



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JOSÉ JOVANNY BERMÚDEZ SIERRA**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE BIOMATERIAIS E  
COMPÓSITOS HÍBRIDOS, DESENHADOS A PARTIR DE ESCAMA DE TILÁPIA  
DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*), COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA  
ENGENHARIA DE REPARAÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS**

**FORTALEZA**

**2020**

JOSÉ JOVANNY BERMÚDEZ SIERRA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE BIOMATERIAIS E  
COMPÓSITOS HÍBRIDOS, DESENHADOS A PARTIR DE ESCAMA DE TILÁPIA  
DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*), COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA  
ENGENHARIA DE REPARAÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS

Documento apresentado à Coordenação do Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia: Área de concentração em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dra. Maria Izabel Gallão

Co-orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B442c Bermúdez, José Jovanny Sierra.  
Caracterização físico-química e biológica de biomateriais e compósitos híbridos, desenhados a partir de escama de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*), com potencial aplicação na engenharia de reparação de tecidos ósseos / José Jovanny Sierra Bermúdez. – 2020.  
157 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2020.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Izabel Gallão.  
Coorientação: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.
1. Biomateriais. 2. Xenoenxertos. 3. Hidroxiapatita. 4. Colágeno. 5. Teste de Biocompatibilidade. I. Título.
-

JOSÉ JOVANNY BERMÚDEZ SIERRA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE BIOMATERIAIS E  
COMPÓSITOS HÍBRIDOS, DESENHADOS A PARTIR DE ESCAMA DE TILÁPIA  
DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*), COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA  
ENGENHARIA DE REPARAÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS

Documento apresentado à Coordenação do Curso de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia: Área de concentração em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 31/07/2020

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Izabel Galão (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro  
Universidade de Fortaleza (Unifor)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Goretti de Vascelos Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Edy Souza de Brito  
Embrapa

---

Prof. Dr. Fransico Samuel Rodrigues Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

**Dedico a Deus.**

**A minhas famílias: Bermudez Sierra e  
Abreu Silvério.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, bênção e proteção;

Aos meus pais, Rufino e Maria Azucena, e meus irmãos, Heidi e Alexander;

A minha esposa Renata Abreu Silvério e sogra Catarina Zoe Abreu Silvério por aceitar-me como parte de sua família e por seus apoios incondicionais;

À Organização de Estados Americanos – OEA e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras - GCUB, pela bolsa concedida; em associação com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES);

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela RENORBIO-UFC, à EMBRAPA e à UNIFOR, especialmente ao laboratório de desenvolvimento de Fármacos “F66” e ao Nucleo de Biologia Experimental “NUBEX” pelo apoio logístico para desenvolver a maior parte da pesquisa;

Aos meus orientadores Renato de Azevedo Moreira e Maria Izabel Gallão pela orientação, confiança e apoio durante todo o doutorado;

Aos professores e avaliadores de minha qualificação e defesa, Ana Cristina de Oliveira Monteiro, Maria Goretti de Vascelos Silva, Ângelo Roncalli de Alves Silva, Edy Souza de Brito, Francisco Samuel Rodrigues Carvalho e Eveline Turrati pela orientação, colaboração e incentivos acadêmicos oferecidos;

Aos professores da UFC: Bartolomeo de Souza, Pedro Ayala, Odair Pastor Ferreira, Socorro Bastos pelo apoio acadêmico, logístico e financeiro;

Aos empresarios André Siqueira e Júlio Ximenes quem forneceram o material biológico (escamas de Tilápia do Nilo) para o desenvolvimento da pesquisa.

A meus amigos e colegas do F66: Hyldecia, Larissa, Rogenio, Lene, Felipe Domingos, Rossueti, João, George, Nayanne, Rachel, Nydy, Caroline Viana, Fernanda, Hemerson, Monique, Julieth, Mateus e Erivan por sua grande contribuição técnico-científica para esta pesquisa;

A meus grandes amigos Pablo, Guillermo, Alexander, Victor, Mario, Gabriel, Fabio, Hortencia, Elielder, Rafael, Denise, Ana Maria, Aurelio, Eduardo, Camila e David, pela amizade e imensa contribuição nestas terras cearenses;

Aos meus amigos latino-americanos Marcelo, Santiago, Daniel "Compay", Victorinox, Edwin, Fermin, Mighay, Guillermo, Jose Francisco, Angelica e Ruben pelos conselhos, incentivo, paciência e agradável convívio ao longo desses quatro anos;

Aos amigos Brasileiros: Rafael, Francis Mauro, Wallace, Eilton, Juvencio, Wellington, Napoleão, Clayton, Lucas, Karine, Camila, Heber e Kleybson;

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e que não foram citadas, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Esta pesquisa propõe a utilização de novos biomateriais, com aplicações biomédicas, especialmente na área da engenharia de tecidos ósseos (reparo ou preenchimento). Nesta pesquisa, foram descritas diversas técnicas simples de extração de Hidroxiapatita (HapP) e Colágeno (Col), a partir da escama de Tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*), por meio da hidrólise química (ácida e básica) e precipitação salina respectivamente. Os biomateriais extraídos e purificados foram caracterizados, segundo suas propriedades físico-químicas, por técnicas de Infravermelho (FT-IR), Termogravimetria (TGA), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplada com Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (MEV-EDX), Espectrometria de Raios X (DRX), Espectrometria Raman (ER), Ressonância magnética Nuclear (RMN) e Eletroforeses (SDS-PAGE). Posteriormente, foram desenhados biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de HapP/Col, baseado no modelo de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) associado à Metodologia de Superfície Resposta (MSR), com caracterização dos parâmetros físicos (porosidade, intumescimento, PVA e MEV). Além disso, foram desenvolvidos dois tipos de análises de biocompatibilidade: 1) viabilidade celular “*in vitro*” dos biocompósitos HapP/Col em cultura de osteoblastos “OFCOL II” durante os períodos de 1, 3 e 7 dias, e 2) “*in vivo*” por inserção subcutânea em ratos Wistar dos biomateriais extraídos das escamas (HapP e Col). Nessa última, uma amostra de HapS sintética e dois tipos de compósito, HapP/Col e HapS/Col, foram desenhados e implantados no tecido conjuntivo e extraídos em três períodos (7, 15 e 30 dias), em cada data, as respostas teciduais foram aferidas, histomorfologicamente, por grau de inflamação, proliferação de fibroblastos e área de neovascularização em tecidos corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os resultados obtidos a partir das análises de caracterização, demonstram que há similaridade físico-química com diversas pesquisas relacionadas com biomateriais extraídos de fontes biológicas: a HapP apresentou característica de cerâmicas com estruturas nanométricas e porosas de tipo amorfo e o Col exibiu características de tipo I, com estrutura helicoidal de boa estabilidade térmica. Os resultados nas análises “*in vitro*” demonstram que os biocompósitos de melhor desempenho na bioatividade celular foram na faixa de concentração entre 60-75% de HapP e 25-40% de Col. Enquanto os resultados “*in vivo*”, em razão da semelhança de resposta inflamatória com o grupo controle,



demonstram que os biomateriais (HapP e Col) e o biocompósito mostraram uma acelerada recuperação tecidual, sendo biocompatíveis em maior grau em comparação com os grupos da HapS sintética (HapS/Col e HapS), destacando, assim uma necessidade de futuras pesquisas para explorar a ligação entre as atividades biológicas dos biomateriais sobre a neoformação óssea *"in vivo"*. Verifica-se que estes tipos de biomateriais e/ou biocompósitos derivados da escama de Tilápia são possivelmente adequados para serem utilizados em processos de Regeneração Óssea Guiada com função osteogênica, especificamente em formas xeno-híbridas de enxertos ósseos granulados ou em biocompósito polimérico.

**Palavra-chaves:** Biomateriais. Hidroxiapatita. Colágeno. Xenoenxertos. Testes de Biocompatibilidade.

## ABSTRACT

This work proposes the use of novel biomaterials, with potential biomedical applications, especially in the area of bone tissue engineering (repair or filling). In this research, several simple technique of Hydroxyapatite (HapP) and Collagen (Col) extraction, from the Nile Tilapia scale (*Oreochromis Niloticus*), using chemical hydrolysis (acid and basic) and saline precipitation respectively. The extracted and purified biomaterials, according to the physical-chemical properties were characterized by infrared (FT-IR), Thermogravimetry (TGA/DTG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Scanning Electronic Microscopy, (SEM-EDX) with Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, X-Ray Spectrometry (XRD), Raman Spectrometry (RS), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Electrophoresis (SDS-PAGE). Posteriorly, xeno-hybrid polymer biocomposites of HapP/Col were designed, based on Central Composite Rotational Delineation (CCRD) associated to the Response Surface Methodology (RSM), with characterization of physical parameters (porosity, swelling, PVA and SEM). furthermore, two types of biocompatibility analysis have been developed: 1) "*in vitro*" cell viability of "OFCOL II" osteoblasts-like co-culture on HapP/Col biocomposites during periods of 1, 3 and 7 days, and 2) "*in vivo*" by subcutaneous insertion in Wistar rats of extracted biomaterials from scales (HapP and Col). In the latter, a sample of synthetic HapS and two types of the HapP/Col and HapS/Col composites, were designed and implanted in the connective tissue, which were then extracted in three periods (7, 15 and 30 days), At each date, tissue responses were assessed histomorphometrically by degree of inflammation, proliferation of fibroblast and area of neovascularization in tissues stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). The results obtained from the characterization analyses, demonstrate that there is a physical-chemical similarity with several researches related to biomaterials extracted from biological sources: HapP presented characteristics of ceramics with nanometric and porous structures of amorphous type and exhibited characteristics of type I Collagen with helicoidal structure of good thermal stability. The "*in vitro*" results showed that the best performing biocomposites in cellular bioactivity were in the concentration range between 60-75% HapP and 25-40% Col. whereas the "*in vivo*" results, due to the similarity of inflammatory response with the control group, demonstrate that biomaterials (HapP and Col) and biocomposite presented an accelerated tissue recovery, being biocompatible to a greater extent

compared to group of synthetic HapS (HapS/Col and HapS), thus, highlighting a need for future research to explore the link between biological activities of biomaterials on "in vivo" bone neoformation. These types of biomaterials and/or biocomposites derived from the Nile Tilapia scale are likely to be suitable for use in Guided Bone Regeneration procedures with osteogenic function, specifically in xeno-hybrid forms of granulated bone grafts or polymeric biocomposites.

**Keywords:** Biomaterials. Hydroxyapatite. Collagen. Xenograft. Biocompatibility Test.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalina da Molécula de Hap.....	39
Figura 2 – Esquemas e imagens de diferentes tipos de distribuição das nanopartículas implicadas no desenho de compósitos.....	45
Figura 3 – Morfologia estrutural da escama da Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ).....	48
Figura 4 – Fluxo das operações unitarias para a preparação e tratamento do material biológico (escamas da Tilápia do Nilo).....	53
Figura 5 – Diagrama de Fluxo das operações unitarias na extração e purificação da HapP a partir das escamas em pó de Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ).....	54
Figura 6 – Diagrama de Fluxo das operações unitarias na extração de colágeno (Col) a partir das escamas não triturada da Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ).....	55
Figura 7 – Imagens dos biomateriais e blendas desenhadas a partir da escama de Tilápia, utilizadas nos ensaios de biocompatibilidade de dorso em ratos Wistar (A) e análises de propriedades físicas e de barreira como porosidade, intumescimento e permeabilidade ao vapor da água-PVA (B).....	57
Figura 8 – Diagrama de fluxo das operações unitarias no desenho dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos a partir dos biomateriais (HapP/Col) extraídos das escamas de Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ).....	60
Figura 9 – Distribuição dos campos de observação das imagens histológicas, dividida em 10 campos adjacentes ao material inserido escolhidas aleatoriamente, com aumento de 40x.....	65
Figura 10 – Ordenação dos campos (40x) de contagem e análises das células inflamatórias, fibroblastos e áreas de neovascularização, escolhidas aleatoriamente dentro da imagen histológica.....	65

Figura 11 – Espectro FT-IR da HapP extraída a partir da escama de Tilápia (Oreochromis Niloticus), indicando a identificação das sinais características (cm <sup>-1</sup> ) correspondentes aos grupos funcionais.....	72
Figura 12 – Comportamento térmico do TG/DTG da HapP extraída a partir da escama de Tilápia do Nilo.....	73
Figura 13 – Difractograma de raios X da HapP extraída a partir da escama de Tilápia do Nilo e o padrão de Hap JCPDS (00-009-0432). Indicando a localização das reflexões (2 ) (amorfos e cristalinos) da estrutura.....	74
Figura 14 – Espectro Raman da HapP extraída a partir da escama de Tilápia. Indicando as posições de banda, modo e grupo funcional na estrutura de característica amorfa.....	76
Figura 15 – Microfotografias morfológica da HapP extraída a partir das escama de Tilápia pela técnica de MEV. Indicando estruturas laminares microporosas amorfas (setas azuis), porosidade (setas vermelha) e aglomerações de partículas de HApP (círculos Vermelhos). Aumentos/barras de escala: a(1000x/100 µm), b(10.000x/10 µm), c e d(50.000x/2.0 µm).....	77
Figura 16 – Imagem e espectro das análises semiquantitativa de EDX da HapP extraída a partir da escama de Tilápia do Nilo. Indicando os conteúdos de minerais e a razão Ca/P.....	79
Figura 17 – Espectro FT-IR do Col extraído a partir da escama de Tilápia do Nilo. indicando a identificação dos sinais característicos (cm <sup>-1</sup> ) correspondentes a os grupos funcionais.....	81
Figura 18 – Distribuição das bandas pela técnica de electroforese SDS-PAGE em gel de poliacradamida 7,5% do padrão de proteínas de maior massa molecular e o Col extraído a partir das escamas de Tilápia do Nilo.....	82
Figura 19 – Microfotografias morfológica do Col extraído a partir das escamas de Tilápia do Nilo pela técnica de MEV. Indicando estruturas fibrosas e amorfas (quadros vermelhos), porosidade.	

	Aumentos/barras de escala: a(100x/1000 $\mu\text{m}$ ), b(1000x/100 $\mu\text{m}$ ), c e d(10.000x/10 $\mu\text{m}$ ).....	84
Figura 20	– Analise termogravimétrica (TG/DTG) dos Col extraída a partir das escamas de Tilápia do Nilo. Indicando dois estágios de perda de massa (DTG).....	85
Figura 21	– Termograma de DSC do Col extraído a partir das escamas de Tilápia do Nilo. Indicando as variações dos fluxos calóricos em função da temperatura: Entalpia de fusão (1), desnaturação da tripla helice (2) e degradação dos aminoácidos (3).....	87
Figura 22	– Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do Col extraídos a partir das escamas de Tilápia do Nilo, indicando a presença dos diferentes aminoácidos com os tempos de retenção representados em picos de detecção.TMS: tetrametilsilano.....	89
Figura 23	– Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN do Col extraído a partir das escamas de Tilápia do nilo, os picos representam os tempos de retenção dos aminoácidos que conformam a estrutura tridimensional da molécula de Col. PADR: Poli Adenosina Difosfato Ribose e GAG: Glicosaminoglicanos.....	91
Figura 24	– Superfícies respostas (a) e curva de contorno (b) na determinação da variável dependente da Porosidade (%); dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de diversas razões de HapP/Col em função da concentração de Col e HapP.....	94
Figura 25	– Superfícies respostas (a) e curva de contorno (b) na determinação da variável dependente de Intumescimento ou capacidade de absorção de água (%); dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de diversas razões de HapP/Col em função da concentração de Col e HapP.....	97
Figura 26	– Superfícies respostas (a) e curva de contorno (b) na determinação da variável dependente de Permeabilidade ao Vapor de Água-PVA ( $\text{g mm kpa}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ); dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de	

diversas razões de HapP/Col em função da concentração de Col e HapP..... 99

Figura 27 – Imagens estruturais dos cortes transversais em biocompósitos polimérico xeno-híbrido de HapP/Col por MEV. Indicando as características morfológicas de porosidade e rugosidade (setas e círculos). Aumento/barra de escala: 100x/1000 µm (Imagens: a,d,g e j); 1000x/100 µm (Imagens: b,e,h e k) 10.000x/10 µm (Imagens: c,f,i e l)..... 102

Figura 28 – Imagens dos cortes histológicos de 7 dias de tratamento. Controle (A-C), HapS (D-F), HapP (G-I), Col (J-L), HapS/Col (M-O) e HapP/Col (P-R). Aumento/barra de escala 1.5x/1000 µm (Imagens: A,D,G,J,M e P), 10x/100 µm (Imagens: B,E,H,K,N e Q) e 40x/20 µm (Imagens: C,F,I,L,O e R). Tecido granuloso (Tg), Neovascularização (Nv), Edema (Ed), Macrófagos (M), Linfócitos (L), Hemácias (He), Fibroblastos (Fb) e Músculo liso (MI). Coloração por H&E..... 104

Figura 29 – Imagens dos cortes histológicos com 15 dias de tratamento. Controle (A-C), HapS (D-F), HapP (G-I), Col (J-L), HapS/Col (M-O) e HapP/Col (P-R). Aumento/barra de escala 1.5x/1000 µm (Imagens: A,D,G,J,M e P), 10x/100 µm (Imagens: B,E,H,K,N e Q) e 40x/20 µm (Imagens: C,F,I,L,O e R). Tecido granuloso (Tg), Neovascularização (Nv), Edema (Ed), Macrófagos (M), Linfócitos (L), Hemácias (He), Fibroblastos (Fb), Fibrina (Fi) e Músculo liso (MI). Coloração por H&E..... 108

Figura 30 – Imagens dos cortes histológicos no período de 30 dias nos tratamentos: . Controle (A-C), HapS (D-F), HapP (G-I), Col (J-L), HapS/Col (M-O) e HapP/Col (P-R). Aumento/barra de escala 1.5x/1000 µm (Imagens: A,D,G,J,M e P), 10x/100 µm (Imagens: B,E,H,K,N e Q) e 40x/20 µm (Imagens: C,F,I,L,O e R). Tecido granuloso (Tg), Neovascularização (Nv), Edema (Ed), Macrófagos (M), células endoteliais (Ce), Linfócitos (L), Hemácias (He),

Fibroblastos (Fb), Fibrina (Fi) e Músculo liso (MI). Coloração por H&E.....	111
Figura 31 – Valores médios de células e status (score) da reação inflamatória (“1” Leve, “2” Moderado e “3” Severa) (OZBAS et al., 2003), presentes no tecido conjuntivo adjacente à superfície dos materiais implantados, durante os períodos experimentais de 7, 15 e 30 dias em campos de 40x. Os valores estão expressos em médias de erro padrão. As letras iguais não deferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	115
Figura 32 – Valores médios de recrutamento de fibroblastos nos tecidos adjacente à superfície dos materiais implantados durante os períodos experimentais de 7, 15 e 30 dias em campos de 40x. Os valores estão expressos em médias de erro padrão e as letras iguais não deferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	119
Figura 33 – Valores médios de área de neovascularização nos tecidos adjacente à superfície dos materiais implantados durante os períodos experimentais de 7, 15 e 30 dias em campos de 40x. Os valores estão expressos em médias de erro padrão e as letras iguais não deferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	122
Figura 34 – Viabilidade celular de osteoblastos “OFCOL II” em biocompósitos de diferentes concentrações de HapP/Col (97/3,0; 90/10; 70/30 e 50/50) durante três períodos de cultivo (1, 3 e 7 dias), usando o teste de Alamar Blue. Os valores estão expressos em médias de erro padrão e diferença estatística representada por *( $p < 0,05$ ) e **( $p < 0,01$ ) pelo teste de Tukey.....	125
Figura 35 – Microfotografias óticas (20x) sobre a distribuição celular dos osteoblastos (OFCOL II) com os biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de diferentes concentrações de HapP/Col, no teste de viabilidade nos sete (7) dias (barra de escala de 100 $\mu$ m).....	126



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais compostos de Fosfatos de Cálcio e suas propriedades....	37
Tabela 2 – Variáveis independentes e valores codificados e reais dos níveis utilizados no planejamento experimental fatorial $2^2$ .....	58
Tabela 3 – Planejamento experimental fatorial 2x2 com valores reais e codificados das variáveis independentes (HapP e Col) para cada ensaio.....	59
Tabela 4 – Resultados de rendimento e análises de proteína e cinzas das amostras de escama completa, HapP (escama em pó) e Col (escama não triturada), em base seca (g/100 g).....	69
Tabela 5 – Bandas do espectro de infravermelho (FT-IR) e tipos de vibrações da HapP extraída das escamas de Tilápia do Nilo.....	72
Tabela 6 – Bandas do espectro de Raman e tipos de vibrações estruturais da HapP extraída a partir das escamas de Tilápia do Nilo.....	75
Tabela 7 – Bandas do espectro de infravermelho (FT-IR) e tipos de vibrações do Col.....	80
Tabela 8 – Perdas de massa das curvas de TGA/DTG do Col extraídos a partir das escamas de Tilápia do Nilo.....	85
Tabela 9 – Identificação dos resíduos de aminoácidos no espectro $^1\text{H-RMN}$ nos Col extraídos a partir das escamas de Tilápia do Nilo.....	89
Tabela 10 – Parâmetros das análises de Porosidade (Poro; %), Intumescimento (Int; %) e Permeabilidade ao vapor de água (PVA; $\text{g mm kPa}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de HapP/Col extraídos a partir das escamas de Tilápia do Nilo.....	92
Tabela 11 – Coeficientes de regressão para análises de Porosidade, Intumescimento (INT) e Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	

dos tratamentos dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de diferentes concentrações de HapP/Col.....	93
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-TCP	Alfa fosfato Tricálcico
-TCP	Beta fosfato Tricálcico
ABIMO	Associação Brasileira de Insumos Medicos e Odontologicos
ACP	Fosfatos de cálcio Amorfos
BCRJ	Banco de Células de Rio de Janeiro
BCP	Fosfatos de cálcio Bifásicos
BMP	Proteína Óssea Morfogénetica
CaPO <sub>4</sub>	Fosfatos de cálcio
Ca/P	Razão cálcio/fosforo
Ce	Célula Endotelial
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CDHA	Hidroxiapatita Deficiente de cálcio
Cf	Cápsula Fibrosa
Cg	Célula Gigante
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Col	Colágeno
CI	Células Inflamatórias
CPs	Fosfatos de cálcio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DTG	Derivada da Termogravimetria
DRX	Difração de Raios X
EDX	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X
Ed	Edema
ER	Espectroscopia Raman
FA	Fluroapatita
FAO	Organização das nações unidas para alimentação
Fb	Fibroblastos
FT-IR	Espectrofotometria de Infravermelho com transformada de Fourier
Hap	Hidroxiapatita

HapP	Hidroxiapatita extraída de escama de Tilápia do Nilo
HapP/Col	Biocompósito de HapP e Col de escama de Tilápia do Nilo
HapS	Hidroxiapatita Sintética
HapS/Col	Compósito de HapS e Col
H&E	Hematoxilina e Eosina
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
ISSO	Organização internacional de Normalização
L	Linfócitos
Nv	Neovascularização
ND	Não Detectado
M	Macrófagos
MEC	Matriz Extra Celular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MI	Músculo liso
MSR	Metodologia Superfície Resposta
ONU	Organização das Nações Unidas
OAP	Oxiapatitas
OCP	Fosfato Octacálcico
PADR	Poli Adenosina Difosfato Ribose
PBS	Buffer de Fosfato
PVA	Permeabilidade ao Vapor de Água
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico
SMAD	<i>Mothers Against Decantaplegic Protein</i>
TA	Tampão Amostra
Tc	Tecido conjuntivo
Tg	Tecido granuloso
TGA	Termogravimetria
TTCP	Fosfatos Tetracálcicos
-TNF	Fator de Necroses Tumoral Alfa

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
3.1	Biomateriais.....	33
3.1.1	<i>Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio.....</i>	33
3.1.2	<i>Hidroxiapatita (Hap).....</i>	38
3.1.3	<i>Colágeno (Col).....</i>	41
3.2	Biocompósitos Poliméricos Híbridos.....	43
3.2.1	<i>Técnicas de Fabricação e Classificação dos Biocompósitos.....</i>	44
3.2.1.1	<i>Biocompósitos particulados.....</i>	44
3.2.1.2	<i>Biocompósitos de partículas fibrosas.....</i>	44
3.2.1.3	<i>Biocompósitos reforçados em camadas.....</i>	45
3.2.2	<i>Papel Biológico dos Compósitos na Engenharia de Tecidos.....</i>	46
3.3	Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ).....	47
3.4	Teste de Biocompatibilidade.....	48
4	OBJETIVOS.....	52
4.1	Geral.....	52
4.2	Específicos.....	52
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
5.1	Sínteses de Hidroxiapatita Sintética (HapS).....	53
5.2	Preparação do material biológico (escamas de Tilápia do Nilo).....	53
5.3	Extração e purificação da Hidroxiapatita (HapP) no material biológico.....	54
5.4	Extração do colágeno (Col).....	54
5.5	Caracterização Físico-Química dos Biomateriais (HapP e Col) Extraídos das Escamas de Tilápia ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ).....	55
5.5.1	<i>Espectrometria Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....</i>	55
5.5.2	<i>Termogravimetria (TGA e DTG).....</i>	55
5.5.3	<i>Difração de raios-X (DRX).....</i>	56
5.5.4	<i>Espectroscopia Raman (ER).....</i>	56

5.5.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDX)</i> .....	56
5.5.6	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H e 13C)</i> .....	57
5.5.7	<i>Análises de Distribuição de Massa Molar (SDS-PAGE)</i> .....	57
5.6	Desenho das pastilhas dos biomateriais (HapS, HapP e Col) e as blendas de (HapS/Col e HapP/Col).....	57
5.7	Delineamento Experimental das análises físicas dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos (HapP/Col).....	58
5.7.1	<i>Desenho do biocompósito polimérico xeno-híbrido (HapP/Col)</i> .....	59
5.7.2	<i>Porosidade</i> .....	60
5.7.3	<i>Grau de intumescimento</i> .....	61
5.7.4	<i>Permeabilidade ao Vapor d'Água (PVA)</i> .....	61
5.8	Ensaio de Biocompatibilidade dos Biomateriais e Blendas: Análises “in vivo” .....	62
5.8.1	<i>Análises Histomorfométrica</i> .....	64
5.9	Cultura Celular.....	66
5.9.1	<i>Viabilidade e morfologia celular sobre os biocompósitos poliméricos xeno-híbridos (HapP/Col) por 1, 3 e 7 dias</i> .....	66
5.10	<i>Análises Estatísticas</i> .....	67
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
6.1	Rendimentos e caracterização (% proteína e cinzas) da HapP e Col extraídos de escama da Tilápia do Nilo.....	68
6.2	Caracterização Físico-Química da Hidroxiapatita (HapP).....	71
6.2.1	<i>Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier</i> .....	71
6.2.2	<i>Análises de Termogravimetria (TGA-DTG)</i> .....	72
6.2.3	<i>Difração de raios X (DRX)</i> .....	73
6.2.4	<i>Espectroscopia Raman (ER)</i> .....	74
6.2.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX)</i> .....	76
6.3	Caracterização Físico-Química do Colágeno (Col).....	79
6.3.1	<i>Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)</i> .....	79
6.3.2	<i>Análises de Distribuição de Massa Molar (SDS-PAGE)</i> .....	81
6.3.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	83

6.3.4	<b>Termogravimetria TGA/DTG.....</b>	84
6.3.5	<b>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....</b>	86
6.3.6	<b>Ressonância Magnética Nuclear RMN (1H e 13C).....</b>	88
6.3.6.1	<i><sup>1</sup>H-RMN.....</i>	88
6.3.6.2	<i><sup>13</sup>C-RMN.....</i>	90
6.4	<b>Metodologia de Superfície Resposta (MSR) do Delineamento Experimental (DCCR).....</b>	91
6.4.1	<b>Porosidade.....</b>	92
6.4.2	<b>Intumescimento.....</b>	95
6.4.3	<b>Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....</b>	97
6.4.4	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	99
6.5	<b>Análises de Biocompatibilidade. Análises “In Vivo”.....</b>	103
6.5.1	<b>Análises histológica descritiva tecidual.....</b>	103
6.5.1.1	<i>Período de Sete (7) dias.....</i>	103
6.5.1.2	<i>Período de Quinze (15) dias.....</i>	106
6.5.2	<b>Análises Quantitativas Estatísticas.....</b>	112
6.5.2.1	<i>Células Inflamatórias (CI).....</i>	112
6.5.2.2	<i>Proliferação de Fibroblastos (Fb).....</i>	116
6.5.2.3	<i>Área de Neovascularização (Nv).....</i>	119
6.6	<b>Teste de viabilidade celular “in vitro” dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de HapP/Col.....</b>	123
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	127
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	128
	<b>ANEXO A – Análises de variância (ANOVA) do modelo para o parâmetro da porosidade dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de HapP/Col.....</b>	155
	<b>Anexo B – Análises de variância (ANOVA) do modelo para o parâmetro de intumescimento dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de HapP/Col.....</b>	155
	<b>Anexo C – Análises de variância (ANOVA) do modelo para o parâmetro de PVA dos biocompósitos poliméricos xeno-híbridos de HapP/Col.....</b>	155

<b>Anexo D – Análises de variância (ANOVA) do modelo para o parâmetro de células inflamatórias no teste “<i>in vivo</i>”</b> .....	155
<b>Anexo E – Análises de variância (ANOVA) do modelo para o parâmetro de proliferação de fibroblastos no teste “<i>in vivo</i>”</b> .....	156
<b>Anexo F – Análises de variância (ANOVA) do modelo para o parâmetro de neovascularização no teste “<i>in vivo</i>”</b> .....	156
<b>Anexo G – Análises de variância (ANOVA) do modelo para o parâmetro de viabilidade celular (%) “<i>in vitro</i>” com osteoblastos “<i>OFCOL II</i>”</b> .....	156
<b>Anexo H – Parecer da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA-UNIFOR)</b> .....	157