

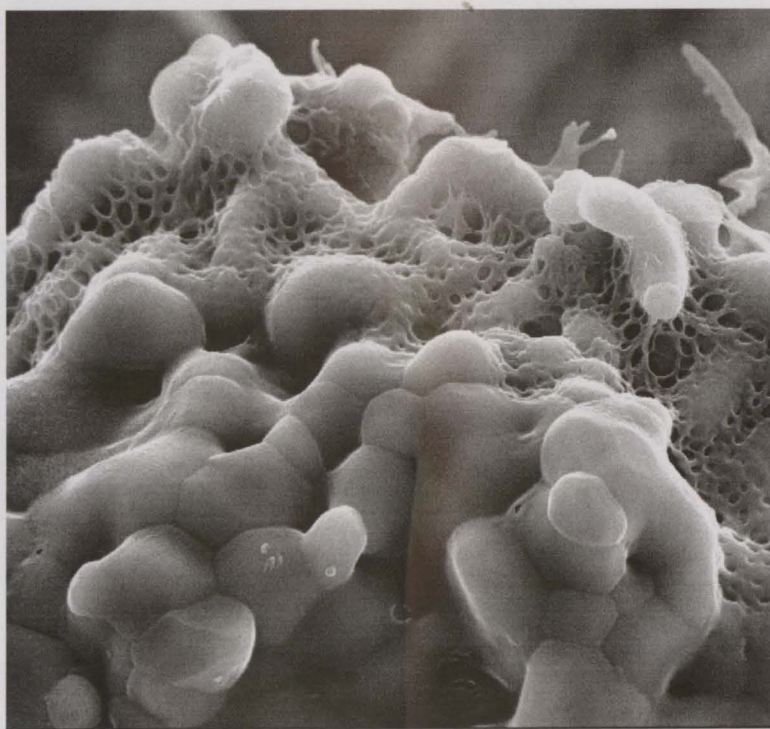


Universidade do Porto

FEUP Faculdade de Engenharia

ESTÁGIO

MATERIAIS CERÂMICOS MACROPOROSOS
BIOACTIVOS ASSOCIADOS AO COLAGÉNIO
PARA SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA



SANDRA MARIA DA SILVA TEIXEIRA

2ºSemestre 2002/2003

5º ANO



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu



Mais Educação

669(047.3) /LEMM 2002/TEIA

Universidade do Porto	
Faculdade de Engenharia	
Biblioteca	
Nº	90001
CDU	
Data	21/05/2007

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Professor Fernando Jorge Monteiro por todo o apoio na realização deste estágio.

Quero agradecer às pessoas do Instituto de Engenharia Biomédica, que me ajudaram quer na execução das experiências, quer na interpretação de resultados, nomeadamente: Ana Queiroz, Pedro Granja, Cristina Martins, Susana Sousa, Isabel Amaral e Manuela Brás.

Quero também agradecer a todas as pessoas do INEB que me apoiaram na realização deste estágio: Ana Silva, Ana Paula Filipe, Catarina Homem, Cristina Barrias, Cristina Ribeiro, Daniel Duarte, Dulce Carqueijó, Fátima Pina, Judite Barbosa, Meriem Lamghari, Serafim Oliveira, Sofia Rodrigues, Susana Carrilho, Vanessa Pereira e Virgínia Fonseca.

Finalmente, tenho que agradecer aos meus pais e ao Daniel por todo apoio, compreensão e pelo tempo que não pude passar com eles.

Índice

Índice

1.Objectivos	1
2.Hidroxiapatite	2
2.1 Produção da matriz de hidroxiapatite	3
2.2 Caracterização da matriz de hidroxiapatite	5
2.2.1 Porosímetria	5
2.2.1 Análise SEM	6
2.2.3 Análise FTIR	7
3.Colagénio	8
3.1 Estrutura e propriedades	8
3.2 Ensaios de degradação	12
3.3 Análise FTIR	16
4. Produção do compósito HA/COL	19
4.1 Ensaios de degradação	21
4.2. Análise FTIR	24
4.3 Análise SEM	26
5. Conclusão	33
6.Bibliografia	33
Anexos	
Anexo I	
Anexo II	
Anexo III	
Anexo IV	
Anexo V	

1. Objectivos

O objectivo deste estágio consistiu, numa primeira fase, no desenvolvimento de uma matriz cerâmica macro e micro porosa com porosidade interconectada.

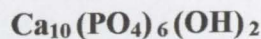
Posteriormente, esta matriz seria impregnada com uma proteína natural – colagénio.

A estratégia utilizada no desenvolvimento deste compósito resume-se à utilização de materiais que são próprios da constituição do osso e mais do que isso, ao desenvolvimento de um compósito cuja estrutura é o mais próxima possível à do osso.

Este compósito pode então ser aplicado nas áreas de substituição, reparação e regeneração óssea.

2. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite é um dos principais constituintes minerais do osso e do dente e a sua fórmula química é:



É um fosfato de cálcio no qual a razão Ca/P é de 1,67. Este composto pertence ao grupo de minerais da apatite, cuja composição é caracterizada por $\text{M}_{10}(\text{Z}\text{O}_4)_6\text{X}_2$

A hidroxiapatite é caracterizada por um sistema cristalino hexagonal. O esquema da estrutura cristalina da hidroxiapatite pode ser visto na figura 2.1. [1]

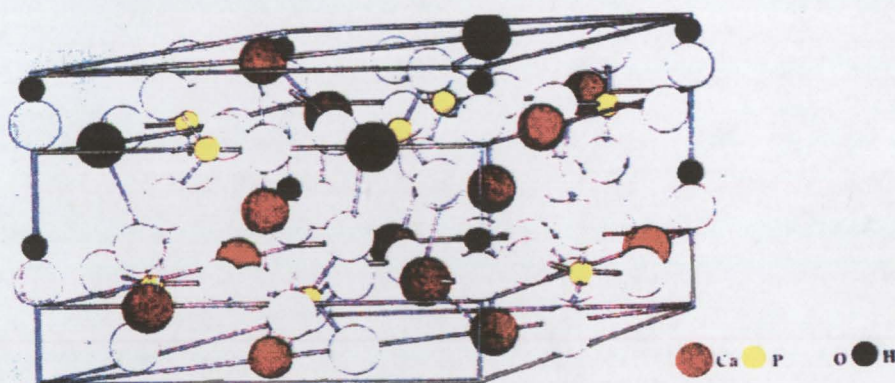


Figura 2.1 Estrutura cristalina da hidroxiapatite.

Uma das propriedades mais importantes da hidroxiapatite é a sua excelente biocompatibilidade. Esta propriedade permite que a rejeição do corpo ao implante de hidroxiapatite seja muito limitada, além de que, não liberta produtos nocivos para o organismo.

Os materiais bioativos podem estimular o crescimento ósseo e são, por vezes, compostos por materiais naturais. Assim, implantes porosos de hidroxiapatite, compósitos de colagénio e hidroxiapatite imersa em colagénio, são materiais que demonstram excelente capacidade regenerativa óssea. [2]

Existe pois, a necessidade de desenvolver biomateriais bioativos, que estimulem o crescimento ósseo, permitam a livre circulação de nutrientes e células ósseas e com propriedades mecânicas semelhantes às do osso. Para isto, é necessário que o material a desenvolver seja macro e micro poroso além de osteocondutor. [1]

2.1 Produção da matriz de hidroxiapatite

Introdução

O material que se pretende obter tem de obedecer a vários requisitos, entre os quais se destacam:

- Bioactividade — para que haja a interacção entre o tecido vivo e o material de implante e que estimule o crescimento ósseo;
- Composição semelhante à do osso — de maneira a permitir uma boa integração no ambiente ósseo;
- Porosidade — O material de implante deve ser suficientemente macroporoso para facilitar a livre circulação das células ósseas, nutrientes e para permitir o crescimento do osso até ao interior. Deve também apresentar uma certa microporosidade para facilitar a adesão celular;
- Interconectividade — O material deve ter poros interconectados possibilitando a livre circulação de células entre os poros.
- Propriedades mecânicas — consoante o local de implante. Não se visa aqui obter um material aplicável a pontos de carga elevada no esqueleto mas sim um material que possa repovoar a zona do defeito afectada pela ausência de osso mineral;
- Reprodutibilidade — O material a desenvolver deve ser facilmente reprodutível.

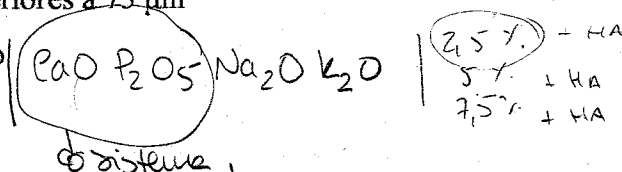
Tendo em consideração estes requisitos, foi desenvolvida uma matriz porosa de hidroxiapatite.

Esta matriz cumpre todos os requisitos supracitados. De seguida proceder-se-à à descrição da sua produção.

Produção da matriz

Os materiais utilizados para a produção da matriz de hidroxiapatite foram os seguintes:

- ☐ Esponja de poliuretano
- ☐ Grânulos de hidroxiapatite com dimensões inferiores a 75 μm
- ☐ Grânulos de hidroxiapatite reforçada com vidro
- ☐ Tensoactivo
- ☐ Água



As esponjas utilizadas tinham dois formatos que podemos ver nas figuras 2.1.1 e 2.1.2.

As esponjas foram produzidas num goblé no qual foram colocados: tensoactivo, água e hidroxiapatite segundo um rácio definido. Os materiais foram misturados com a ajuda de um agitador e a uma temperatura sempre inferior a 50°C. Posteriormente, as esponjas foram impregnadas com a solução previamente descrita e sinterizadas.

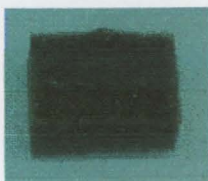


Figura 2.1.1 Esponja em forma de bloco

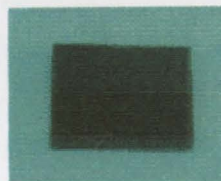


Figura 2.1.2 Esponja em forma de placa

As amostras em forma de placas foram cortadas em cubos com as dimensões aproximadas de 3x5x3mm. O ciclo de sinterização que as amostras sofreram foi o seguinte (figura 2.1.3):

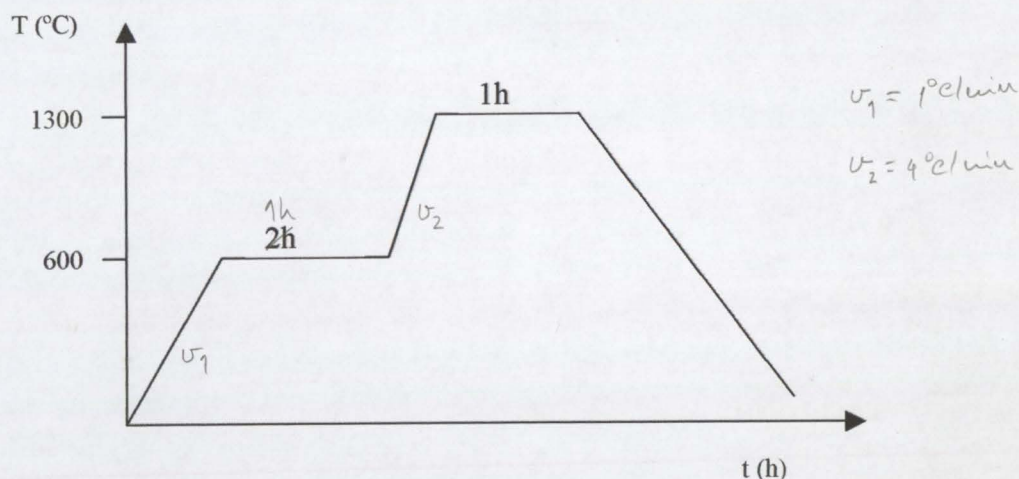


Figura 2.1.3 Ciclo de sinterização aplicado.

Resultados

O aspecto das esponjas após a sinterização pode ser observado nas figuras 2.1.4 e 2.1.5.



Figura 2.1.4

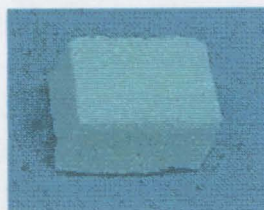


Figura 2.1.5

Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de hidroxiapatite e não com hidroxiapatite reforçada com vidro. As matrizes reforçadas com vidro eram pouco manipuláveis e de fraca consistência. As matrizes obtidas com hidroxiapatite obedeciam a um rácio específico (Água: HA: Tensoactivo) e dentro dos rácios experimentados (2:2:0,1 - 3:3:0,1 - 6:6:0,2 - 6:4:0,2) aquele que deu melhores resultados é 6:4:0,2. As matrizes cerâmicas com este rácio foram escolhidas para a produção do compósito de hidroxiapatite/colagénio.

2.2 Caracterização da matriz de hidroxiapatite

2.2.1 Porosímetria

Foram realizados ensaios de porosímetria de intrusão de mercúrio às seguintes matrizes: 3:3:0,1; 6:4:0,2 e 6:6:0,2. Esta técnica de porosímetria tem sido extensivamente utilizada para caracterizar vários aspectos dos materiais porosos, e baseia-se no facto de o mercúrio se comportar como um fluido não-molhante em relação à maior parte das substâncias. Assim, não penetra espontaneamente em pequenos furos ou fissuras destes materiais a menos que se aplique uma pressão [3]. Os resultados relativos às porosidades obtidas de cada matriz podem ser observados na tabela 2.2.1.

	3:3:0,1	6:4:0,2	6:6:0,2
<i>Porosidade total (%)</i>	93,6%	80,7%	97%
<i>Macroporosidade (%)</i>	93,3%	79,1%	96,8%
<i>Microporosidade (%)</i>	0,3%	1,6%	0,2%

Tabela 2.2.1 Resultados de porosidade obtidos para as matrizes cerâmicas 3:3:0,1; 6:4:0,2 e 6:6:0,2.

Por exemplo, no caso da matriz 6:4:0,2 temos que a porosidade total é de 80,7% dos quais 79,1% são macroporos e cerca de 1,6% são microporos, cujo diâmetro se situa entre 0,7 e 1 μm como se pode ver na fig. 2.2.1. Os gráficos correspondentes às restantes matrizes podem ser consultados no Anexo I.

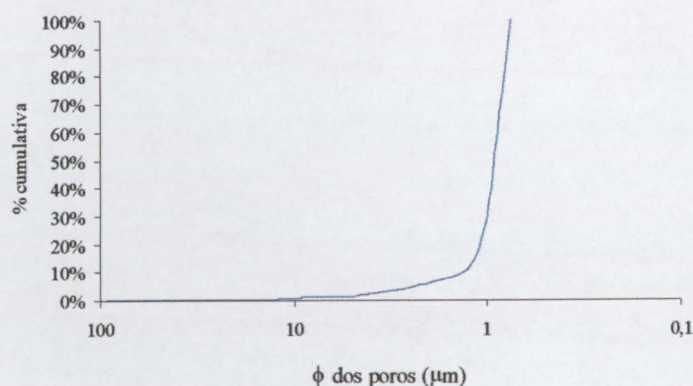


Figura 2.2.1 Gráfico de % cumulativa da matriz cerâmica 6:4:0,2.

No entanto, os resultados obtidos por esta técnica, após análise, demonstraram não serem viáveis, visto que, a técnica requer um peso mínimo das amostras que não foi atingido, e em alguns casos nem sequer se conseguiu determinar a densidade aparente das amostras. Assim sendo, estes dados devem ser observados com prudência devendo, no futuro, ser efectuados ensaios mais precisos sobre o mesmo tipo de amostras, mas com massas mais representativas.

2.2.2 Análise SEM

Podemos observar de seguida as fotomicrografias SEM da matriz cerâmica obtida cujo rácio é 2:2:0,1 a diferentes ampliações: 35X (fig. 2.2.2.1a) e 200X (fig.2.2.2.1b).

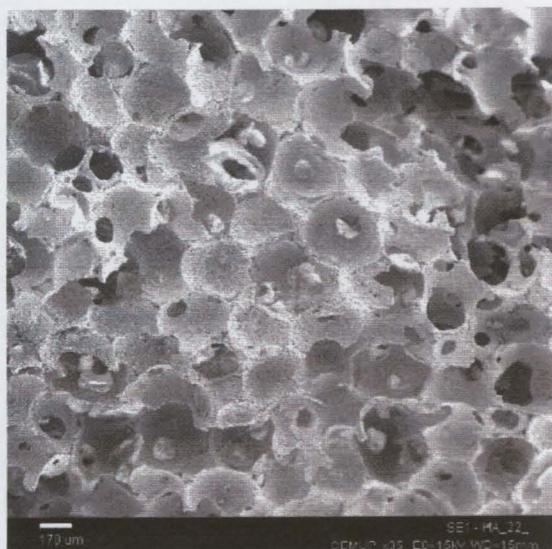


Figura 2.2.2.1a Interior da matriz cerâmica. (50X)

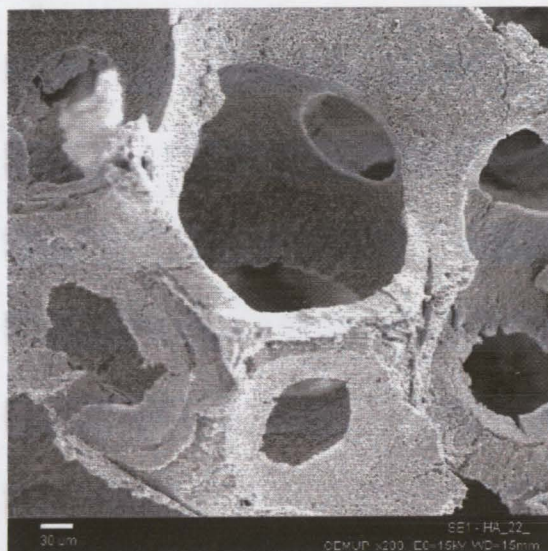


Figura 2.2.2.1 b Interior da matriz cerâmica. (200X)

Verifica-se que a matriz obtida tem micro e macroporosidade além de poros interconectados.

Podemos ver de seguida fotomicrografias da matriz 6:4:0,2 nas figs. 2.2.2.2a e 2.2.2.2b e ver que também esta matriz apresenta macro e microporosidade cujo diâmetro dos microporos se situa entre 0,7 e 1 µm como já foi referido na secção 2.2.1.

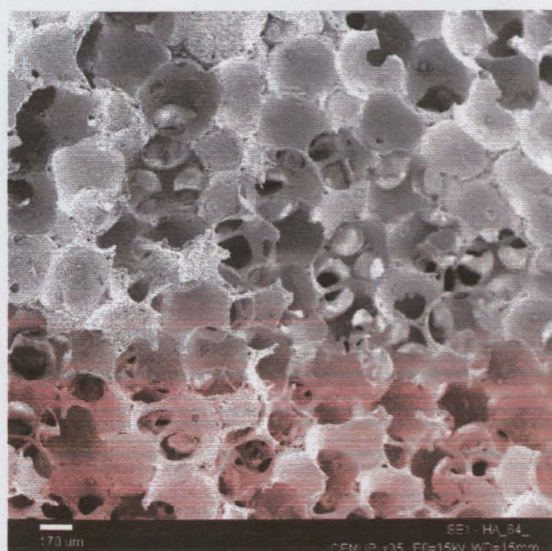


Fig. 2.2.2.2a Interior da matriz cerâmica. (50X)

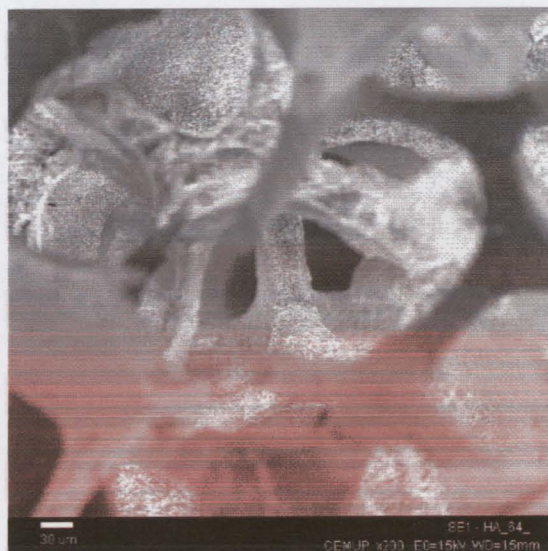


Fig. 2.2.2.2.b Interior da matriz cerâmica. (200X)

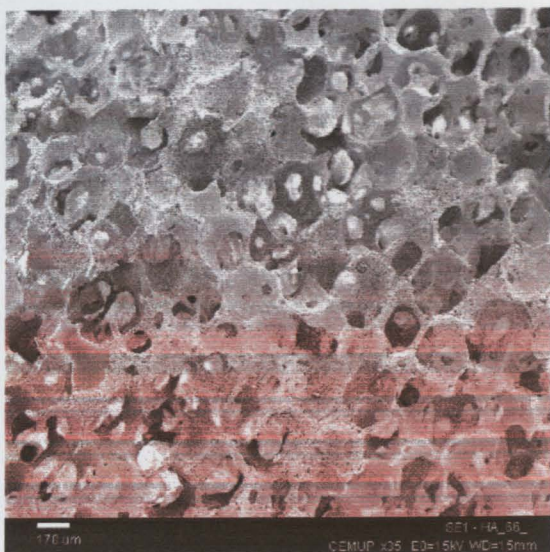


Fig. 2.2.2.3a Interior da matriz cerâmica. (50X)

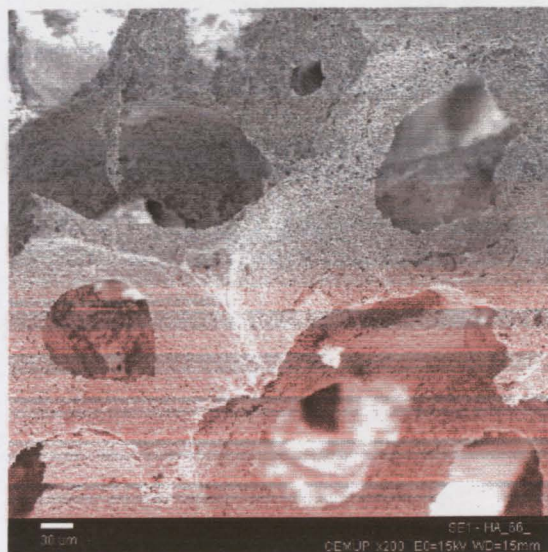


Fig. 2.2.2.3b Interior da matriz cerâmica. (200X)

Como podemos observar nas figuras 2.2.2.3a e 2.2.2.3b a matriz (6:6:0,2) apresenta micro e macroporosidade tal como as matrizes anteriormente citadas.

Podemos ver em pormenor as matrizes apresentadas no Anexo II.

2.2.3 Análise FTIR

Foi efectuada uma análise FTIR da hidroxiapatite (fig. 2.2.3.1). O gráfico expõe a % Transmitância em função da localização das bandas (cm^{-1}) e apresenta as bandas dos fosfatos que se situam entre 1041cm^{-1} e 473 cm^{-1} . Vêem-se também as bandas referentes aos carbonatos que se situam entre $1400\text{-}1580\text{cm}^{-1}$, $1350\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ e $850\text{-}890\text{ cm}^{-1}$ o que mostra que a hidroxiapatite utilizada é carbonatada. A definição dos picos indicia tratar-se de material quase cristalizado. Não foi feita a análise XRD deste material já que trabalhos anteriores tinham obtido esses resultados. [4]

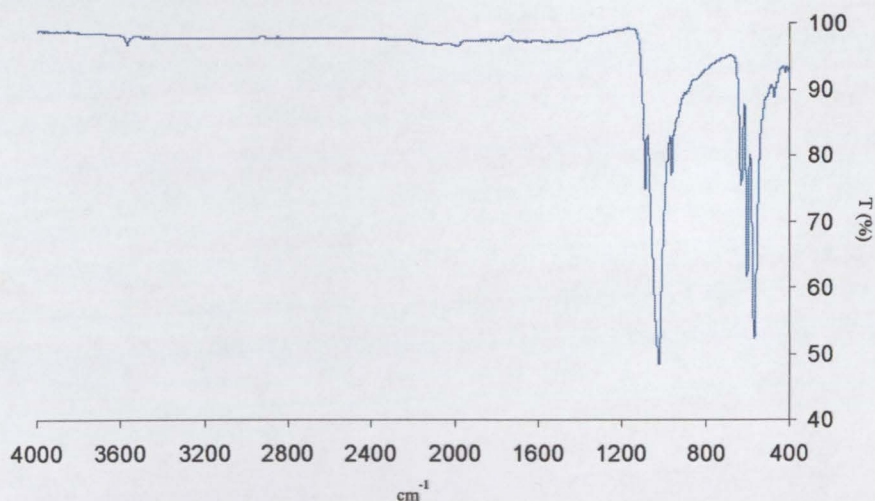


Figura 2.2.3.1 Espectro do pó de hidroxiapatite utilizado para a produção das matrizes porosas.

3.Colagénio

3.1 Estrutura e propriedades

O colagénio faz parte de uma família de proteínas com características estruturais únicas.

É a proteína mais abundante no corpo humano e a sua função principal consiste em servir de suporte biomecânico ao osso, pele, tendão e ligamentos.

Cerca de 50% da pele e mais de 90% do tendão e do osso são constituídos por colagénio.

A importância do colagénio na matriz óssea deriva de não só conter em si ou ser portador de moléculas vitais à sobrevivência e crescimento do osso, mas igualmente pelo facto de a sua presença conferir ao tecido ósseo a sua elevada capacidade de absorção de impacto e a sua elasticidade.

O colagénio é uma proteína que compreende três polipéptidos, tendo cada um, uma sequência de aminoácidos $(-Gly-X-Y)_n$, no qual Y é um aminoácido designado por glicínia (fig.3.1.1a), X é um aminoácido designado por prolina (fig.3.1.1b) e Y é outro aminoácido e é designado hidroxiprolina.

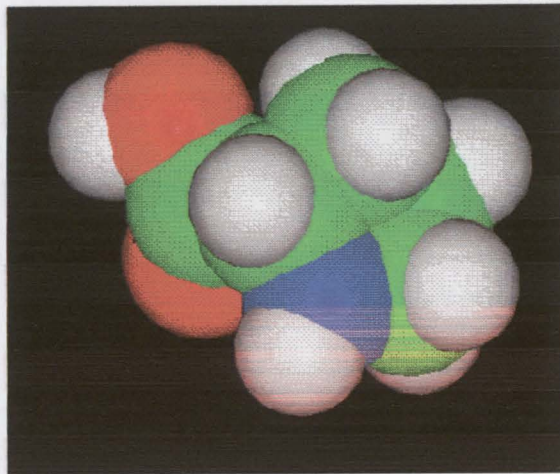
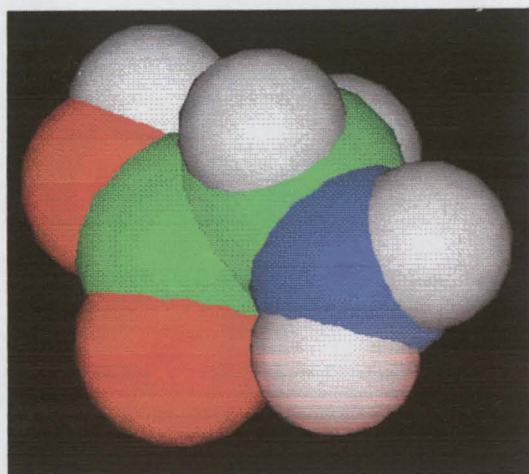


Figura 3.1.1 a)Glicínia, b) Prolina. (verde=carbono, branco= Hidrogénio, azul = azoto, vermelho = oxigénio). [5]

Resumindo, o colagénio pode ser definido como uma proteína que tem uma estrutura helicoidal tripla na maioria da sua extensão (fig. 3.1.2).

No entanto, a prolina e a hidroxiprolina são aminoácidos necessários para a formação e estabilização da molécula.

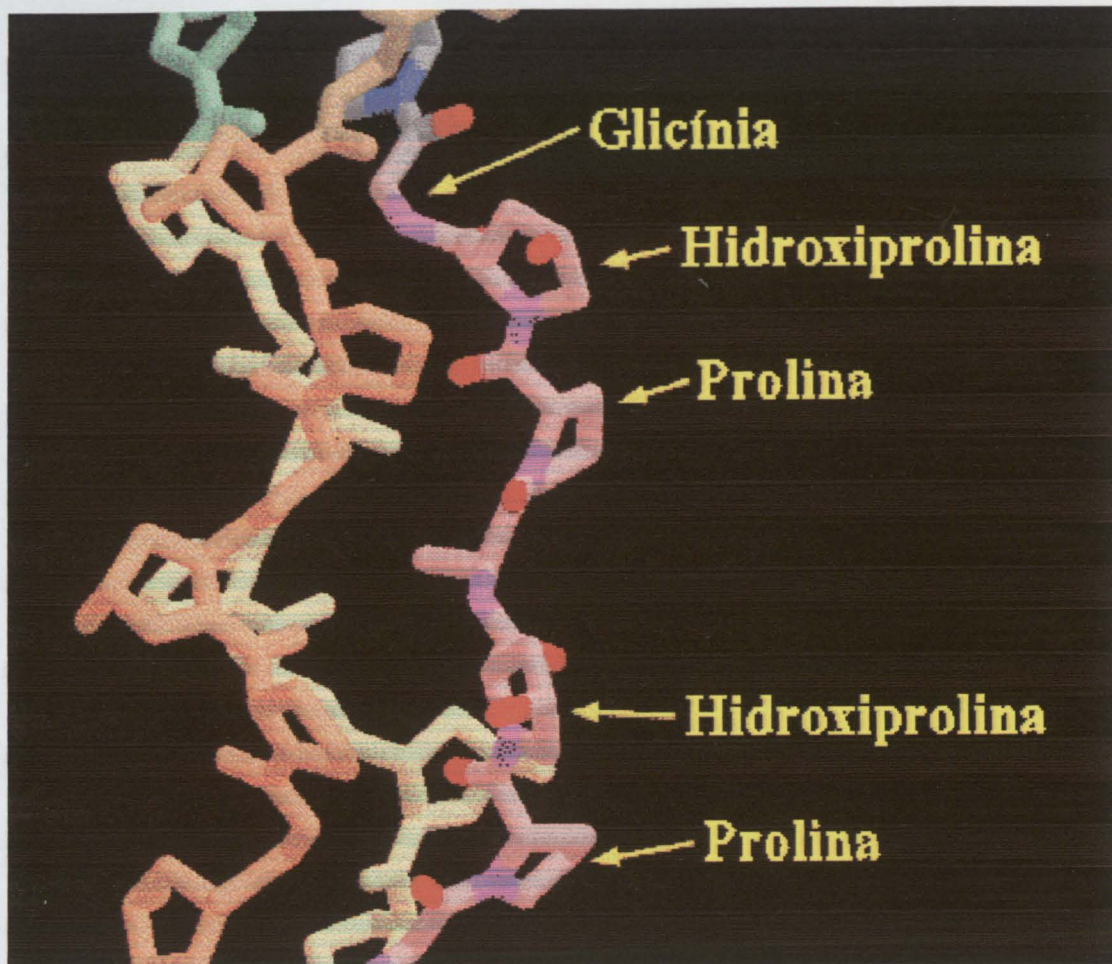


Figura 3.1.2 Estrutura helicoidal tripla do colagénio [5]

Até à data, 19 proteínas já foram classificadas como sendo colagénio. Dentro dos vários tipos de colagénio, o tipo I é o mais abundante e é o maior constituinte do osso, pele, ligamento e tendão.

A molécula de colagénio do tipo I (também referida como tropocolagénio), quando isolada dos vários tecidos, tem um peso molecular de 283 000 daltons, o seu comprimento é de 280 nm e tem um diâmetro de 1,5 nm.

A molécula de colagénio do tipo I é compreendida por três cadeias polipépticas helicoidais que estão interligadas formando uma hélice à volta de um eixo central molecular (fig.3.1. 2).

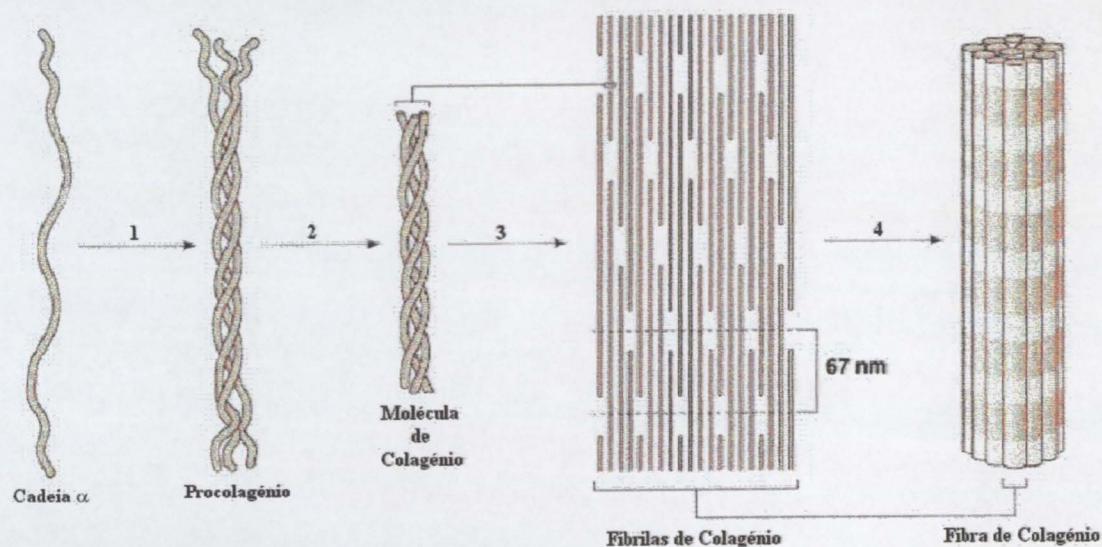


Figura 3.1.3 Representação da formação das fibras de colagénio. 1) As cadeias α unem-se formando o procologénio. 2) A cadeia torna-se helicoidal tripla - tropocolagénio. 3) As moléculas de colagénio unem-se e alinham-se de modo a formar as fibrilas de colagénio. 4) As fibrilas unem-se segundo uma ordem específica e constituem a fibra de colagénio. [7].

Duas das cadeias polipeptídicas (α_1) que constituem a molécula de colagénio são idênticas tendo 1056 resíduos de aminoácidos e a terceira cadeia polipeptídica (α_2) tem 1029 resíduos de aminoácidos. Mais de 95% dos aminoácidos têm a sequência Gly-X-Y. Os restantes 5% da molécula não possuem a sequência Gly-X-Y e assim sendo, esta secção da molécula não é helicoidal tripla.

O colagénio não existe no corpo humano na forma de moléculas isoladas.

As moléculas de colagénio unem-se e alinham-se segundo uma ordem específica formando as fibrilas de colagénio (fig. 3.1.3).

Dependendo do tecido e da idade, o diâmetro de uma fibrila de colagénio varia entre 50 nm e 300 nm (fig.3.1.4).

Estas fibrilas são unidades estruturais que se agregam, formando fibras de colagénio como se pode ver na figura 3.1.3, e em mais detalhe na figura 3.1.4.

As moléculas de colagénio são arranjadas em ordens específicas, tanto longitudinal como transversalmente.

A organização das moléculas nas fibrilas é regida pelo tipo de tecido e respectiva função. Podemos ver em detalhe as fibras de colagénio e a sua estrutura na figura 3.1.5.

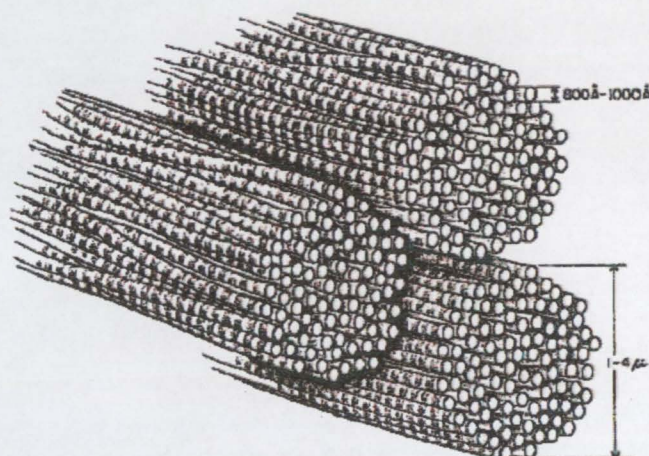


Figura 3.1.4 Unidades de fibrilas de colagénio que compõem as fibras de colagénio.[8]

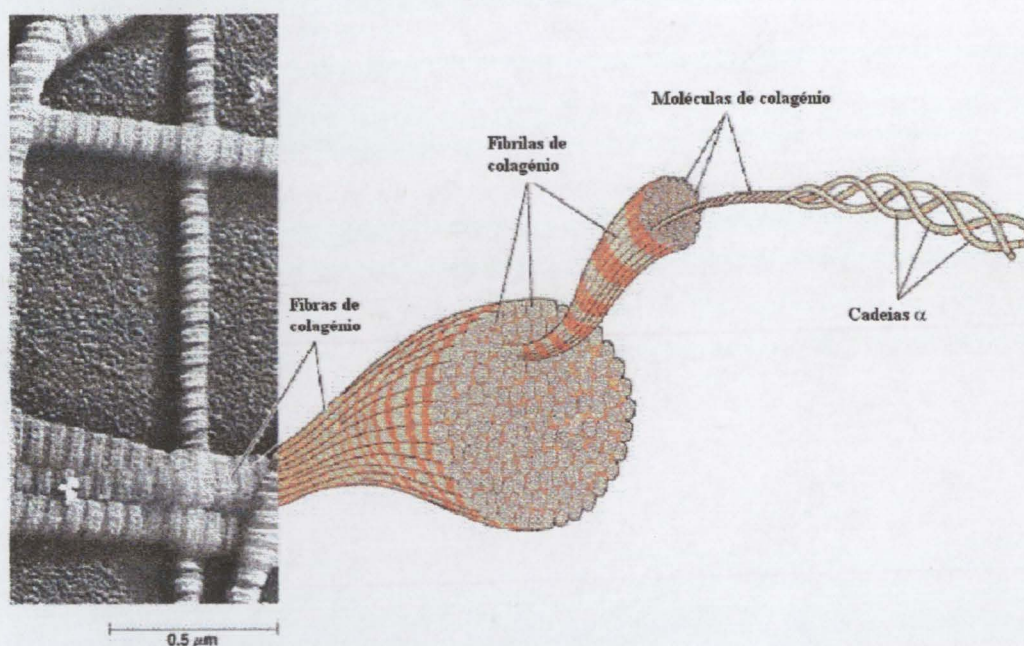


Figura 3.1.5 Esquema que representa a constituição da fibra de colagénio.[7]

As fibras de colagénio são arranjadas em configurações distintas em diferentes tecidos dependendo da sua função. Por exemplo, as fibras de colagénio estão arranjadas em paralelo nos pois estes são solicitados numa única direcção.

Já as fibras de colagénio presentes no osso estão arranjadas de uma forma aparentemente aleatória e interconectadas umas com as outras de forma a originar uma estrutura reticular.

Este tipo de configuração permite que haja resiliência, flexibilidade e elasticidade suficiente no tecido quando solicitado. [8]

3.2. Ensaios de degradação

Para impregnar a matriz cerâmica foi utilizada uma solução aquosa de colagénio a 20% que foi preparada com agitação manual e a uma temperatura de 70°C. Podemos observar a montagem experimental da preparação da solução de colagénio na figura 3.2.1.



Figura 3.2.1 Montagem experimental da preparação da solução de colagénio.

No entanto, antes de impregnar a matriz cerâmica com a solução de colagénio, alguns testes foram efectuados para determinar a optimização da razão tempo/temperatura de crosslinking que seria aplicada à solução de colagénio de maneira a que esta não se degradasse num curto espaço de tempo.

Após a preparação da solução foi necessário pensar no tipo de crosslinking que seria aplicado ao colagénio: químico ou térmico.

O crosslinking químico é executado com a presença de um agente químico, neste caso o glutaraldeído e apresenta uma grande vantagem: o crosslinking obtido é eficiente. No entanto apresenta uma desvantagem muito séria: este reagente é um agente tóxico que reduz a biocompatibilidade do material tornando-o impróprio para a utilização em implantes.

Assim sendo, optou-se pelo crosslinking térmico que não apresenta toxicidade, e executou-se o procedimento experimental descrito por Ueda et al [9] que é descrito de seguida.

A solução - após a preparação - foi congelada (-71°C), submetida ao processo de liofilização e posteriormente foi colocada numa estufa de vácuo.

As amostras de colagénio liofilizadas foram submetidas às seguintes temperaturas e tempos de crosslinking (tabela 3.2.1).

Temperatura (°C)	Tempo de crosslinking (h)				
	6 h	12h	24h	48h	72h
70 °C	✓	✓	✓	-	-
100 °C	✓	✓	✓	-	-
140 °C	✓	✓	✓	✓	✓
170°C	✓	-	-	-	-
190°C	-	✓	-	-	-

Tabela 3.2.1 Temperaturas e tempos de crosslinking utilizados para realizar os ensaios de degradação do colagénio.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a ensaios de degradação para ver qual seria a melhor combinação de temperatura/ tempo de crosslinking que deveria ser aplicado aquando a produção dos compósitos.

Os ensaios de degradação consistiam no seguinte: as amostras foram secas e, após a pesagem inicial, foram colocadas em tubos com 2,5mL de água desionizada e sujeitas a uma agitação de 100 rpm e à temperatura de 37°C. Os tempos de degradação escolhidos foram 1h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h.

De todas as amostras – mencionadas na tabela 3.2.1 – apenas as amostras que sofreram um crosslinking à temperatura de 140, 170 e 190°C demonstraram uma taxa de degradação mais lenta, tendo as restantes uma taxa de degradação de 100% para todos os tempos de crosslinking experimentados.

Podemos observar de seguida, a figura 3.2.2 que representa a taxa de degradação das amostras que sofreram um tempo de crosslinking de 6, 12, 24, 48, 72 horas a uma temperatura de 140°C.

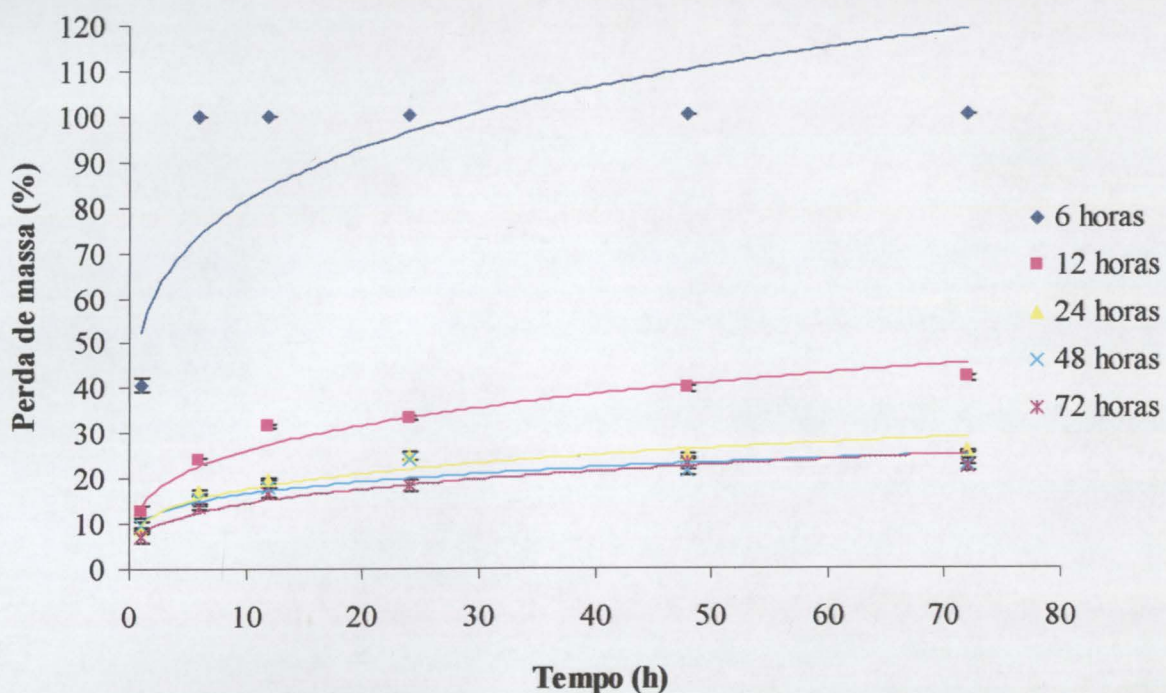


Figura 3.2.2 Representação da perda de massa das amostras de colagénio submetidas a tempos de crosslinking de 6, 12, 24, 48 e 72 horas à temperatura de 140°C.

Como podemos ver, apenas as amostras que foram submetidas a um tempo de degradação de 1 hora é que resistiram ao ensaio sofrendo uma degradação de 41% (1 hora). (140°C)

No entanto, as amostras que foram sujeitas a um tempo de crosslinking igual ou superior a 12 horas a uma temperatura de 140°C resistiram a todos os tempos do ensaio.

Nota-se desde já repara-se que com o aumento do tempo de crosslinking, a taxa de degradação diminui. Isto acontece devido à forte ligação que se estabelece entre as cadeias de colagénio com o aumento do tempo de crosslinking. Assim, estando as cadeias mais unidas é mais difícil proporcionar a sua degradação.

A partir de 24 horas de crosslinking, não se registam alterações significativas na degradação das amostras, o que leva a crer que este tempo de crosslinking é suficiente para ser aplicado nos compósitos de hidroxiapatite/colagénio.

De seguida, podemos ver a influência da temperatura nas amostras, quando o tempo de crosslinking é fixo, neste caso, 6 horas (figura 3.2.3).

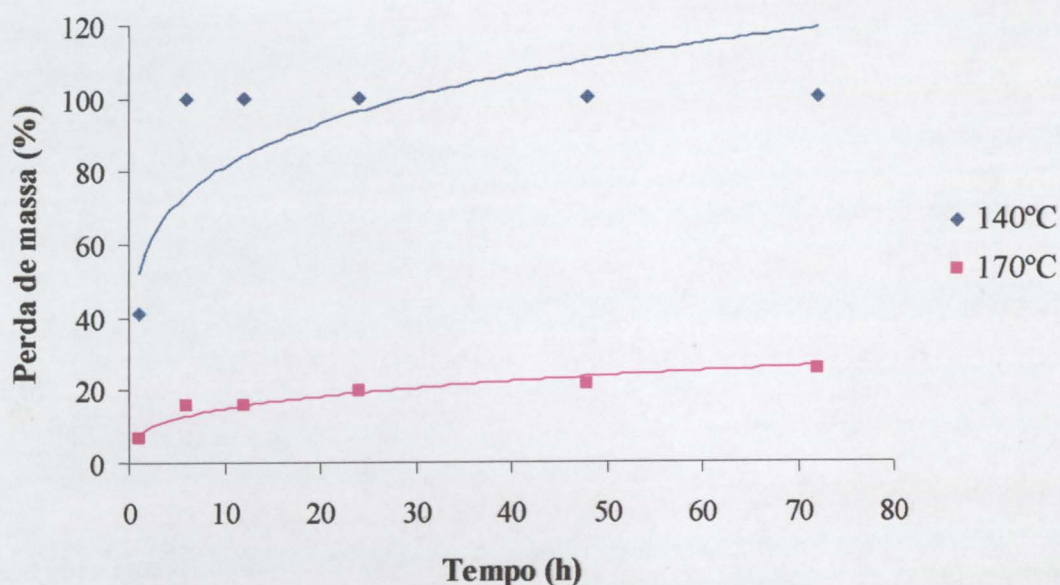


Figura 3.2.3 Representação da perda de massa das amostras de colagénio submetidas a tempos de crosslinking de 6 horas à temperatura de 140°C e 170°C respectivamente.

No caso das amostras que sofreram um tempo de crosslinking de 6 horas à temperatura de 170°C, a degradação já era visível mesmo a olho nu pois, as amostras já apresentavam uma coloração castanha escura.

No entanto e como podemos observar na fig. 3.2.3, com o aumento da temperatura de crosslinking verifica-se uma diminuição da degradação das amostras.

Isto é, com o aumento da temperatura, as cadeias de colagénio ganham mais mobilidade executando assim um crosslinking mais consistente.

Como podemos observar na figura 3.2.4 a influência da temperatura quando o tempo de crosslinking é fixo, neste caso, 12 horas.

Neste caso, verifica-se o que atrás foi referido: com o aumento da temperatura, a taxa de degradação diminui se bem que, como podemos ver na fig.3.2.4, a degradação na 1ª hora das amostras de 190°C é superior às amostras de 140°C. Mas, após a 1ª hora, a taxa de degradação das amostras de 190°C é sempre inferior às amostras de 140°C.

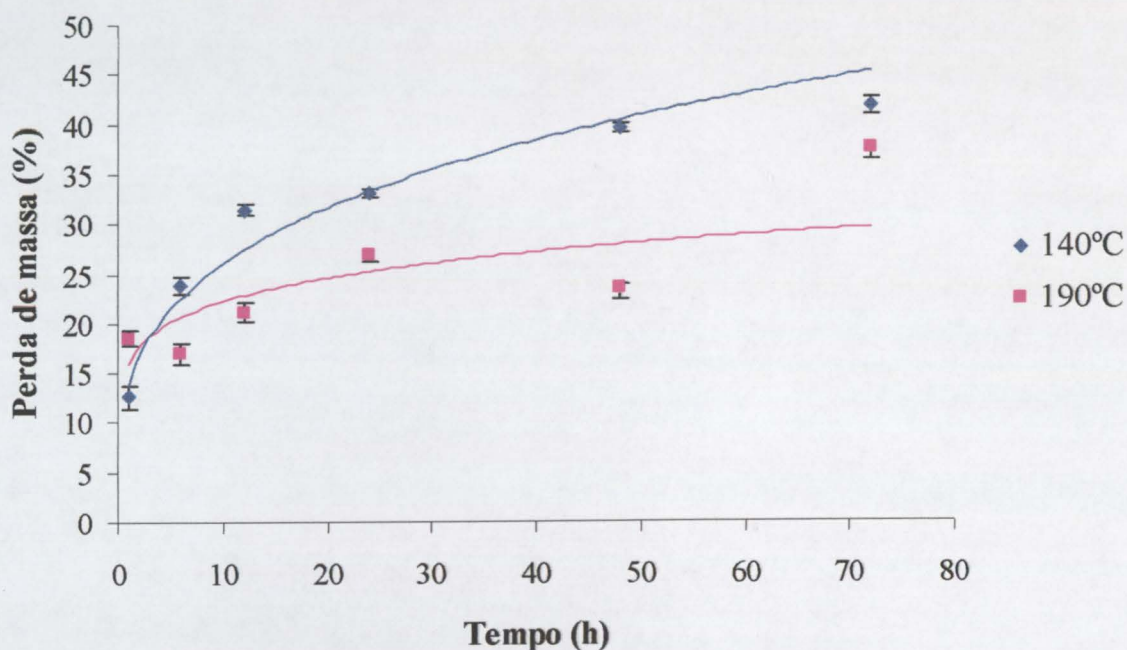


Figura 3.2.4 Representação da perda de massa das amostras de colagénio submetidas a tempos de crosslinking de 12 horas à temperatura de 140°C e 190°C respectivamente.

Da análise dos resultados, concluiu-se que a temperatura mais adequada para ocorrer o crosslinking do colagénio na matriz de hidroxiapatite seria 140°C, tal como Ueda et al referiu [9], e o tempo de crosslinking devem ser de 12 a 24 horas.

3.3 Análise FTIR

Foi realizado um ensaio FTIR para observar as diferenças que ocorrem nos picos referentes aos grupos funcionais quando se varia a temperatura e o tempo de crosslinking.

No entanto, algumas diferenças já eram registadas a olho nu nas amostras que foram submetidas ao ensaio FTIR, nomeadamente na sua coloração – de amarelo pálido a castanho-escuro – como podemos observar na seguinte figura (figura 3.3.1).



Figura 3.3.1 Amostras de colagénio que foram submetidas ao ensaio de FTIR. Já é evidente a degradação do colagénio como se pode confirmar na coloração das amostras.

Podemos observar o espectro do colagénio (pó) que foi utilizado (figura 3.3.2), quando submetido à temperatura de 140°C (fig.3.3.3). As restantes temperaturas: 70°C, 100 °C, 170°C e 190°C e tempos de crosslinking: 12 e 24 horas podem ser consultados no Anexo III.

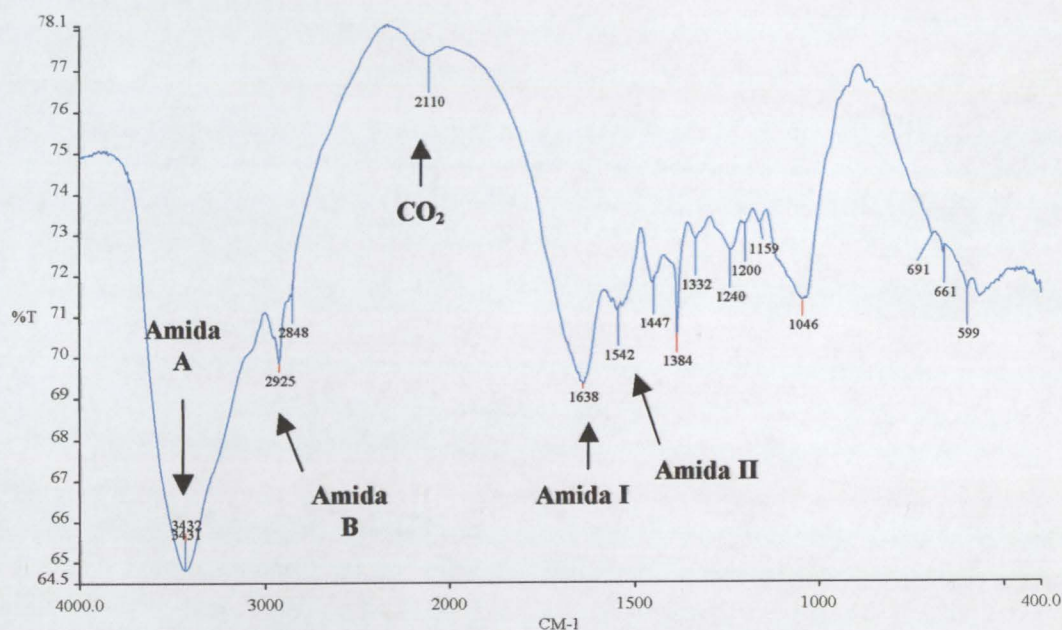


Figura 3.3.2 Espectro FTIR do colagénio (pó) utilizado.

Observando a figura 3.3.3, podemos verificar que o pico que corresponde à Amida A está mais acentuado no caso do colagénio em pó ($\sim 3423 \text{ cm}^{-1}$) do que no colagénio que sofreu o tratamento térmico ($\sim 3294 \text{ cm}^{-1}$ a $\sim 3307 \text{ cm}^{-1}$).

Além disso, verifica-se que com a indução de temperatura, o pico relativo à Amida I torna-se mais acentuado passando de $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ (colagénio em pó) para $\sim 1647 \text{ cm}^{-1}$ (colagénio submetido à temperatura de 170°C).

Isto significa que com o aumento da temperatura, o pico correspondente à Amida I é intensificado devido à combinação existente entre os grupos amina e carboxilo. Este fenómeno também explica o facto do pico da Amida A acentuar-se e deslocar-se para a direita com o aumento da temperatura. Observa-se também que a região correspondente ao grupo carboxilo está um pouco pronunciada no caso do colagénio em pó ($\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) e desaparece com o início do tratamento térmico.

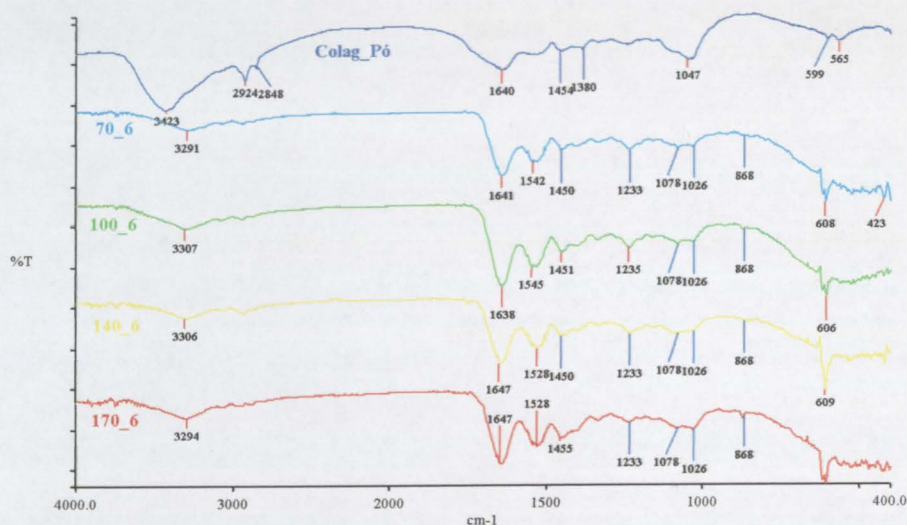


Figura 3.3.3 Espectro FTIR do colagénio que representa as variações ocorridas nos picos quando o tempo de crosslinking 6 horas e a temperatura varia de 70 a 170 °C. **Legenda:** colagénio em pó, colagénio T=70°C e t = 6h, colagénio T=100°C e t = 6h, colagénio T=140°C e t = 6h, colagénio T=170°C e t = 6h.

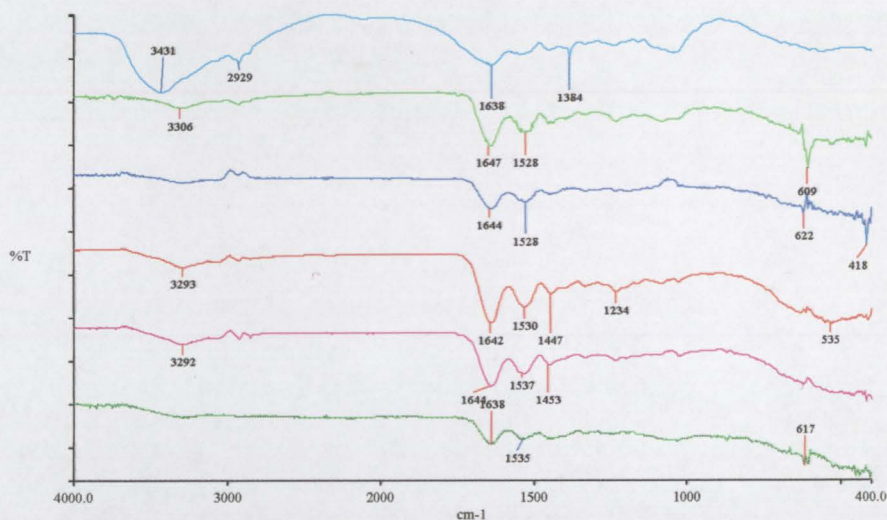


Figura 3.3.4 Espectro FTIR do colagénio sujeito à temperatura de 140°C durante 6, 12, 24, 48 e 72 horas. **Legenda:** colagénio em pó, colagénio T=140°C e t = 6h, colagénio T=140°C e t = 12h, colagénio T=140°C e t = 24h, colagénio T=140°C e t = 48h, colagénio T=140°C e t = 72h.

Podemos ver que, com o aumento do tempo de crosslinking (fig.3.3.4), o pico relativo à Amida I aumenta ($\sim 1641\text{cm}^{-1}$ a $\sim 1647\text{cm}^{-1}$) e o pico da Amida A desloca-se consecutivamente para a direita e torna-se menos pronunciado ($\sim 3432\text{cm}^{-1}$). Esta situação já era esperada, visto que com o aumento do tempo de crosslinking, os grupos das aminas e do carboxilo tem mais tempo para se organizar e originarem mais amidas, daí o aumento do pico da Amida I.

Além disso, estes resultados confirmam os dos ensaios de degradação visto que com o aumento do tempo de crosslinking, a degradação das amostras diminui.

4. Produção do compósito HA/COL

Para preparar o compósito, preparou-se inicialmente uma solução de colagénio já anteriormente descrita. Para a solução penetrar em todos os poros foi montado um sistema de vácuo, que pode ser observado na figura 4.1.

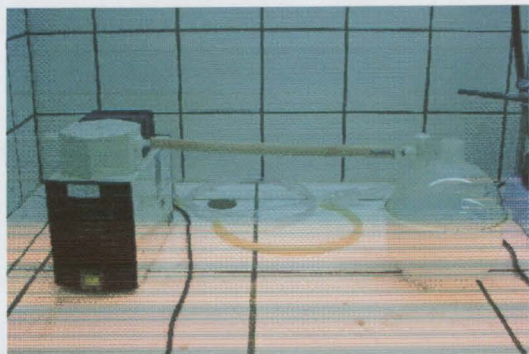


Figura 4.1

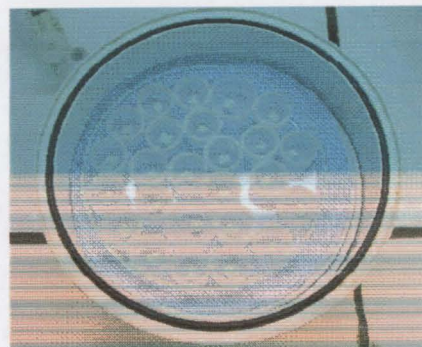


Fig.4.2

Podemos ver em pormenor como é que as matrizes cerâmicas estavam dispostas no excicador na figura 4.2.

As matrizes, já colocadas em recipientes próximos das suas dimensões, eram mergulhadas na solução de colagénio. De seguida, o excicador foi fechado e ligou-se a bomba de vácuo.

O princípio desta montagem é muito simples: o ar é sugado (devido ao vácuo) e a solução é obrigada a penetrar em todos os poros da matriz cerâmica. Assim, como o ar abandona a amostra, todos os poros são preenchidos pela solução (o vácuo fornecido por esta bomba é de -0,1 bar).

Os compósitos formados são retirados do excicador e colocados no congelador a -71°C , sendo de seguida liofilizados por um período de 24 horas. Após a liofilização, os compósitos são colocados na estufa de vácuo na qual irão sofrer um tratamento a uma temperatura de 140°C e dois tempos de crosslinking: 12h e 24h. Podemos ver o aspecto dos compósitos no seu estado liofilizado (fig.4.3a), após o tempo de crosslinking de 12horas (fig.4.3b) e de 24 horas (fig.4.3c) nas figuras seguintes.

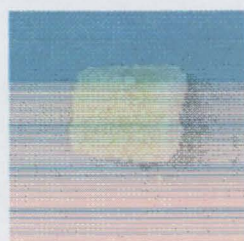


Figura 4.3a

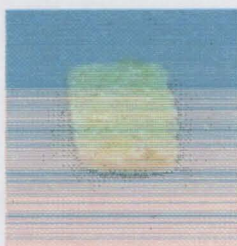


Figura 4.3b



Figura 4.3c

No entanto, durante a execução deste método verificou-se que a solução de colagénio gelificava extremamente depressa (uma hora era o suficiente), o que provavelmente conduzia a uma impregnação pouco extensa da solução de colagénio. Assim, além deste método de impregnação, foi decidido utilizar uma outra forma de vácuo de maneira a comparar a extensão da impregnação: em vez de utilizar uma bomba de vácuo, a impregnação foi executada numa estufa de vácuo

(fig.4.4) a uma temperatura de 50°C (para evitar gelificação rápida da solução de colagénio). Neste caso o vácuo aplicado foi de -1 bar.

Os compósitos foram colocados num goblé que continha 10 mL de solução de colagénio ficando, portanto, totalmente mergulhados na solução. O goblé foi tapado com PARAFILM e o filme foi perfurado de maneira a permitir a saída de gases. Após a impregnação (cuja duração foi de quinze minutos) os compósitos foram imediatamente congelados a uma temperatura de -71°C e posteriormente liofilizados (24 horas). Para simplificar, a designação do método que utiliza a bomba de vácuo será método 1 e o método que utiliza a estufa de vácuo será método 2.



Figura 4.4 Estufa de vácuo utilizada.



Fig.4.5 Matriz impregnada com liquido escuro.

Após a análise SEM, verificou-se que o método 2 (estufa de vácuo) foi mais eficiente como se verá mais à frente. Um dos obstáculos que se presenciou em ambos os métodos foi a gelificação rápida da solução de colagénio. Assim, foi decidido utilizar várias concentrações da solução de colagénio a fim de comparar a extensão de impregnação. Isto é, à medida que a solução de colagénio gelificava, a fluidez da solução diminuía, o que por sua vez prejudica a entrada da solução para o interior da matriz. Assim, para aumentar a fluidez prepararam-se duas soluções aquosas de colagénio com uma concentração de 5% e de 1%, tendo sido utilizado o método 2.

No entanto, as soluções preparadas apresentavam uma cor pálida quase transparente sendo difícil ver a olho nu se no interior da matriz estava algum colagénio depositado. Para ter a certeza de que a solução teria eventualmente passado para o interior da matriz, foi feita a seguinte experiência:

Repetiu-se o método 2 e em vez de se utilizar a solução de colagénio com a concentração de 20%, 5% ou 1%, utilizou-se um líquido próximo da fluidez da solução de 1% e com uma cor muito escura. Após a impregnação, secou-se a amostra e cortou-se ao meio para ver se de facto a amostra exibia a coloração escura. Após o corte verificou-se que a amostra tinha uma coloração próxima da do líquido e que a coloração diminuía da tonalidade escura para uma tonalidade clara à medida que examinamos a amostra da periferia para o interior como podemos observar na figura 4.5

4.1 Ensaio de degradação

Os compósitos obtidos pelo método 1 e que sofreram um tempo de crosslinking de 12 e 24 horas a uma temperatura de 140°C foram também sujeitos a testes de degradação.

Os testes de degradação foram executados da maneira descrita anteriormente na secção 3.2. Os tempos de degradação escolhidos também foram os mesmos: 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas respectivamente. A taxa de degradação dos compósitos que sofreram um tempo de crosslinking de 12 horas a 140°C varia de 6% (1 hora) a 24% (72 horas), e no caso dos compósitos que foram submetidos a um tempo de crosslinking de 24 horas à temperatura de 140°C, a sua taxa de degradação varia de 4% (1 hora) a 15% (72 horas). De seguida podemos ver na figura 4.1.1 os resultados desses mesmos testes.

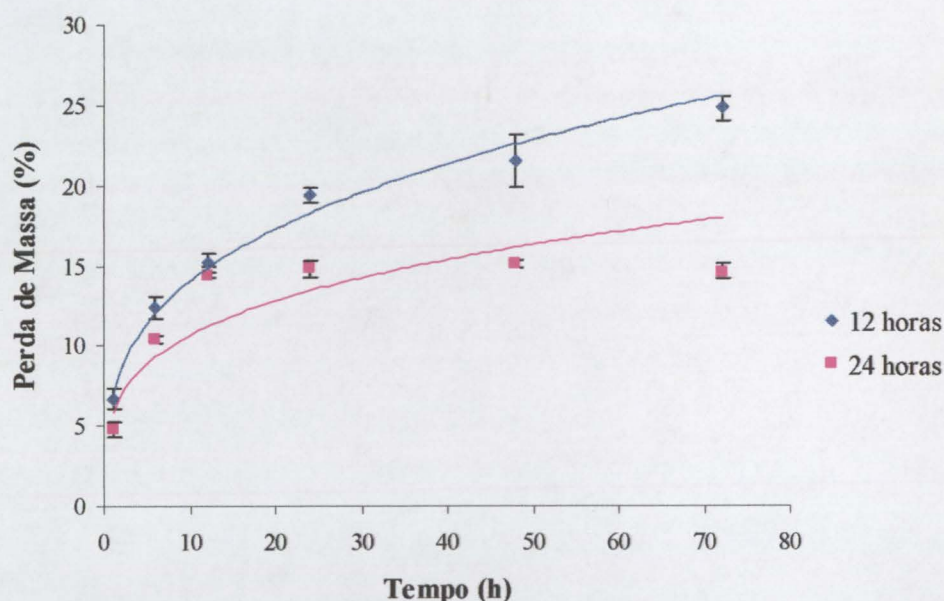


Figura 4.1.1 Representação da taxa de degradação dos compósitos que sofreram crosslinking durante 12 horas e 24 horas à temperatura de 140°C.

Podemos verificar que com o aumento do tempo de crosslinking de 12 horas para 24 horas, a taxa de degradação do compósito diminuiu.

Estes compósitos degradaram-se com mais dificuldade devido ao facto de o seu crosslink ser mais efectivo e por isso ser mais difícil de quebrar as ligações.

Isto é, as cadeias de colagénio tiveram mais tempo para se organizarem e modificarem a sua estrutura de maneira a ser mais difícil a sua degradação.

Assim sendo, os compósitos que reúnem as melhores condições em termos de degradação, são os compósitos obtidos à temperatura de 140°C com tempo de crosslinking de 24 horas.

Se compararmos estes resultados com os resultados dos ensaios de degradação do colagénio nas mesmas condições, verifica-se que no caso do colagénio a degradação foi o dobro da obtida pelo compósito (Tabela 4.2.1).

Taxa de degradação (%)	Tempo de crosslinking (h)					
	1	6	12	24	48	72
Colagénio						
12 h	12%	23%	31%	33%	39%	42%
24 h	8%	17%	19%	24%	25%	26%
Compósito						
12 h	6%	12%	15%	19%	21%	24%
24 h	4%	10%	14%	14%	15%	15%

Tabela 4.1.1 Comparação das taxas de degradação obtidas para as amostras de colagénio e compósitos.

De seguida, podemos comparar a taxa de degradação entre as amostras de colagénio e os compósitos de HA/COL para tempo de crosslinking de 12 horas e a temperatura e para a temperatura de 140°C (figura 4.2.2).

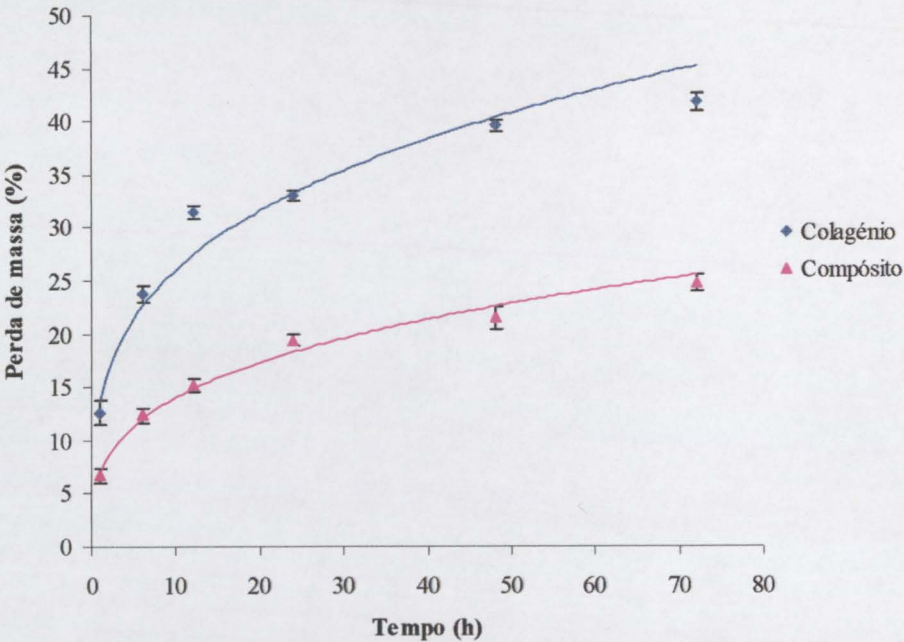


Figura 4.1.2. Representação da taxa de degradação dos compósitos e das amostras de colagénio que sofreram crosslinking durante 12 horas à temperatura de 140°C.

Como podemos observar na figura 4.1.2, a degradação do compósito é inferior à degradação das amostras de colagénio.

De seguida, podemos comparar a degradação que ocorre nas amostras de colagénio e nos compósitos que sofreram um tempo de crosslinking de 24 horas à temperatura de 140°C (gráfico 4.1.3).

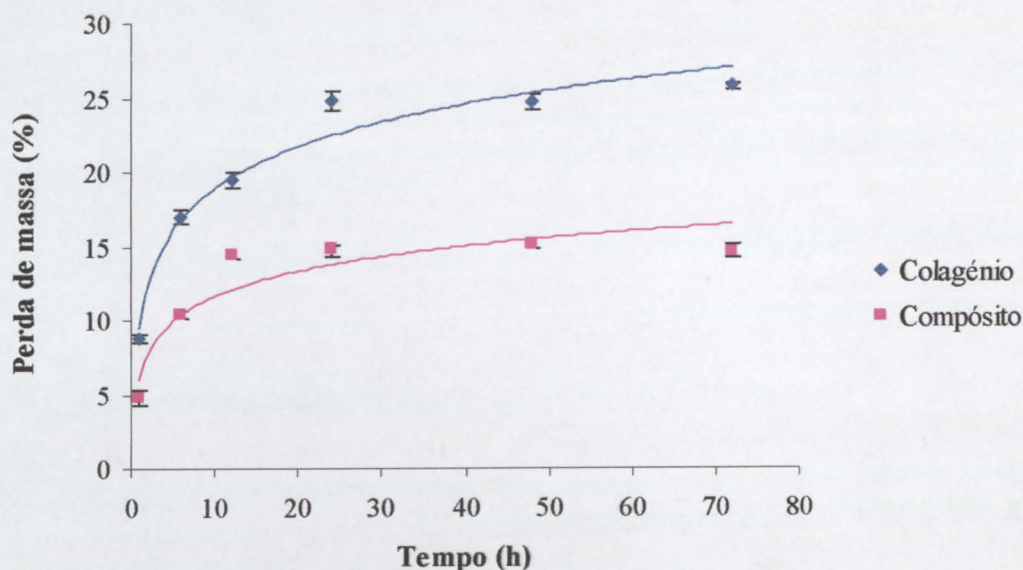


Figura 4.1.3 Representação da taxa de degradação dos compósitos e das amostras de colagénio que sofreram crosslinking durante 24 horas à temperatura de 140°C.

Podemos verificar, após a observação da figura 4.1.3, que a degradação do compósito é inferior à degradação das amostras de colagénio, além de que, como já tinha sido referido anteriormente, a degradação deste compósito é também inferior à degradação do compósito que sofreu um tempo de crosslinking de 12 horas.

Assim sendo, podemos concluir que o compósito que apresenta as melhores propriedades, em termos de degradação é o compósito cujo tempo de crosslinking é de 24 horas.

No entanto, e para este estudo estar completo, deveriam ser executados ensaios de degradação aos restantes compósitos, nomeadamente aqueles obtidos com o método 2 e com concentrações de 5% e 1%. Além disso, estes ensaios deviam ser executados com outro meio, nomeadamente um meio que reunisse características próximas às dos fluidos humanos, para poder determinar a sua viabilidade.

4.2. Análise FTIR

Foi efectuada a análise FTIR dos compósitos que sofreram um tempo de crosslinking de 12 e 24 horas à temperatura de 140°C obtidos pelo método 1.

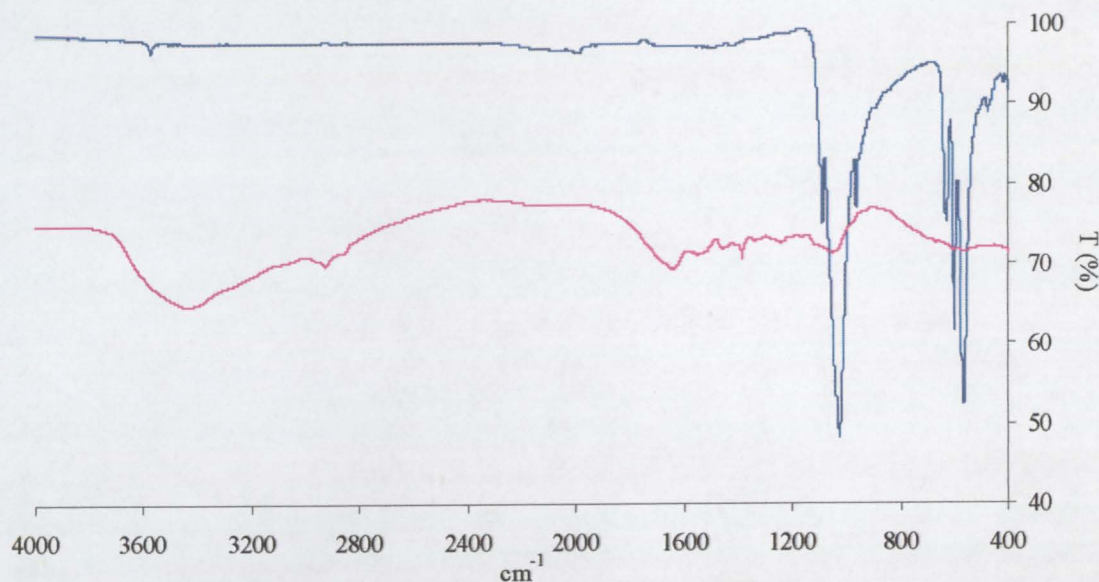


Figura 4.2.1 Espectro FTIR do colagénio utilizado (pó) e da hidroxiapatite utilizada (pó). Legenda: **colagénio**, **hidroxiapatite**.

Podemos ver na fig.4.2.1 os espectros da hidroxiapatite e do colagénio em sobreposição. Assim como os espectros relativos aos compósitos, que estão representados na fig. 4.2.2.

Pode-se observar as diferentes bandas características de cada grupo: grupo OH a 3571cm^{-1} ; NH alongamento a 3418cm^{-1} para a Amida A; CH alongamento a 2925cm^{-1} para a Amida B; C=O alongamento a 1655cm^{-1} para a Amida I; deformação do NH a 1546cm^{-1} para a Amida II; deformação do NH a 1384cm^{-1} para a Amida III.

Quanto às bandas características da hidroxiapatite, temos as bandas dos fosfatos que se situam entre 1041cm^{-1} e 473cm^{-1} . As bandas referentes aos carbonatos situam-se entre $1400\text{-}1580\text{cm}^{-1}$, $1350\text{-}1550\text{cm}^{-1}$ e $850\text{-}890\text{cm}^{-1}$.

Comparando os espectros dos dois compósitos (fig.4.2.2) nota-se que o pico referente à Amida I do compósito de 24 horas ($\sim 1655\text{cm}^{-1}$) está maior em relação ao pico da Amida I do compósito de 12 horas ($\sim 1646\text{cm}^{-1}$). Isto indica que, com o aumento do tempo de crosslinking, os grupos carboxilo e amino tiveram mais tempo para se organizarem e originarem amidas, apresentando assim um pico de Amida I superior ao do compósito de 12 horas.

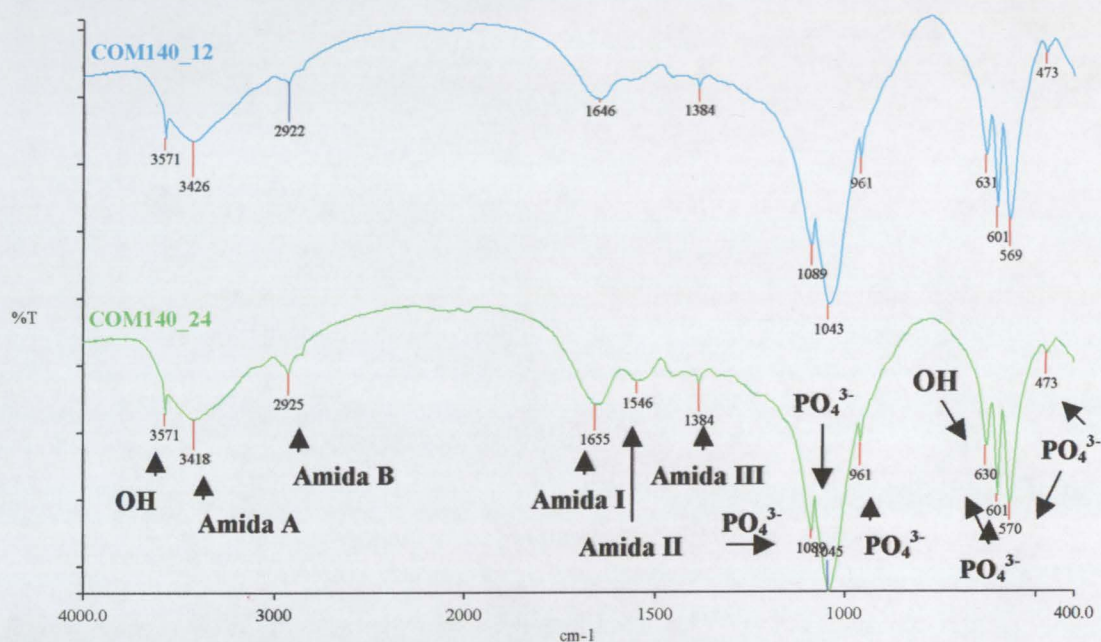


Figura 4.2.2 Espectro FTIR dos compósitos que foram submetidos a um tempo de crosslinking de 12 e 24 horas respectivamente à temperatura de 140°C. Legenda: **compósito T= 140°C e t = 12 horas**, **compósito T=140°C e t = 24 horas**.

Estes resultados são consistentes com os apresentados nos ensaios de degradação que confirmam que com o aumento do tempo de crosslinking, a degradação é inferior.

Outro pormenor interessante que resulta desta junção é o facto de o compósito de 24 horas exibir uma banda mais proeminente da Amida II ($\sim 1546 \text{ cm}^{-1}$) do que o compósito de 12 horas (que é praticamente imperceptível). Quanto às bandas características da hidroxiapatite, não se verifica nenhuma alteração com o tratamento térmico efectuado, condição que já era esperada. No entanto, as bandas dos carbonatos são difíceis identificar devido à sua sobreposição com as bandas das amidas.

4.3 Análise SEM

De seguida vamos observar as fotomicrografias do compósito impregnado com uma solução de colagénio (concentração de 20%) pelo método 1.

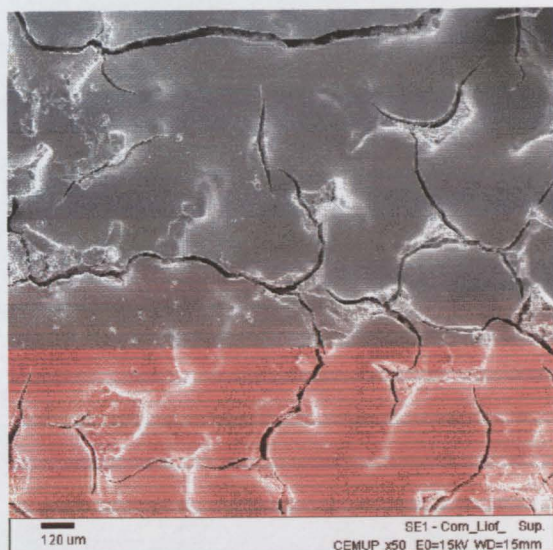


Fig.4.3.1a Superfície do compósito liofilizado. (50X)

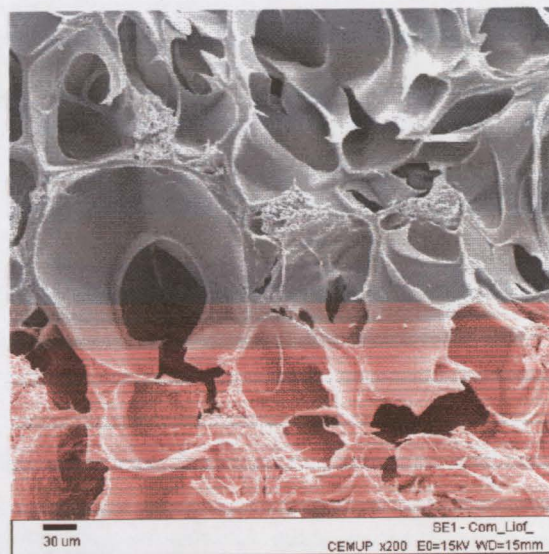


Fig.4.3.1b Interior do compósito liofilizado. (200X)

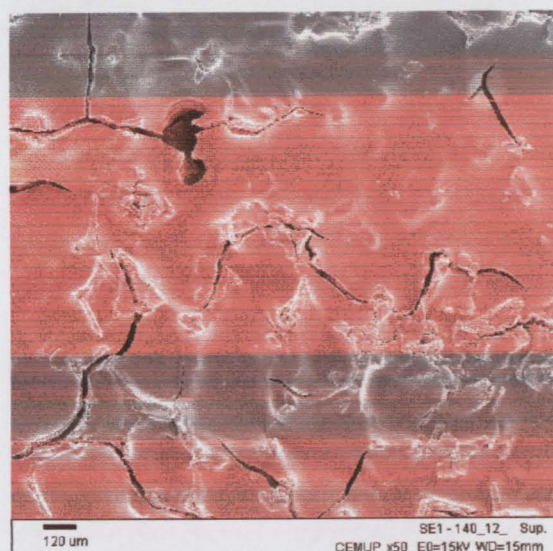


Fig.4.3.2a Superfície do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 12h a 140°C. (50X)

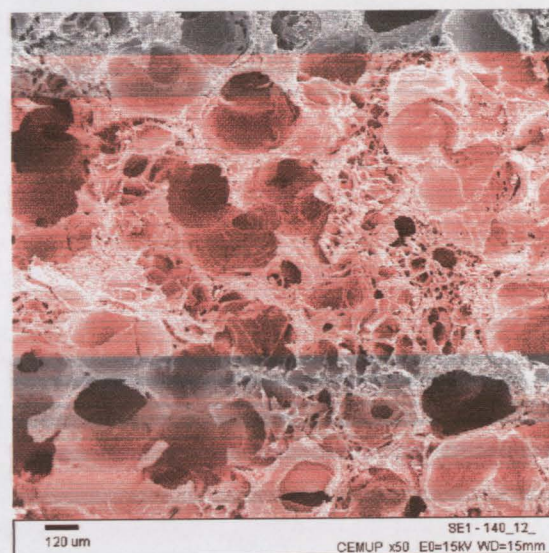


Fig.4.3.2b Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 12h a 140°C. (50X)

Como podemos observar na figura 4.3.1a, o colagénio recobriu praticamente toda a superfície da matriz cerâmica, assim como o seu interior (como podemos ver nas figuras IVa e IVb existentes no Anexo IV). Se repararmos, já no processo de liofilização, há a formação de uma rede de colagénio dentro dos próprios poros da matriz (fig. 4.3.1b). No entanto, a distribuição e deposição do filme de colagénio assim como a rede de colagénio ao longo da matriz não é homogênea sendo muito densa na periferia e pouco ou nada densa no interior da matriz. Esta configuração pode ser atribuída ao método de impregnação utilizado, visto que a matriz cerâmica foi impregnada no excicador com a ajuda de uma bomba de vácuo (método 1).

Analisando a figura 4.3.2a, podemos verificar que não há diferenças muito significativas entre a superfície da figura 4.3.2a e a superfície da figura 4.3.1a estando as duas recobertas com colagénio. O filme depositado na superfície apresenta algumas fendas mas, aparenta elevada compacidade. No interior do compósito verifica-se, como nos anteriores, que a distribuição da rede de colagénio formada não é homogénea. Este facto deve-se provavelmente ao método de impregnação utilizado: o vácuo exercido não é muito forte, a solução não apresenta uma fluidez elevada (devido à concentração) e o colagénio gelifica num curto espaço de tempo não permitindo uma impregnação totalmente homogénea. Podemos ver em detalhe o revestimento de colagénio nas figs IVc e IVd do Anexo IV.

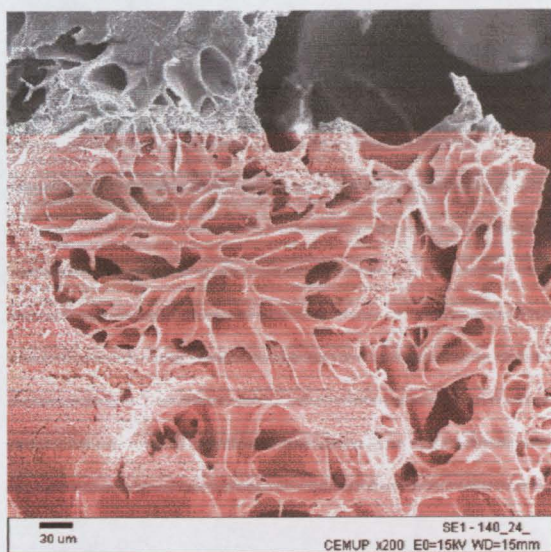


Fig. 4.3.3a Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 24 h a 140°C. (200X)

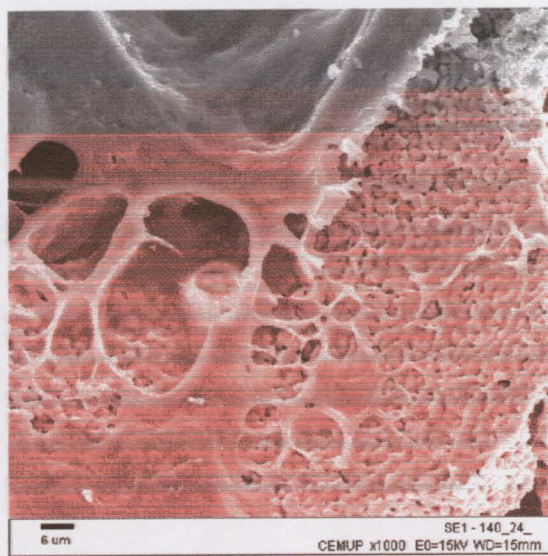


Fig. 4.3.3b Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 24h a 140°C. (1000X)

Os compósitos que sofreram um tratamento de crosslinking durante 24 horas à temperatura de 140°C podem ser vistos na figura 4.3.3. Nestes compósitos é evidente a densidade e complexidade da rede de colagénio formada (fig.4.3.3a). Formam-se “pontes” de colagénio de uma parede do poro para outra, como podemos ver em pormenor na figura 4.3.3b. Nestas amostras nota-se que a rede de colagénio formada é mais densa e complexa do que no caso das amostras cujo tempo de crosslinking foi de 12h, visto que as amostras de 24h tiveram mais tempo para fortalecer o seu crosslinking. Podemos ver em pormenor a superfície e a distribuição da rede de colagénio nas figuras IVe e IVf do Anexo IV.

Tendo-se verificado que a distribuição da rede de colagénio não era homogénea, efectuou-se uma mudança de estratégia, com a utilização de uma estufa de vácuo. Assim, de seguida vamos analisar as fotomicrografias referentes à impregnação da matriz através da estufa de vácuo (método 2) com uma solução de colagénio de concentração é de 20% (fig.4.3.4a e 4.3.4b).

Analisando a superfície do compósito liofilizado (fig. IVf do Anexo IV), verifica-se que a superfície está recoberta de um modo mais homogêneo do que a superfície do compósito da fig.4.3.1a.

Como podemos ver na figura 4.3.4a, existe no interior dos poros uma rede de colagénio mais densa do que a da figura 4.3.1b e com uma distribuição mais homogênea e dirigida para o centro da amostra. Este facto deve-se a uma impregnação mais eficaz que foi obtida pela utilização da estufa de vácuo. Podemos ver em pormenor o revestimento de colagénio nos poros assim como a espessura na fig. IVg.

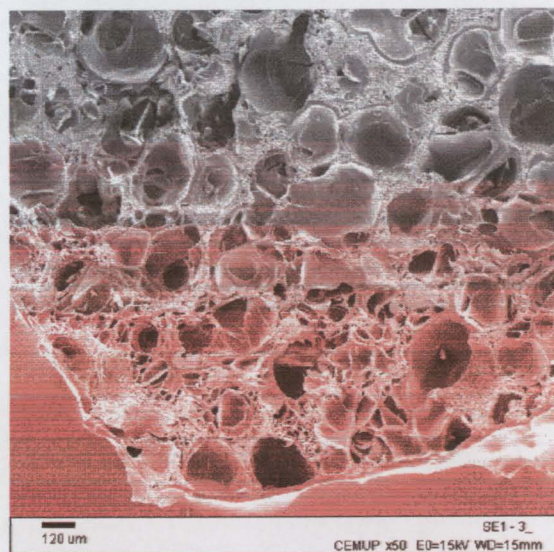


Fig.4.3.4a Interior do compósito liofilizado. (50X)

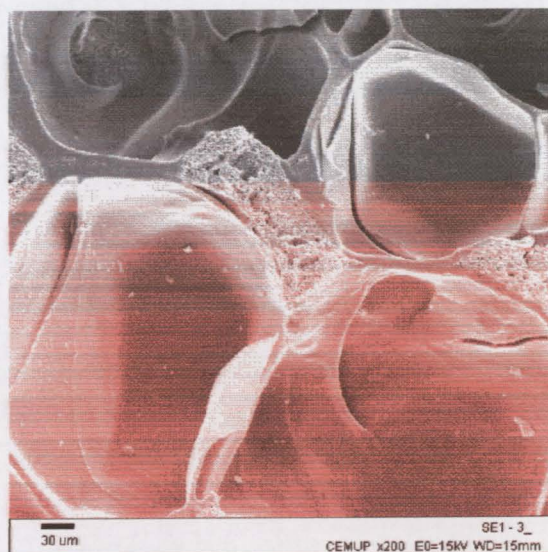


Fig.4.3.4b Interior do compósito liofilizado. (200X)

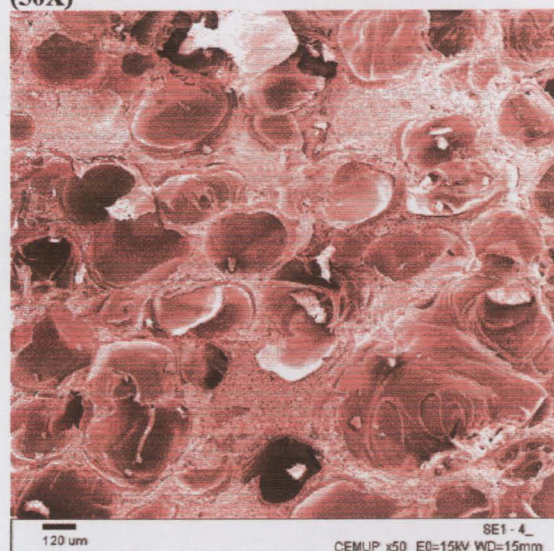


Fig.4.3.5a Interior do compósito que sofreu um tempo de crosslinking durante 12 h a 140°C.(50X)

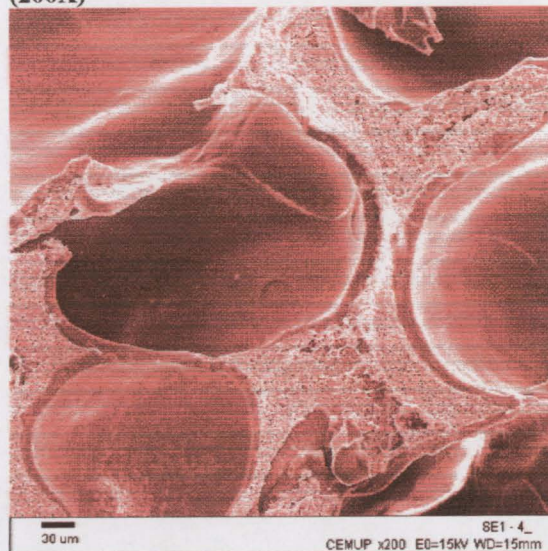


Fig.4.3.5b Interior do compósito que sofreu um tempo de crosslinking durante 12 h a 140°C. (50X)

Na figura 4.3.5a podemos observar no interior do compósito o revestimento de colagénio, e ver que neste caso, é mais sólido além de que a rede de colagénio observada nas figuras 4.3.2a e 4.3.2b não

se verifica (fig.4.3.5b). A superfície e outros pormenores relativos a este compósito podem ser observados nas figuras IVh e IVi do Anexo IV.

Como podemos ver nas figuras 4.3.6a e 4.3.6b, não há formação de rede de colagénio nesta amostra. Podemos observar a superfície e a espessura do revestimento de colagénio deste compósito nas figuras IVj e IVk no Anexo IV.

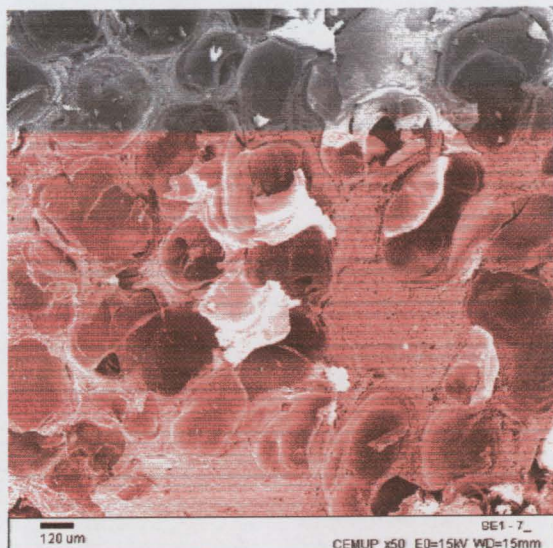


Fig.4.3.6 a Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (50X)

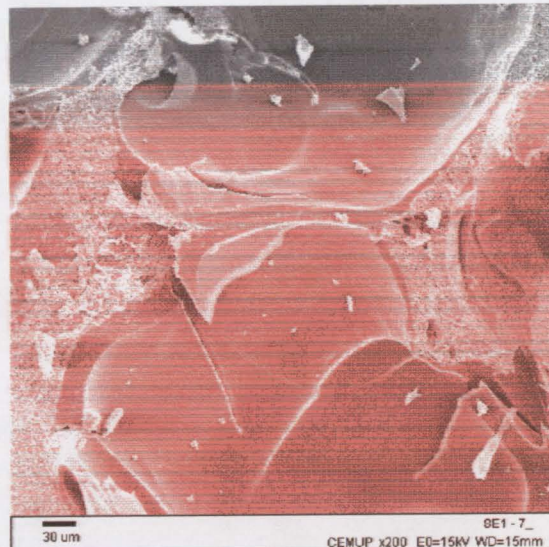


Fig. 4.3.6b Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (200X)

De seguida vamos analisar as fotomicrografias referentes à impregnação da matriz através da estufa de vácuo (método 2) com uma solução de colagénio cuja concentração é de 5%.

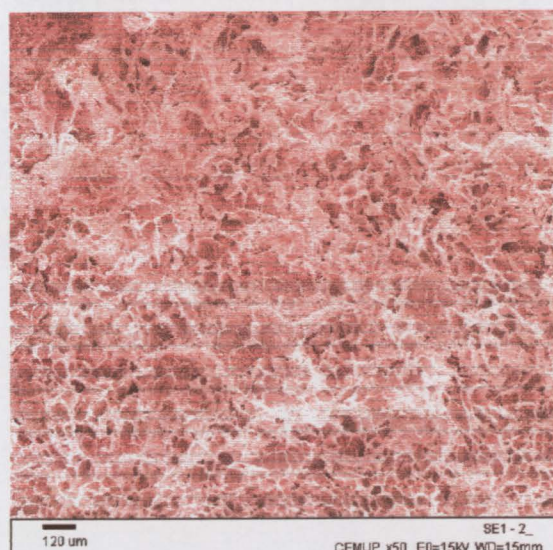


Fig.4.3.7a Interior do compósito liofilizado submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (50X)

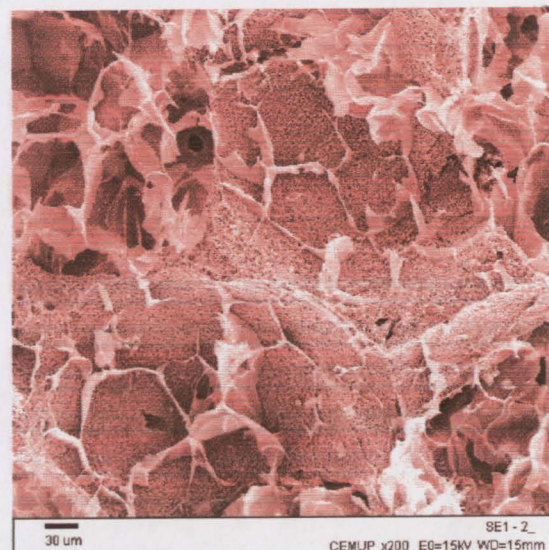


Fig.4.3.7b Interior do compósito liofilizado submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (200X)

Analisando a fig. 4.3.7a e fig.4.3.7b, verifica-se que há a formação de uma rede de colagénio no interior dos poros ao contrário do que se observa na fig. 4.3.4c na qual existe apenas um revestimento sólido de colagénio. Este facto é consistente com a diminuição da concentração de

colagénio, visto que há um aumento substancial da fluidez da solução permitindo não só um maior alcance no interior dos poros, como a formação de uma rede mais fina.

Podemos ver a superfície deste composto na fig. IVl no Anexo IV.

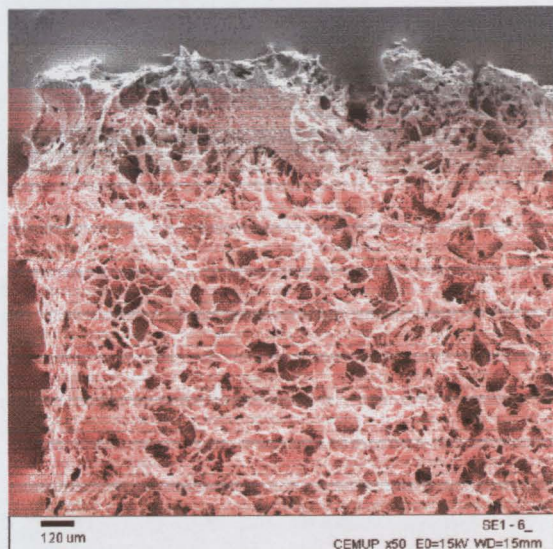


Fig.4.3.8a Interior do composto submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (50X)

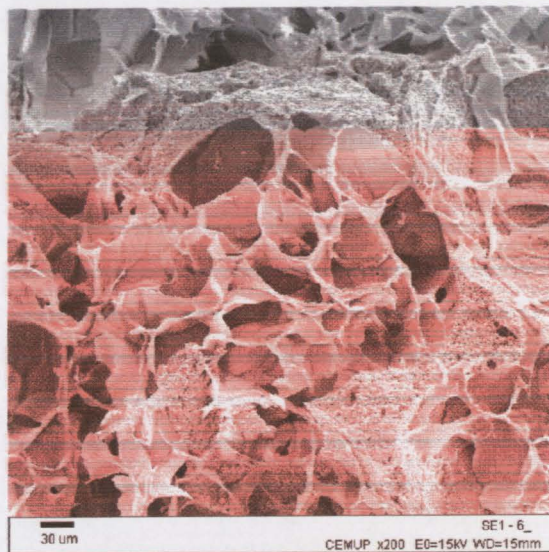


Fig.4.3.8b Interior do composto submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (200X)

Analisando a fig.4.3.8a, podemos verificar que o interior do composto apresenta uma rede de colagénio no interior dos poros (fig. 4.3.8b) que não se verifica nos compostos obtidos com a solução de colagénio a 20% (fig.4.3.6). Quando comparada com o composto liofilizado, a rede de colagénio formada no composto liofilizado (fig.4.3.7b) é claramente mais “aberta” e menos densa do que a rede de colagénio do composto (fig.4.3.8b). Podemos observar a superfície deste composto na fig. IVm do Anexo IV. Vamos analisar de seguida as fotomicrografias referentes à impregnação da matriz através da estufa de vácuo (método 2) com uma solução de colagénio cuja concentração é de 1%.

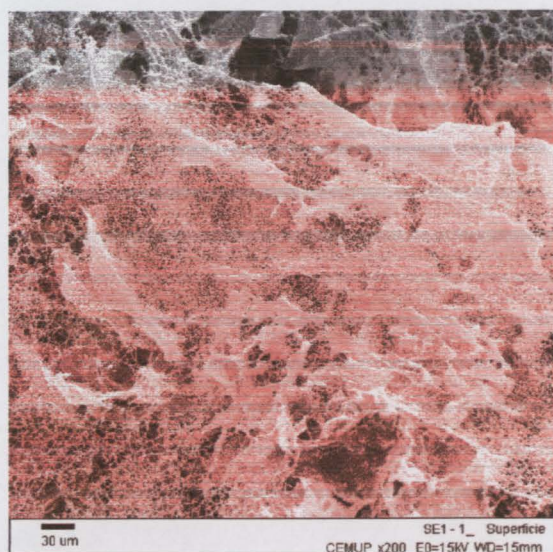


Fig. 4.3.9a Superfície do composto liofilizado. (200X)

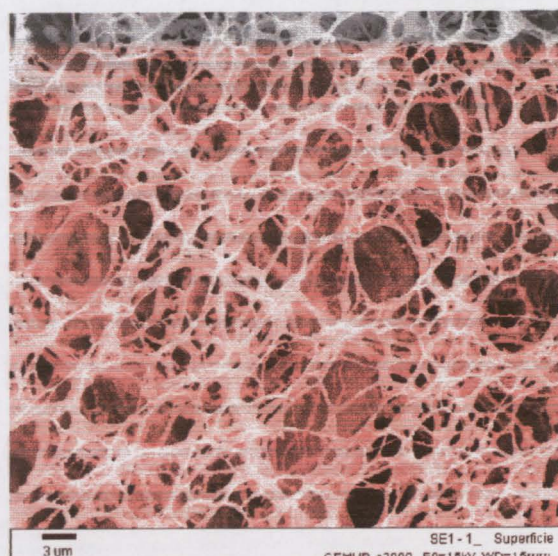


Fig. 4.3.9b Superfície do composto liofilizado. (2000X)

Observando a fig.4.3.9a, nota-se que a superfície do composto liofilizado parece quase indistinta quando comparada com as superfícies dos outros compostos. Como se pode reparar, o colagénio que recobre a superfície tem uma morfologia muito diferente da apresentada nas imagens anteriores, aparentando que a matriz está coberta por uma fina “teia de aranha”. Podemos ver em pormenor esta rede na fig. 4.3.9b, na qual se observa como esta rede (semelhante a uma esponja) se espalha na superfície e interior dos poros superficiais. Podemos ver em pormenor a superfície nas figuras IVn e IVo no Anexo IV.

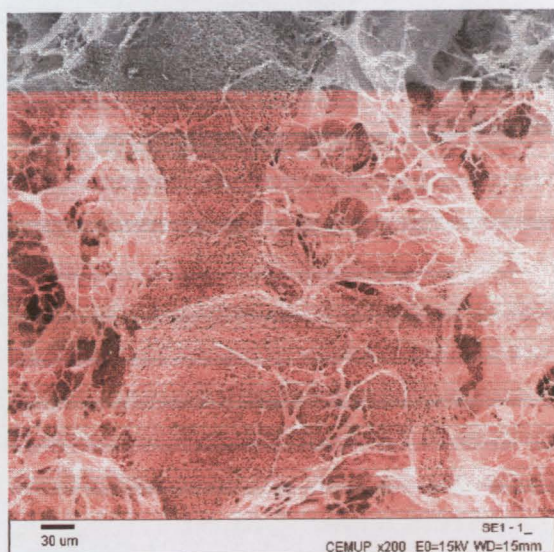


Fig.4.3.10a Interior do composto liofilizado. (200X)

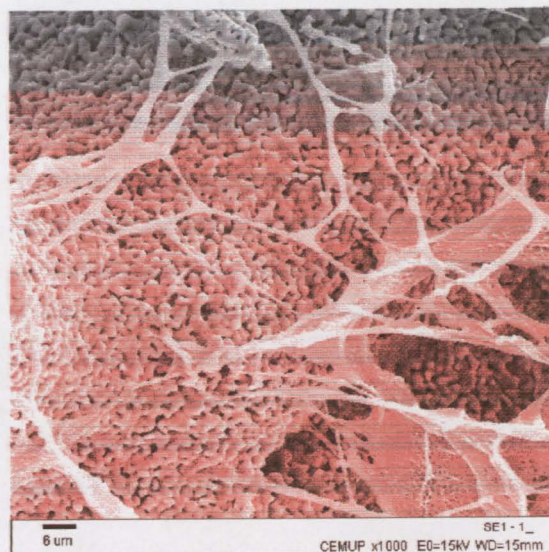


Fig.4.3.10b Interior do composto liofilizado. (1000X)

No interior do composto (fig.4.3.10a) a mesma situação se verifica, isto é, todas as imagens são completamente diferentes das anteriormente apresentadas. Temos na mesma a formação de uma rede de colagénio, no entanto, esta é caracterizada por sua densidade e por ser extremamente fina, como podemos ver na fig. 4.3.10b.

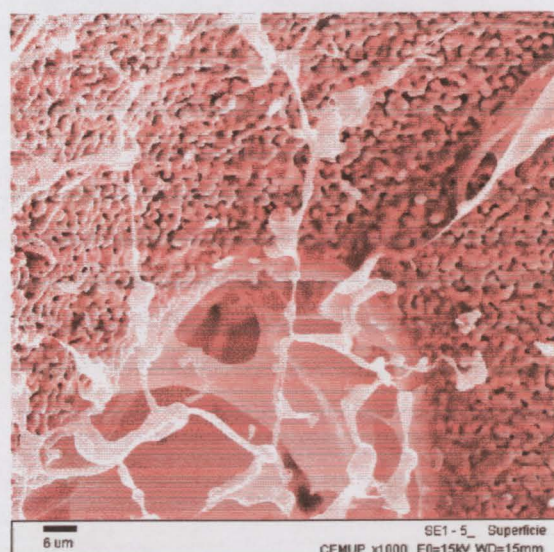


Fig. 4.3.11a Superfície do composto submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (1000X)

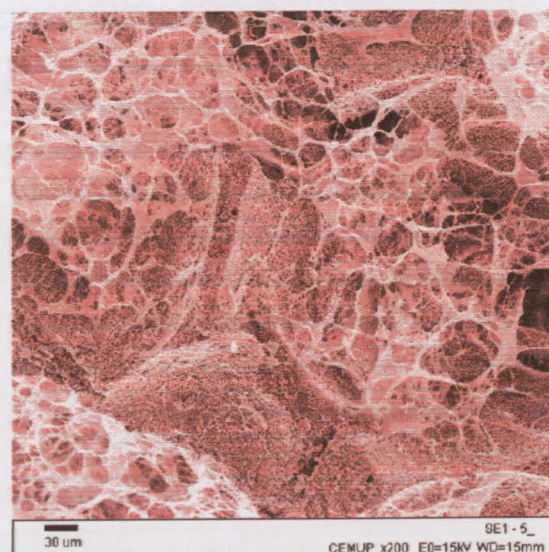


Fig. 4.3.12a Interior do composto submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (200X)

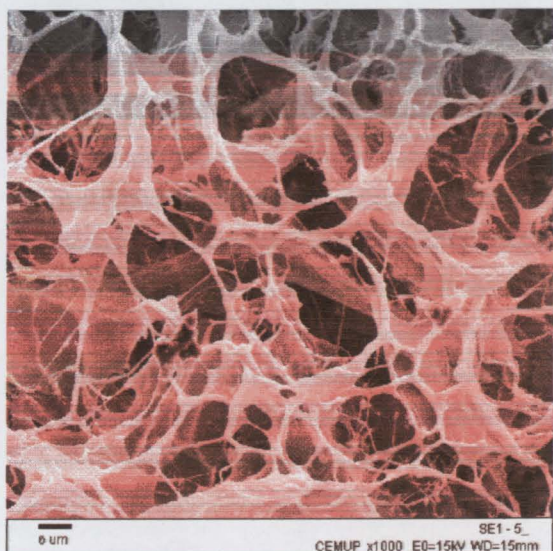


Fig. 4.3.12b Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (1000X)

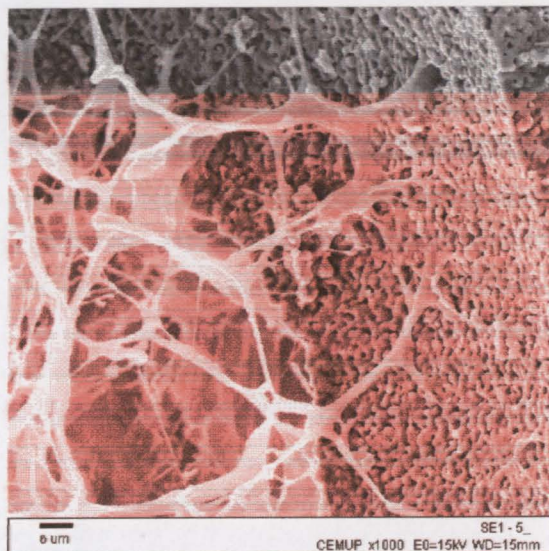


Fig. 4.3.12c Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (1000X)

Na fig.4.3.11a, vemos em pormenor a rede de colagénio que se estende da parede de um poro para a outra. Comparando com as imagens anteriormente apresentadas nas quais os poros apenas tinham colagénio revestido e a rede de colagénio estava distribuída de forma heterogénea, observa-se que na superfície do compósito a fina rede de colagénio formada preenche por completo os poros de uma forma e distribuição homogénea. Podemos ver em pormenor a rede de colagénio na figura 4.3.11e verificar que a sua densidade e espessura é extremamente diferente da observada nas restantes visto que, a superfície das amostras estão completamente recobertas. Isto representa um ponto negativo pois não é viável para as células pois, estas têm de migrar do tecido ósseo para o nosso implante e vice-versa, no entanto, o mesmo não acontece com a amostra analisada na figura 4.3.11.a. Observando o inteiro dos compósitos das figs 4.3.12a, 4.3.12b e 4.3.12c, podemos ver que o colagénio desenvolveu também no interior do compósito uma rede fina, densa e com elevada superfície específica. Esta rede é muito diferente da observada nas figuras anteriores, o que demonstra que o decréscimo da concentração da solução de colagénio e consequente aumento de fluidez da mesma influenciou o tipo de rede de colagénio obtida. Com a utilização do método 2 podemos concluir que este método produz uma impregnação de colagénio mais eficaz do que a do método 1, além de que a distribuição e forma da rede de colagénio é mais homogénea e fina. Isto é, a intensidade do vácuo e a concentração da solução de colagénio são os parâmetros chave da impregnação. Assim, podemos depreender que a concentração de 1% e a utilização do método 2 são os parâmetros mais adequados que foram verificados e analisados neste relatório. Com estes resultados seria útil a progressão deste estudo nomeadamente com outras concentrações de colagénio.

5. Conclusão

- A matriz porosa de hidroxiapatite tem micro/macroporosidade e porosidade interconectada;
- Os melhores resultados foram obtidos com a matriz cujo rácio é de 6:4:0,2;
- Os melhores compósitos foram obtidos com tempo de crosslinking de 24 horas e temperatura de 140°C;
- A concentração da solução aquosa de colagénio que demonstrou ser a mais apropriada é a de 1%, no entanto seria aconselhável experimentar outras concentrações;
- O ambiente criado no interior dos poros parece apropriado para a circulação e ancoragem das moléculas e células;
- Este compósito pode ter mais aplicações nomeadamente como veículo de libertação de fármacos e factores de crescimento.

6. Bibliografia

- [1] Aoki, H., *Medical Applications of Hydroxyapatite*, Ishiyaku EuroAmerica Inc, Tokyo, 1994, cap.1, pag.1-3
- [2] Bagamisa F., Joos U., Schilli W., Mechanisms and structutre of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics, *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1047-1055
- [3] Site que explica a técnica de porosimetria por intrusão de mercúrio:
<http://www.lmpt.ufsc.br/porosimetria.html>
- [4] Queiroz, A.C.,Teixeira, S.,Santos J.D., Monteiro F.J.,Production of porous hydroxyapatite for controlled drug delivery, Accepted for Key Engineering Materials 2003.
- [5] Site com imagens dos aminoácidos da molécula de colagénio:
<http://www.nyu.edu>
- [6] Site com imagens da molécula da colagénio:
<http://0-pdb.nist.gov.library.csu Hayward.edu>
- [7] Site com imagens da molécula de colagénio:
<http://www.lmu.ac.uk>
- [8] CRC Press, *The Biomedical Engineer Handbook*, 2000,"Engineering biomaterials for tissue engineering- the 10-100 micron scale",cap. 112
- [9] Ueda H., Hong L, Yamamoto M., Shigeno K., Inoue M., Toba T., Yoshitani M., Nakamura T., Tabata Y., Shimizu Y., Use of collagen sponge incorporating tranforming growth factor- β 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits. *Biomaterials* 2002; 23: 1003-1010

ANEXO I

Anexo I

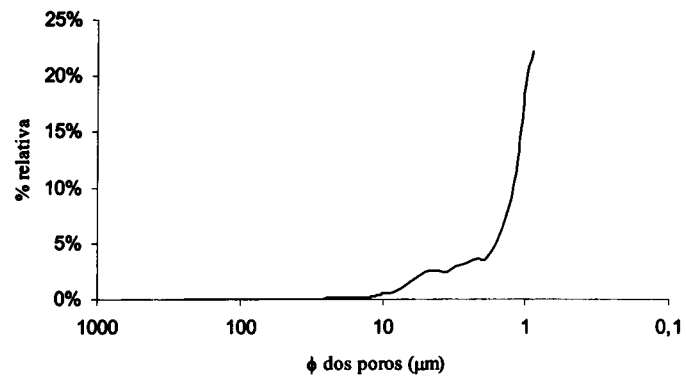


Figura 1 Gráfico de % relativa da matriz cerâmica 3:3:0,1.

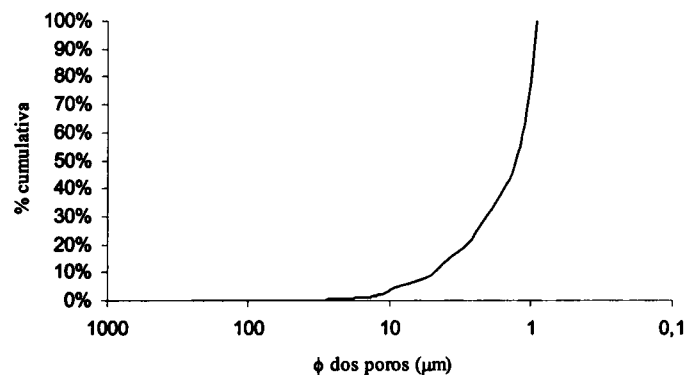


Figura 2 Gráfico de % cumulativa da matriz cerâmica 3:3:0,1.

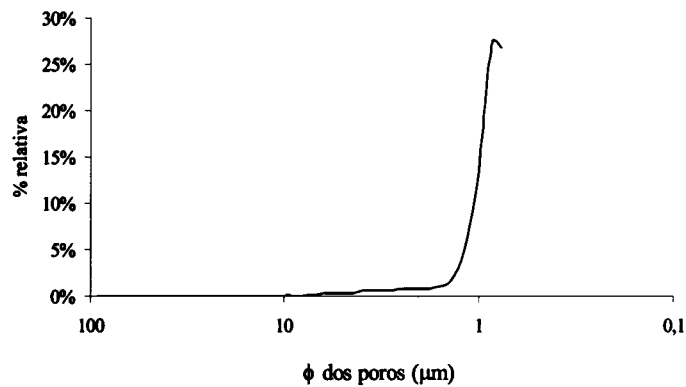


Figura 3 Gráfico de % relativa da matriz cerâmica 6:4:0,2.

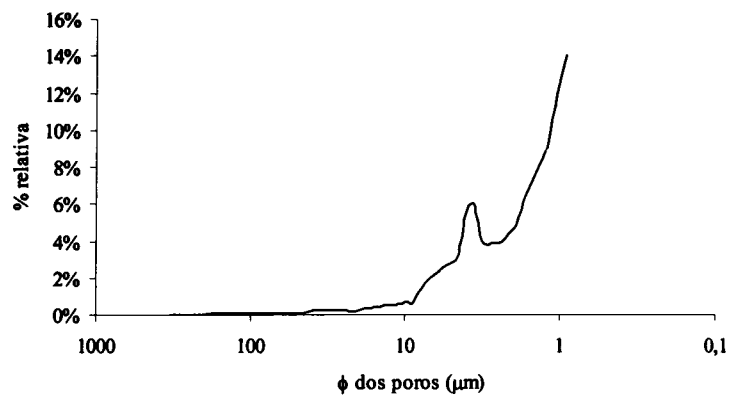


Figura 4 Gráfico de % relativa da matriz cerâmica 6:6:0,2

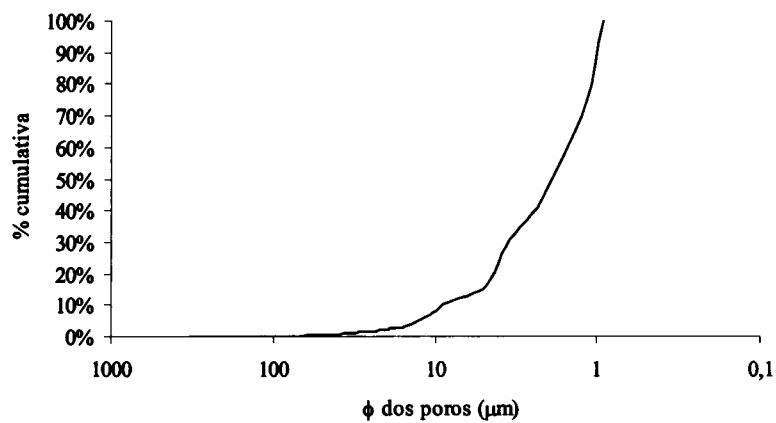


Figura 5 Gráfico de % cumulativa da matriz cerâmica 6:6:0,2.

ANEXO II

Anexo II

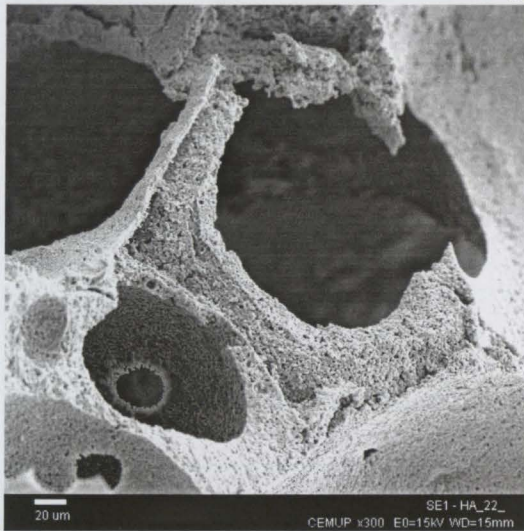


Fig. IIa Matriz cujo rácio é de 2:2:0,1. (300X)

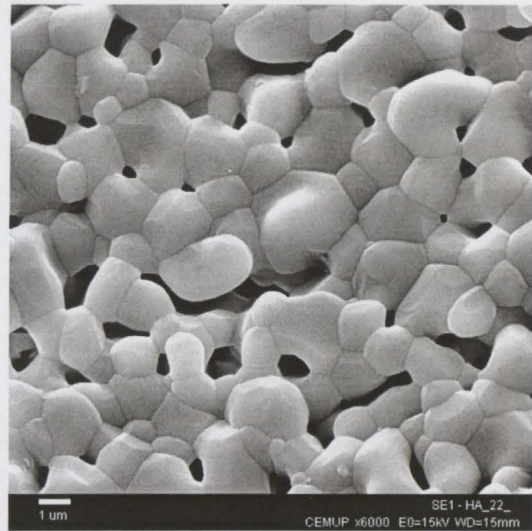


Fig. IIb Matriz cujo rácio é de 2:2:0,1. (6000X)

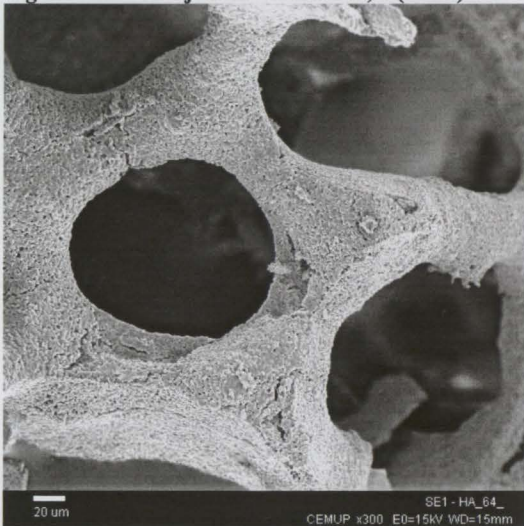


Fig. IIc Matriz cujo rácio é de 6:4:0,2. (300X)

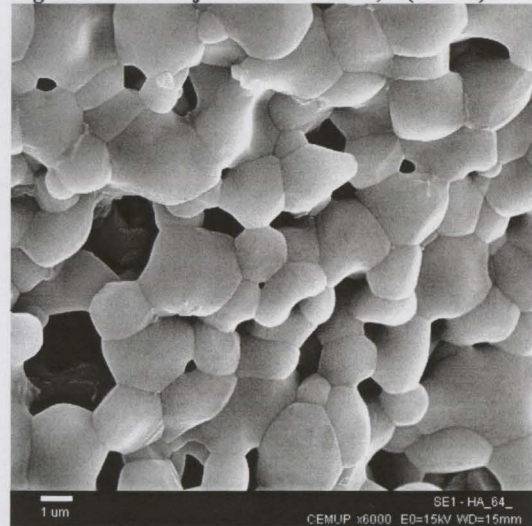


Fig. II d Matriz cujo rácio é de 6:4:0,2. (6000X)

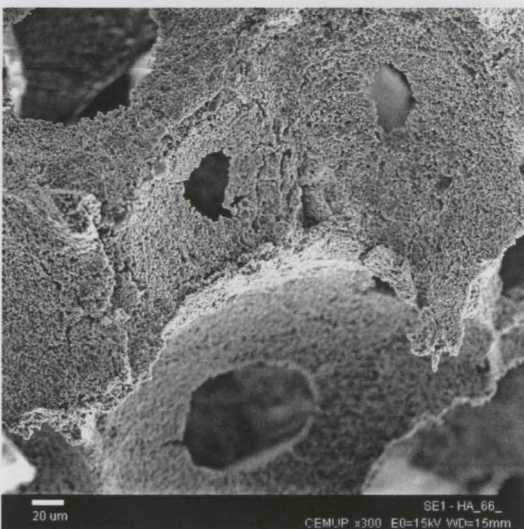


Fig. IIe Matriz cujo rácio é de 6:6:0,2. (300X)

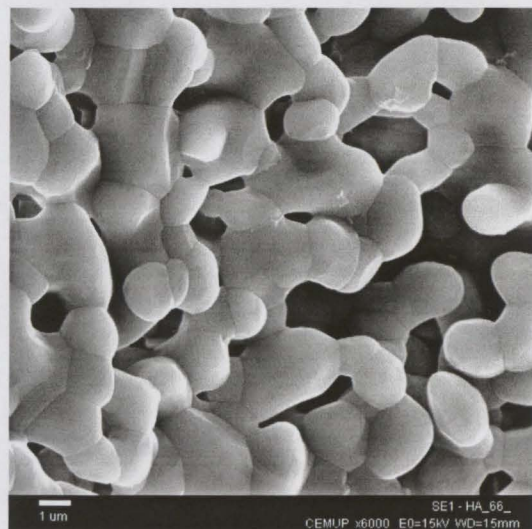


Fig. II f Matriz cujo rácio é de 6:6:0,2. (6000X)

ANEXO III

Anexo III

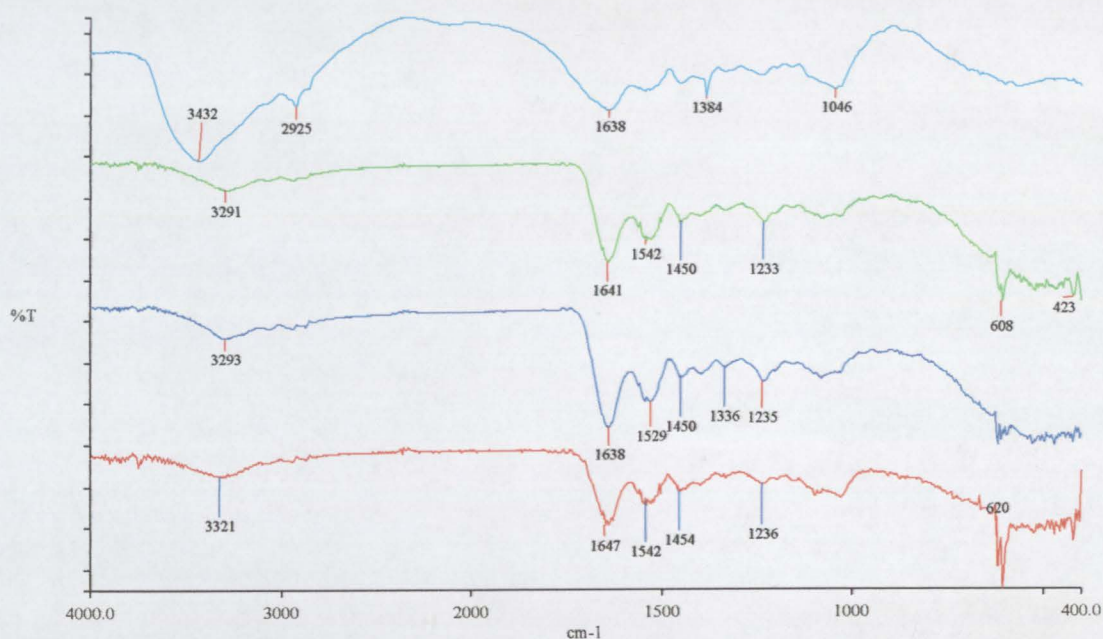


Figura 1 Espectro FTIR do colagénio sujeito à temperatura de 70°C durante 6, 12 e 24 horas. **Legenda:** colagénio em pó, colagénio T=70°C e t = 6h, colagénio T=70°C e t = 12h, colagénio T=70°C e t = 24h.

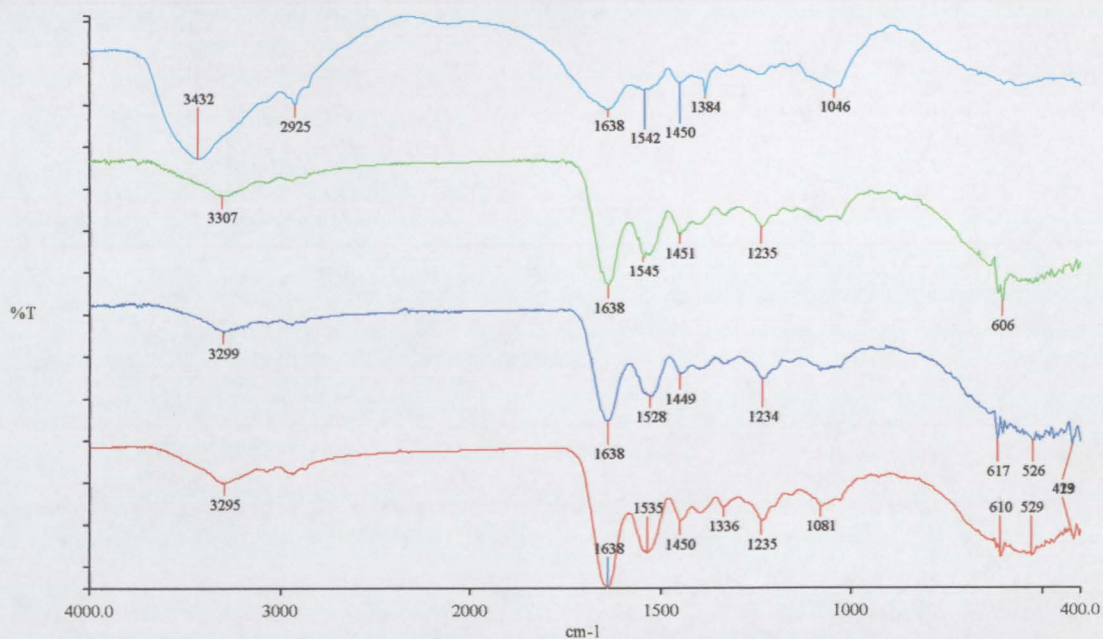


Figura 2 Espectro FTIR do colagénio sujeito à temperatura de 100°C durante 6, 12 e 24 horas. **Legenda:** colagénio em pó, colagénio T=100°C e t = 6h, colagénio T=100°C e t = 12h, colagénio T=100°C e t = 24h.

Se observarmos, não existem alterações significativas nos grupos funcionais das amostras quando o tempo de crosslinking varia de 6 para 12 horas.

No caso das amostras cujo tempo de crosslinking é de 24 horas as mesmas alterações referidas anteriormente são verificadas, sendo neste caso o pico da Amida I mais

pronunciado (com o aumento da temperatura) do que nas figuras anteriores. Além disso, o pico da Amida A ($\sim 3432\text{cm}^{-1}$) desloca-se para a direita e fica mais esbatido com o aumento da temperatura.

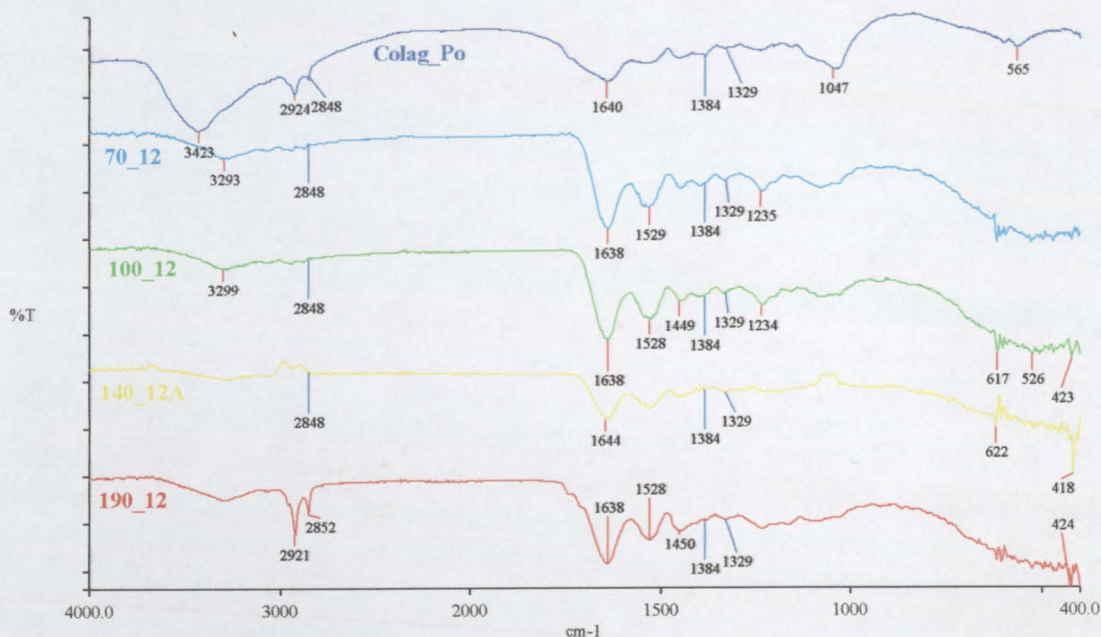


Figura 3 Espectro FTIR do colagénio que representa as variações ocorridas nos picos quando o tempo de crosslinking é de 12 horas e a temperatura varia de 70 a 190 °C. Legenda: colagénio em pó, colagénio T=70°C e t = 12h, colagénio T=100°C e t = 12h, colagénio T=140°C e t = 12h, colagénio T=190°C e t = 12h.

De seguida estudou-se a influência do tempo de crosslinking nas amostras de colagénio sujeitas à temperatura de 140°C.

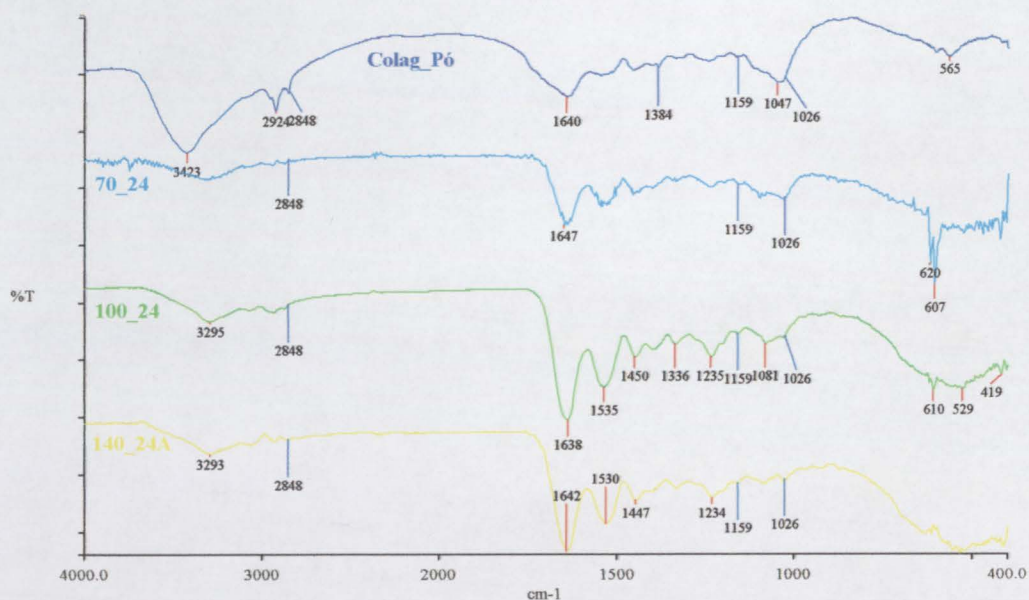


Figura 4 Espectro FTIR do colagénio que representa as variações ocorridas nos picos quando o tempo de crosslinking é de 24 horas e a temperatura varia de 70 a 140 °C. Legenda: colagénio em pó, colagénio T=70°C e t = 24h, colagénio T=100°C e t = 24h, colagénio T=140°C e t = 24h.

ANEXO IV

Anexo IV

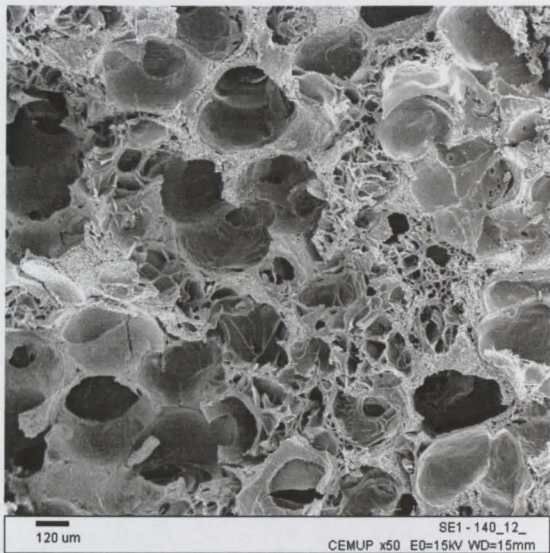


Figura IVa Interior do compósito liofilizado. (50X)

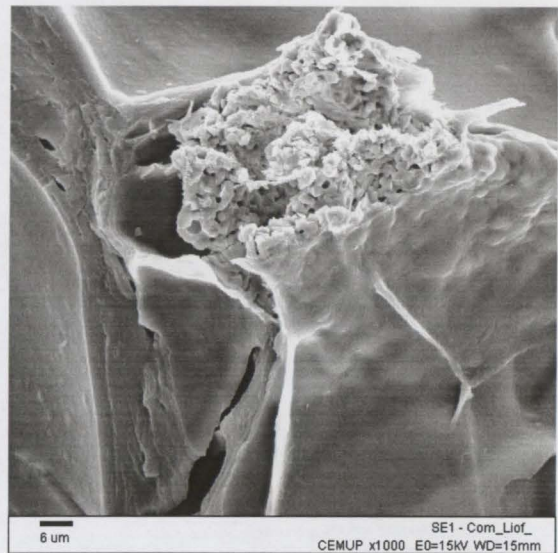


Figura IVb Interior do compósito liofilizado. (1000X)

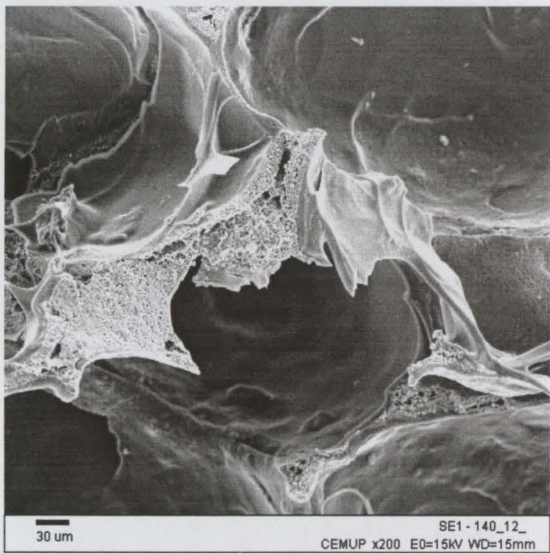


Figura IVc Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 12h a 140°C. (200X)

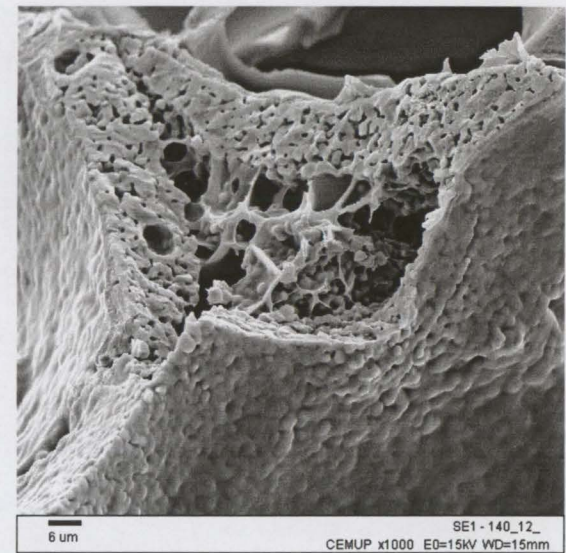


Figura IVd Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 12h a 140°C. (1000X)

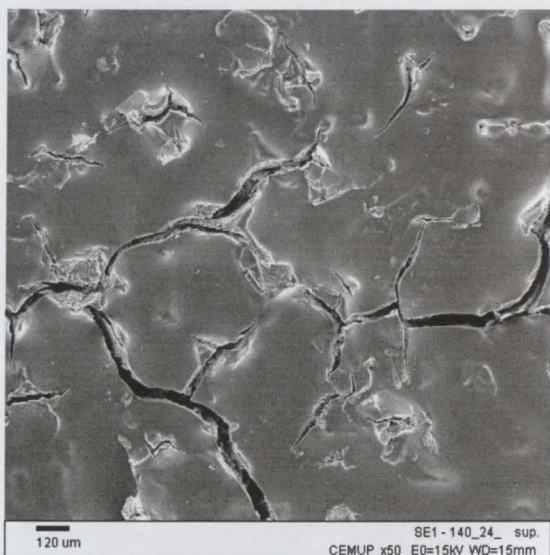


Figura IVe Superfície do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 24h a 140°C. (50X)

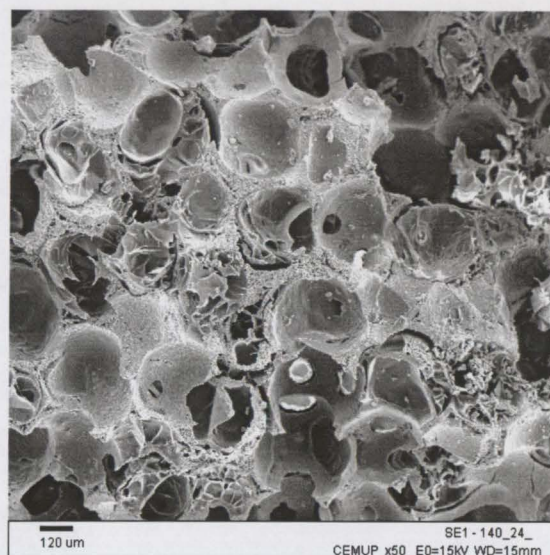


Figura IVf Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 24h a 140°C. (50X)

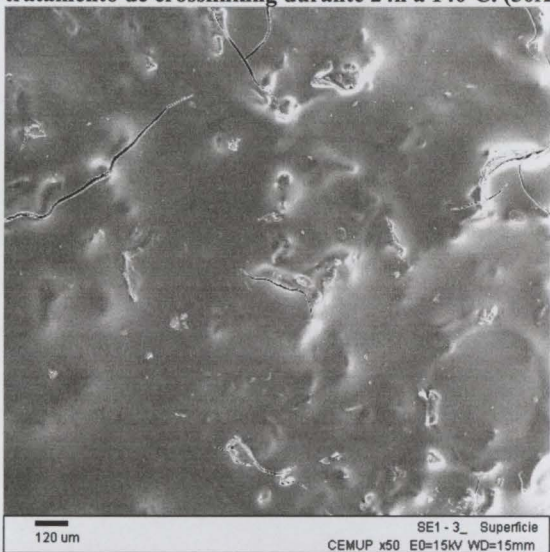


Figura IVf Superfície do compósito liofilizado. (50X)

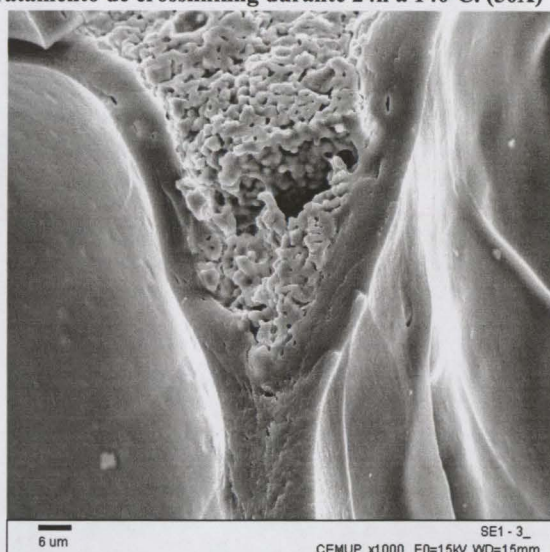


Fig. IVg Interior do compósito liofilizado. (1000X)

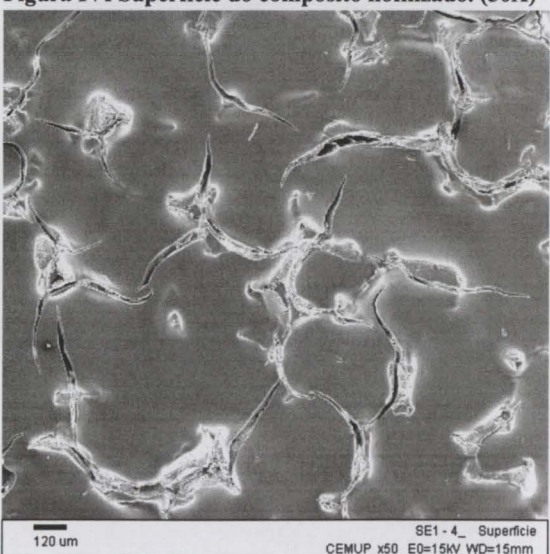


Fig.IVh Superfície do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 12 horas. (50X)

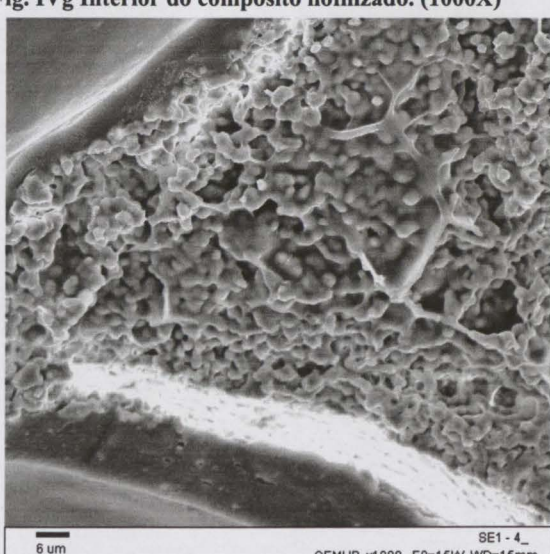


Fig. IVi Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 12 horas.(1000X)

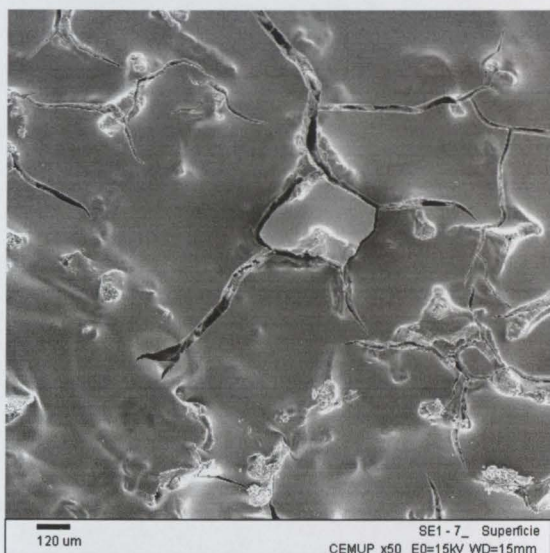


Fig. IVj Superfície do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24horas (50X)

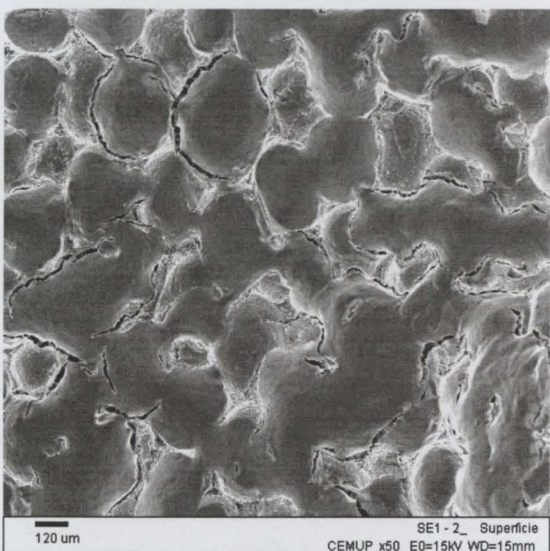


Fig. IVl Superfície do compósito liofilizado. (50X)

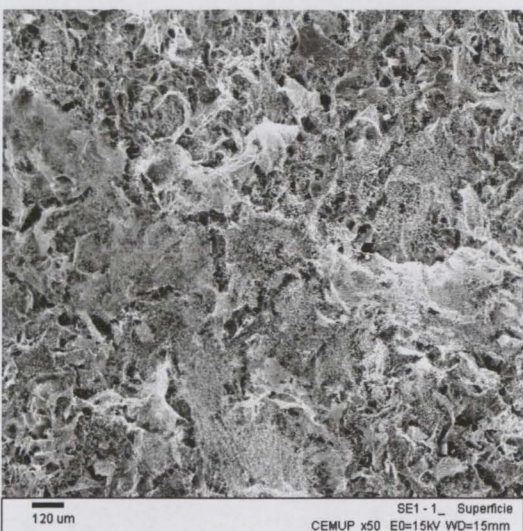


Fig.IVn Superfície do compósito liofilizado. (50X)

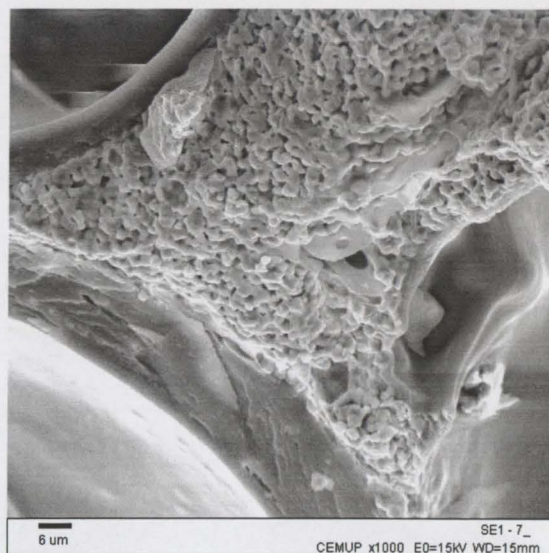


Fig. IVk Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24horas. (1000X)

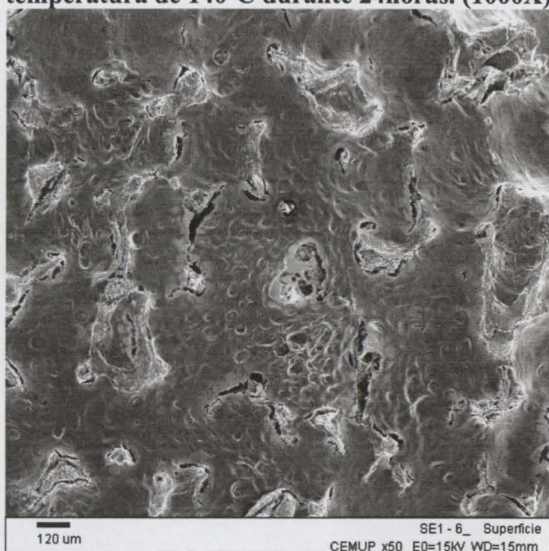


Fig. IVm Superfície do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (50X)6

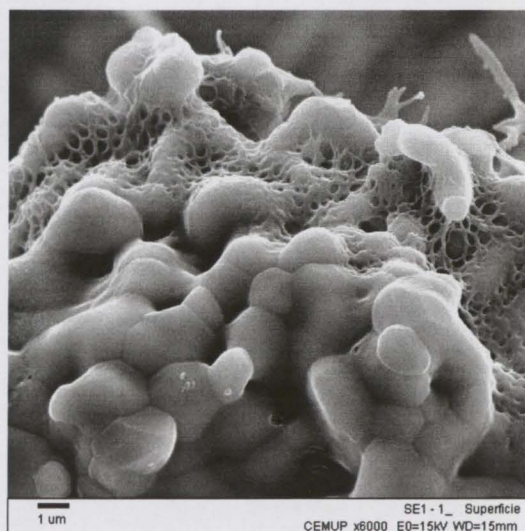


Fig. IVo Superfície do compósito liofilizado. (6000X)

ANEXO V

Anexo IV

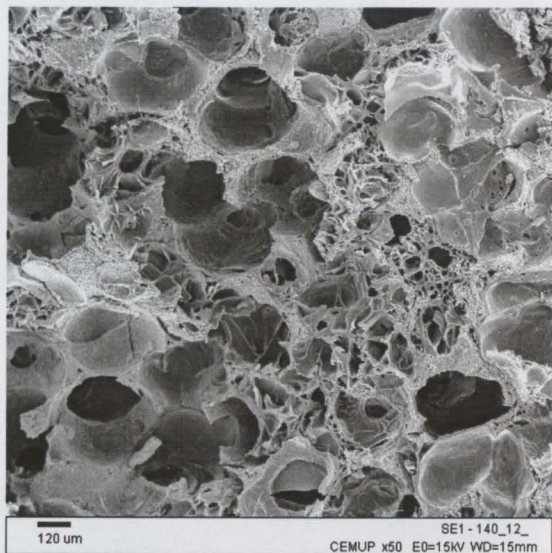


Figura IVa Interior do compósito liofilizado. (50X)

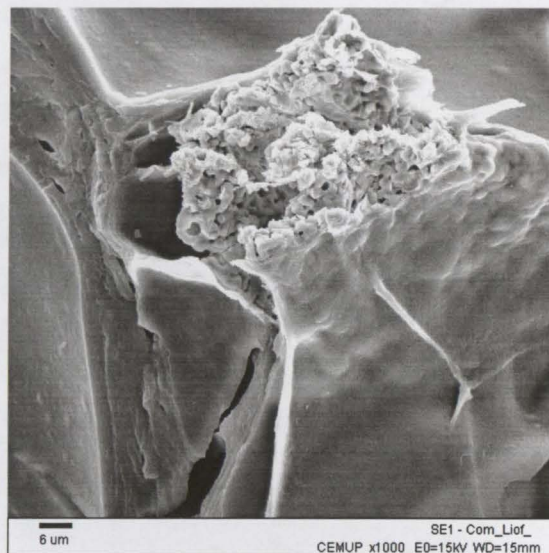


Figura IVb Interior do compósito liofilizado. (1000X)

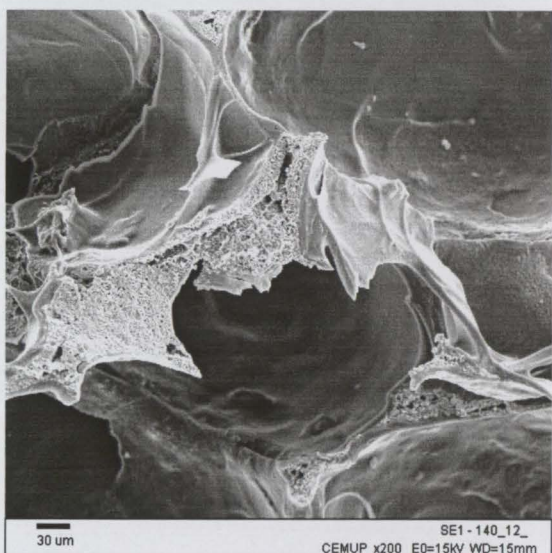


Figura IVc Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 12h a 140°C. (200X)

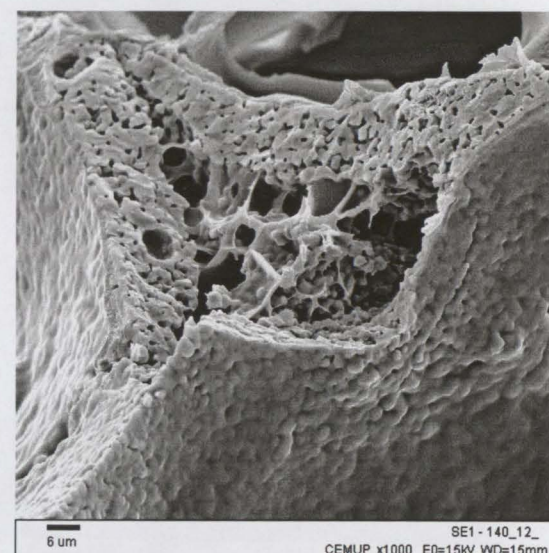


Figura IVd Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 12h a 140°C. (1000X)

ANEXO IV

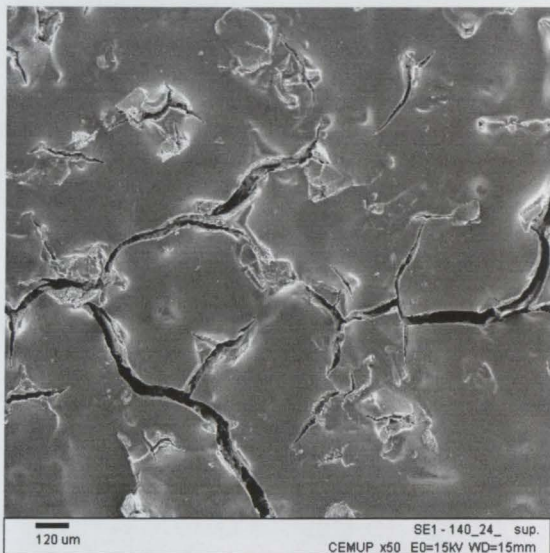


Figura IVe Superfície do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 24h a 140°C. (50X)

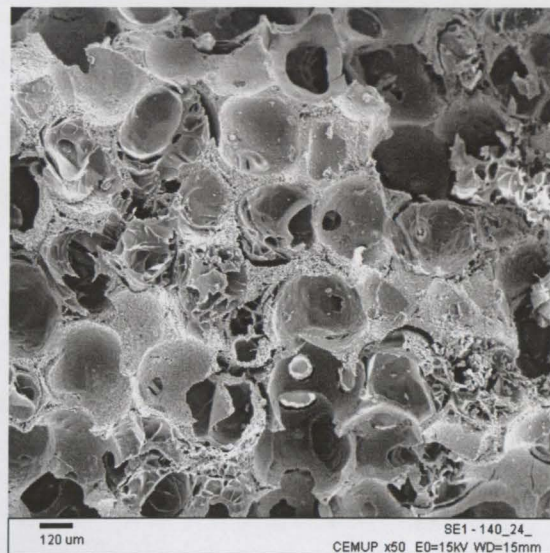


Figura IVf Interior do compósito que sofreu um tratamento de crosslinking durante 24h a 140°C. (50X)

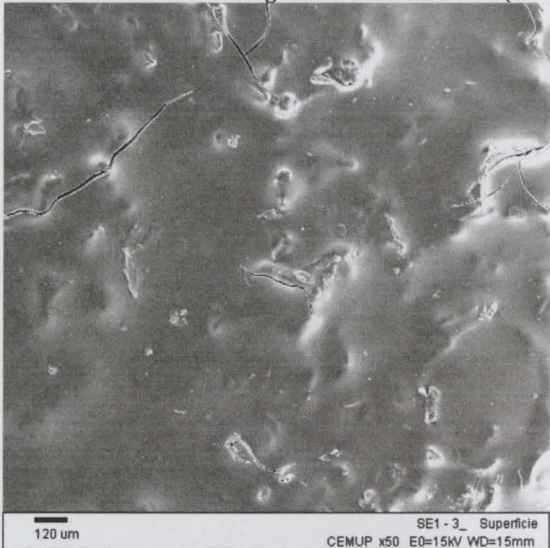


Figura IVf Superfície do compósito liofilizado. (50X)

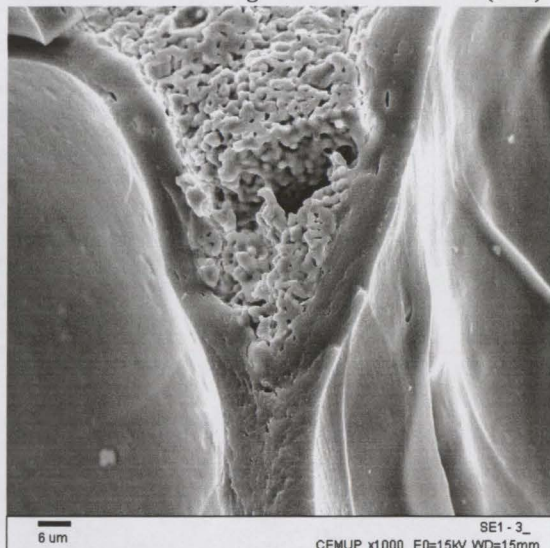


Fig. IVg Interior do compósito liofilizado. (1000X)

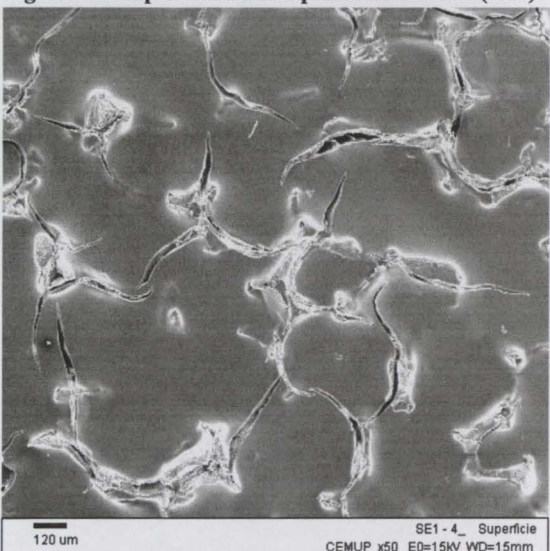


Fig.IVh Superfície do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 12 horas. (50X)

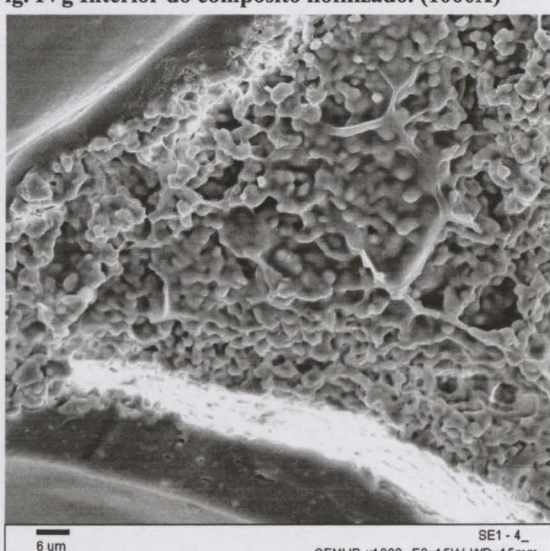


Fig. IVi Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 12 horas.(1000X)

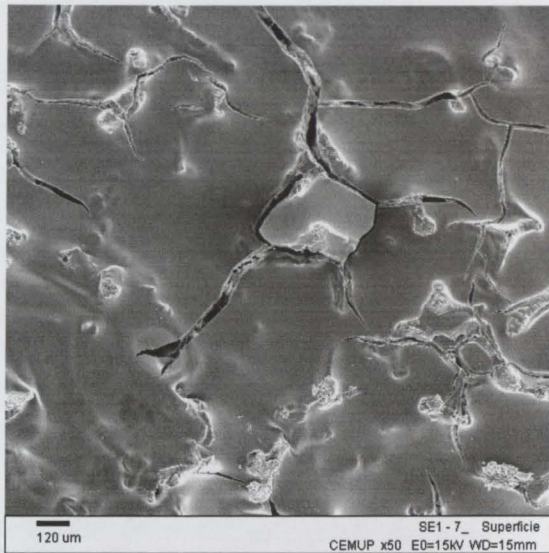


Fig. IVj Superfície do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24horas (50X)

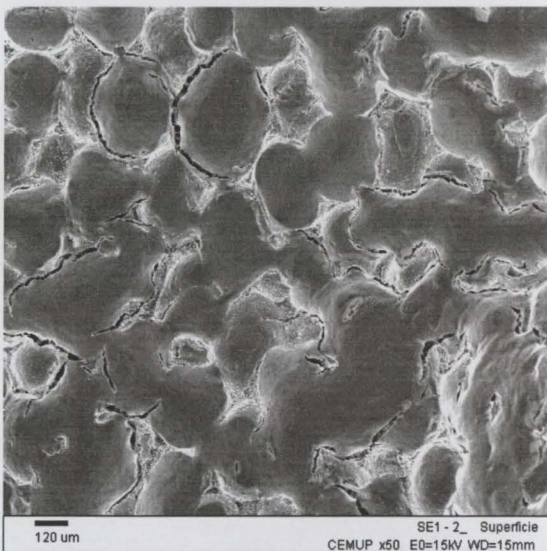


Fig. IVl Superfície do compósito liofilizado. (50X)

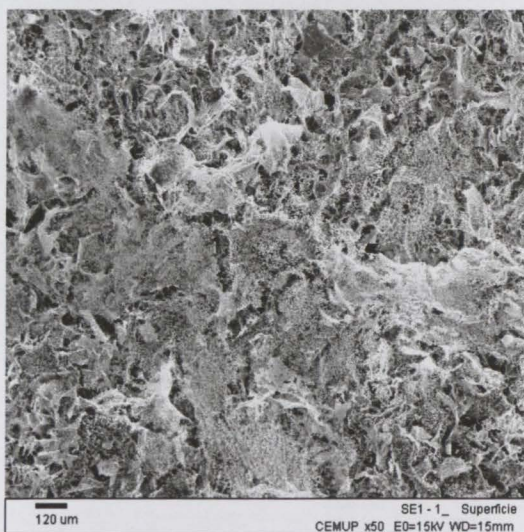


Fig.IVn Superfície do compósito liofilizado. (50X)



Fig. IVk Interior do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24horas. (1000X)

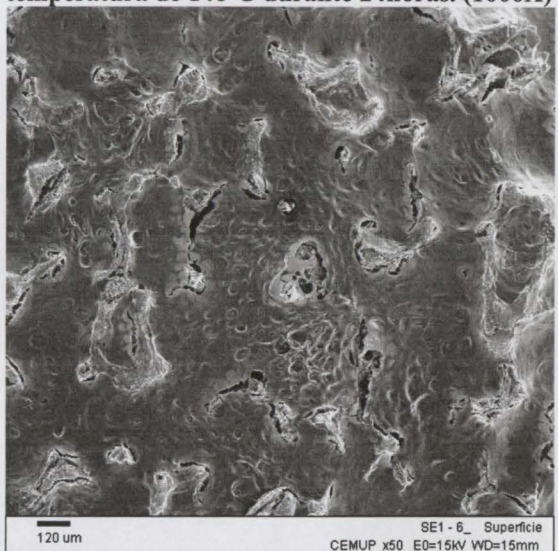


Fig. IVm Superfície do compósito submetido à temperatura de 140°C durante 24 horas. (50X)6

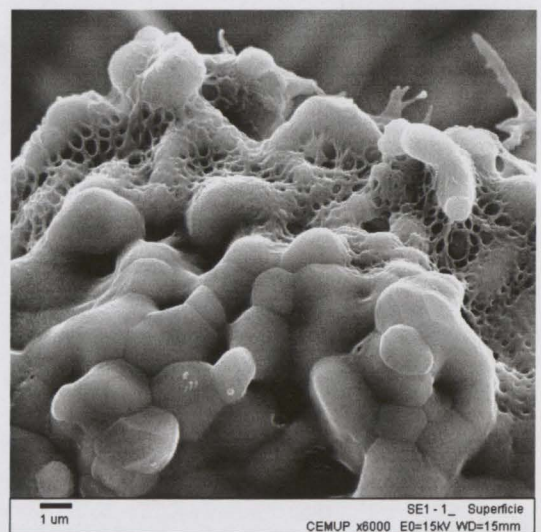


Fig. IVo Superfície do compósito liofilizado. (6000X)

PRODUCTION OF POROUS HYDROXYAPATITE FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY

A.C. Queiroz^{1,2}, S. Teixeira^{1,3}, J.D. Santos^{1,3}, F.J. Monteiro^{1,3}

¹ INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, R do Campo Alegre, 823, 4150-180 Porto, Portugal;
tel. +351 22 6074984; email: aqueiroz@ineb.up.pt

² Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Ap 574 , 4901 Viana do Castelo Codex, Portugal

³ Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, R Dr Roberto Frias, 4150 Porto, Portugal

Keywords: Hydroxyapatite, porous, drug delivery

Abstract

Porous hydroxyapatite was prepared in order to be used as a drug carrier and promote bone ingrowth. For this purpose, the microstructure should have interconnective pores and micro as well as macro porosity, for bone cell adhesion and bone ingrowth. The porous hydroxyapatite prepared by this burn out method has shown all these features. For measuring porosity, SEM analysis, mercury porosimetry and BET were used. FT-IR and XRD analysis revealed that only hydroxyapatite phase was present, being this result similar to the one found for the dense samples, as described elsewhere. In what concerns its compressive strength the porous materials showed sufficient values to withstand manipulation. The morphology obtained appears to be well adapted to bone growth and drug adsorption.

Introduction

Periodontitis is an oral disease that ultimately promotes bone loss [1, 2]. Current systemic approach leads to the use of very high dosages of antibiotics, that may induce drug resistance and eventually its local concentration is lower than the minimum inhibitory concentration (MIC) [3-5]. In order to obtain maximized local drug delivery, surface area should be as high as possible to provide accommodation for large content of drugs. This kind of structure can be obtained either by use of granules or porous materials [6].

As periodontitis in its most severe form produces bone loss, the search for an osteoconductive implant material is fundamental. In the case of porous materials, the osteoconduction may be favorable or not, depending on the pore type, size and distribution [7-10].

The ongoing search for a porous bioactive material, with adequate mechanical properties, high surface to volume ratio, and desirable porosity to induce bone in-growth led to the optimisation of the production method of porous hydroxyapatite (HA).

Hydroxyapatite is a well studied bioceramic widely used as an implant [11-12], and extensively studied in its porous form [9-10, 13]. The high surface area achieved by this method allows increased amounts of drug to be adsorbed onto the surface for local release.

Materials and methods

Porous HA samples with approximately 10x10x15 mm were obtained by immersing a polyurethane (PU) sponge in a slurry at 50 °C. The slurry was obtained by mixing, at 50 °C, commercially pure HA (Plasma Biotol, P-120), water and a tensioactive agent (LM3 commercial detergent) at pre-established proportions. After immersion, the PU sponge was removed by the burn out method using the following burn out/sintering cycle (figure 1).

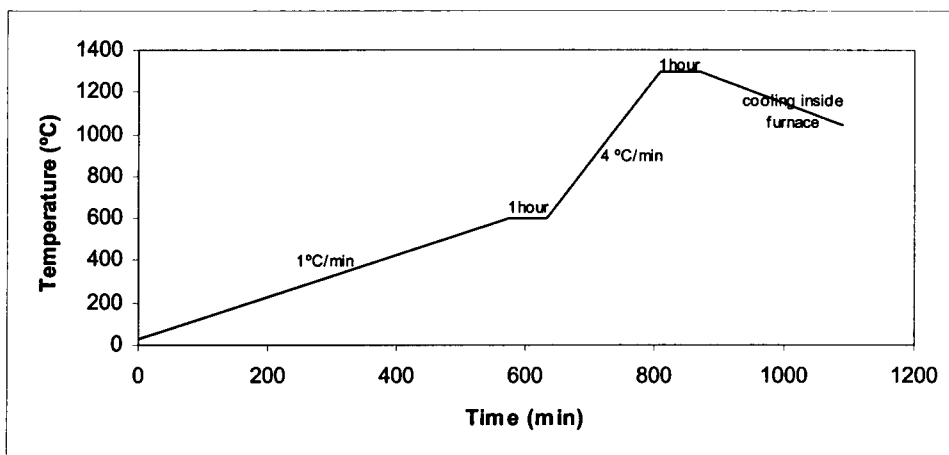


Figure 1 – Burn out/sintering cycle for porous hydroxyapatite.

Several HA (g):Water (ml):tensioactive agent (ml) ratios were tested. The best results were obtained with the 6:6:0.2 ratio. Structural surface characterisation was performed on samples using Scanning electron microscopy (SEM). Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR), using the split pea accessory and X-ray diffraction (XRD) analysis were used. These analysis techniques were carried out in order to evaluate possible surface chemical modifications induced by the use of both tensioactive agent and polyurethane sponge. In order to characterise macroporosity and actual surface area, mercury porosimetry (Micromeritics Mercury Intrusion Porosimeter, PoreSizer 9320) and BET measurements were carried out. Compressive strength assays were also performed in a Lloyd LR 30 K tension machine with a load of 5 KN.

Results and discussion

FT-IR results for HA showed the specific peaks for the phosphate (1086, 96, 598, 563 and 465 cm^{-1}) and hydroxyl (626 cm^{-1}) groups for HA (figure 2).

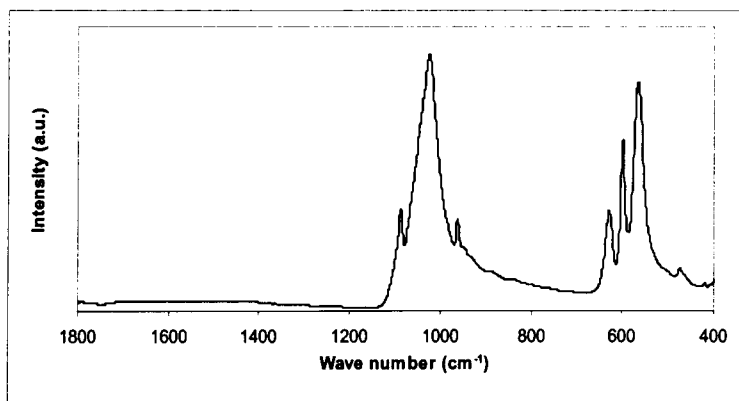


Figure 2 – FTIR of the porous HA sample.

XRD results (figure 3) show the presence of hydroxyapatite, not being different from the hydroxyapatite detected on dense samples [14], similar results were drawn from FT-IR.

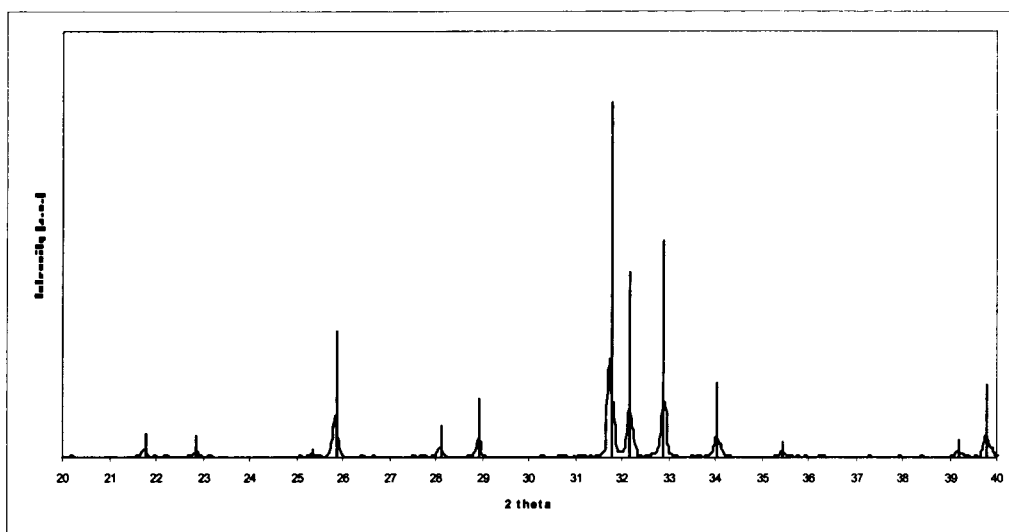


Figure 3 – XRD analysis of porous hydroxyapatite.

SEM observations revealed an interconnective macroporous structure (figure 4a), but also microporosity was present (figure 4b). This kind of structure is considered to be adequate, as the macroporosity induces osteoinduction and the microporosity allows improved cell adhesion [9].

These results were corroborated by the mercury porosimetry where it can be seen that pores are present ranging for 100 to 1 μm (figure 5), where the majority of pores occurs for 1 μm diameter. From this technique it was also concluded that the porosity should be of approximately 15 %. Yet, samples revealed 0.8476 gcm^{-3} apparent density, that when compared to 2.97 gcm^{-3} for dense samples (Archimedes method), show a significant difference. From these results it can be inferred that the porosity of the produced samples is of approximately 73%, instead of the 15% given by the technique. The difference between these figures, should be accounted by the presence of interconnected macroporosity, being the 15 % the approximate value attributed to the microporosity. In fact, SEM analysis produced results leading to the confirmation of this idea, as

larger porous around 150-400 μm are shown. In order to evaluate the actual surface area, BET measurements were made, and a value of $1.5 \text{ m}^2/\text{g}$ was obtained.

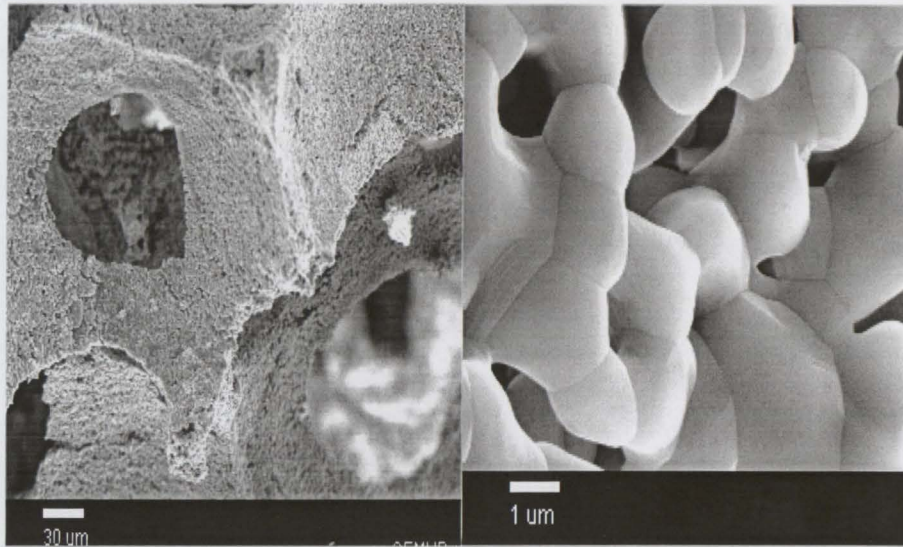


Figure 4 – Porous HA sample (a) left – interconnected macroporosity; (b) right – microporosity.

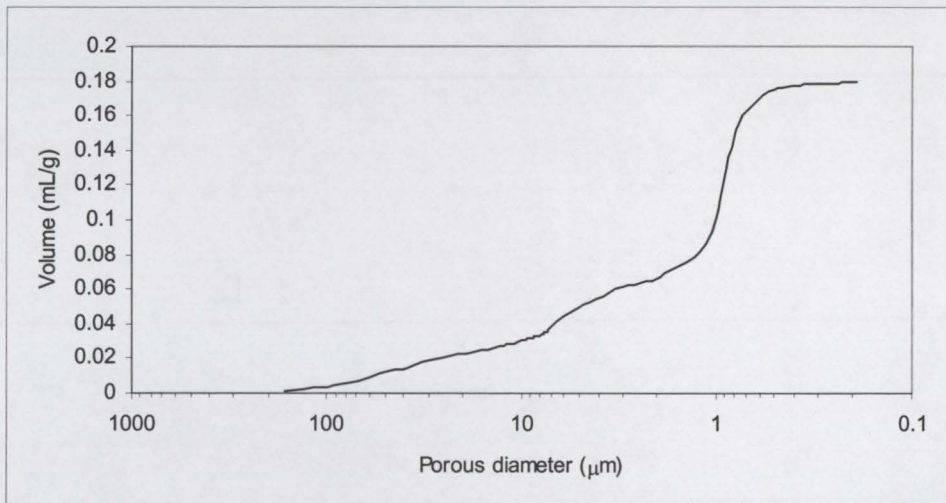


Figure 5 – Porous distribution on HA samples.

Compressive strength results (data not shown) indicated that the porous HA samples present adequate mechanical strength for manipulation and shaping during surgery and implantation.

Conclusions

With the applied technique for production of porous materials, the results revealed the possibility of obtaining interconnective pores, with fully reproducible results.

FT-IR and XRD analysis revealed that no chemical modification has occurred during processing and burn-out of the PU sponge. Mercury intrusion porosimetry, BET and SEM revealed the presence of micro and macroporosity, adequate for cell adhesion, bone ingrowth and vascularisation.

High surface area of this material, makes it a good candidate as drug delivery agent. The porous material showed enough strength to withstand manipulation. Although high loads are expected not to occur in actual working conditions.

Bibliography

- [1] Krejci, C.B.;Bissada, N.F.;Farah, C.; Greenwell, H.: *Journal of Periodontology* **58** (1987), p. 521.
- [2] Seymour, R.A.;Heasman, P.A.; MacGregor, I.D.M., *The pathogenesis of periodontal disease*, in *Drugs, Diseases, and the Periodontium* (Oxford University Press 1992).
- [3] *Journal of Periodontology* **67** (1996), p. 831.
- [4] Steinberg, D.;Friedman, M.;Soskolne, A.; Sela, M.N.: *Journal of Periodontology* **61** (1990), p. 393.
- [5] Soskolne, W.A.;Heasman, H.A.;Stabholz, A.;Smart, G.J.;Palmer, M.;Flashner, M.; Newman, H.N.: *Journal of Periodontology* **68** (1997), p. 32.
- [6] Prado da Silva, M.H.;Lemos, A.F.;Gibson, I.R.;Ferreira, J.M.F.; Santos, J.D.: *Journal of Non-Crystalline Solids* **304** (2002), p. 286.
- [7] Chang, B.; Lee, C.; Hong, K.; Youn, H.; Ryu, H.; Chung, S.; Park, K.: *Biomaterials* **21** (2000), p. 1291.
- [8] Ewers, R.; Simons, B.: *Biomaterials – Hard Tissue Repair and Replacement* (Elsevier Science Publishers 1992).
- [9] Hing, K.A.; Best, K.E.; Tanner, K.E.; Revell, P.A.; Bonfield, W.: *Bioceramics* **8** (1995) p. 75.
- [10] Ohgushi, H.; Okumura, M; Yoshikawa, T.; Inoue, K.; Senpuku, N.; Tamai, S.; Shors, E.C.: *Journal of Biomedical Materials Research* **26** (1992) p. 885.
- [11] Barinov, S.M. and Baschenko, Y.V.: *Bioceramics and the human body* (Elsevier Science Publishers 1992, UK).
- [12] Koshino, T.;Murase, T.;Takagi, T.; Saito, T.: *Biomaterials* **22** (2001) p. 1579.
- [13] Hing, K.A.; Best, S.M.; Tanner, K.E.; Bonfield, W.; Revell, P.A.: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **8** (1997), p. 731.
- [14] Queiroz, A.C.; Santos, J.D.; Monteiro, F.J.; Gibson, I.R.; Knowles, J.C.: *Biomaterial* **22** (2001) p. 1393



16th
International
Symposium
on CERAMICS
in MEDICINE

Bioceramics 16

6th-9th November 2003
Porto, Portugal

Abstract form

Title of the paper

☒ Controlled release of sodium ampicillin from dense and porous hydroxyapatite

Authors (e.g. E.M. Costa)

☒ A.C. Queiroz^{1,2}, S. Teixeira^{1,3}, J.D. Santos^{1,3}, F.J. Monteiro^{1,3}

Presenting author (First name in full; e.g. Eduard M. Costa)

Ana C. Queiroz

Title

Mrs

Affiliation of the authors (include names and addresses of the institutions)

☒ 1 INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, R do Campo Alegre, 823, 4150-180 Porto, Portugal; tel. +351 22 6074984; email: aqueiroz@ineb.up.pt

☒ 2 Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Ap 574, 4901 Viana do Castelo Codex, Portugal

☒ 3 Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, R Dr Roberto Frias, 4150 Porto, Portugal

Email for correspondence

☒ aqueiroz@ineb.up.pt

Preferred form of presentation (oral/poster)

☒ Oral

Is the presenting author a student? (Yes/No) (*)

☒ Yes

Does he/she want to be considered for the Best Oral and Best Poster awards? (Yes/No)

☒ Yes

Topics in which the work is suited best

(Refer to the list of topics and select a maximum of two)

¹

☒ Porous bioceramics

²

☒ Dental applications

(*) Please enclose a letter confirming your status, signed by your supervisor.

CONTROLLED RELEASE OF SODIUM AMPICILLIN FROM DENSE AND POROUS HYDROXYAPATITE

Introduction

Periodontitis is an oral disease that promotes, in its most severe form, maxillar bone loss. Current systemic approach leads to the use of very high dosages of antibiotics and anti-inflammatory drugs. This may induce drug resistance, and in the case of antibiotics, eventually occur locally in less than the minimum inhibitory concentration (MIC).

Polymer porous scaffolds have been widely used for soft tissue replacement and drug delivery.

By proposing the use of a porous hydroxyapatite (HA) scaffold the aim is not only to local deliver a specific drug, in this case sodium ampicillin, a wide spectrum antibiotic, but also, after delivery, to continue acting by inducing cell attachment, osseointegration and vascularisation, promoting rapid healing of the bone tissue after an efficient treatment of the periodontitis infection.

Materials and methods

Dense materials were obtained in disc shapes by uniaxially pressing at 180 MPa, followed by sintering at 1200 °C, and then milled and sieved until granules of 250-850 µm were obtained. Porous HA samples with approximately 5x5x5 mm were obtained by immersing a polyurethane (PU) sponge in a HA slurry at 50 °C. The slurry was obtained by mixing, at 50 °C, commercially pure HA (Plasma Biotol, P-120), water and a tensioactive agent at pre-established proportions. After immersion, the sponge was squeezed, for excess removal, and dried overnight. The PU sponge burned out method at 600 °C, followed by sintering at 1300 °C. Sintering temperature was 100 °C higher for porous materials, to increase mechanical strength.

Several HA(g):Water(ml):tensioactive agent (ml) ratios were tested, in order to obtain the porous HA. The best results were obtained with the 6:6:0.2 and 6:4:0.2 ratios. After being characterised in terms of chemistry and surface, samples were used for drug adsorption and release according to the following method. Both dense granules (D) and porous (P66) samples were put in contact with a 10 mg/mL sodium ampicillin solution for 24 hours, at 37 °C, with continuous agitation of 250 rpm. The amount of sodium ampicillin adsorbed was measured from the supernatant, using UV spectroscopy at 230 nm. Adsorption in a similar set of porous samples (VP66, VP64) was carried out in vacuum for 15 min. at controlled temperature of 37 °C, and then followed the same method as previously described, being agitated at 110 rpm, as air bubbles could be generated by a more vigorous agitation.

Released profiles were obtained using a flow through dissolution system.

Results and discussion

Previous work has shown considerable increase in actual surface area, due to the formation of the porous HA structure (figure 1).

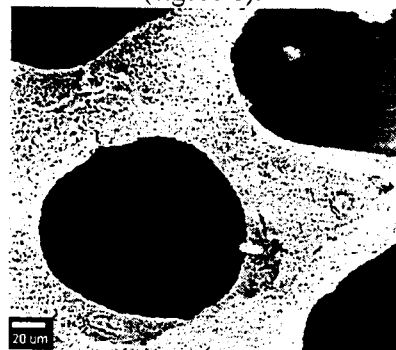


Fig. 1 – Porous 6:4:0.2 (HA:W:TA) structure. (SEM image).

The adsorption studies, have indicated that both granular and porous material could initially adsorb similar amounts of sodium ampicillin. This being a very strange result, due to the well known difference in surface area between these materials, indicated that ampicillin was not reaching the interior of the porous structure.

To overcome this problem, vacuum adsorption was tried for 15 minutes, prior to the standard adsorption procedure followed in previous experiments. The resulting adsorption proved to be very effective, specially in the case of HA sponge prepared with 6:6:0.2 ratio (figure 2).

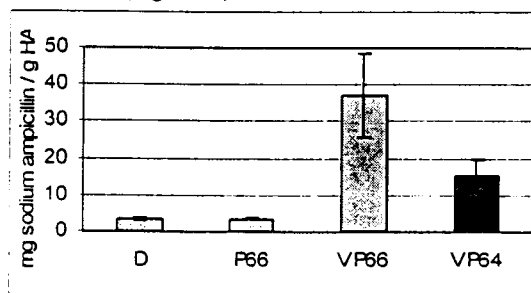


Fig. 2 – Sodium ampicillin adsorption onto dense HA granules (D); porous 6:6:0.2 (P66) and vacuum adsorption onto porous 6:6:0.2 (VP66) and 6:4:0.2 (VP64).

Sodium ampicillin release tests have been performed on granules [1], and comparisons are being carried out on porous materials (VP).

Conclusions

Porous HA showed to be able to adsorb larger amounts of antibiotic, than granules. Becoming a better candidate material to be used as a scaffold for drug delivery in the case of periodontitis.

References

- [1] AC Queiroz *et al.*, Biomaterials 22 (2001) p.1393



FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000090001



Mais Educação



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

Nome: Sandra Maria da Silva Teixeira

Curso: Eng. Metalúrgica e Materiais

Datas: 1/2/2003 a 6/30/2003

Tema: Interação entre materiais macroporosos de fosfato de cálcio e colagénio

Empresa: Instituto Nacional de Engenharia Biomédica

Concurso: 306/012-03 – PRODEP II – Medida 3/Ação 3.2 - Estágios