

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

Thelma Matuura de Batista

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2008

# *Dedicatória*

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

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

# *Agradecimentos*

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

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

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

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

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

*A CAPES pela bolsa concedida.*

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

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

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

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

*Charles Chaplin*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

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

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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



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

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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

