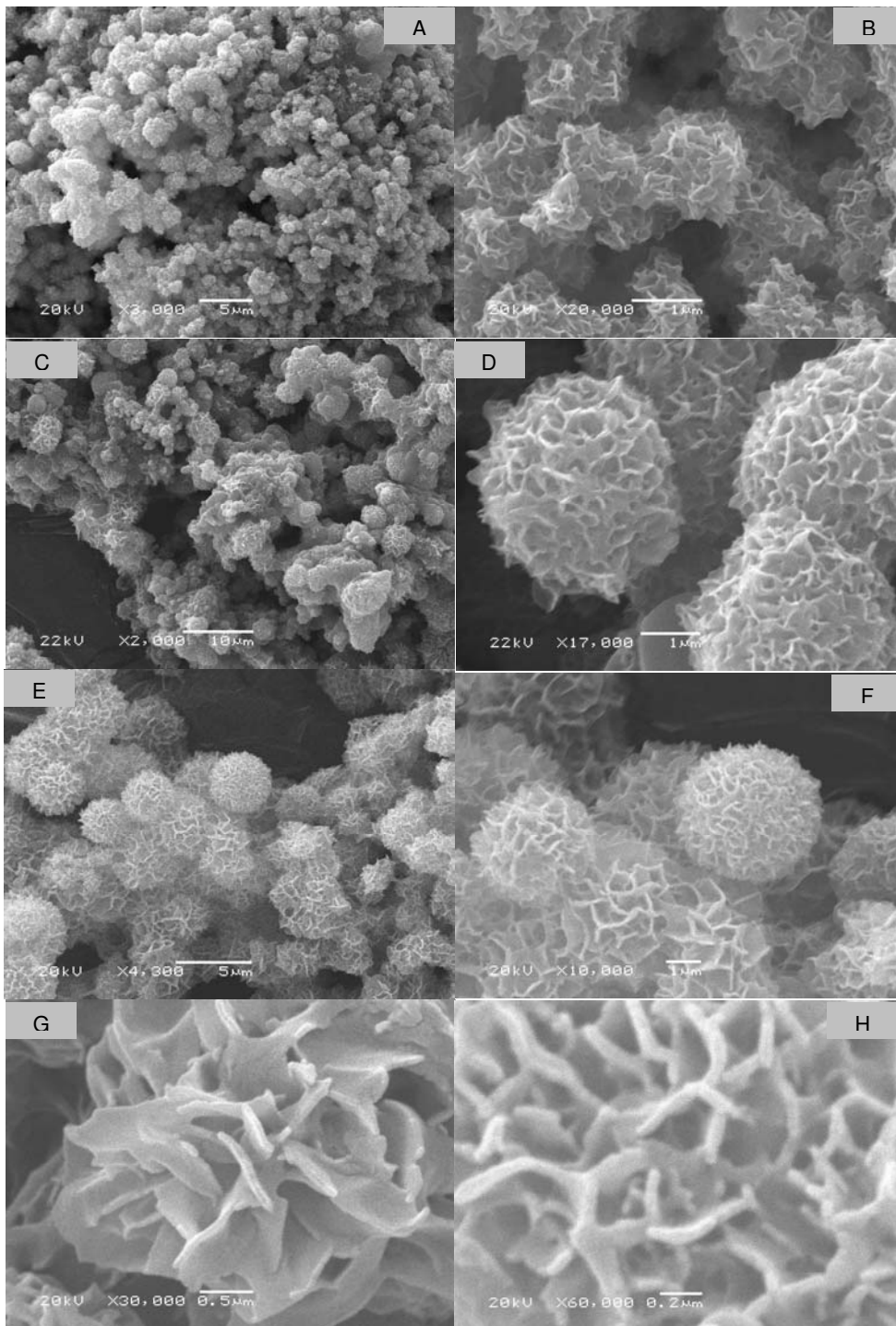


Figura 20 - Micrografias das partículas de fosfato de cálcio obtidas após sedimentação em meio a matriz de colágeno. (A) e (B) com concentração de 0,025 g/mL, (C) e (D) com concentração de 0,05 g/mL e (E) a (H) com concentração de 0,10g/mL.

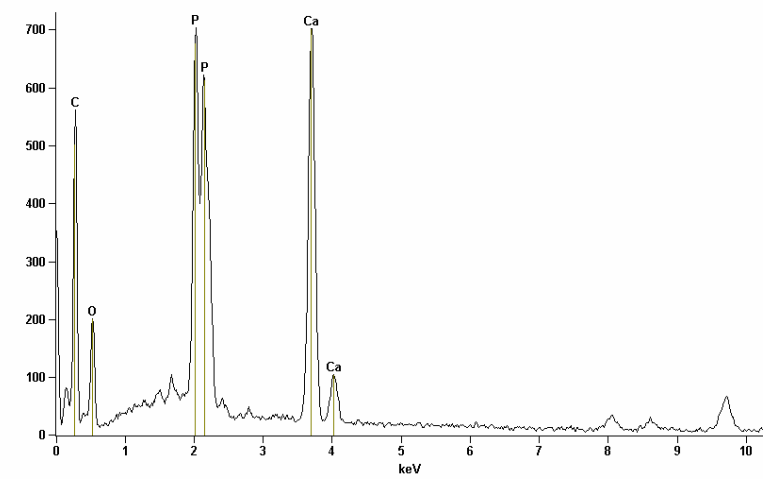
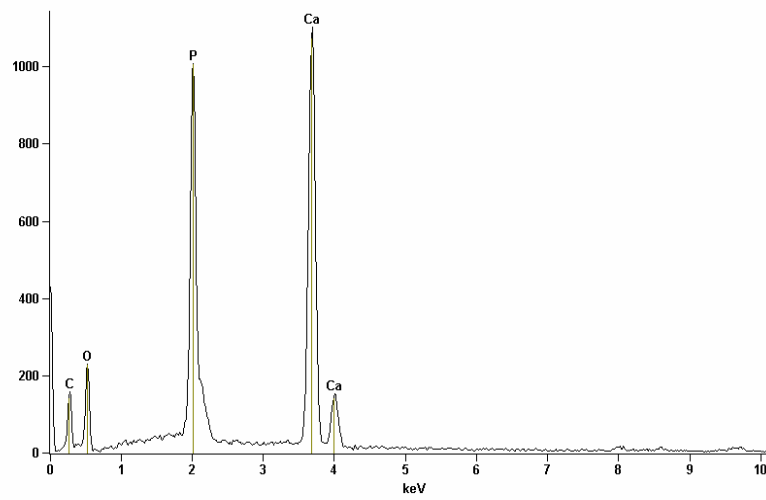
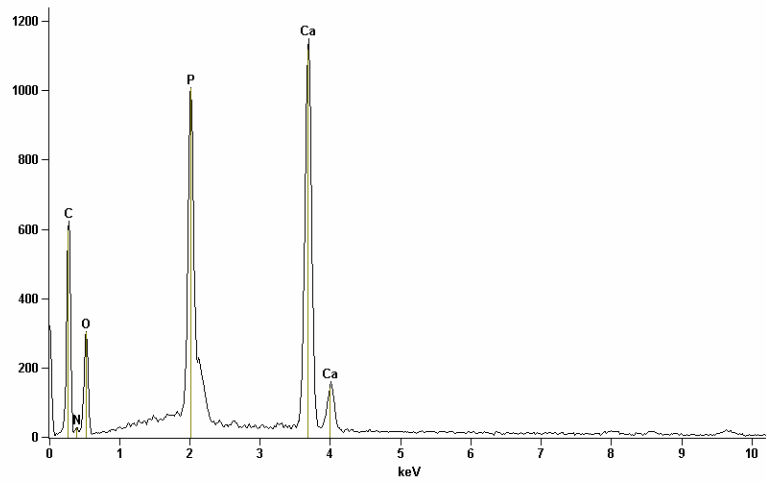


Figura 21 – Espectros de EDS referentes às micrografias mostradas nas Figuras 20A, 20C e 20E, respectivamente.

A Figura 22A mostra novamente a micrografia 20F, obtida após selecionar a fenda do EDS, que piora muito a qualidade da imagem. No entanto, nossa intenção é mostrar que as Figuras 22B e 22C são respectivamente os resultados dos mapeamentos de Ca e P obtidos por EDS das partículas na mesma região da amostra, ou melhor, dos aglomerados delas, representando o fosfato de cálcio precipitado em colágeno, após sedimentação.

O mapeamento confirma não apenas a composição, mas também o posicionamento e disposição do material na amostra, reforçando as sugestões feitas anteriormente, de que o colágeno modifica a morfologia e o tamanho das partículas de fosfato de cálcio precipitadas simultaneamente à estruturação da matriz protéica, que se dá pela elevação do pH promovida pela permeação de amônia gasosa.

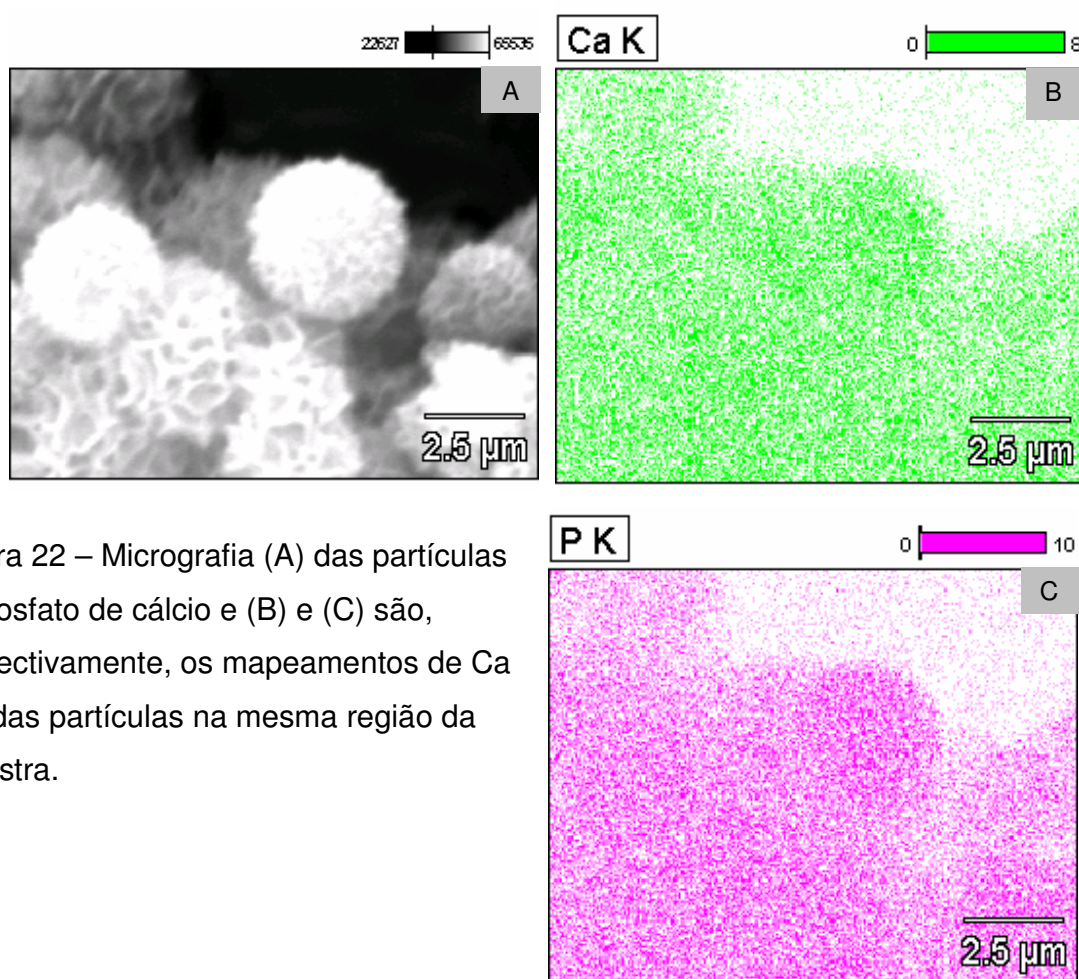


Figura 22 – Micrografia (A) das partículas de fosfato de cálcio e (B) e (C) são, respectivamente, os mapeamentos de Ca e P das partículas na mesma região da Amostra.

5.5 - Partículas de fosfato de cálcio precipitadas em géis de colágeno contidos no saco de diálise.

A permeação ainda mais lenta de amônia foi promovida para avaliar a formação de fosfato de cálcio em meio ao colágeno dialisado. Esta permeação foi realizada através do próprio saco de diálise com intenção de precipitar fosfato de cálcio dentro dele. Foram testadas duas condições de diálise para avaliar os efeitos da neutralização a partir delas, uma em pH 2 e outra em pH 5, e os resultados destas diálises serão mostradas, respectivamente nesta seqüência.

5.5.1 - Partículas formadas pela precipitação de fosfato de cálcio dentro do saco de diálise, em pH próximo de 2.

A Figura 23A mostra a micrografia das partículas de fosfato de cálcio precipitadas após permeação com amônia a partir de solução de colágeno preparada com concentração de 0,15 g/mL e contida no saco de diálise. A solução foi preparada pela dissolução de colágeno em solução de íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- em $\text{pH} \cong 2$, e dialisada contra a mesma solução, conforme descrito no item 4.2.3.

As partículas observadas na Figura 23A apresentam-se com formatos arredondados, tamanhos muito reduzidos e correspondem às menores partículas precipitadas neste trabalho. Para tentar explicar a formação destas partículas pode-se considerar que a permeação da amônia ocorreu e que ao atravessar a parede do saco de diálise promoveu a precipitação de partículas com tamanhos muito pequenos.

A Figura 23B mostra as partículas de fosfato de cálcio preparadas da mesma forma como descrita para as amostras mostradas na Figura 23A, mas na ausência de colágeno. As partículas, formadas sob esta condição são muito diferentes das precipitadas na presença de colágeno, mostrando dimensões e morfologias muito diferentes, indicando novamente a atuação do colágeno, modificando a morfologia das partículas de fosfato de cálcio.

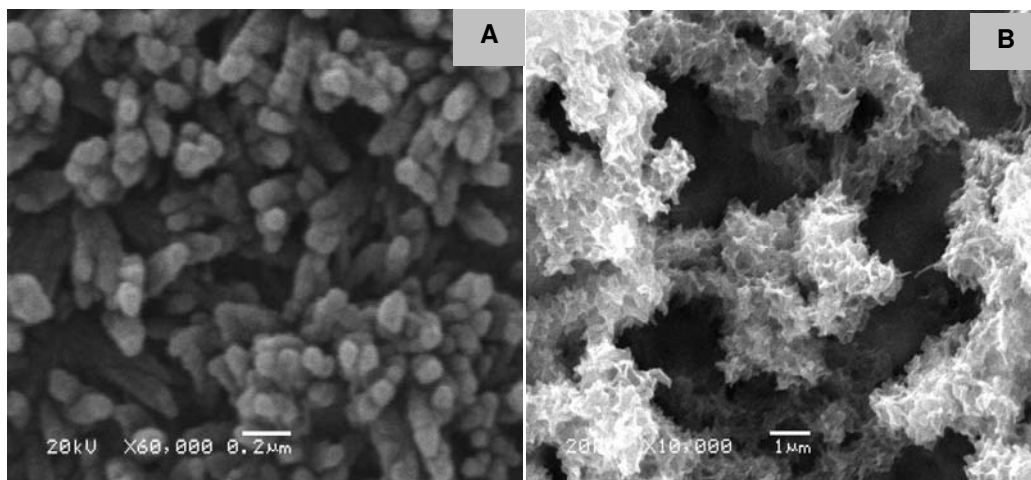


Figura 23 – Partículas de fosfato de cálcio precipitadas pela permeação de amônia em soluções contidas dentro do saco de diálise. (A), solução na presença de colágeno e (B), solução na ausência de colágeno.

5.5.2 - Partículas formadas pela precipitação de fosfato de cálcio dentro do saco de diálise, em pH 5.

A Figura 24A mostra a micrografia das partículas de fosfato de cálcio precipitadas da mesma forma como a descrita para a amostra da Figura 23A, mas após diálise contra solução de íons Ca^{+2} e H_2PO_4^- em pH 5 conforme descrito no item 4.2.3. Normalmente em condições mais lentas de neutralização, o colágeno se auto-organiza e forma fibras (fibrilogênese).^[20, 41]

Esta micrografia resultou na formação de fibras com dezenas de nanômetros. A formação de fibras, neste caso, pode ser explicada pela permeação de amônia provavelmente mais lenta através do saco de diálise e o menor intervalo de pH para neutralização. Elevar o pH da solução foi provavelmente o fator responsável pela formação das fibras, pois mesmo que a permeação da amônia seja lenta, ela é muito mais rápida que o tempo necessário para a neutralização e auto-organização do sistema. Realmente, aproximar a faixa de pH, é como deixar

o colágeno mais próximo do seu ponto isoelétrico e como se estivesse mais pronto para se organizar em fibras.^[41]

As fibras são produzidas quando há tempo suficiente para as moléculas de colágenos perderem carga positiva, difundirem no meio viscoso, se aglomeram e se auto-organizarem, antes que ocorra precipitação de fosfato de cálcio, causada pela elevação do pH, assim como proposto por Bradt et al e Fan et al.^[10, 41]

Neste trabalho, se fizéssemos a diálise apenas contra a água, também isolaríamos o colágeno dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} e não haveria mineralização da matriz de colágeno.

A fibrilogênese ocorre na maioria das vezes durante a diálise de soluções ácidas contra água, uma vez que ocorre neutralização e o pH não se eleva rapidamente.^[20, 42]

A Figura 24A mostra micrografia contendo alguns aglomerados de partículas ligados intimamente com as fibras de colágeno. A Figura 24B representa a mesma região da Figura 24A, que foi analisada e sua composição e distribuição de partículas foi comprovada pela microanálise de raios -X dos espectros de EDS no modo "point-and-shoot". Sete regiões distintas da micrografia foram analisadas para verificação da presença de posições ricas em cálcio e fósforo próximas às fibras.

Os resultados dos espectros de EDS confirmam a presença de emissões de cálcio e fósforo mais intensas nos pontos 1, 5, 6, e 7 da micrografia, que são as regiões mais claras e, sem dúvida, mais ricas na fase mineral. Apenas os espectros mais significantes estão representados a seguir na Figura 25, sendo que as regiões mais escuras (pontos 3 e 4), com menor formação de fosfato de cálcio, mostram baixa emissão de cálcio e fósforo.

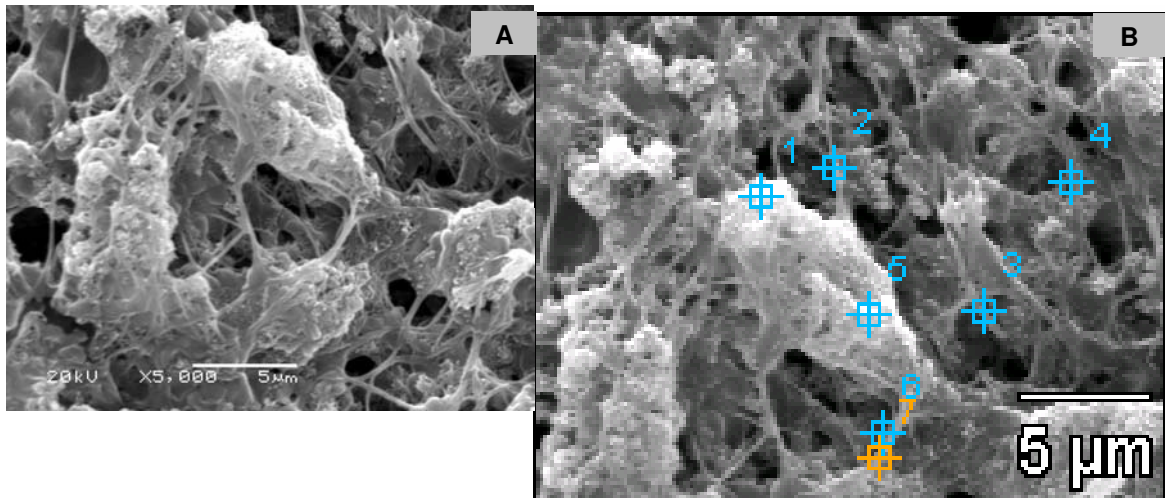


Figura 24 - (A) representa micrografia de fibras de colágeno mineralizadas com aglomerados de fosfato de cálcio. (B) representa micrografia eletrônica das fibras de colágeno junto ao fosfato de cálcio no modo “point-and-shoot”.

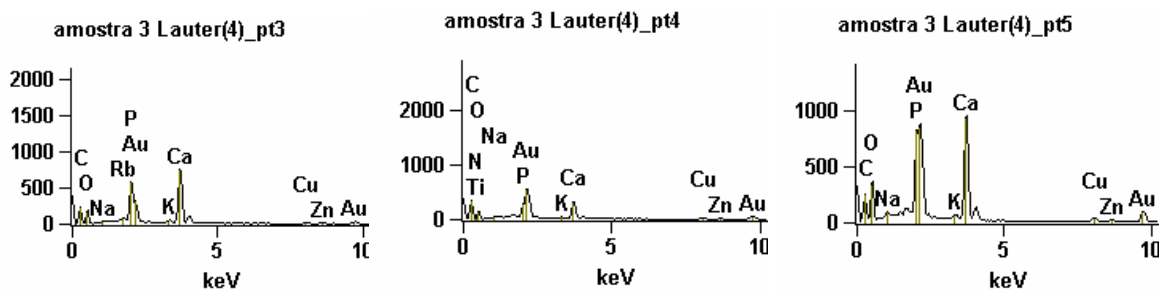


Figura 25 – Espectros de EDS no modo “point-and-shoot”. Os três espectros são os mais representativos; cujos pontos são 3, 4 e 5, respectivamente.

As Figuras 26A e 26B representam as micrografias com maior ampliação da Figura 24A, e mostram muitas partículas de tamanhos reduzidos (50 a 200 nm), muito parecidas em morfologia e com padrões de crescimento (ao longo do eixo longitudinal das fibras) similares às partículas observadas nos minerais dos ossos de ratos.^[47]

As precipitações em colágeno estruturado na ausência de fibras, com certeza formam partículas de tamanhos reduzidos e muito diferentes morfologicamente das partículas em solução aquosa, mas em condições de fibrilogênese. Essas partículas são diferentes morfologicamente das demais condições e são mais semelhantes às partículas da fase óssea inorgânica. Como

se não bastasse, estão associadas às fibras fortalecendo a hipótese de que o colágeno interage com as partículas de fosfato de cálcio para a mineralização. [1, 3, 10, 14, 22, 31, 32, 33]

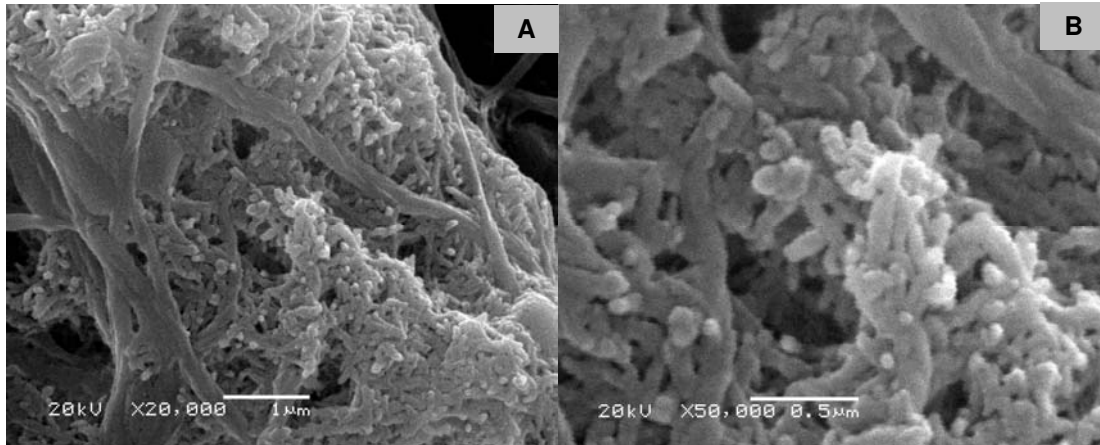


Figura 26 – Micrografias de fibras de colágeno e fosfato de cálcio formado ao longo das fibras.

5.6 - Precipitação de fosfato de cálcio em feixes de fibras (tendões) de colágeno.

Os resultados de formação das partículas no gel de colágeno, sob condições que resultaram na fibrilogênese mostraram possível orientação das partículas formadas. Para avaliar o efeito de matrizes de colágeno, organizadas como o observado nas fibras, foram realizados experimentos de precipitação de partículas de fosfato de cálcio, conforme descrito no item 4.3, sobre feixes de colágeno *in natura*, obtidos diretamente dos tendões das caudas dos ratos.

Os feixes de colágeno obtidos diretamente dos tendões apresentam alto grau de organização e apresentam-se birrefringentes ao microscópio ótico com luz polarizada indicando anisotropia de suas propriedades, como mostrado pela Figura 27C. Para comparação, a micrografia mostrada na Figura 27A indica a completa ausência de anisotropia da solução de colágeno em meio ácido, enquanto a Figura 27B mostra a solução ácida após diálise contra água e possível fibrilogênese e algum grau de estruturação ao microscópio ótico com luz polarizada.

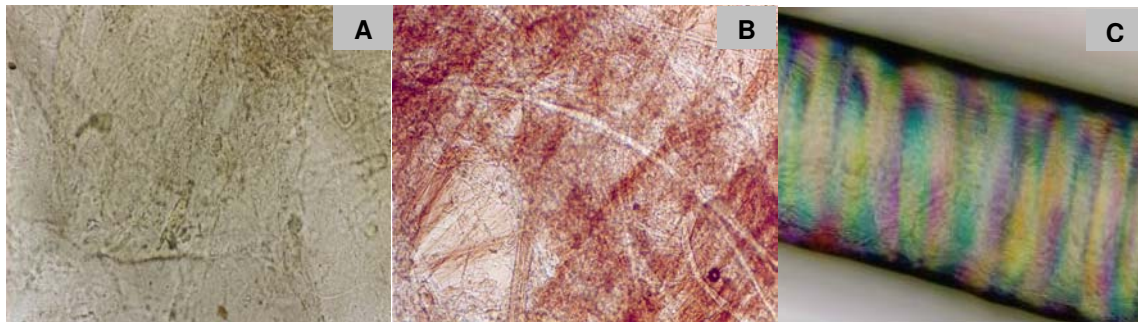


Figura 27 - Micrografia ótica dos materiais de colágeno (aumento de 200X). (A) para a solução de colágeno e (B) solução após diálise e fibrilogênese e (C) para o tendão (feixe) de colágeno *in natura*.

A micrografia mostrada na Figura 28 apresenta o resultado obtido pela intumescência parcial do tendão pela ação da solução contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} em pH 4,8, seguida da permeação de vapor de amônia. Visível é a manutenção da birrefringência no interior da fibra, apesar de certa opacidade e a presença de uma região externa semelhante aos géis de colágeno estruturados. Esse resultado sugere fortemente que apenas a região externa da fibra sofreu ação da solução e conseqüentemente a mesma região sofreu ação da amônia, que estruturou a capa do colágeno e precipitou fosfato de cálcio no gel e/ou interface entre a fibra organizada e o gel.

Nesta condição de precipitação temos praticamente a concentração máxima para o gel de colágeno intumescido a pH 4,8.

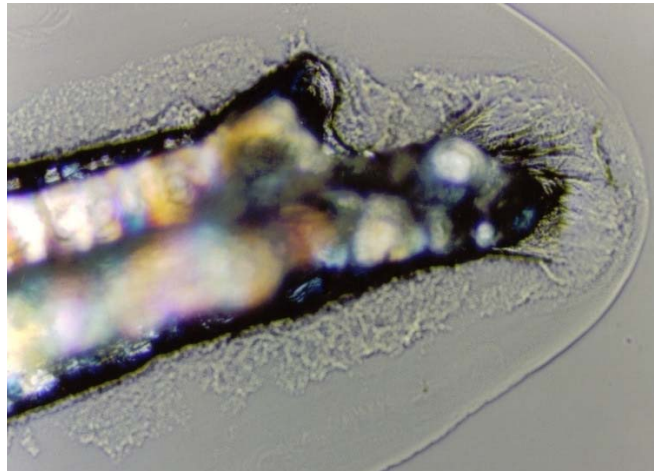


Figura 28 – Micrografia ótica para a fibra de colágeno (aumento de 200X) parcialmente intumescida pela ação da solução contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} em pH 4,8, após permeação de vapor de amônia.

A Figura 29A mostra a micrografia eletrônica de varredura da fibra mostrada na Figura 28. Nesta micrografia, verifica-se que as partículas de fosfato de cálcio foram formadas na interface fibra/gel estruturado e as partículas são semelhantes às observadas nos géis estruturados obtidos nos experimentos de diálise e permeação de amônia. A Figura 29B representa o mapeamento de cálcio obtido por EDS para a mesma região mostrada na figura 29A, confirmando a composição e distribuição das partículas na interface fibra/ gel estruturado.

A formação das partículas na interface gel estruturado/ fibra mostra que os íons Ca^{2+} e H_2PO_4^- difundem exclusivamente no gel intumescido antes da estruturação pela amônia, não permeando pela parte estruturada e anisotrópica da fibra. Esta observação concorda com o observado em micrografias de matriz óssea, nas quais as partículas de fosfato de cálcio revestem as fibras de colágeno presentes nesta parte do tecido ósseo.

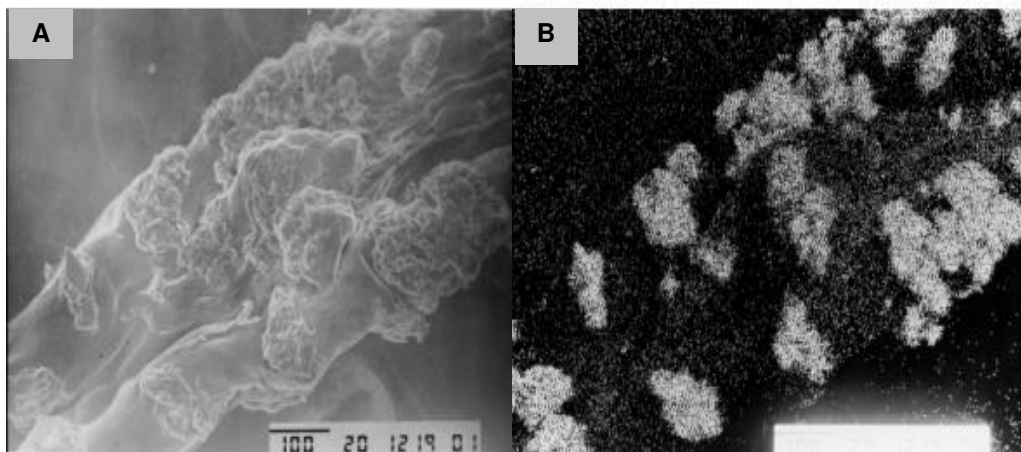


Figura 29 – Micrografias de fibra de colágeno e fosfato de cálcio precipitado. (A) representa a fibra e (B) representa o mapeamento de cálcio na fibra.

Feita a caracterização do tamanho e morfologia das partículas de fosfato de cálcio e observada a semelhança destas partículas com as da matriz óssea, serão apresentados nos tópicos seguintes os resultados de caracterização das partículas formadas nos géis estruturados quanto a sua: composição, cristalinidade, tamanho de partículas, razão Ca/P, assim como as possíveis interações entre os íons e o gel de colágeno e as interações entre a interface inorgânica / orgânica presente nos géis estruturados contendo as partículas precipitadas.

5.7 - Cristalinidade e Composição.

Os géis de colágeno com partículas de fosfato de cálcio obtidas por precipitação e matriz óssea inorgânica desproteínada, disponível no laboratório, foram caracterizados por difração de raios-X, para determinação do grau de cristalinidade, identificação de possível fase cristalina, obtenção do tamanho médio de cristalitos e verificação da semelhança da fase mineral obtida com a fase inorgânica dos ossos.

Os difratogramas de raios-X (Figura 30), obtidos do gel de colágeno dialisado sem Ca^{2+} e PO_4^{3-} , gel de colágeno dialisado em solução de Ca^{2+} e PO_4^{3-} não precipitado e gel de colágeno dialisado em solução de Ca^{2+} e PO_4^{3-} após a precipitação, mostram em geral que há apenas um pico largo em 2θ entre 20° e 35° , provavelmente referente ao colágeno, como observado por Rhee et al e Du et al^[14, 44]. Os difratogramas são típicos de materiais amorfos.

Em comparação, o difratograma obtido para o material precipitado ausente de colágeno, apresenta picos discretos, mostrando a existência de alguma organização cristalográfica. A presença do pico largo, representativo de material amorfo, ainda é marcante, sugerindo a presença de uma fase amorfa, ou sem grande organização a longas distâncias.

Possivelmente a fase cristalina formada na precipitação sem colágeno é de dihidrogeno fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), apresentando picos de difração em 2θ próximo de 12° (002), 21° (121) e 30° .^[48] Pode-se também sugerir a existência de uma mistura de fases, já que pico em 31° é bastante pronunciado para o α -fosfato tricálcico.^[48] Entretanto, sabe-se que em pH 10 a precipitação de fosfatos de cálcio a partir de soluções de Ca^{2+} e PO_4^{3-} forma predominantemente hidroxiapatita em relação às apatitas brushita e monetita, que são formadas em pH mais baixos, como proposto por Walsh et al^[33]. Contudo, o DCPD e o TCP é um dos precursores da HAp, o que justifica sua presença.

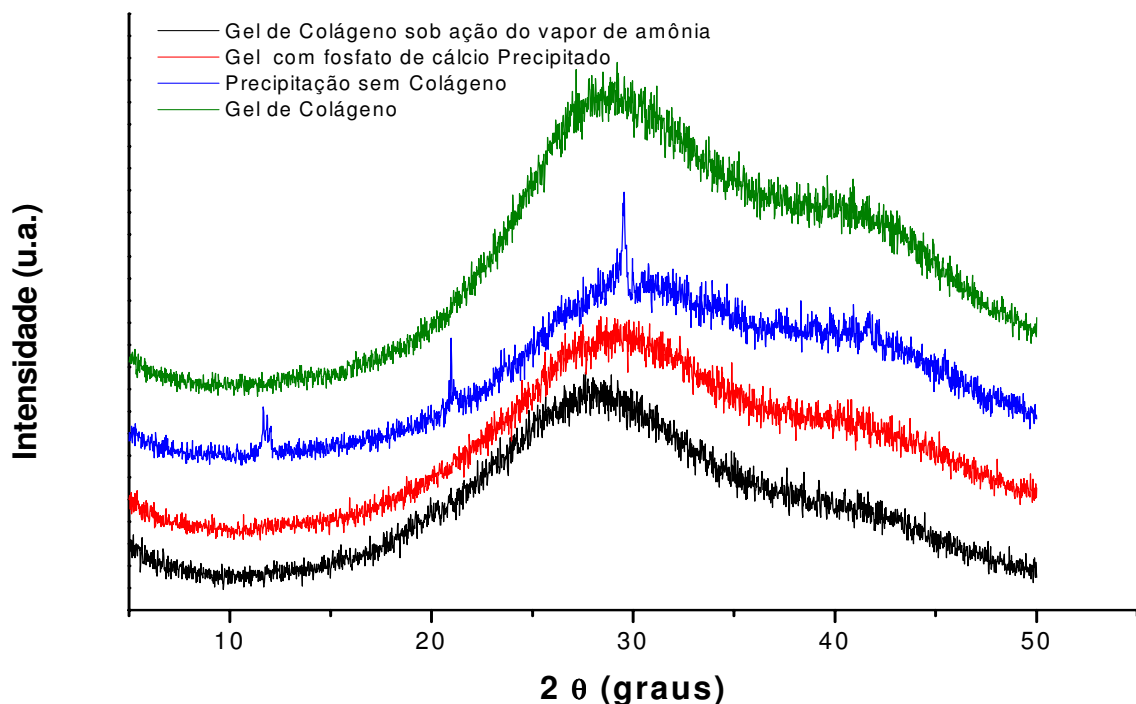


Figura 30 - Difratoogramas de raios-X para os géis de colágeno; géis de colágeno sob ação de vapor de amônia; géis de colágeno contendo fosfato de cálcio e fosfato de cálcio sem colágeno.

A Figura 31 apresenta os difratogramas obtidos para fase óssea inorgânica de crânio e fêmur, disponível no laboratório; fosfato de cálcio dos géis tratados com papaína e com hidrazina e do material sedimentado nas precipitações relatadas nos item 4.2.2 após precipitação.

As posições dos picos de difração são muito semelhantes entre todas as amostras, concordando com as primeiras observações feitas por De Jong e Roseberry et al ^[1] em relação à similaridade de fosfatos de cálcio (hidroxiapatita mais especificamente) e as fases inorgânicas dos ossos.

Os picos apresentados aproximadamente em 26° (002) e 32° (211), representam padrões de difração de apatitas, provavelmente hidroxiapatita e possivelmente outras fases ^[32, 49].

Todos os materiais inorgânicos obtidos através das precipitações e a matriz óssea inorgânica obtidas dos ossos dos ratos são bastante semelhantes quanto à cristalinidade, uma vez que apresentam os mesmos padrões de difração, picos são largos, indicando que o material é formado por cristalitos pequenos ou ainda pouco cristalinos, como observado por Rhee et al e Bigi et al^[14, 32, 49].

Pela comparação das Figuras 30 e 31, observa-se que os fosfatos de cálcio obtidos pela precipitação em colágeno após o tratamento com papaína e hidrazina (Figura 31) que revela a fase mineral, apresentam cristalinidade bem mais acentuada em relação aos materiais recém precipitados (Figura 30) e ainda incluídos na matriz.

Uma explicação possível para a ausência de padrões de difração, remete à presença do pico largo observado para o colágeno, que provavelmente sobrepõe aos picos de baixa intensidade, correspondente aos fosfatos precipitados no interior do colágeno e por isso não foram observados padrões de difração de materiais cristalinos na Figura 30.

Outra explicação para a ausência de picos de difração antes dos tratamentos com hidrazina e papaína, sugere que os fosfatos de cálcio sofrem possível transição para uma fase mais cristalina, assim como proposto por Bradt et al, Weiner et al e Olszta et al. [10, 24, 29, 30] em relação a uma possível fase amorfa precursora, que se forma na presença de sistemas biológicos ou na presença de macromoléculas.

Observa-se que os padrões de difração para os fosfatos de cálcio que sedimentaram após precipitação são muito semelhantes com os demais difratogramas, reforçando a idéia de que foram formados em meio à matriz de colágeno.

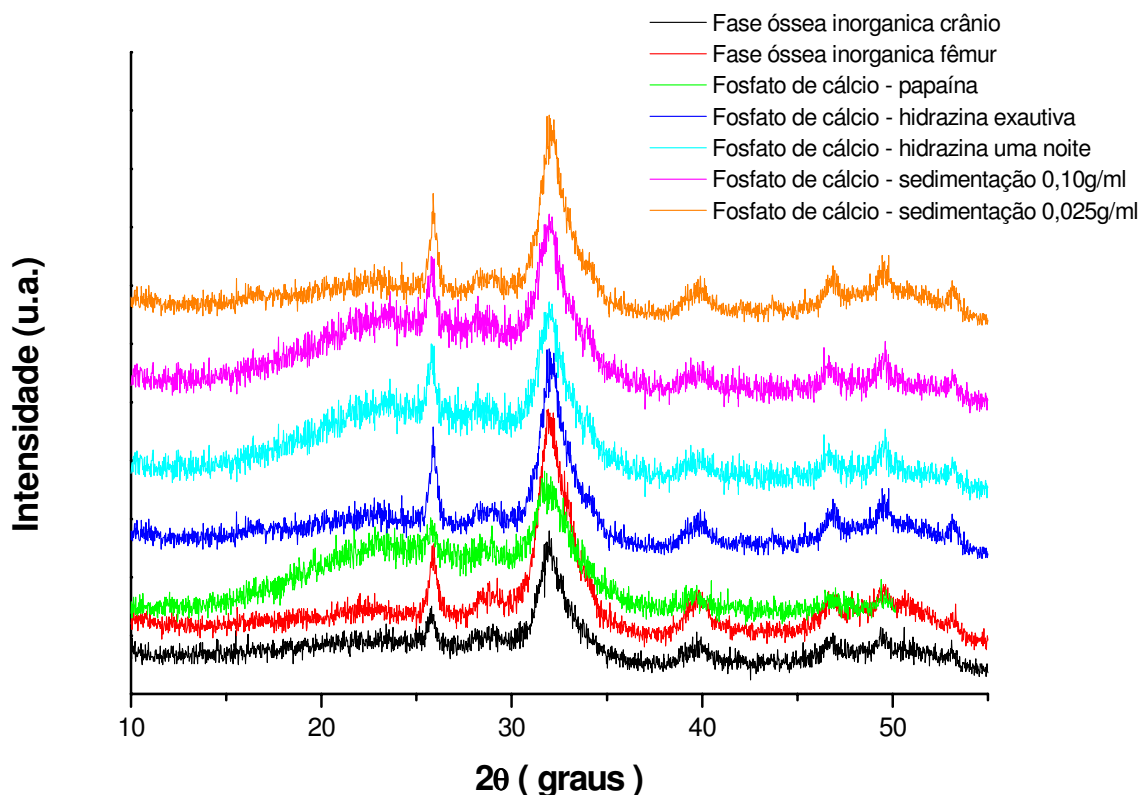


Figura 31 - Difrátogramas de raios-X para os fosfatos de cálcio de ossos do crânio e fêmur de rato, fosfato após tratamento com papaína, fosfato cálcio após tratamento com hidrazina, fosfato de cálcio sedimentado.

5.8 - Determinação do tamanho médio de partículas.

As partículas de fosfato de cálcio precipitadas no gel de colágeno estruturado após tratamento com hidrazina e a fase óssea inorgânica dos ratos *Wistar* foram analisados por difração de raios-X para determinação do tamanho dos cristalitos, usando a equação de Debye Scherrer. [37, 38, 39, 40]

A Figura 32 apresenta os difratogramas e embora largos, os picos em 26° (002) e 32° (211), como já afirmado, representam padrões típicos de difração de apatitas, possivelmente hidroxiapatita [10, 32, 49].

Aplicando a equação de Debye-Scherrer para a largura de meia altura do pico em 25.8° (002) obteve-se os tamanhos médios de cristalitos mostrados na Tabela 2.

Os tamanhos dos cristalitos mostram que as partículas de fosfato de cálcio são formadas por aglomerados de cristais nanométricos, similares aos observados para fase óssea inorgânica.

Tabela 2: Tamanhos aproximados de cristalitos dos fosfatos de cálcio sintéticos e da fase óssea inorgânica, obtidos por Debye-Scherrer.

Material	Tamanho (nm)
Fosfato de cálcio	$\cong 20$ nm
Fase óssea inorgânica	$\cong 20$ nm

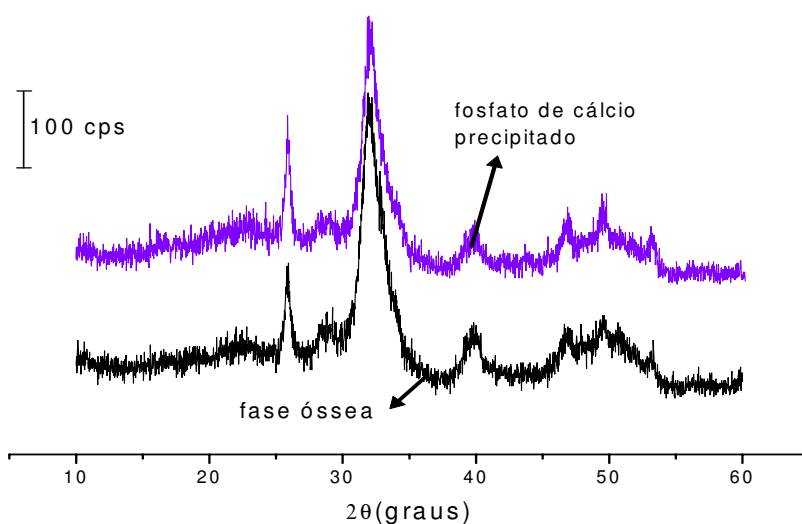


Figura 32 - Difratoograma de raios-X dos fosfatos de cálcio precipitados em colágeno após tratamento com hidrazina e fase mineral óssea.

5.9 - Composição.

A razão Ca/P das partículas de fosfato de cálcio formadas nos géis estruturados foram determinadas por ICP-OES e a Tabela 3 traz os resultados obtidos.

Os resultados mostram razão Ca/P próximos ou iguais a 1,67 para amostras preparadas em condições e concentrações diferentes de colágeno, valor típico de cristais de HAp^[48]. No entanto, há resultados em que a razão Ca/P é superior a da hidroxiapatita, o que representa um aumento na razão Ca/P, fato que pode ser explicado pela substituição de carbonato no lugar do hidrogenofosfato ou hidroxila no lugar do hidrogenofosfato.^[48]

Esses resultados indicam fortemente a presença majoritária da fase cristalina dos precipitados como sendo HAp.^[48] Novamente pode-se notar a semelhança da razão Ca/P das partículas precipitadas nos géis estruturados com a razão Ca/P da fase óssea inorgânica.

Tabela 3: Valores de concentração relativos de cálcio e fósforo obtidos pela técnica de ICP/OES para amostras de materiais obtidos pela precipitação de fosfato de cálcio em meio à matriz de colágeno por permeação de vapor de amônia.

Amostras de fosfato de cálcio	Razão Ca/P
Amostra 1	1,67
Amostra 2	1,67
Amostra 3	1,66
Amostra 4	1,76
Amostra 5	1,78
Fase óssea inorgânica de crânio	1,71
Fase óssea inorgânica de fêmur	1,70

5.10 - Interação fosfato-colágeno: espectros no infravermelho.

Conforme proposto inicialmente por Rhee et al ^[14], íons cálcio interagem com grupos aniônicos do colágeno, principalmente com os grupos carboxilato, realizando a primeira etapa de precipitação dos fosfatos de cálcio, constituintes da matriz óssea inorgânica e que é fundamental para as etapas seguintes da mineralização óssea, além de influenciar a morfologia e disposição das partículas de fosfato de cálcio, formadas na matriz de colágeno. Com intenção de investigar as interações Ca^{2+} - colágeno, foram feitos espectros de IV de colágeno dialisado com soluções de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , porém sem precipitação pela permeação com amônia, pois caso contrário, não haveria íons Ca^{2+} livres.

A Figura 33 mostra os espectros de FTIR obtidos segundo a técnica de ATR, para géis de colágeno e géis de colágeno na presença de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Na Figura 34 temos a ampliação do espectro da Figura 33 na região de interesse.

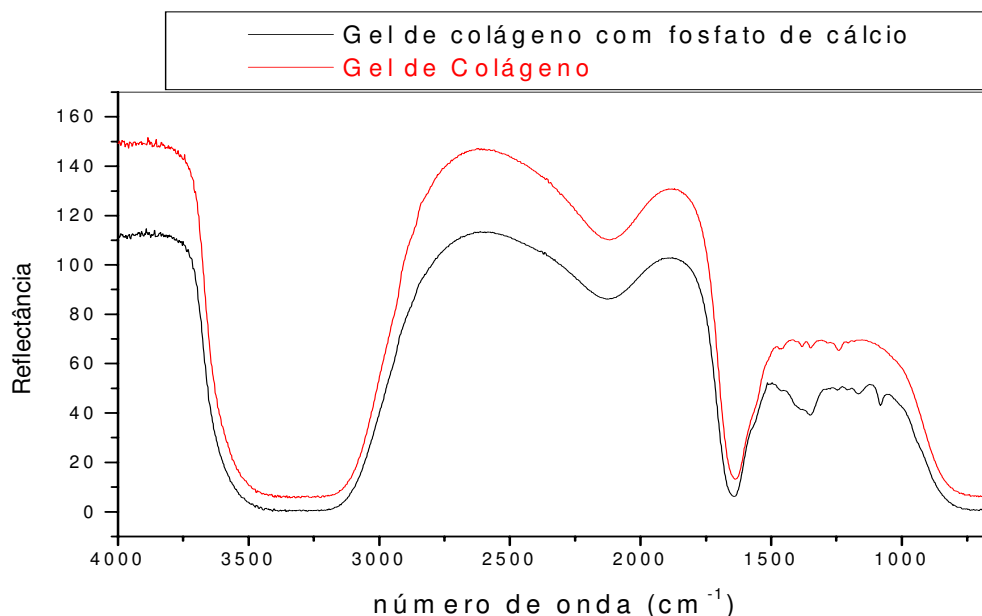


Figura 33 - Espectro no infravermelho dos géis de colágeno e géis de colágeno na presença de Ca^{2+} e PO_4^{3-} (FT-IR).

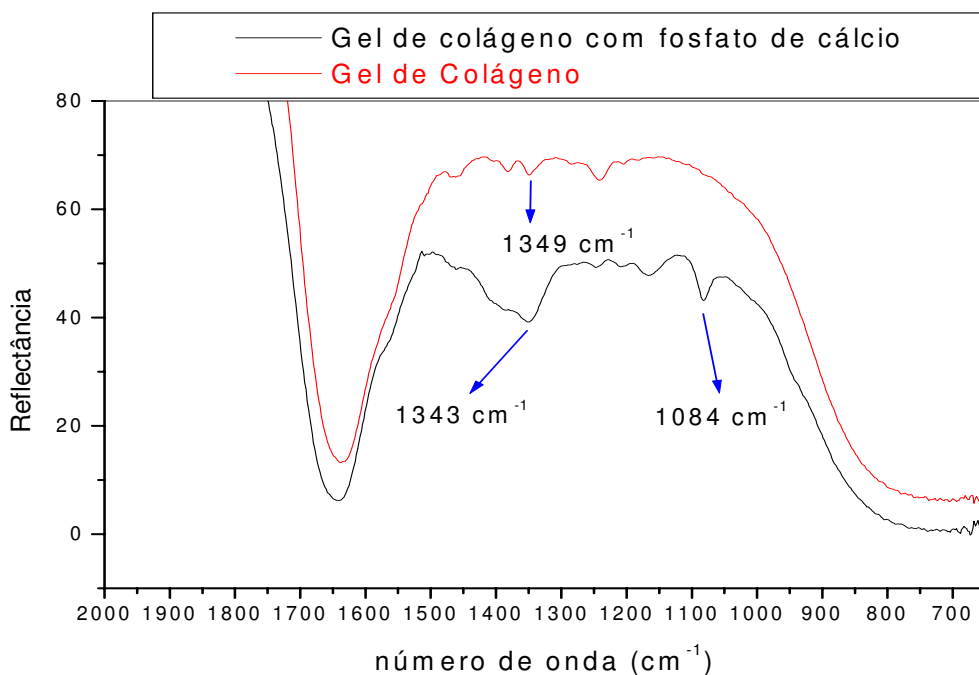


Figura 34 - Ampliação do espectro no infravermelho da Figura 33.

A Figura 33 mostra que os géis de colágeno, sem e com os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , apresentam espectros de infravermelho, muito semelhantes até 1500 cm^{-1} , região ausente de estiramentos e deformações do fosfato.

A Figura 34 mostra que o gel de colágeno apresenta a banda de estiramento em 1349 cm^{-1} , correspondente à presença de carboxilato (RCOO^-). O gel de colágeno na presença de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} apresenta a banda de estiramento do PO_4^{3-} em 1084 cm^{-1} e a banda mais intensa atribuída ao RCOO^- um pouco deslocada em 1343 cm^{-1} . O resultado indica que existe interação dos COO^- do colágeno com íons cálcio. ^[12, 14] O deslocamento observado é consistente, pois quando o carboxilato se liga ao cálcio, a nova ligação promove enfraquecimento da ordem de ligação $\text{C}=\text{O}$.

Esta interação reforça a forte afinidade de adsorção entre a hidroxiapatita e a fase orgânica. Essa adsorção reafirma as interações eletrostáticas entre sítios catiônicos do mineral (cálcio) e domínios aniônicos da proteína.

5.11 - Fosfatos de cálcio: espectros no infravermelho.

A Figura 35 mostra os espectros usando a técnica de FTIR, com pastilha de KBr, obtido a partir do fosfato de cálcio precipitado em colágeno dialisado, segundo procedimento 4.2.2, após tratamento com hidrazina e das fases ósseas inorgânicas de fêmur e de crânio desproteinizadas e disponíveis no laboratório. As atribuições das principais bandas presentes nos espectros são apresentadas na Tabela 4 ^[50].

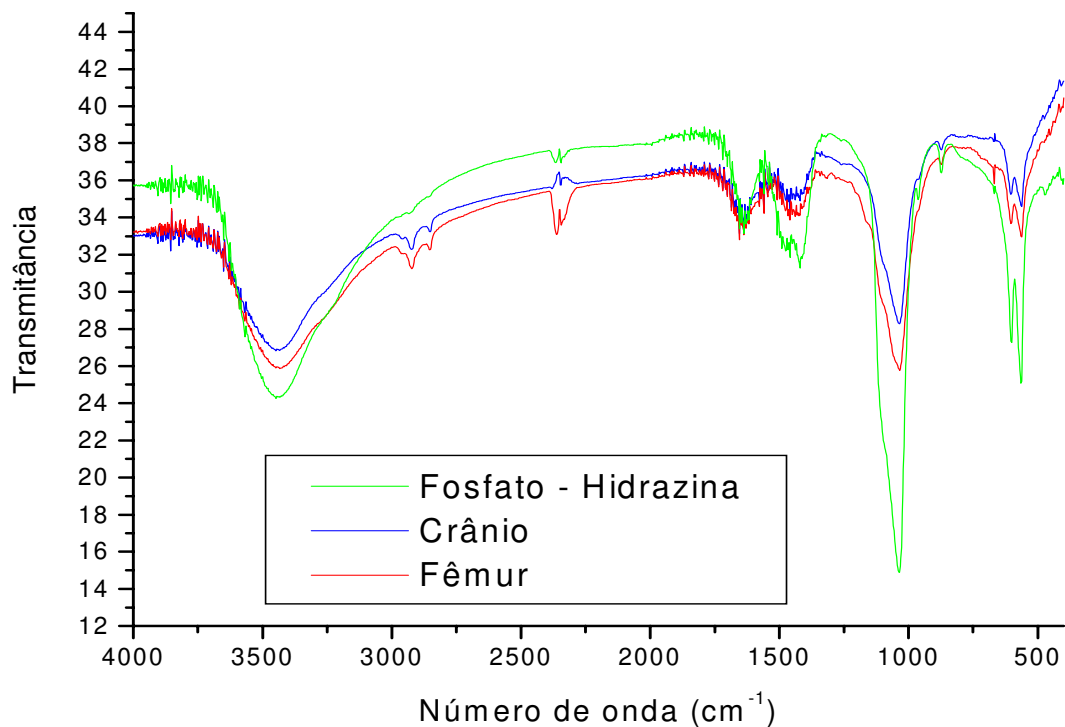


Figura 35 - Espectros no IV da fase óssea inorgânica de crânio e fêmur de ratos e do fosfato de cálcio precipitado após tratamento com hidrazina.

Tabela 4: Atribuição das bandas dos espectros no Infravermelho.

Banda / cm⁻¹	Atribuição
3580	ν_s estiramento OH de hidroxila
3400	ν_s estiramento OH de H ₂ O
1645	deformação H-O-H de H ₂ O
1470-1420	ν_1 estiramento simétrico de CO ₃ ²⁻
1128	ν_6 estiramento PO ₃ ⁻ em HPO ₄ ²⁻
1100, 1093, 1047	ν_3 estiramento assimétrico de PO ₄ ³⁻ ou ν_6 estiramento PO ₃ em HPO ₄ ²⁻
965	ν_1 estiramento simétrico PO ₄ ³⁻
918	ν_3 estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻
884	ν_2 estiramento antissimétrico de CO ₃ ²⁻
650	vibrações OH de hidroxila
616, 581	ν_4 deformação O-P-O em PO ₄ ³⁻ ou ν_4 deformação O-P-O em HPO ₄ ²⁻
535	ν_7 estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻

As fases minerais dos materiais precipitados reproduzem de maneira muito semelhante os espectros das fases ósseas usados comparativamente, comprovando novamente a presença de fosfatos de cálcio. No entanto, existem no espectro do material precipitado bandas mais finas e acentuadas que sugerem partículas de maior cristalinidade, quando comparadas com as partículas ósseas.

Essa observação é pertinente, pois as fases ósseas são sabidamente pouco cristalinas e os fosfatos após ataque com hidrazina podem apresentar ligeiro aumento da cristalinidade. Optou-se por representar os padrões de bandas apenas para a amostra sem colágeno, pois todos os demais não estavam na forma de pó e apresentariam muitas bandas de absorção para a fase orgânica.

As fases ósseas inorgânicas apresentam bandas características de carbonato, que indicam que o carbonato substitui OH⁻ e HPO₄²⁻ na estrutura da HAp, formando apatitas carbonatadas. Para os materiais obtidos nas sínteses,

nenhum cuidado com o controle de CO₂ foi realizado, portanto a presença de CO₃²⁻ nas amostras é perfeitamente possível.

A técnica de FTIR, é reconhecidamente sensível a compostos orgânicos, e por esta razão também foi escolhida para analisar se os compostos orgânicos formadores da matriz (principalmente colágeno) foram eliminados pelo tratamento com hidrazina. Os espectros mostram que a composição das 3 amostras são semelhantes indicando que, dentro do limite de detecção do FTIR, não se observa a presença significativa de compostos orgânicos constituintes da matriz óssea quanto menos na amostra de fosfato precipitado.

5.12 - Calorimetria Diferencial (DSC)

Amostras de gel de colágeno estruturado e gel de colágeno estruturado com partículas de fosfato de cálcio foram analisadas por DSC. A Figura 36 mostra o resultado da calorimetria diferencial de varredura.

A comparação das curvas calorimétricas do colágeno estruturado com a do colágeno estruturado com partículas de fosfato de cálcio mostra que para a amostra contendo fosfato de cálcio ocorre transição endotérmica por volta de 90°C que não está presente na curva correspondente ao colágeno estruturado.

Na curva calorimétrica da amostra contendo apenas colágeno estruturado, observa-se uma transição endotérmica discreta por volta de 65°C, que pode sugerir a desnaturação do colágeno.

Este resultado permite afirmar que a formação das partículas de fosfato de cálcio simultaneamente com o processo de sua estruturação, resulta em uma interação entre os dois componentes que estabiliza o colágeno, mostrando que existe interação de colágeno com o fosfato de cálcio e não apenas com os íons cálcio.^[41, 46]

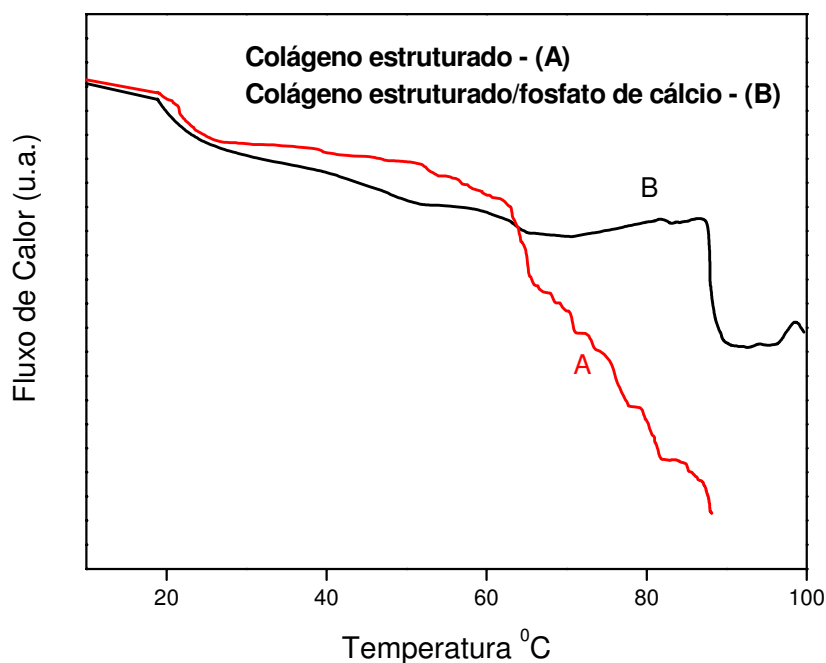


Figura 36 - DSC: (A) Colágeno estruturado e (B) Colágeno mineralizado com fosfato de cálcio.

5.13 – Considerações Finais e Conjecturas.

A perda de qualidade de vida que pode ser causada por enfermidades e traumas dos ossos aumenta a importância em estudar e compreender este material fantástico. Entender as enfermidades dos ossos, ou seja, conhecê-las melhor, pode contribuir para a solução destes problemas.

O crescimento da expectativa de vida da população e o modo de viver a “vida moderna” tornam mais comuns os problemas com os ossos. Neste contexto as Nações Unidas declararam que o período entre 2000-2010 é a “Década do Osso e da Junta”.^[51]

Com este foco, fosfatos de cálcio são, alvo de interesse para a preparação de biomateriais em associação com matrizes, principalmente de colágeno, uma vez que apresentam similaridades com relação à composição da matriz óssea.

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis para reparar ou substituir tecidos duros (ossos e dentes) tem sido, portanto, uma área de atividade intensa.

Nos últimos anos tem crescido muito o esforço para produzir biomateriais nanoparticulados, usando processos biomiméticos inovadores, e ensinamentos da própria natureza.

Todas essas informações justificam e fortalecem os tópicos abordados neste trabalho e os resultados obtidos podem contribuir para o progresso dos estudos nesta área.

Esta pesquisa não tinha como propósito a produção de biomateriais para enxertos ósseos, mas inerente às atividades desenvolvidas e o fato da área de biomateriais estar intimamente ligada a área médica, não se pode ignorar as características potencialmente presentes como biocompatibilidade, bioatividade e a similaridade química dos materiais preparados com a HAp, que no futuro, com aprofundamento e criatividade, podem transformá-los em nanocompósitos para substituição óssea.

O objetivo de muitos pesquisadores nesta área, remete à possibilidade de, um dia, poder produzir um material que se assemelhe de fato, e tenha as mesmas características dos ossos. O trabalho inter e multidisciplinar parece ser condição *sine qua non* para o sucesso na área de biomateriais, uma vez que a natureza os faz assim e com extrema competência. Para a produção de novos materiais que substituam os ossos acredita-se na necessidade de desvendar muitos dos mistérios da osteogênese.

6 - Conclusões.

A permeação do vapor de amônia e conseqüente elevação do pH estruturam o colágeno e precipita as partículas de fosfato de cálcio em processos que ocorrem simultaneamente.

Os géis de colágeno que sofrem estruturação, simultaneamente com a formação de partículas de fosfato de cálcio, alteram a morfologia destas partículas nucleadas e crescidas no seu interior.

A concentração de colágeno nos géis altera as morfologias das partículas de fosfato de cálcio nucleadas e crescidas no seu interior.

Quando a estruturação resulta em fibrilogenese, além da morfologia, são simultaneamente, produzidas partículas de fosfato de cálcio intimamente ligadas às fibras e observa-se um efeito de orientação sobre as partículas formadas, assim como é observado nas partículas de fosfato de cálcio formadas nas matrizes ósseas de ratos Wistar.

O colágeno interage tanto com os íons cálcio dispersos no gel, antes da estruturação, assim como as partículas de fosfato de cálcio que estabilizam o gel. A morfologia, cristalinidade e tamanho de cristalitos das partículas formadas nos géis estruturados, são semelhantes às observadas para as partículas de fosfato de cálcio que constituem a matriz inorgânica dos ossos.

O método proposto para precipitação de fosfato de cálcio em meio a matriz de colágeno é inovador e tem potencial para produção de biomaterial sintético de boa qualidade em condições de assepsia que apresenta similaridades com diversas propriedades observadas para a matriz óssea, além disso, as similaridades dos materiais sintetizados com a fase óssea inorgânica podem, no futuro, formar bons osteointegradores e/ou osteocondutores.

7 - Referências Bibliográficas.

- [1] Landis W. J., *Connect. Tissue Res.*, **1997**, 34, 239-246.
- [2] Kawachi E. Y., Bertran C. A., Reis R., Alves O. L., *Quim. Nova*, **2000**, 23, 518-522.
- [3] Seibel, J. M., Robins S. P., Bilezikian, J. P., **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. Academic Press, 421-430, **1999**.
- [4] Murugan R., Ramakrishna S., *Compos. Sci. Technol.*, **2005**, 65, 2385-2406.
- [5] Song J., Malathong V.C., Bertozzi R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 3366-3372.
- [6] Rubin M. A., Jasiuk I., Taylor J., Rubin J., Ganey T., Apkarian R., *Bone*, **2003**, 33, 270-282.
- [7] Weiner S., Wagner H. D., *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **1998**, 28, 271-298.
- [8] Gutierrez M., Lopes M. A., Hossain N. S., Cabral A. T., Almeida L., Santos J. D., *Arquimed*, **2006**, 19, 153-162.
- [9] Suchanek W., Yoshimura M., *J. Mater. Res.*, **1998**, 13, 94-117.
- [10] Bradt J. H., Mertg M., Teresiak A. Pompe W., *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 2694-2701.
- [11] Goissis G., Marcantônio E. J., Marcantônio R. A. C., Lia R. C. C., Cancian D. C. J., Carvalho W. M., *Biomaterials*, **1999**, 20, 27-30.
- [12] Mayumi I., Moriwaki Y., Yamaguchi R., Kuboki Y., *Connect. Tissue Res.*, **1997**, 36, 73-83.
- [13] Zambuzzi W. F., *Mecanismos de Transdução de Sinal Envolvidos com a Diferenciação de Osteoblastos e Osteócitos*. Tese de Doutorado. **2008**, Instituto de Biologia – Unicamp.
- [14] Rhee S., Lee J. D., *J. Am. Ceram. Soc.*, **2000**, 83, 2890- 2892.
- [15] Voet D., Voet J.G. **Biochemistry**. Oxford University Press, 156-161, **1995**.
- [16] Mano J. F., *Mater. Sci. & Eng.*, **2005**, 25, 145-152.
- [17] Aubin J. E., Liau F., **Principles of bone biology**, Academic Press, **1996**.
- [18] Ducey P., Schinke T., Karsenty G., *Science*, **2000**, 289, 1501-1504.
- [19] Alberts B., Bray D., Raff M., Roberts K., **Molecular biology of the cell**. Garland Publishing, Inc., 802-815, **1989**.
- [20] Piez K. A., Reddi A. H., **Extracellular matrix biochemistry**. Oxford University Press, **1984**.
- [21] Posner A. S., *Clin. Orthop. Rel Res.*, **1985**, 200, 87- 97.
- [22] Boskey A. L., *Connect. Tissue Res.*, **1996**, 35, 357-363.
- [23] Bet M. R., Goissis G., Plepis A. M. G., *Quím. Nova*, **1997**, 20, 5.
- [24] Weiner S., **Biom mineralization: A structural perspective**, *J Struct. Biol.*, doi: 10.1016/j.jsb.2008.02.001. **2008**.
- [25] Vallet-Regí M., *Anal. de Quím.*, **1997**, 93, 6.
- [26] Videau J. J., Dupuis V., *Eur. J. Solid. State. Inorg. Chem.* **1991**, 28, 303.
- [27] Rey C., *Biomaterials*, 11, **1990**, 13-15.
- [28] Baig A. A., Fox J. L., Wang Z., Higuchi W. I., Miller S. C., Barry A. C., Otsukea

- M., *Calcif. Tissue Int.*, **1999**, 64, 329-339.
- [29] Olszta M. J., Odom D. J., Douglas E. P., Gower L. B., *Connect. Tissue Res.*, 2003, 44, 326-334.
- [30] Olszta M. J., Cheng X., Jee S. S., Kumar R., Kim Y. Y., Kaufaman M. J., Douglas E. P., Gower L. B., *Mater. Sci. & Eng.*, **2007**, R 58, 77-116.
- [31] Interrante, L.V. Hampden-Smith, M.J., **Chemistry of advanced materials: an overview**. Wiley-VCH Inc., 499-526, **1998**.
- [32] Rhee S., Suetsugu Y., Tanaka J., *Biomaterials*, **2001**, 22, 2843-2847.
- [33] Walsh W.R., Christiansen D.L., *Biomaterials*, **1995**, 16, 1363-1371.
- [34] Eidem A. S., *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 91, 481-484.
- [35] Schor S.L., *J. Cell. Sci.*, **1980**, 41, 159-175.
- [36] Bertazzo S., Bertran, C. A., *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102, 137-145.
- [37] Burnell J. M., Teubner E. J., Miller A. G., *Calcif. Tissue Int.*, 1980, 31, 13-19.
- [38] Legeros R. Z., Balmain N., Bonel G., *Calcif. Tissue Int.*, 1987, 41, 137-144.
- [39] Müller F. A., Müller L., Caillard D., Conforto E., *J. Cryst. Growth*, **2007**, 304, 464-471.
- [40] Klug H. P., Alexander L. E., **X-ray diffraction procedures**, John Wiley and Sons, 687-692, **1974**.
- [41] Fan Y., Duan K., Wang R., *Biomaterials*, **2005**, 26, 1623-1632.
- [42] Gobeaux F., Mosser G., Anglo A., Panine P., Davidson P., Giraud-Guille M. M., Belamie E., *J. Mol. Biol.*, **2008**, 376, 1509-1522.
- [43] Termine J. D., Eanes E. D., Greenfie D. J., Nysten M. U., Harper R. A., *Calcif. Tissue Res.*, **1973**, 12, 73-90.
- [44] Du C., Cui F. Z., Zhang W., Feng Q. L., Zhu X. D., Groot K., *J. Biomed. Mater. Res.*, 50, **2000**, 518-527.
- [45] Combes C., Rey C., *Biomaterials*, **2002**, 23, 2817-2823.
- [46] Zhang L. J., Feng X. S., Liu H. G., Qian D. J., Zhang L., Yu X. L., Cui F. Z., *Mater. Let.*, **2004**, 58, 719-722.
- [47] Bertazzo S., Matriz Óssea Inorgânica e Propriedades da Interface Fosfatos de Cálcio/Soluções Aquosas. Tese de Doutorado. **2007**. Instituto de Química – Unicamp.
- [48] Elliott J.C., **Structure and chemistry of apatites and other calcium orthophosphates**. Elsevier, 51-85, **1994**.
- [49] Bigi A., Gandolfi M., Koch M. H. J., Roveri N., *Biomaterials*, **1996**, 17, 1195-1201.
- [50] Kawachi E.Y., *Síntese de Nanopartículas de Fosfatos de Cálcio em Ambientes Líquidos Confinados*. Tese de Doutorado. **2001**. Instituto de Química – Unicamp.
- [51] Boskey A. L., *Calcif. Tissue Int.*, **2003**, 72,533-536.