

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
MATERIAIS E METALURGIA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS

HIDROXIAPATITA/BORRACHA NATURAL POR PRECIPITAÇÃO

QUÍMICA *IN SITU*

Teo Atz Dick

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
MATERIAIS E METALURGIA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS
HIDROXIAPATITA/BORRACHA NATURAL POR PRECIPITAÇÃO
QUÍMICA *IN SITU***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais.

Mestrando: Eng. Teo Atz Dick

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos

Porto Alegre

2016

À minha avó, Yeda Pinheiro Dick, pela vida dedicada à química e pelo desejo de ter presenciado este momento.

Agradecimentos

Aos meus pais, pela ajuda em casa e na universidade. Nesta dissertação tive ajuda intelectual e experimental de ambos.

À minha namorada, por ser a pessoa com quem posso sempre contar, não importa qual seja a situação.

Aos colegas do LABIOMAT, pelas conversas, discussões, e brincadeiras.

À Micheli do LAPOL, por ceder a centrífuga nas várias vezes que precisei.

À Professora Marly Maldaner Jacobi, por tirar várias dúvidas a respeito da borracha natural.

Por fim, ao meu orientador Luis Alberto dos Santos e à professora Vânia Caldas de Souza, pelo apoio e por fazer do LABIOMAT ótimo lugar de se trabalhar.

Índice

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xiv
1 Introdução	1
2 Objetivos	4
3 Revisão Bibliográfica	5
3.1 Fosfatos de Cálcio.....	5
3.1.1 Osteocondução e Osteoindução.....	5
3.1.2 Fosfato Tricálcico.....	7
3.1.3 Fosfato de Cálcio Amorfo.....	7
3.1.4 Hidroxiapatita.....	8
3.1.5 Biomineralização em processo Biológicos como Inspiração para Novos Materiais à Base de Hidroxiapatita.....	11
3.2 Borracha Natural.....	16
3.2.1 Histórico.....	16
3.2.2 Composição do Látex da Hevea Brasiliensis.....	17
3.2.3 Interações entre Partículas e Macromoléculas na Borracha Natural – <i>Bound Rubber Phenomenom</i>	20
3.2.4 Aplicação da Borracha Natural como Biomaterial.....	22
3.2.5 Uso da Borracha Natural em Conjunto com Fosfatos de Cálcio.....	25
4 Materiais e Métodos	28
4.1 Purificação da Borracha Natural.....	28
4.2 Preparação dos compósitos Hidroxiapatita/Borracha natural.....	28
4.3 separação das partículas de Hidroxiapatita da Matriz Polimérica.....	31

4.4	Obtenção do Teor de HA no Material Compósito.....	32
4.5	Análise de Fases.....	32
4.6	Análise do Tamanho de Cristalito.....	33
4.7	Análise de FT-IR.....	33
4.8	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33
4.9	Caracterização Mecânica.....	34
5	Resultados e Discussão.....	35
5.1	Reação de Síntese.....	35
5.2	Análise de Fases por Difração de Raios X.....	38
5.3	Análise FTIR.....	43
5.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
5.5	Análise Termogravimétrica.....	53
5.6	Caracterização Mecânica.....	55
6	Conclusões.....	58
7	Anexo: Scaffolds Hidroxiapatita/Poli(lactídeo-co glicolídeo/Borracha Natural por Inversão de Fase.....	60
7.1	Introdução.....	60
7.2	Materiais e métodos.....	61
7.2.1	Preparação dos <i>Scaffolds</i> Hidroxiapatita/Borracha Natural/Poli(lactídeo-co-glicolídeo).....	61
7.2.2	Análise FTIR.....	63
7.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
7.3	Resultados.....	64
7.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	64
7.3.2	Caracterização FTIR.....	69
7.4	Conclusões.....	70
8	Sugestões para Futuros Trabalhos.....	72
9	Referências Bibliográficas.....	73

Resumo

O crescente número de pacientes apresentando perda óssea gera um aumento na demanda pelo desenvolvimento de novos substitutos ósseos. Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e polímeros naturais utilizados na forma de material compósito são uma alternativa promissora aos tradicionais enxertos ósseos. No entanto, o sucesso destes materiais em aplicações médicas depende da boa interação entre a fase orgânica e inorgânica, nem sempre uma tarefa fácil. Neste trabalho foi desenvolvida uma nova estratégia de síntese de compósitos hidroxiapatita/borracha natural para aplicações médicas com boa dispersão e controle das fases produzidas. Para isso, foi realizada uma reação de precipitação *in situ* em que as cadeias poliméricas da borracha funcionaram como *template* para mineralização. A hidroxiapatita (HA) foi sintetizada a partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e H_3PO_4 com uma razão Ca/P de 1,67 em tetraidrofurano (THF) na presença de borracha natural (NR) solubilizada. Os compósitos foram preparados contendo até 27,9 % em massa de HA e apresentando partículas nanodispersas na matriz polimérica. A técnica de precipitação desenvolvida permitiu a obtenção de HA nanocristalina com alto grau de pureza e controle do tamanho de cristalito e da fase produzida. Os compósitos apresentaram melhores propriedades mecânicas do que a NR pura para todas as concentrações de HA e houve perda de solubilidade dos compósitos produzidos em bons solventes, indicando a presença de borracha ligada à HA. Conforme proposto, a borracha natural possui uma proteína e um lipídio como grupos terminais portando cargas negativas que atuam como sítios de nucleação para a HA, melhorando a dispersão e controle do tamanho de cristalito.

Abstract

The growing number of patients with bone loss generates an increase in demand for the development of new bone substitutes. Hydroxyapatite and natural polymers used in the form of composite materials are a promising alternative to the traditional bone grafts. However, the success of these materials in medical applications depends on good interaction between the organic and inorganic phase. In this work we developed a new strategy for the synthesis of hydroxyapatite/natural rubber composites for biomedical applications with good dispersion and phase control. To achieve this goal, an in-situ chemical precipitation method in which the polymer chains act as mineralization template was performed. The starting materials used for synthesizing hydroxyapatite (HA) were $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and H_3PO_4 with a Ca/P ratio of 1.67 in tetrahydrofuran (THF) in the presence of solubilized natural rubber (NR). The composites were prepared containing up to 27.9 wt.% HA presenting nanodisperse particles in the polymer matrix. The developed precipitation technique produced nanocrystalline HA with high purity and crystallite size and phase control. The composites presented better mechanical properties than NR alone with loss of solubility, indicating bound rubber to the HA phase. As proposed, natural rubber has a protein and a lipid as terminal groups carrying negative charges, which act as nucleation sites for HA, improving dispersion and control over crystallite size.

Lista de Figuras

Fig. 1. Exemplos de osteoindução e osteocondução: (a) ligação entre tecido ósseo e implante de FC bifásico, e (b) indução de formação de tecido ósseo em músculo de cachorro por implante poroso de FC bifásico após 3 meses (YUAN & GROOT, 2005).

Fig. 2. Níveis hierárquicos no esqueleto da esponja *Euplectella* (NUDELMAN & SOMMERDIJK, 2012)

Fig. 3.: Níveis hierárquicos do osso secundário como descritos por Weiner e Wagner (WEINER & WAGNER, 1998).

Fig. 4. Imagens de MEV das amostras de HA sintetizadas na presença de PVA: (a) sem presença de polímero, (b) na presença de polímero com massa molecular de 22.000, (c) na presença de polímero com massa molecular de 88.000 , e (d) na presença de polímero com massa molecular de 145.000 (MOLLAZADEH et al., 2007).

Fig. 5. Diferentes frações do látex separáveis por centrifugação (FERREIRA et al., 2009).

Fig.6. (a) Estrutura proposta da macromolécula de PI na NR, ligada covalentemente à uma proteína e um lipídio, e (b) mecanismo por trás do aumento de percentual de gel no látex. Elaborado a partir de figuras contidas em (SAKDAIPANICH e ROJRUTHAI, 2012).

Fig. 7. Desenho esquemático representando: (a) interação simples, (b) interação dupla, e (c) interação entre duas partículas (adaptado de WOLF et al., 1993).

Fig. 8. Procedimento de regeneração óssea guiada. (a) Identificação do defeito. (b) Defeito é exposto e córtex ósseo é perfurado. (c) Membrana é colocada conforme o

contorno desejado do osso. (d) Após regeneração o osso apresenta contorno desejado (TAL et al., 2012).

Fig. 9. Dispositivo de expansão craniana constituído pela blenda NR/PLGA: Osteotomia à esquerda, mola colocada ao centro e retirada à direita (FALLER et al., 2015).

Fig. 10. (a) FCs como sintetizados e (b) dispersos em NR (NASCIMENTO et al., 2014).

Fig. 11. Fluxograma contendo as etapas da produção dos compósitos HA/NR

Fig. 12. I - Mecanismo de precipitação proposto, e II – efeito na dispersão em THF.

Fig. 13. Filme de NR purificada (esquerda) e compósito contendo 30% HA (direita).

Fig 14. Padrões de DRX dos compósitos contendo 10%, 20% e 30% HA.

Fig. 15. Padrão de DRX do padrão de silício, utilizado para calcular o alargamento instrumental (β_{ins})

Fig. 16. Padrões de DRX das amostras de HA usados para cálculo de tamanho de cristalito pela Lei de Scherrer: (a) Sintetizada na presença de NR e (b) apenas THF

Fig. 17. Espectros de (a) HA sintetizada na presença de NR, (b) NR e (c) compósito 30% HA.

Fig. 18. Imagens de MEV por elétrons retroespalhados dos compósitos contendo (a) 10% HA, (b) 20% HA e (c) 30% HA. Aumento = 5.000 X

Fig. 19. Imagens de MEV por elétrons secundários dos compósitos contendo (a) 10% HA, (b) 20% HA e (c) 30% HA. Aumento = 50.000 X

Fig. 20. Imagens de MEV por elétrons secundários das partículas de HA separadas do compósito contendo 30% HA: (a) região dispersa sobre substrato de silício(aumento de 100.000x); (b) e (c) regiões contendo blocos de partículas aparentam remoção incompleta de polímero (aumentos de 300.000x e 500.000x, respectivamente).

Fig. 21. Imagens de MEV por elétrons secundários das partículas de HA sintetizadas em THF: (a) aumento de 200.000x ; (b) aumento de 300.000x; (c) aumento de 400.000x.

Fig 22. Curva TGA/DTGA da amostra 30% HA

Fig. 23. O rendimento experimental e o calculado para a reação de síntese da HA (n=3).

Fig. 24. Curvas Tensão x Deformação para a NR e o compósito contendo 30% HA.

Fig. 25. Variação do módulo de elasticidade a 5% de deformação com o percentual teórico de HA.

Fig. 26. Fluxograma contendo as etapas de preparação do compósito HA/NR/PLGA.

Fig. 27. Separação entre PLGA e NR no filme obtido por evaporação do THF durante a noite.

Fig. 28. Compósito contendo 10% HA : (a)Visão geral (b) detalhe de fibras e poros em menor aumento e (c) maior aumento (imagem por elétrons secundários).

Fig. 29. Regiões do *scaffold* apresentando separação de fase

Fig. 30. Região do *scaffold* contendo separação de fases (a) analisada por mapeamento EDS de Ca (b), P(c) e O (d). Tamanho da barra de escala = 300 μm .

Fig.31. Espectros de IR (a) da blenda NR/PLGA e (b) do compósito contendo 10% HA.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Volumes das soluções utilizadas e massa total de HA produzida em cada compósito.

Tabela 2: Tabela 2: Resultados de tamanho de cristalito obtidos pela Lei de Scherrer.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

DMA	Análise dinâmico-mecânica
DRX	Espectroscopia por difração de raios x
DTGA	Derivada pelo tempo da curva de TGA
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier
FC	Fosfato de cálcio
FCA	Fosfato de cálcio amorfo
HA	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NR	Borracha natural
PI	Poli(<i>cis</i> -1,4-isopreno)
PLGA	Poli(lactídeo- <i>co</i> -glicolídeo)
PVA	Álcool polivinílico
SBF	<i>Simulated body fluid</i>
THF	Tetraidrofurano
TGA	Análise termogravimétrica
β -TCP	Fosfato tricálcico β
α -TCP	Fosfato tricálcico α
β_{obs}	Alargamento de pico observado total
β_{tam}	Alargamento de pico devido ao tamanho de cristalito
β_{inst}	Alargamento de pico devido ao instrumento
λ	Comprimento de onda

1 Introdução

A crescente quantidade de pacientes que apresentam perda óssea, seja por trauma ou doenças, gera uma demanda na mesma proporção pelo desenvolvimento de substitutos ósseos. A técnica padrão de substituição óssea consiste em utilizar enxertos ósseos alógenos (do próprio paciente) ou exógenos (obtido de cadáveres). No entanto, ambos os procedimentos causam risco à vida do paciente: enxertos alógenos exigem cirurgias adicionais e remoção de material ósseo de áreas saudáveis, enquanto enxertos exógenos apresentam risco de contaminação e rejeição (BOSE et al., 2012). Além disso, o risco do processo e o longo tempo de recuperação tornam o processo caro e traumático para o paciente. É preciso, portanto, investir na pesquisa de substitutos ósseos sintéticos que permitam que o tecido ósseo perdido seja regenerado de forma satisfatória sem riscos ao paciente.

Todas as classes de materiais já foram usados como substitutos ósseos: metais tendem a ser biologicamente inertes, enquanto cerâmicas e polímeros podem ser inertes ou bioativos (HOFFMAN et al., 2013). Embora metais apresentem altas resistências mecânica eles não interagem com o corpo, o que não é satisfatório do ponto de vista da engenharia de tecidos. O substituto ósseo ideal deve, além de possuir propriedades mecânicas satisfatórias, interagir quimicamente com o tecido ósseo, proporcionando a regeneração do tecido sem gerar uma reação adversa do organismo. Neste sentido, a aplicação de cerâmicas de fosfato de cálcio (FC) em conjunto com polímeros tem se tornado o foco de muitos estudos visando a substituição de tecido ósseo (BOSE et al., 2012 ; SUPOVÁ et al., 2009).

As cerâmicas de fosfato de cálcio são materiais bioativos, podendo ser encontrados em diferentes fases cristalinas dependendo de sua proporção Ca/P das condições da reação em que são produzidos (YUAN & GROOT, 2005). Dentre estes materiais, o mais popular em aplicações ósseas tem sido a hidroxiapatita

(HA), devido ao fato de ser o fosfato de cálcio com a maior similaridade química com a parte inorgânica dos ossos humanos e o mais estável quimicamente no ambiente do corpo (YUAN et al., 1998). No entanto, a HA é um material extremamente frágil e muito raramente a sua aplicação permite que ela seja utilizada sozinha. Polímeros, por outro lado, são muito menos frágeis, embora não possuam o mesmo grau de interação com o tecido ósseo. Aparentemente uma maneira de contornar este problema é a utilização de HA e polímeros em conjunto na forma de compósitos, aliando as características de bioatividade da HA em conjunto com as propriedades mecânicas dos polímeros (VENKATESAN & KIM, 2014).

A borracha natural (NR) é um polímero natural obtido a partir do látex da planta *Hevea brasiliensis*, de largo uso industrial e extrema importância cotidiana. Sua composição consiste principalmente em poli(cis-1,4-isopreno) e componentes não isoprenos em menor quantidade, como proteínas, lipídios e carboidratos (SANSATSADEEKUL et al., 2011). Alguns destes compostos não isoprenos possuem propriedades regenerativas, dando à borracha natural o caráter de material bioativo (ERENO et al., 2010 ; MENDONÇA et al., 2010 ; BALABANIAN et al., 2006). A NR é capaz de atuar na regeneração de diversos tipos de tecido, o que tem despertado o interesse de pesquisadores nas novas aplicações deste material no ramo dos biomateriais. Recentemente houveram tentativas de aplicação da NR em conjunto com cerâmicas de fosfato de cálcio para aplicações ósseas. Foram produzidas membranas contendo fosfatos de cálcio dispersos (NASCIMENTO et al., 2014) e precipitados em sua superfície (BORGES et al., 2015), no entanto nenhum dos métodos apresentado foi capaz de gerar controle sobre a fase de FC formada, tamanho de partícula, boa dispersão da fase de FC na NR e incorporação de altas quantidades FC.

A NR apresenta uma proteína e um fosfolipídio como grupos terminais de sua cadeia polimérica de poli(cis-1,4-isopreno), e é conhecido que tanto proteínas quanto fosfolipídios desempenham papel fundamental na biomineralização em organismos vivos e *in vitro* (OLSZTA et al, 2007 ; S. WEINER & WAGNER, 1998 ; COLLIER & MESSERSMITH, 2001). Portanto, é plausível afirmar que a síntese *in*

situ da HA seja influenciada pela macromolécula híbrida da NR caso esta esteja em solução no momento da precipitação. Tal controle sobre a microestrutura da HA pode ser vantajoso em ditar uma melhor resposta osteogênica. A produção destes compósitos, no entanto, exige a escolha de um solvente que seja comum à NR e aos reagentes envolvidos em sua síntese.

Existem diversas maneiras de se sintetizar a HA descritas na literatura. Dentre elas, os métodos aquosos à baixa temperatura são vantajosos pois inibem o crescimento de grão, normalmente levando à partículas nanométricas (SADAT-SHOJAI et al., 2013). No entanto, a escolha de um método *in situ* em NR restringe o número de possibilidades devido à necessidade de baixa temperatura e a insolubilidade dos reagentes precursores na maioria dos solventes orgânicos, exigindo-se a necessidade da adaptação de rotas de síntese existentes. Neste trabalho, uma reação de síntese de HA à temperatura ambiente na presença de NR foi desenvolvida com o objetivo de se aproveitar o potencial dos grupos terminais da NR em atuar como sítios de nucleação para HA. Para tal, tetraidrofurano (THF) foi escolhido como solvente e uma reação de síntese de HA tradicional foi adaptada. Acredita-se que as proteínas e lipídios presentes na composição da NR possam desempenhar papel fundamental na dispersão e controle da microestrutura da HA ao atuarem como sítios de nucleação.

2 Objetivos

O objetivo do trabalho apresentado nesta dissertação foi o estudo da síntese *in situ* de hidroxiapatita em solução de borracha natural para obtenção de compósitos HA/NR.

Justificativa

O sucesso de um material em aplicações biomédicas exige previsibilidade nas características do material produzido, exigindo a elaboração de um método de produção com alto controle sobre seus parâmetros. Infelizmente, este tipo de controle ainda não foi descrito na produção de materiais compósitos HA/NR, deixando uma lacuna científica que este trabalho se propõe a preencher.

Para alcançar o objetivo proposto foi elaborado um método de síntese da HA na presença da borracha natural solubilizada, através de uma reação de precipitação por via úmida não aquosa, escolhendo tetraidrofurano (THF) como solvente. A literatura recente foi consultada na tentativa de se obter informações a respeito dos parâmetros que influenciam o produto da síntese da HA e sua dispersão em matrizes poliméricas, utilizando conhecimentos de química orgânica e inorgânica para gerar uma estratégia de síntese específica para o caso da borracha natural, tomando proveito da característica híbrida de sua cadeia polimérica.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Fosfatos de Cálcio

3.1.1 Osteocondução e Osteoindução

Fosfatos de cálcio (FCs) são uma classe de materiais bioativos que tem sido largamente utilizados em aplicações ósseas devido às similaridades químicas com a parte mineral dos ossos. Essas similaridades químicas dão a estes materiais propriedades únicas, conhecidas como osteocondução e osteoindução (BARRÉRE et al., 2006):

-Osteocondução: A osteocondução se refere à capacidade de formar tecido ósseo na superfície do material de forma guiada, resultando numa ligação entre osso e implante. Na prática, a ausência de outros tecidos entre o osso formado e o biomaterial é usada para identificar a osteocondutividade de um material. Este crescimento ósseo acontece de forma passiva, necessitando do contato com tecido ósseo para que este seja “conduzido”(HENCH, 1980 ; HENCH & WILSON, 1984 ; BARRÉRE et al., 2006) (Fig 1(a)).

-Osteoindução: A osteoindução se refere a capacidade de além de se ligar ao tecido ósseo e suportar seu crescimento, induzir um estímulo positivo na formação de tecido ósseo. Neste fenômeno, primeiro ocorre a diferenciação de células não osteogênicas em células osteogênicas, e posteriormente a formação de tecido ósseo. Se um material é capaz de induzir a formação de tecido ósseo quando implantado em locais que apresentam outros tipos de tecido, ele pode ser considerado ósteoindutor (RIPAMONTI, 1991 ; YUAN et al., 1998 ; BARRÉRE et al., 2006:)(Fig. 1(b)).

Nem todos os tipos de FCs têm o mesmo efeito biológico *in vivo*, enquanto a maioria é osteocondutora, nem todos são osteoindutores (BARRÉRE et al., 2006). Essas diferenças na indução da resposta celular são causadas por diferentes características químicas e físicas. Por exemplo, propriedades químicas da superfície destes fosfatos de cálcio podem influenciar fenômenos biológicos como adsorção de proteínas (SCHMIDT et al., 2009).

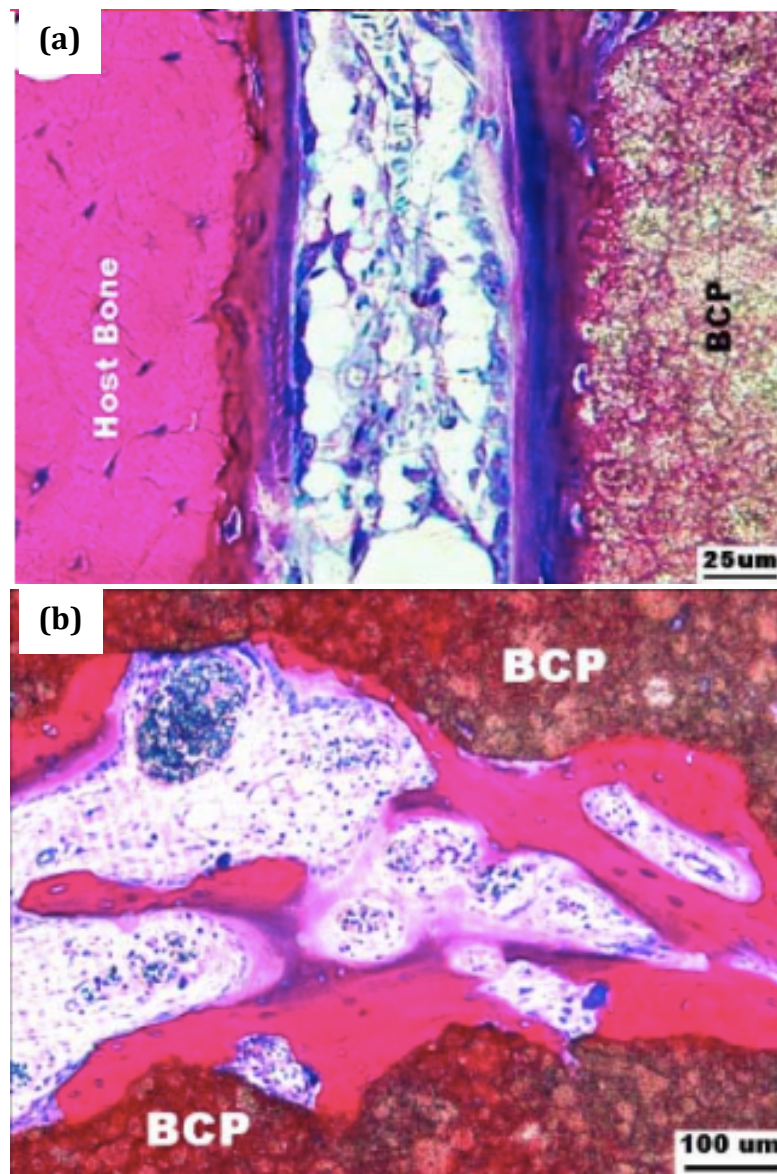


Fig. 1. Exemplos de osteoindução e osteocondução: (a) ligação entre tecido ósseo e implante de FC bifásico, e (b) indução de formação de tecido ósseo em músculo de cachorro por implante poroso de FC bifásico após 3 meses (YUAN & GROOT, 2005).

A adsorção de proteínas, por sua vez, influencia a resposta do organismo, uma vez que as proteínas na superfície do material regem a resposta das células, podendo induzir diferenciação celular devido à interação com a matriz extracelular. Da mesma forma, a rugosidade superficial também pode influenciar a diferenciação devido à adesão celular, o que também é consequência da adsorção de proteínas, uma vez que uma maior rugosidade gera uma maior concentração de proteínas devido à maior área específica (WANG et al., 2012 ; SCHMIDT et al., 2009).

3.1.2 Fosfato Tricálcico

Existem duas fases cristalinas principais de fosfato tricálcico (*tricalcium phosphate, TCP*): α -TCP e β -TCP. O α -TCP cristaliza na forma monoclínica e o β -TCP na forma romboédrica. Embora possuam composição química similar, com razão Ca/P de 1,5 (BARRÉRE et al., 2006), suas diferentes formas cristalinas proporcionam diferentes propriedades de reabsorção: o α -TCP ($K_{ps} = 10^{-25,5}$) é mais solúvel que o β -TCP ($K_{ps} = 10^{-28,9}$), e é obtido após o aquecimento do β -TCP acima de 1170°C (FERNANDEZ et al., 1999). O β -TCP é considerado osteocondutor e osteoindutor, e devido à sua baixa energia superficial com respeito à HA ele pode provocar a precipitação de uma camada de HA quando incubado em *SBF* (*Simulated Body Fluid*) (BOHNER & JACQUES, 2009). O β -TCP é usado clinicamente como substituto ósseo em pequenos defeitos na forma de pasta cimentícia, podendo ser também utilizado na liberação de drogas que auxiliariam o processo de regeneração óssea (GINEBRA et al., 2006)

3.1.3 Fosfato de Cálcio Amorfo

Os fosfatos de cálcio amorfos (FCAs) são uma família de FCs caracterizadas por uma ausência de ordem a longa distância (TER BRUGGE et al., 2006). Eles podem ser produzidos pela rápida precipitação de íons Ca e P a partir de soluções aquosas, sendo considerados uma fase metaestável, primeira a precipitar a partir de íons cálcio e fosfato. FCAs tipicamente exibem uma larga faixa de valores de proporção Ca/P (usualmente entre 1,15 e 1,67) dependendo das condições de

síntese, como pH e razão inicial dos íons em solução (ZHAO et al., 2008). A sua natureza amorfa, baixa razão Ca/P e alta concentração de substitutos iônicos (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , CO_3^{2-}) conferem um alto grau de solubilidade aos FCAs: valores de K_{ps} de $10^{-24,8}$ para FCAs possuindo uma razão Ca/P de 1,5, e $10^{-23,9}$ para FCAs que incorporam pequenas quantidades de carbonato (COMBES & REY, 2010). Em ambientes aquosos os FCAs liberam íons que reprecipitam em uma forma mais estável, como HA com baixa cristalinidade. Acredita-se que esses íons liberados em solução também contribuam na osteoindução dos FCAs. (COMBES & REY, 2010).

3.1.4 Hidroxiapatita

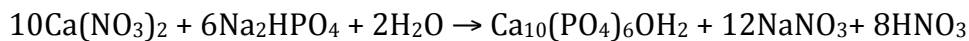
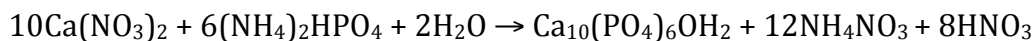
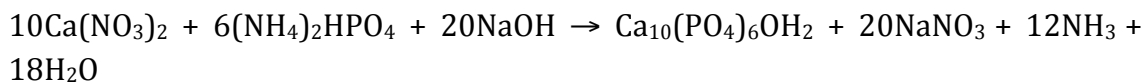
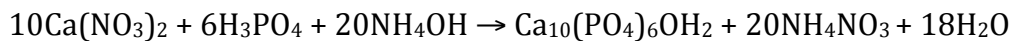
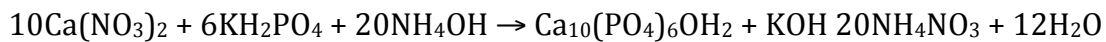
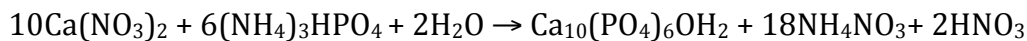
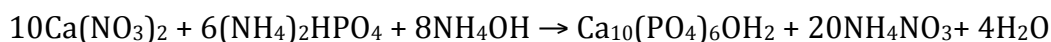
A hidroxiapatita (HA) é um FC largamente utilizado na área médica devido à sua similaridade química com a parte mineral que forma o tecido ósseo. A HA estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) apresenta razão Ca/P de 1,67 e é considerada osteocondutora, mas pouco osteoindutora quando comparada com os outros FCs apresentados anteriormente (YUAN & GROOT, 2005). Dentre os FCs, a HA é a fase mais estável e a menos solúvel, possuindo um K_{ps} de aproximadamente $2,9 \times 10^{-58}$ na faixa de pH de 3,5 a 9,7 (BELL et al., 1978). Embora não seja altamente solúvel, a superfície da HA apresenta sítios de nucleação para cristais de apatita em SBF (BOHNER & JACQUES, 2009). As propriedades de solubilidade da HA podem ser modificadas através de substituição iônica, como a substituição de fosfato por carbonato, que aumenta a solubilidade e a bioatividade da HA (LANDI et al, 2003).

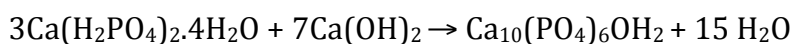
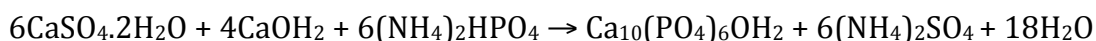
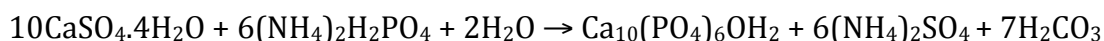
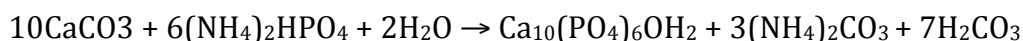
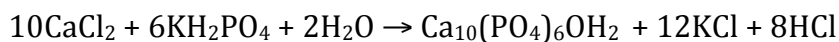
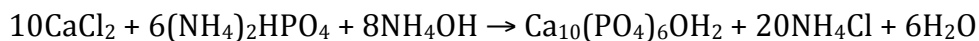
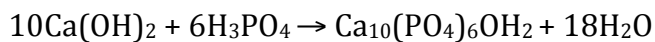
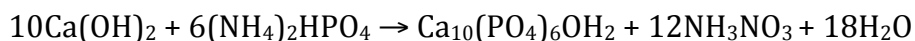
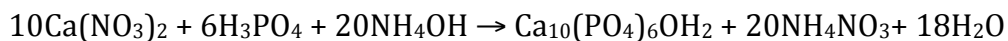
Existem diferentes métodos de síntese descritos na literatura para a HA. De modo geral, os métodos de precipitação por via úmida são os mais simples de se obter partículas nanométricas, e são baseados no fato da HA ser a fase termodinamicamente estável de FC em soluções aquosas à $\text{pH} > 4,2$ e à temperatura ambiente (Wang et al., 2010 ; SADAT-SOJAI et al., 2013). Neste tipo de síntese, a HA é sintetizada a partir de soluções de reagente precursores de Ca e P, em que um reagente é adicionado ao outro sob agitação e controle do pH em temperaturas que variam da ambiente até próximo ao ponto de ebulição da água. Para assegurar a formação de HA os reagentes seguem a proporção Ca/P de 1,67, que é a mesma

encontrada na HA estequiométrica, e o pH é mantido básico ou a temperatura é elevada, ou ambos. De modo geral, para obtenção HA como única fase, sempre que o pH precisar ser diminuído, a temperatura deve ser aumentada, e vice-versa (SADAT-SOJAI et al., 2013).

Diversos parâmetros influenciam a morfologia do pó sintetizado. Wang e colaboradores observaram o efeito da temperatura, pH inicial da reação e método de secagem na morfologia de HA nanocristalina (WANG et al., 2010). Em pH inicial de 10 foram obtidas partículas esféricas, enquanto em pH=8 foram obtidas partículas com formato de agulha. O formato dos cristais também pode ser controlado pela temperatura da reação: em pH inicial = 10 foram reportados cristais esféricos à 25 °C, em formato de coluna à 60 °C e em formato de folha à 80 °C. O método de secagem também foi importante, gerando menores partículas para a secagem à vácuo em comparação com o método de *freeze drying*.

Diferentes reações de síntese da HA podem ser executadas a partir de diversos reagentes precursores. Sadat-Sojai e colaboradores realizaram uma extensa revisão da literatura a respeito destes métodos de síntese (SADAT-SOJAI et al., 2013). Dentre as reações mais conhecidas na síntese da HA por via úmida, de forma simplificada, pode-se citar





A escolha de uma determinada reação deve ser feita conforme a estratégia montada para a reação de síntese, o que pode limitar o número de possibilidades à disposição. Entre alguns fatores excludentes, podem ser citados:

- Necessidade do uso de solventes orgânicos: Dependendo da aplicação da HA pode ser necessária a utilização de solventes orgânicos para a reação de síntese da HA. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Raucci e colaboradores (RAUCCI et al., 2010), em que HA foi sintetizada no solvente tetraidrofurano (THF) para posterior dispersão no polímero poli(caprolactona) (PCL) para produção de *scaffolds*. Os autores tiveram a sua escolha de rota de síntese limitada pelo solvente escolhido, uma vez que nem todos os reagentes precursores são solúveis em THF. Os autores partiram da reação $10\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 6\text{H}_3\text{PO}_4 + 20\text{NH}_4\text{OH} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2 + 20\text{NH}_4\text{NO}_3 + 18\text{H}_2\text{O}$, precipitando primeiramente o composto $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a partir de H_3PO_4 e NH_4OH em THF e posteriormente adicionando o reagente $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, realizando uma reação na interface sólido-líquido.

- Coprodutos gerados pela reação química de síntese da HA: A grande maioria das reações de síntese da HA gera coprodutos potencialmente tóxicos para as células, exigindo uma etapa posterior de lavagem ou calcinação. A impossibilidade de realização dessa etapa de lavagem acarreta na eliminação de um grande número de reações disponíveis. Usando ainda como exemplo o trabalho de Raucci, devido à produção de NH_4NO_3 como coproduto da reação, os autores realizaram uma etapa de imersão em água, uma vez que este sal é solúvel. Os diversos resultados de caracterização biológica confirmaram a remoção deste coproduto do compósito produzido (RAUCCI et al.,2010).

3.1.5 Biomineralização em Processo Biológicos como Inspiração para Novos Materiais à Base de Hidroxiapatita.

O termo biomineralização diz respeito ao processo de precipitação de minerais que ocorre nos organismos vivos envolvendo moléculas orgânicas, gerando estruturas híbridas complexas em termos de organização e adaptação às suas funções. Existem mais de 60 minerais conhecidos usados de forma íntima com matrizes orgânicas por seres vivos de todos os 5 reinos. Como exemplo do tipo de estrutura extremamente complexa que pode ser formado em processos de biomineralização temos o esqueleto de sílica da esponja *Euplectella*, apresentando diversos níveis hierárquicos (Fig. 2). Outros exemplos são as nanopartículas de magnetita produzidas por bactérias que se guiam pelo campo magnético terrestre, o carbonato de cálcio encontrado em diversos organismos marinhos e os ossos encontrados nos vertebrados (NUDELMAN & SOMMERDIJK, 2012).

Os ossos são um exemplo de tecido formado por biomineralização cujo entendimento do processo de formação é de grande interesse do ponto de vista da engenharia de materiais, devido às ótimas propriedades mecânicas e complexa estrutura hierárquica deste material. O tecido ósseo corresponde a um compósito biomineralizado colágeno-HA (com outros componentes orgânicos em menor proporção) de alta complexidade, apresentando diversos níveis hierárquicos, o que promove uma ótima distribuição de tensões no material (WEINER & WAGNER,

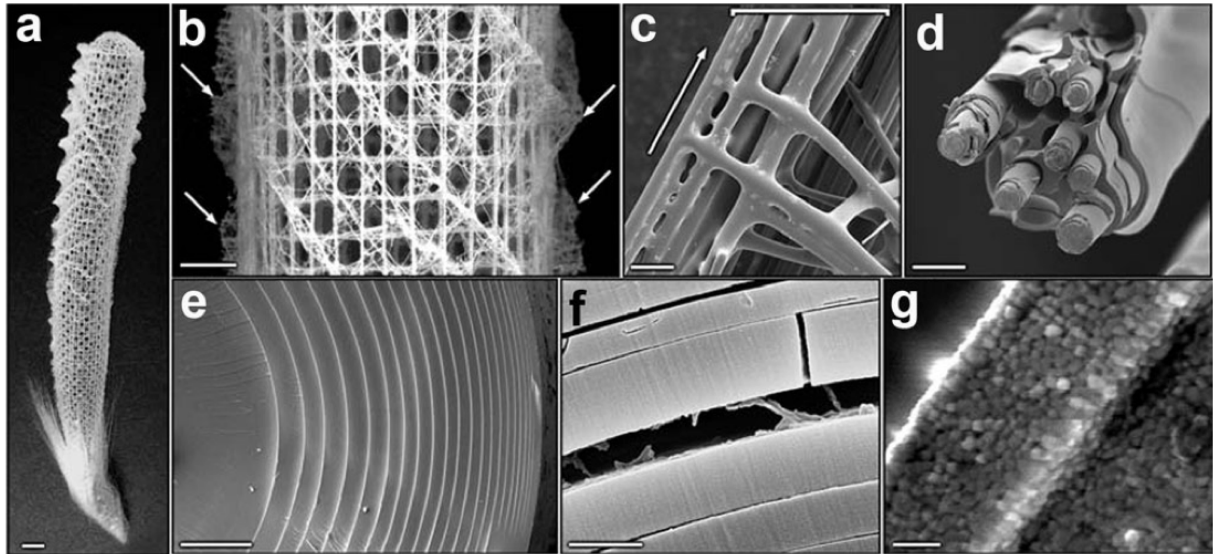


Fig. 2. Níveis hierárquicos no esqueleto da esponja *Euplectella*. (a) Esqueleto completo (escala: 1cm). (b) Maior magnificação da estrutura do esqueleto (escala: 5mm). (c) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de uma seção da estrutura formada por espículas agrupados (escala: 100 μm). (d) Imagem de MEV de uma única espícula fraturada (escala: 20 μm). (e) Imagem de MEV de uma seção transversal de uma espícula mostrando sua estrutura laminar (escala: 5 μm) (f) Imagem de MEV do espaço interlaminar da espícula, revelando uma camada orgânica (escala: 1 μm). (g) Natureza nanoparticulada da biosilica (escala: 500 nm). (NUDELMAN & SOMMERDIJK, 2012).

1998). A alta complexidade do tecido ósseo é fruto de um processo que pode ser dividido em duas etapas: as fases primária e secundária de formação. Na fase primária o osso se forma de forma rápida e desorganizada, sem uma grande influência do colágeno em uma matriz de proteoglicanos. Na segunda etapa o material formado na etapa 1 é remodelado em uma estrutura mais complexa em que a mineralização é direcionada por fibrilas de colágeno, secretadas por osteoblastos, e proteínas não colágenas, que embora não influenciem as propriedades mecânicas por si só, desempenham papel importante na formação do osso (OLSZTA et al, 2012). Weiner e Wagner descreveram a estrutura óssea em 7 níveis hierárquicos que podem ser observados na Fig. 3 (WEINER & WAGNER, 1998).

A complexidade estrutural do osso e suas ótimas propriedades mecânicas levou os cientistas a desenvolver estratégias de síntese de materiais híbridos

orgânico-HA que se inspiram no processo natural de formação do osso, um processo dito biomimético, no sentido de criar um análogo ao que existe em

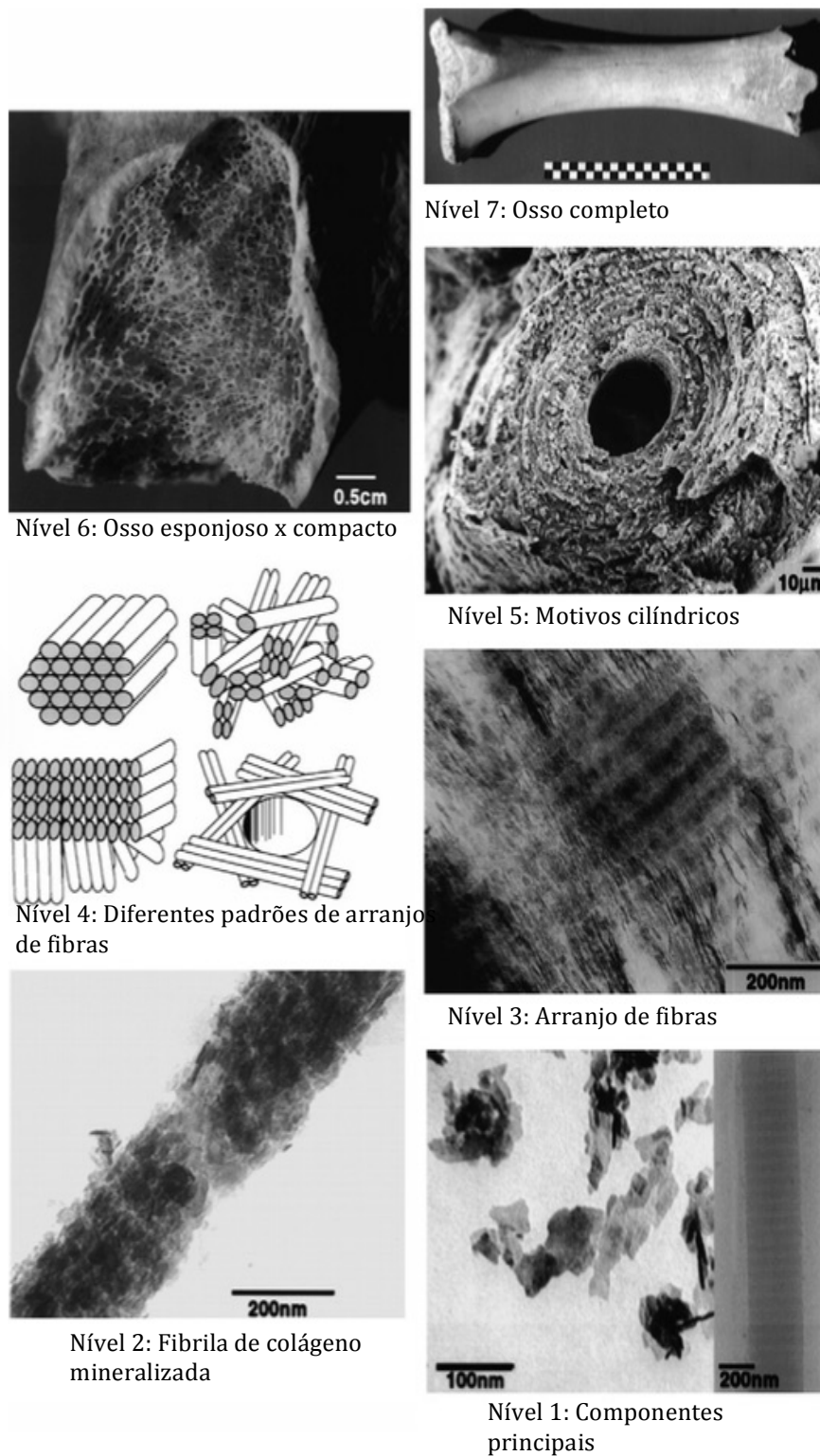


Fig. 3.: Níveis hierárquicos do osso secundário como descritos por Weiner e Wagner (WEINER & WAGNER, 1998).

organismos vivos. Neste tipo de estratégia, moléculas orgânicas são utilizadas como *template* no processo de mineralização da hidroxiapatita e outros minerais, buscando-se maior controle do tamanho de partícula, melhor interação com matrizes orgânicas e dispersão, criando-se um material compósito com características mais próximas à do osso. Esta estratégia é considerada promissora em contornar ao mesmo tempo o problema de dispersão da hidroxiapatita em matrizes poliméricas e gerar um tamanho de cristalito mais homogêneo (SUPOVÁ, 2009).

Pesquisadores realizaram a síntese da HA na presença de álcool polivinílico (PVA) a partir de soluções aquosas. Os resultados indicam que o tamanho de cristalito da HA sintetizada é influenciado pela massa molecular do polímero e a concentração do mesmo em solução, de forma que o menor tamanho de cristalito foi observado no caso do PVA com a maior massa molecular (MOLLAZADEH et al., 2007). A HA teria precipitado através da interação com grupos negativos na cadeia polimérica. O maior número de sítios de nucleação no polímero com maior massa molecular teria produzido mais núcleos de HA e, portanto, menor tamanho de cristalito. Os diferentes tamanhos obtidos com o aumento da massa molecular dos polímeros podem ser visualizados na Fig. 4. A síntese de HA também foi realizada na presença de diversos polímero iônicos, que mostraram influência no processo de cristalização da HA (KATO et al., 1997), servindo de sítios de nucleação para os cristais e formando compósitos com propriedades mecânicas superiores às de compósitos formados por mistura física.

A hidroxiapatita também foi sintetizada na presença de diferentes concentrações de lecitina (um fosfolípídeo) em soluções aquosas (WOJASINSKI et al., 2015) resultando em menor tamanho de partícula com o aumento da concentração de lecitina em solução e melhor dispersão das partículas de HA no meio de reação. Fosfolipídios têm papel importante na biomineralização em vários processo biológicos e vem sendo utilizados em diversos métodos de fabricação de biomateriais (COLLIER & MESSERSMITH, 2001).

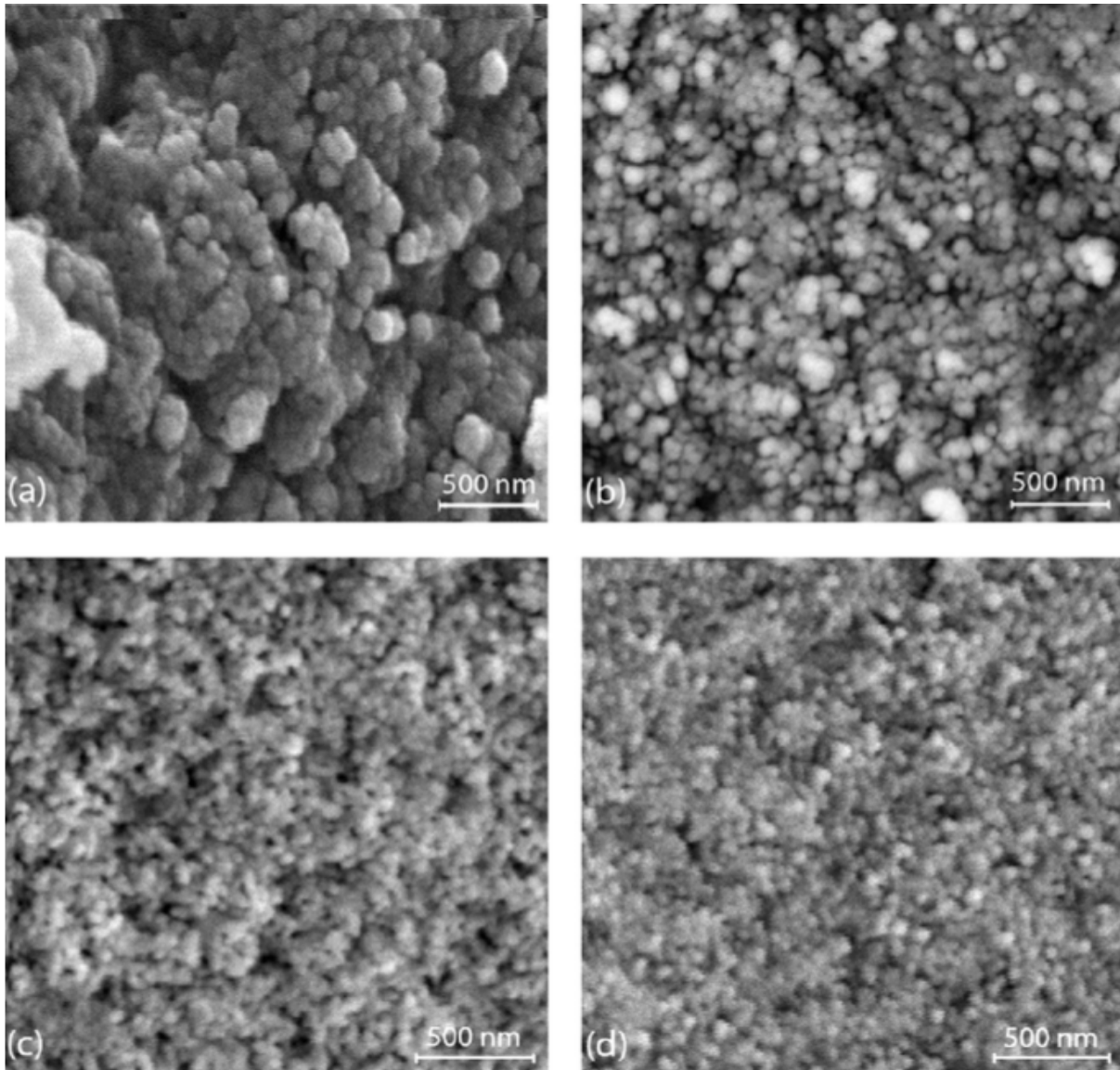


Fig. 4. Imagens de MEV das amostras de HA sintetizadas na presença de PVA: (a) sem presença de polímero, (b) na presença de polímero com massa molecular de 22.000, (c) na presença de polímero com massa molecular de 88.000 , e (d) na presença de polímero com massa molecular de 145.000 (MOLLAZADEH et al., 2007).

A síntese de HA na presença de proteínas também é alvo frequente de estudos. Huang e colaboradores realizaram a síntese da HA na presença da fibroína da seda, obtendo uma HA altamente dispersível em água devido à formação de uma camada contendo cargas negativas de fibroína na superfície das partículas (HUANG et al., 2014). Wang e colaboradores produziram compósitos de HA em matriz formada por colágeno e fibroína por método biomimético, obtendo uma proporção HA/matriz polimérica próxima à do osso (WANG et al., 2011).

O processo de biomineralização da HA também tem sido empregado utilizando-se moléculas de DNA. Pesquisadores realizaram a precipitação de cristais de HA ao longo de 4 semanas na presença de moléculas de DNA a partir de solução de fluido corpóreo simulado (SBF), obtendo cristais com diversas morfologias (TAKESHITA et al., 2013). Chen e colaboradores usaram um método de síntese hidrotermal em conjunto com ultrassom para produzir partículas de HA na presença de DNA e incorporar proteínas antibacterianas para liberação lenta das mesma em aplicações biológicas (CHEN et al., 2016).

3.2 Borracha Natural

3.2.1 Histórico

A borracha natural (NR) é um polímero natural obtido do látex da planta *Hevea brasiliensis*, uma árvore originária da floresta tropical da Bacia Amazônica sendo a principal fonte comercial deste material. O primeiro registro científico da borracha natural foi feito por F. Fresneau (1703-1770), um cientista agrônomo francês que viajava pela Guiana Francesa e Bacia Amazônica em busca de plantas com possível utilidade econômica. Ele ficou interessado pelas propriedades de árvores produtoras de borracha, escrevendo um relatório sobre as mesmas. Um outro cientista francês, C. M. De la Condomine, teve acesso ao relatório de F. Fresneau e apresentou seus resultados no encontro da Academia Francesa de Ciências em Paris (HURLEY, 1981; KOHJIYA & IKEDA, 2014).

Na Inglaterra em 1770, Joseph Priestley, químico descobridor do oxigênio, relatou a capacidade da borracha natural de apagar escritos feitos com lápis, no entanto o material teve o grande uso pelo público pela primeira vez no século 19, através de tecidos impregnados com borracha natural. A impermeabilidade da borracha natural aliada à sua elasticidade viabilizou a produção de capas de chuva e outros tecidos impermeáveis por Charles Macintosh (1766-1843), um empreendedor, e Thomas Hancock (1786-1865), um engenheiro (HURLEY, 1981).

Mas um dos marcos mais importantes relacionadas à borracha natural e à indústria moderna foi o desenvolvimento do processo de vulcanização por Charles Goodyear (GOODYEAR, 1855). O processo consistiu na reticulação das macromoléculas da borracha natural com enxofre, gerando uma rede tridimensional estável. A descoberta possibilitou grandes avanços na indústria moderna intensificados com a possibilidade de produção em massa. Durante a segunda guerra mundial, borrachas sintéticas começaram a ser produzidas nos Estados Unidos, Alemanha e União Soviética e desde então coexistem com a NR no mercado internacional da borracha. No entanto, a NR ainda é preferida em muitas aplicações devido às suas propriedades mecânicas superiores (HURLEY, 1981; KOHJIYA & IKEDA, 2014).

A produção mundial de borracha natural é feita toda a partir de árvores originárias de mudas transportadas do Brasil para a Índia Britânica em 1876, das quais apenas 2000 mudas sobreviveram. Como consequência, a maioria das árvores atuais são originárias de uma reserva pequena, apresentando baixa variabilidade genética. Atualmente, o continente Asiático possui a grande maioria da produção global (KOHJIYA & IKEDA, 2014).

3.2.2 Composição do Látex da *Hevea Brasiliensis*

O látex da *Hevea brasiliensis* consiste em uma suspensão coloidal em que partículas de poli(*cis*-1,4-isopreno) (PI) são estabilizadas em uma fração aquosa (soro) contendo diversos componentes não isoprenos, como proteínas, lipídeos, carboidratos e íons inorgânicos. Quando o látex é centrifugado ele se separa em 3 frações: uma fração superior contendo partículas de borracha; uma fração intermediária, formada pelo soro; e fração do fundo contendo os lutóides, organelas que desempenham funções bioquímicas na *Hevea brasiliensis* (Fig. 5) (Ferreira et al., 2009).

A borracha consiste em 30-35% em massa do látex fresco. Sua estrutura química pode ser separada em 3 partes: um grupo terminal ω , uma longa cadeia polimérica de PI e um grupo terminal α (SAKDAIPANICH e ROJRUTHAI, 2012). No

caso da *H. brasiliensis*, estes grupos terminais ainda não foram completamente descritos, mas estudos realizados em borrachas deproteinizadas sugerem que o grupo terminal ω possui uma proteína (ou polipeptídeo) e o α possui um fosfolípido (ou ácido graxo) (Fig.6(a)) (TARACHIWIN et al.,2005 ; ROLLERE et al., 2015 ; KOHJIYA & IKEDA, 2014).

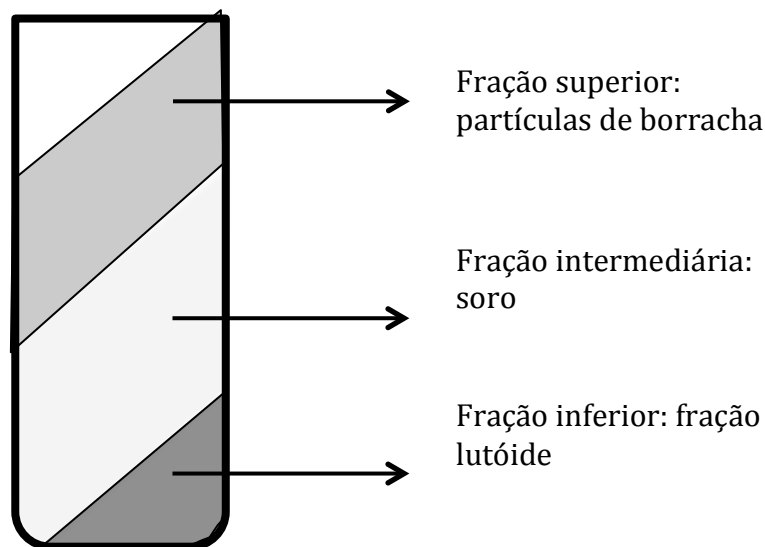


Fig. 5. Diferentes frações do látex separáveis por centrifugação (FERREIRA et al., 2009).

Aproximadamente 5% da borracha natural verde corresponde a proteínas, lipídios, carboidratos e componentes inorgânicos. Esses componentes são a maior diferença composicional da NR em relação ao PI sintético, podendo estar dissolvidos no soro ou adsorvidos às partículas de borracha (SAKDAPIPANICH e ROJRUTHAI, 2012). As proteínas correspondem a 1,5% em massa do látex, dos quais 25-30% estão ligadas às partículas de borracha, 25% ligada à fração lutóide e 45% contidos no soro (WITITSUWANNAKUL & WITITSUWANNAKUL, 2001). Dentre as proteínas do látex existe uma fração de proteínas separada por eletroforese denominada F1 que possui propriedades regenerativas, gerando interesse no meio científico no seu uso em aplicações médicas (BARREIROS et al., 2014.)

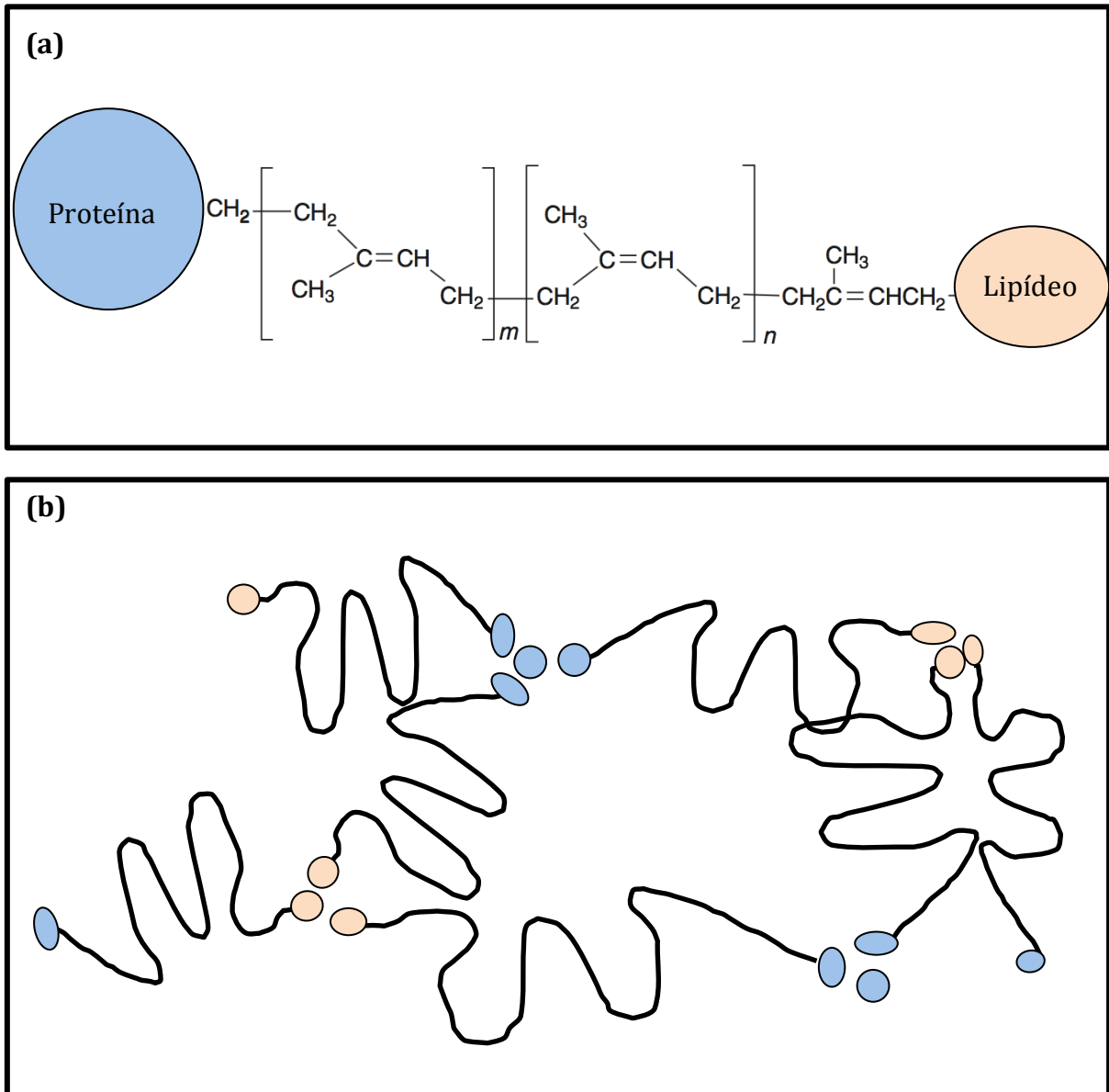


Fig.6. (a) Estrutura proposta da macromolécula de PI na NR, ligada covalentemente à uma proteína e um lipídeo, e (b) mecanismo por trás do aumento de percentual de gel no látex. Elaborado a partir de figuras contidas em (SAKDAPIPANICH e ROJRUTHAI, 2012).

Os lipídeos correspondem à aproximadamente 1,3 % do látex fresco e de 2,5-3,2% do látex seco. Dentre os lipídeos, 18-25% correspondem à fosfolipídios, 25%-35% correspondem a glicolipídios e 40-60% correspondem a lipídios

neutros. Devido ao caráter anfótero, com uma cabeça negativa e uma cadeia apolar, os fosfolípidos estão envolvidos na estabilização coloidal do látex em conjunto com proteínas negativamente carregadas (RIPPEL et al 2003). Como citado anteriormente, também estão presentes no grupo α terminal, ligados covalentemente à cadeia de PI.

Acredita-se que as proteínas e lipídios ligados, assim como as proteínas e lipídios livres, estariam por trás de algumas das características únicas da NR. Estes compostos estariam também por trás do efeito de formação de gel que se observa em NR guardada por longo período, através da associação entre compostos não isoprenos ligados e livres, formando uma rede tridimensional (SAKDAIPANICH e ROJRUTHAI, 2012) (Fig. 6).

3.2.3 Interações entre partículas e macromoléculas na borracha natural – *Bound Rubber Phenomenom*

O fenômeno da borracha ligada (*bound rubber phenomenom*) diz respeito à quantidade de borracha que não pode ser separada de partículas de reforço, em reforços que apresentam boa interação com a NR. Como resultado, observa-se uma drástica diminuição na solubilidade da borracha natural em solventes considerados “bons solventes”, com a formação de um gel formado por partículas de carga ligadas às cadeias poliméricas. Em baixas quantidades de reforço disperso na matriz, ou seja, com grande espaço entre partículas, as cadeias poliméricas estão ligadas a apenas uma partícula, em apenas um ponto da macromolécula ou múltiplos. Neste caso é formado um gel disperso. Um gel coerente é apenas formado quando uma mesma macromolécula estará ligada à mais de uma partícula, o que ocorre a partir de uma determinada concentração crítica (Fig. 7) (WOLF et al., 1993).

Ainda não existe um completo entendimento do mecanismo de formação da borracha ligada e da real natureza das interações partícula-polímero. Sabe-se que pode ocorrer a formação de ligações químicas, como no caso de negro de fumo. No entanto, o fenômeno também pode ser observado em situações em que só

existe interações físicas, como no caso da sílica. Dentre os fatores que influenciam a quantidade de borracha ligada estão o tamanho das partículas dispersas, o quão bem dispersas estão estas partículas e a natureza química da superfície do reforço (BLOW, 1973).

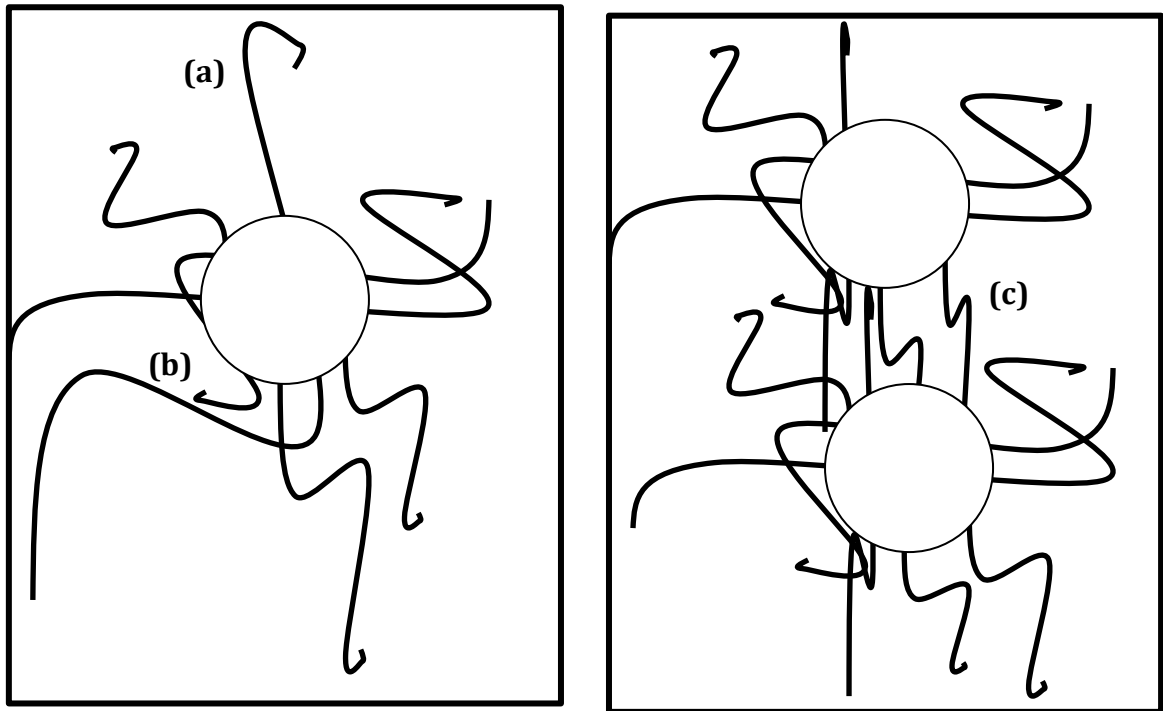


Fig. 7. Desenho esquemático representando: (a) interação simples, (b) interação dupla (uma mesma macromolécula adsorvida em dois pontos), e (c) interação entre duas partículas (adaptado de WOLF et al., 1993).

No que diz respeito ao reforço, o fator mais importante é o tamanho médio de partícula. Partículas maiores do que 10^3 nm não possuem a capacidade de reforçar a NR, ou até mesmo apresentam um efeito negativo e aumentam a viscosidade por um mero efeito hidrodinâmico. O reforço da matriz é obtido com partículas menores do que 100 nm, no entanto a estrutura formada por essas partículas é um fator decisivo. Duas classes de minerais são conhecidas por oferecer capacidade de reforço significativa, negro de fumo e sílica. Outro fator que influencia as interações borracha-partículas é a atividade da superfície das partículas. Muitos fatores podem influenciar a atividade da superfície dos reforços, desde forças de Van der Waals até interações químicas específicas, dependentes

dos grupos químicos na superfície das partículas (LEBLANC, 2002). Uma vez que o efeito da atividade e a real interação partícula-macromolécula não é algo completamente compreendido, se utiliza a quantidade total de borracha ligada como uma medida dos fatores que envolvem este fenômeno. Os testes para determinar o conteúdo de borracha ligada normalmente consistem na exposição da NR por longos períodos de tempo à um bom solvente. O gel formado é separado e seco, sendo pesado para se determinar a quantidade que não pode ser separada da carga de reforço (LEBLANC, 2002) .

3.2.4 Aplicação da Borracha Natural como Biomaterial

A NR possui propriedades interessantes do ponto de vista médico devido aos seus compostos não isoprenos. O material teria propriedades regenerativas devido à presença de uma fração de proteínas que induziria a formação de novos vasos sanguíneos tendo efeito na regeneração de ferimentos (MRUE, 2013). Os estudos neste assunto são escassos, e não parece existir um real conhecimento do mecanismo de atuação das proteínas e qual ou quais proteínas exatamente seriam responsável pelo efeito observado. A borracha natural apresenta muitas moléculas biológicas, tornando difícil o estudo de seus efeitos. Em todo caso, serão discutidos os trabalhos mais relevantes envolvendo as aplicações biológicas da NR.

Membranas não vulcanizadas de NR foram testadas em aumento de bexiga em coelhos, promovendo regeneração do epitélio e da musculatura da bexiga de forma organizada, sem a presença de vazamento de urina (DOMINGOS et al, 2009). Em outro estudo, autores determinaram a atividade angiogênica do soro do látex através do ensaio de membrana cório-alantóide de embriões de galinha e a capacidade regenerativa em úlceras em orelhas de coelho (MENDONÇA et al, 2009). O soro apresentou evidente efeito angiogênico e aumento de permeabilidade vascular além de significativo aumento na capacidade de regeneração das úlceras. O mesmo efeito não foi observado quando o soro foi fervido e tratado com proteases, indicando que o efeito provavelmente é causado pela presença de proteínas. Em um estudo mais recente, uma fração de proteína do

soro do látex, chamada pelos autores de F1, foi isolada e aplicada em lesões controladas em nervos ciáticos de ratos, tendo o seu efeito comparado com hidrogéis de ácido hialurônico (um carregador de substâncias e fatores frequentemente utilizado em reparação de tecido nervoso). A fração F1 em conjunto com o ácido hialurônico apresentou a recuperação mais satisfatória dos nervos ciáticos, mostrando que este biomaterial possui propriedades regenerativas também em tecido nervoso. Até então, este é o único estudo usando uma fração isolada dos outros componentes do soro do látex (BARREIROS et al., 2014).

O efeito angiogênico da borracha natural podem ser promissores em aplicações ósseas uma vez que a regeneração do tecido ósseo é altamente dependente da vascularização, e a falha em obtê-la é motivo de fracasso em diversas aplicações médicas (MERCADO-PAGÁN et al., 2015). A regeneração óssea adjacente à grânulos de borracha natural em alvéolos dentários de ratos foi analisada quantitativamente, observando-se aceleração da formação de matriz óssea paralelamente a uma diminuição na quantidade de tecido conjuntivo nas áreas adjacentes ao implante e integração progressiva do material pelo tecido ósseo (BALABANIAN et al, 2006). Uma aplicação óssea promissora para a NR é a regeneração óssea guiada, em que a regeneração de defeitos ósseos pode ser prevista através da aplicação de uma membrana oclusiva que mecanicamente exclui populações celulares não osteogênicas dos tecidos moles adjacentes, permitindo que células osteogênicas do tecido danificado proliferem na ferida óssea, guiando a formação do tecido (Fig. 8) (TAL et al., 2012 ; RETZEPI & DONOS, 2010). Nos testes realizados em coelhos não foram observados sinais de alergia ou reações inflamatórias ao corpo estranho e análise histológica, radiografia digital e ressonância magnética indicaram uma diferença significativa na regeneração óssea em comparação com o controle, indicando que a NR pode acelerar a regeneração de defeitos ósseos (ERENO et al, 2010).

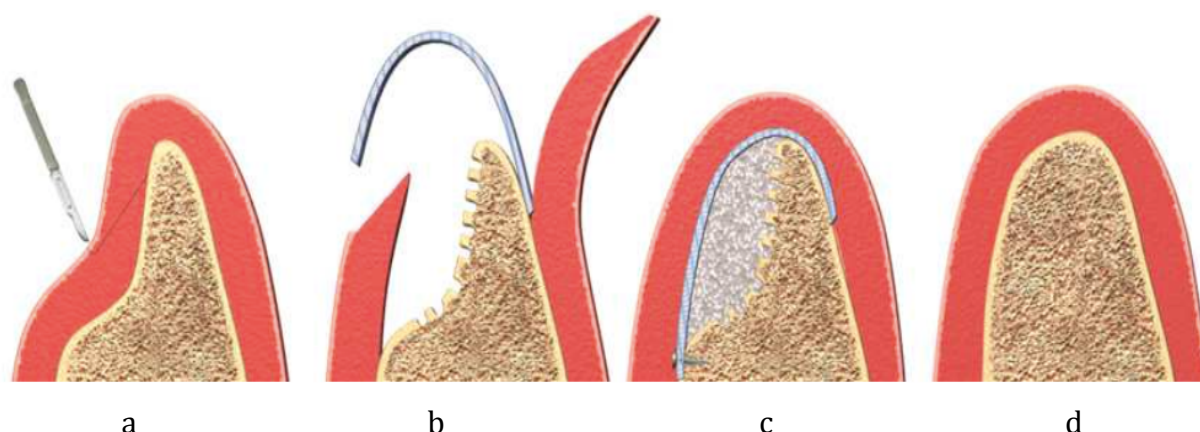


Fig. 8. Procedimento de regeneração óssea guiada. (a) Identificação do defeito. (b) Defeito é exposto e córtex ósseo é perfurado. (c) Membrana é colocada conforme o contorno desejado do osso. (d) Após regeneração o osso apresenta contorno desejado (TAL et al., 2012).

A utilização de polímeros em aplicações ósseas frequentemente exige a necessidade da dispersão de HA ou outros fosfatos de cálcio para se obter melhores resultados na regeneração deste tecido. No entanto, até este momento, são raros os estudos que trabalharam com NR aplicada em conjunto com FCs. Até a publicação desta dissertação, apenas dois trabalhos foram identificados neste aspecto (NASCIMENTO et al., 2014 ; BORGES et al.,2015), os quais serão discutidos posteriormente em mais detalhe devido ao grau de relação com o campo de estudo desta dissertação.

A NR também foi utilizada em blendas poliméricas com poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) na proporção de 40% NR e 60% PLGA em peso, corrigindo a fragilidade do PLGA e aliando a propriedade de angiogênese à biodegradabilidade. A mistura de polímeros, patenteada sob o nome de Cellprene, foi utilizada para a fabricação de molas para expansão craniana em coelhos. Segundo os autores, este foi o primeiro implante biodegradável e completamente integrado a demonstrar efetividade significativa na expansão craniana (FALLER et al., 2015) (Fig. 9).

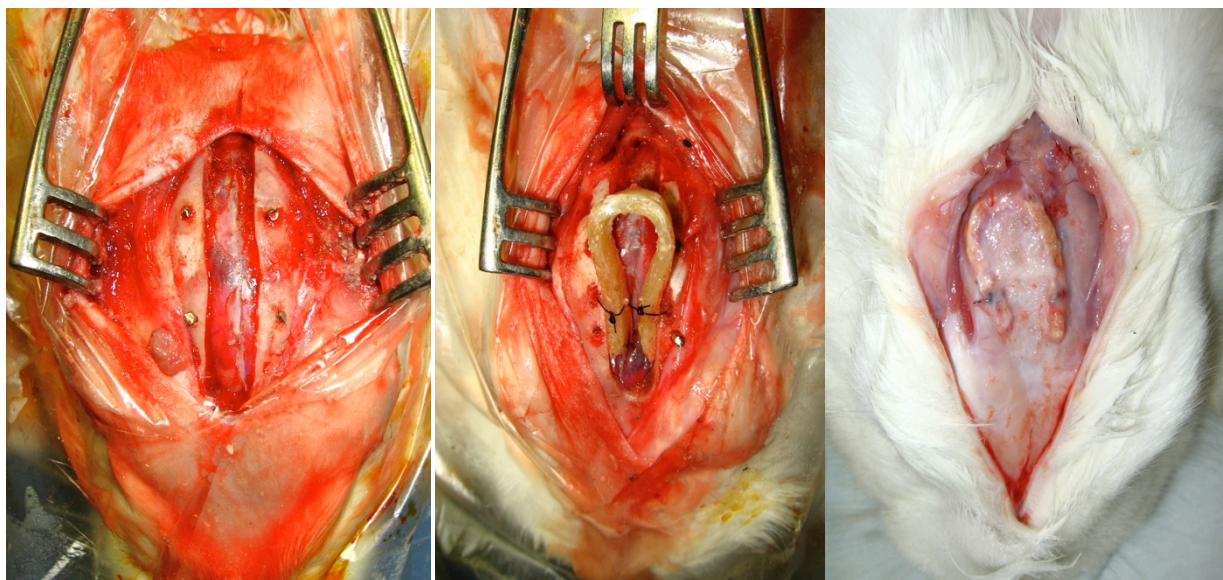


Fig. 9. Dispositivo de expansão craniana constituído pela blenda NR/PLGA: Osteotomia à esquerda, mola colocada ao centro e retirada à direita (FALLER et al., 2015).

Existem patentes na indústria que exploram as propriedades regenerativas da NR em dispositivos em formato de membrana microporosa (ZBOROVSKI & MRUE, 1998) e na separação e purificação da fração de proteínas angiogênica (MRUE, 2013) referentes a produtos que já estão em comercialização. A possibilidade de separar a fração de proteínas angiogênicas gera novas possibilidades de aplicação não associadas à NR, como pomadas ou aplicação em conjunto com outros polímeros. Um exemplo é a pomada REGEDERM®, desenvolvida pela Pele-Nova Biotecnologia SA, que consiste em um gel-creme contendo a proteína (<http://www.pelenova.com.br>).

3.2.5 Uso da Borracha Natural em Conjunto com Fosfatos de Cálcio

Em “*Production and characterization of natural rubber–Ca/P blends for biomedical purposes*”, Nascimento e colaboradores produziram materiais compósitos consistindo de fosfatos de cálcio dispersos em uma matriz de NR na concentração em massa de 10% (NASCIMENTO et al., 2014). O processo de produção dos compósitos consistiu em uma simples mistura física dos

componentes, em que a NR foi dissolvida em clorofórmio e o pó de fosfatos de cálcio foi disperso por agitação mecânica, e posterior formação de filmes por evaporação do solvente (Fig. 10). Os fosfatos de cálcio foram sintetizados pelo método sol-gel e geraram um produto contendo diversas fases : Ca_5P_8 (47,8 %), CaCO_3 (36,3 %), $\text{Ca}(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (9,5 %) e Ca (6,3 %), sendo que não houve presença de nenhuma das fases consideradas de maior interesse do ponto de vista de aplicações biológicas, como a HA ou fosfatos tricálcicos. Ainda, a maioria das partículas formadas teve tamanho de 10 e 15 μm , e houve presença de partículas de até 40 μm , provavelmente devido às altas temperaturas empregadas no processo, favorecendo o crescimento de grão. Estes valores estão acima do ideal para aplicações biológicas, já que é conhecido que a bioatividade dos FCs é influenciada pela área superficial (WANG et al., 2012 ; SCHMIDT et al., 2009). Quanto às propriedades mecânicas, os autores não observaram aumento de rigidez com a adição dos FCs, o que pode ser devido à baixa interação das partículas com a matriz de NR e ao elevado tamanho de partícula. É possível afirmar que se a carga cerâmica tivesse tamanho nanométrico e estivesse nanodispersa na matriz, fosse observado aumento no módulo de elasticidade devido à formação de borracha ligada.

O outro estudo, “*Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application*”, descreve a preparação de uma membrana de NR recoberta com FCs por um processo dito biomimético, que consistiu na precipitação dos FCs na superfície do material a partir de SBF (*simulated body fluid*) ao longo de uma semana (BORGES et al., 2015). A borracha natural se mostrou capaz de precipitar FC em sua superfície, indicando que a NR possui grupos químicos em sua superfície que levam a crer que este material poderia ser bioativo (embora ainda exista dúvida quanto à possibilidade de se fazer tal afirmação pelo método de imersão em SBF). O produto precipitado foi considerado multifásico, com presença de HA e outras fases de FC. O tamanho de partícula se encontrou em uma larga faixa e considerado como dependente dos “diferentes estágios de maturação” em que o precipitado se encontra.

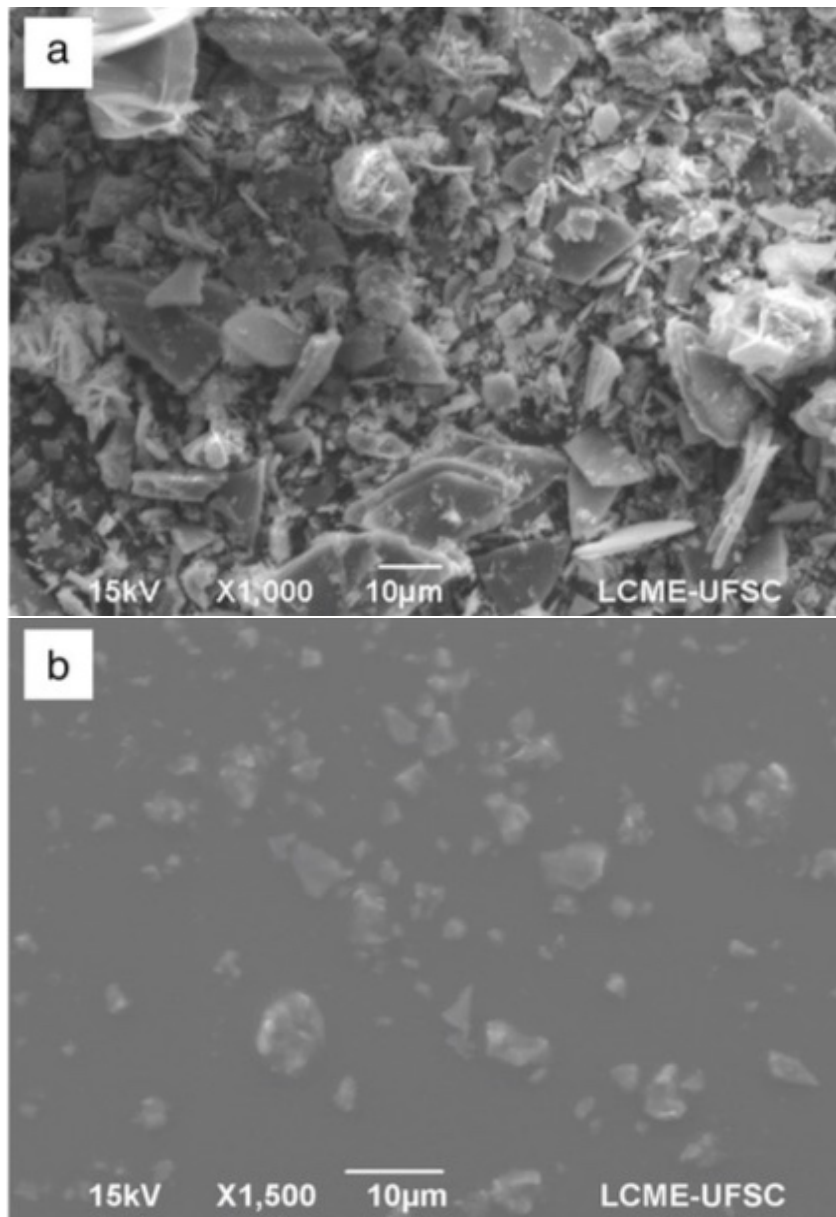


Fig. 10. (a) FCs como sintetizados e (b) dispersos em NR (NASCIMENTO et al., 2014).

4 Materiais e Métodos

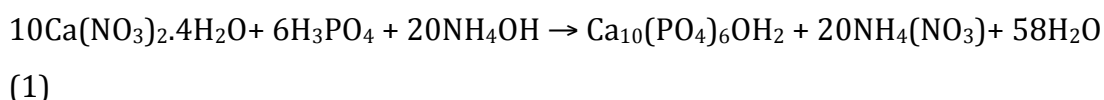
4.1 Purificação da borracha natural

A primeira etapa do processo de preparação consistiu na obtenção da borracha natural (NR) a partir de látex da planta *Hevea brasiliensis* obtido comercialmente (Maffer – origem Malásia). O látex comprado é centrifugado, possuindo 60% de teor de sólidos, quantidade maior em comparação com o látex em sua forma original (30% de teor de sólidos). Devido ao processo de centrifugação, parte de soro do látex é removida, e junto com ele parte das proteínas hidrossolúveis sendo. Portanto, o material já possui teor reduzido de proteínas. Como etapa adicional de purificação, foi feita a dissolução e precipitação da NR. Primeiramente o látex foi coagulado por gotejamento em metanol sob agitação. Após a evaporação do metanol em estufa a 70 °C o mesmo foi cortado em pequenos pedaços e dissolvido em clorofórmio, sendo posteriormente precipitado novamente em metanol, processo que foi realizado 3 vezes. Alguns autores usaram a NR como biomaterial sem purificação ou apenas centrifugada, inclusive comercialmente (ZBOROWSKI & MRUE, 2006 ; NASCIMENTO et al., 2014). No entanto, mesmo o material centrifugado pode ser alergênico, pois pacientes podem desenvolver alergias às diferentes frações do látex (LAMBERTI et al, 2015).

4.2 Preparação dos Compósitos Hidroxiapatita/Borracha Natural

O método de síntese desenvolvido dos compósitos HA/NR teve como objetivo executar a síntese da HA na presença das moléculas de NR, uma vez que ela possui em sua macromolécula elementos que já foram reportados na literatura como possíveis agentes na biomineralização: uma proteína e um fosfolipídio (WOJASIŃSKI et al, 2015 ; EIDEN-AßMANN et al., 2001 ;). Para que a NR funcione como agente de biomineralização é preciso que ela esteja em solução no momento da adição dos reagentes. Para isso é necessário selecionar um solvente capaz de

solubilizar tanto a NR quanto os reagentes envolvidos na síntese da hidroxiapatita (HA). Desenvolveu-se uma rota de síntese utilizando-se tetraidrofurano (THF, 99+% A.C.S. Reagent, Aldrich) como solvente. Os reagentes escolhidos para síntese da HA foram $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99% A.C.S. Reagent, Aldrich), H_3PO_4 (85%, DINAMICA) e NH_4OH (20%, DINAMICA). A reação química ocorre conforme segue:



Foram produzidos compósitos com as concentrações de 10, 20 e 30% em massa. As etapas do processo estão descritas no fluxograma da Fig. 11. Primeiramente a NR foi cortada em pequenos pedaços e dissolvida em THF na concentração de 0,05 g/ml, sob agitação por 24 h. Após a dissolução completa da NR, é adicionada uma solução 0,5 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em THF e a mistura é homogeneizada por 30 min. Em sequência, o pH da solução é regulado com NH_4OH , e medido com auxílio de um pHmetro, para valores de $\text{pH} > 10$. A reação de síntese da HA ocorre com a adição de uma solução 0,3 M de H_3PO_4 em THF na taxa de 1ml/min. NH_4OH foi utilizado para manter o $\text{pH} > 8$ durante a adição do H_3PO_4 , e após término da adição de H_3PO_4 o pH foi regulado em 9 e a mistura foi envelhecida sob agitação por 24 h para assegurar a formação de HA. As soluções de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e H_3PO_4 foram adicionadas em volumes correspondentes à quantidade de HA desejada no compósito (10%, 20% ou 30%) e sempre respeitando a razão Ca/P de 5/3, correspondente à razão encontrada na HA estequiométrica. Cada processo de síntese foi preparado para se obter 5g de material compósito. Os volumes de cada solução e a respectiva massa de HA produzida para cada compósito estão apresentadas na tabela 1.

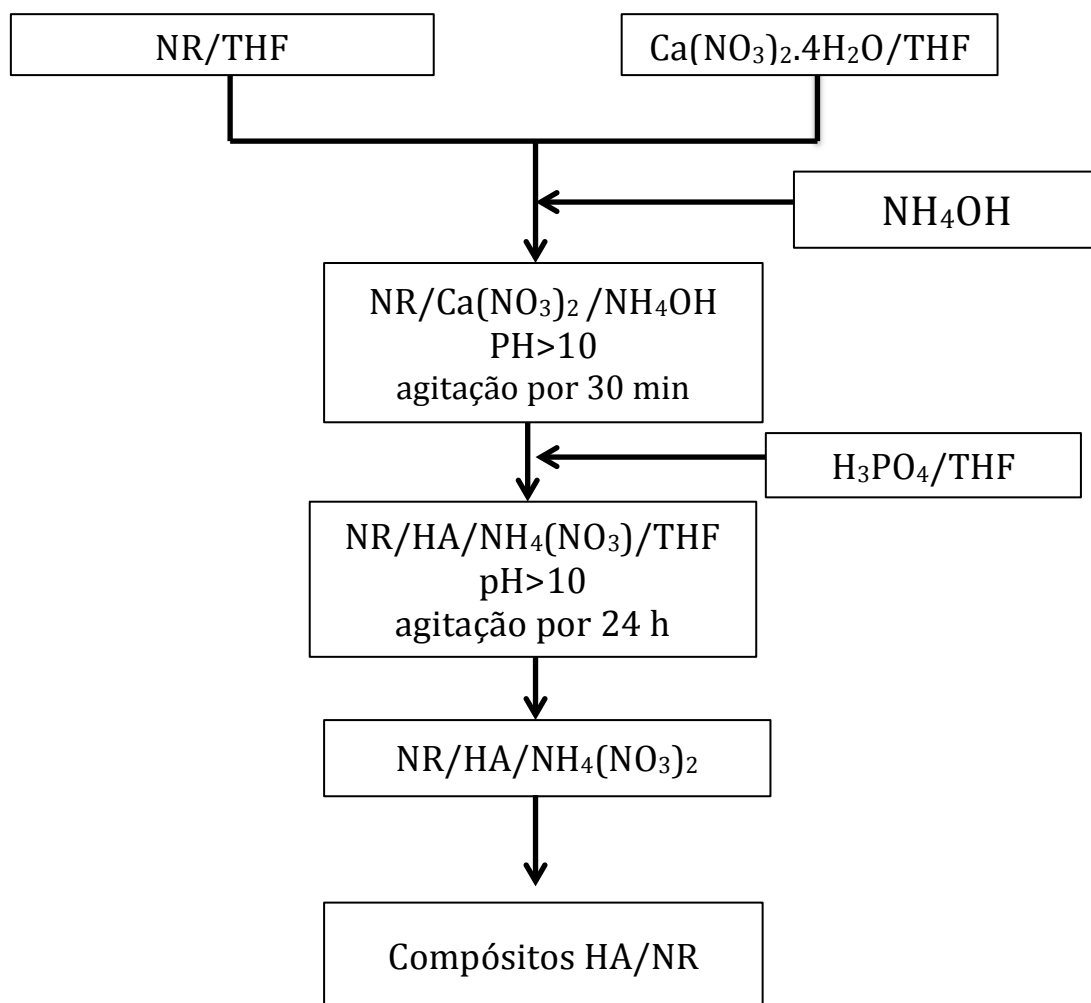


Fig. 11. Fluxograma contendo as etapas da produção dos compósitos HA/NR

Passadas 24 h de reação, a mistura foi vazada em uma placa de Petri para evaporação do THF durante a noite e posterior evaporação em estufa à 50 °C por 3 h. Os filmes formados contém traços de solvente e $\text{NH}_4(\text{NO}_3)$, uma vez que este é um dos coprodutos da reação de síntese, sendo necessária a remoção destes resíduos por imersão em água. A remoção foi realizada deixando o filme submerso por 48 h em um Becker de 1L, provocando o inchamento dos compósitos devido à absorção de água. Após, foi feita uma nova etapa de secagem em estufa por 24 h à 50 °C.

Tabela 1: Volumes das soluções utilizadas e a massa total de HA produzida em cada compósito.

Quantidade desejada de HA na amostra	Volume da solução NR/THF (0.05 g/ml)	Volume da solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (0.5 M)	Volume da solução de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{THF}$ (0.3 M)	Massa total de HA
10% HA	90 ml	10 ml	10 ml	0.5 g
20% HA	80 ml	20 ml	20 ml	1.0 g
30% HA	70 ml	30 ml	30 ml	1.5 g

Também foi realizada uma reação de síntese da HA sem a presença de NR, utilizando as mesmas concentrações utilizadas no compósito de 30% HA, de forma que única diferença na reação foi a presença ou não da NR, sem influência de diferenças na concentração. A reação foi realizada adicionando-se 30 ml da solução 0,5M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ a 70 ml de THF, seguido de regulagem do $\text{pH} > 10$ e adição de 30 ml da solução 0,5 M de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{THF}$. O efeito da NR na dispersão da HA e o mecanismo proposto estão discutidos na seção 5.1.

4. 3 Separação das Partículas da Hidroxiapatita da Matriz Polimérica

Para se caracterizar as partículas de HA sintetizadas na presença de NR foi realizado um processo de separação para o compósito contendo 30% HA. Após a reação de síntese por 24 h, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 15 min. O material precipitado apresentou caráter borrachoso e de cor branca, aparentemente uma mistura de NR e HA, rica nesta última. O precipitado foi seco em estufa para remoção de solvente agitado em 1L de clorofórmio para separação das partículas de HA da NR por decantação. O material não se solubilizou completamente em clorofórmio mesmo após 5 dias de agitação no solvente, o que indica alguma modificação química ou física causada no material devido à reação química de síntese da HA, uma vez que a NR sozinha se dissolveu completamente em THF após 24 h. A porção das partículas separadas foi coletada para caracterização por FTIR, MEV e DRX. Por praticidade, as partículas de HA obtidas

por síntese na presença de NR em THF serão chamadas de HA-NR-THF e as amostras obtidas em THF serão chamadas de HA-THF. O método de centrifugação do meio reacional foi utilizado devido à insolubilidade dos compósitos produzidos em solventes considerados “bons solventes” para a NR, como THF e clorofórmio.

4.4 Obtenção do Teor de Hidroxiapatita no Material Compósito

A quantidade de HA contida nos compósitos depende de quanto a reação química de síntese se aproxima dos 100% de rendimento. A análise termogravimétrica diferencial (TGA) foi utilizada para se obter o real percentual de HA nos compósitos (Discovery TGA, TA instruments). Os compósitos foram produzidos com os percentuais em massa teóricos de 10%, 20% e 30%. No entanto, os percentuais reais de HA podem ser influenciados por variáveis experimentais, como o tempo de reação. A análise foi conduzida em ar sintético a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, da temperatura ambiente até 1.000 °C, o que permitiu avaliar o rendimento da reação química de precipitação da HA e o real percentual nos compósitos. O TGA também foi usado para se tirar conclusões a respeito da estabilidade térmica da HA produzida. A análise foi feita em triplicata com amostras retiradas de diferentes regiões dos filme compósitos.

4.5 Análise de Fases

A análise de fases foi feita através da espectroscopia de difração de raios-x dos filmes compósitos e do pó de HA extraído do compósito contendo 30% HA. Foi utilizado o equipamento PHILIPS X'pert MPD, operando em 40 kV e 40 mA (Cu K α), em um intervalo 2 θ de 20° - 60°, empregando passo de 0,02 e 2s de tempo de aquisição para os filmes compósitos. Para as amostras de HA foi utilizado passo de 0,02 e 3s de tempo de aquisição.

4.6 Análise de Tamanho de Cristalito

A análise de tamanho de cristalito foi realizada através da Lei Scherrer com os resultados de DRX obtidos das partículas de HA sintetizadas com e sem presença de NR. Ambas as reações foram realizadas de forma idêntica quanto à concentração dos reagentes, tendo como única diferença a presença ou não de NR. Os picos dos espectros de DRX foram ajustados com funções lorentzianas para deconvolução dos picos sobrepostos e obtenção da largura à meia altura com a ajuda do software MagicPlot.

4.7 Análise FT-IR

A caracterização dos grupos químicos presentes nas amostras foi feita através da análise de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). As amostras do material compósito, NR e HA foram analisadas com a ajuda de um Brucker Alpha equipado com acessório de Zn-Se no modo ATR no intervalo de 500-4000 λ^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram feitas em dois microscópios, um Carl Zeiss MEV EVO MA-50 para as imagens de elétrons retroespalhados e um Carl Zeiss MEV-FEG Auriga para as imagens com elétrons secundários. As amostras de compósito foram cortadas e recobertas com carbono e as amostras de HA foram analisadas em um monocristal de silício sem metalização. A amostra HA-NR-THF foi dispersa no cristal gotejando-se a fração de partículas que se mostrou mais dispersa em clorofórmio após 5 dias de solubilização do compósito contendo 30% HA e a amostra HA-THF foi dispersa em etanol com a ajuda de ultrassom. As tensões utilizadas para as imagens com elétrons retroespalhados e secundários foram 15 kV e 2 kV, respectivamente.

4.9 Caracterização mecânica

A caracterização mecânica foi feita através da análise dinâmico-mecânica (DMA) à temperatura ambiente, utilizando um aparelho TA Instruments DMA Q800 no modo tensão x deformação para amostras retangulares, até o limite de deformação do aparelho, que ocorreu antes da falha dos filmes compósitos. As amostras foram cortadas em tiras de 18 mm de comprimento, 5 mm de largura e 0,5 mm de espessura. A análise foi feita em triplicata para a NR e compósitos contendo de 10%, 20% e 30% HA. Valores de modo elástico foram obtidos para deformações a 5%.

5 Resultados e Discussão

5.1 Reação de Síntese

Nesse estudo foram avaliados compósitos HA/NR nas concentrações 10%, 20% e 30% HA e amostras de HA sintetizadas na presença da NR (HA-NR-THF), obtidas do compósito contendo 30% HA, e sintetizadas apenas em THF (HA-THF). O motivo da estratégia de reação adotada se deve ao fato da NR conter moléculas biológicas ligadas à sua cadeia polimérica que poderiam exercer controle sobre o tamanho de cristalitos das partículas sintetizadas e melhorar a sua dispersão na matriz: um fosfolipídio e uma proteína (RAO & CÖLFEN, 2016). Adicionando sítios de nucleação através das macromoléculas, espera-se que as partículas apresentem um tamanho de cristalito homogêneo. Este método também é vantajoso devido ao menor número de etapas necessárias para se produzir o material. Caso a HA fosse sintetizada separada da matriz de NR, seria necessário se realizar uma etapa adicional para dispersão das partículas. Na estratégia proposta, as partículas são nucleadas ao longo dos sítios de nucleação contidos nas macromoléculas, precipitando já na forma dispersa. Um esquema para o mecanismo proposto para a síntese é apresentado na Fig. 12-I. A proteína e o fosfolipídio ligado covalentemente à cadeia da NR possuem grupos negativos que poderiam atrair os íons Ca^{2+} , a partir dos quais a HA nuclearia com a adição do reagente contendo os grupos PO_4^{3-} , de forma íntima com a cadeia polimérica. Os sítios de nucleação organizados ao longo da macromolécula adicionam ordem ao processo de precipitação.

Comparando-se o aspecto das misturas ao longo do processo de precipitação fica evidente a diferença na dispersão do produto da reação (Fig. 12-II). O produto sintetizado na presença de NR teve aspecto leitoso e não foi possível observar qualquer tipo de separação de fase ou partícula identificável a olho nu.

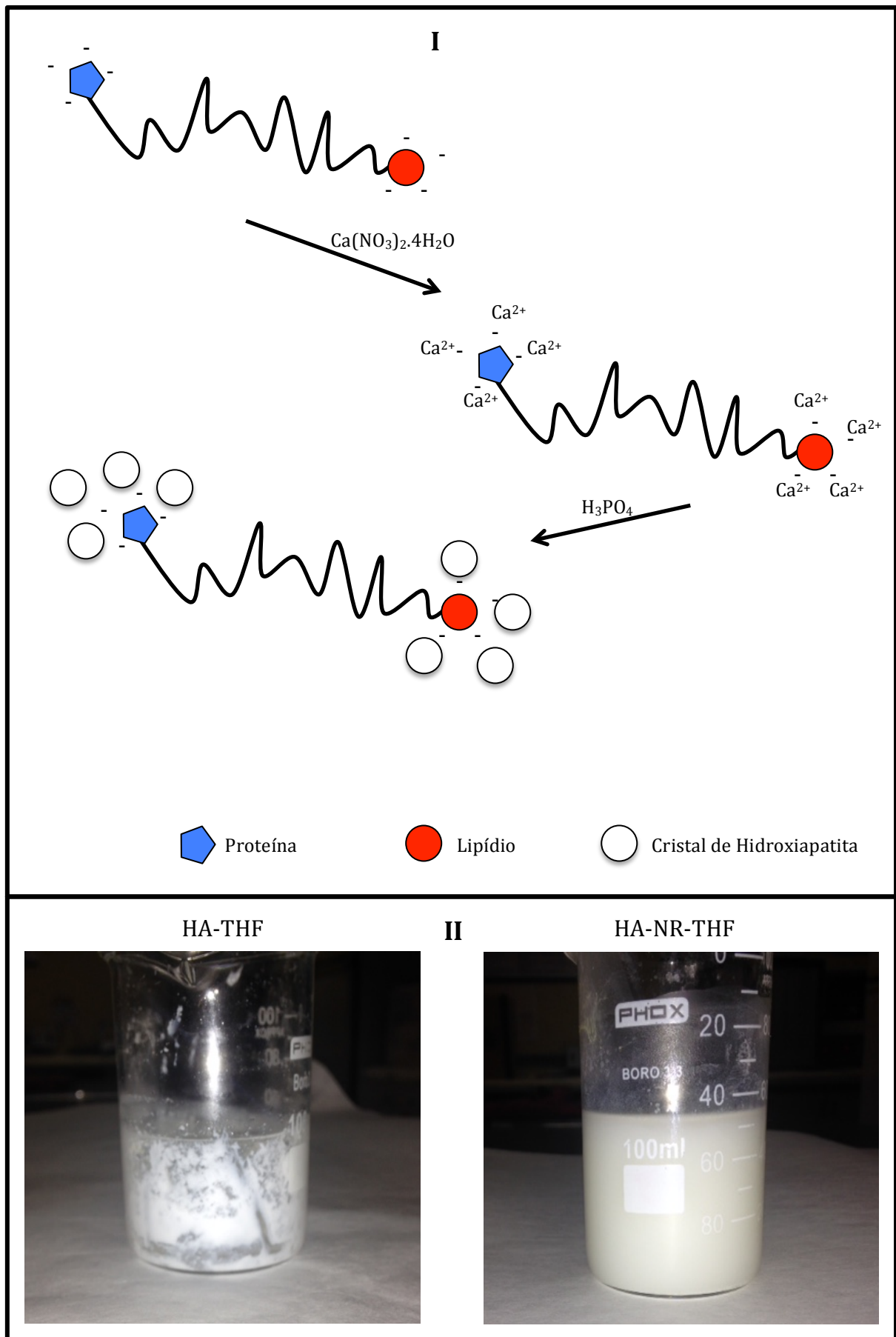


Fig. 12. I - Mecanismo de precipitação proposto, e II - efeito na dispersão em THF.

Não foi observado qualquer tipo de produto decantado ou separação de fase quando a agitação da mistura foi interrompida, indicando o caráter coloidal da mistura. O produto da reação realizada apenas em THF teve um aspecto completamente diferente, se aglomerando nas paredes do becker desde o início da reação de síntese, provavelmente devido à maior diferença de polaridade entre HA e THF em comparação com a diferença de polaridade entre HA e o vidro do becker.

Os filmes produzidos apresentaram coloração branca opaca e aspecto homogêneo, sem separações de fase visíveis, enquanto o filme de borracha natural se mostrou transparente. Na Fig. 13 os filmes de NR e compósito contendo 30% HA são mostrados.



Fig. 13. Filme de NR purificada (esquerda) e compósito contendo 30% HA (direita).

5.2 Análise de Fases por Difração de Raios X

A Fig. 14 apresenta o espectro de difração de raios X dos filmes compósitos contendo 10%, 20% e 30% de HA. Não são observados picos referentes ao nitrato de amônio, o que significa que a remoção em água foi eficiente. Não estão presentes picos de nenhuma outra fase de fosfatos de cálcio como hidrogeno fosfato de cálcio (monetita: pico mais intenso em $30,3^\circ$) ou β -fosfatos tricálcicos (β -TCP: pico mais intenso em $30,9^\circ$) comumente presente em reações de síntese em que o pH não é mantido básico (TAKEUCHI et al., 2016 ; DUNCAN et al., 2014 ; CIMDINA & BORODAJENKO, 2012). O padrão referente à HA torna-se mais evidente com a maior concentração nos compósitos (ficha nº 09-0432-HA).

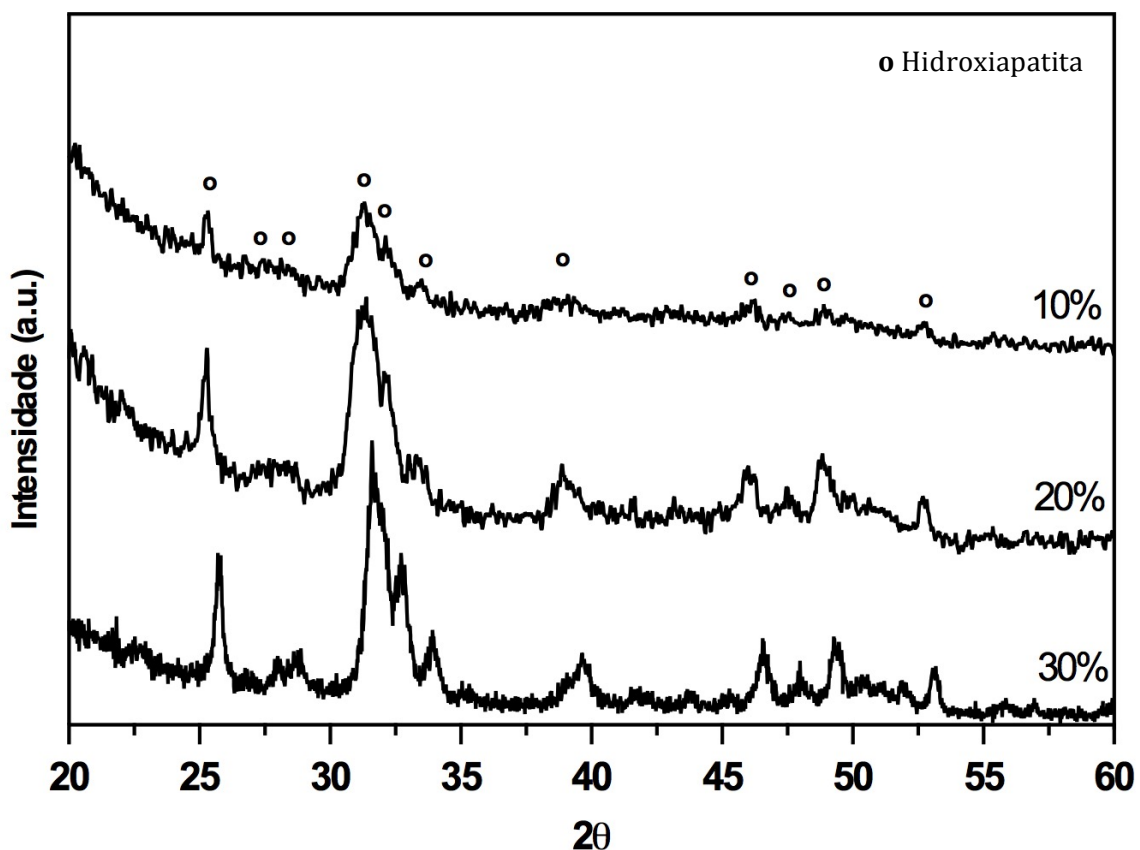


Fig 14. Padrões de DRX dos compósitos contendo 10%, 20% e 30% HA.

A Fig. 15(a) apresenta um espectro de DRX da HA separada do compósito contendo 30% HA (HA-NR-THF) e a figura 15(b) o espectro da amostra sintetizada sem presença de polímero (HA-THF). Ambos os espectros correspondem à HA, sem

presença de impurezas ou outras fases de fosfato de cálcio, e apresentam picos largos e sobrepostos, característicos de HA nanocristalina.

É possível se relacionar o alargamento dos picos de difração com fatores instrumentais, deformação da rede e tamanho dos domínios cristalinos na amostra (CULITY & STOCK, 2014). O alargamento dos picos pode ser medido pela largura a meia altura do pico (FWHM, do inglês *full width at half maximum*), ou dividindo a integral do pico pela sua intensidade. Para se obter a influência no alargamento apenas devido tamanho de cristalito da amostra é preciso primeiramente separar os diferentes efeitos no alargamento, como segue.

$$\beta_{obs} = \beta_{tam} + \beta_{inst} \quad (2)$$

Onde β_{obs} é ao alargamento observado total do pico, β_{inst} é o alargamento causado por fatores instrumentais, relativos a parâmetros físicos do difratômetro utilizado, e β_{tam} é o alargamento causado pelo tamanho reduzido dos domínios cristalitos no material. Para se obter o valor de β_{inst} foi realizada DRX de um amostra padrão de silício em que não existem tensões não uniformes na rede e o tamanho de cristalito é grande o suficiente para considerar o β_{tam} desprezível (Fig. 16). O β_{inst} foi obtido fazendo o ajuste de curvas dadas pela função de Lorentz.

Para se obter informações a respeito do tamanho de médio de cristalito foi realizado o *fitting* da curva utilizando a função de Lorentz para separar os picos sobrepostos e remover o efeito da linha de base com a ajuda do software MagicPlot. O tamanho de cristalito foi calculado pela lei de Scherrer, usando FWHM como medida do alargamento dos picos, como segue:

$$t = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3)$$

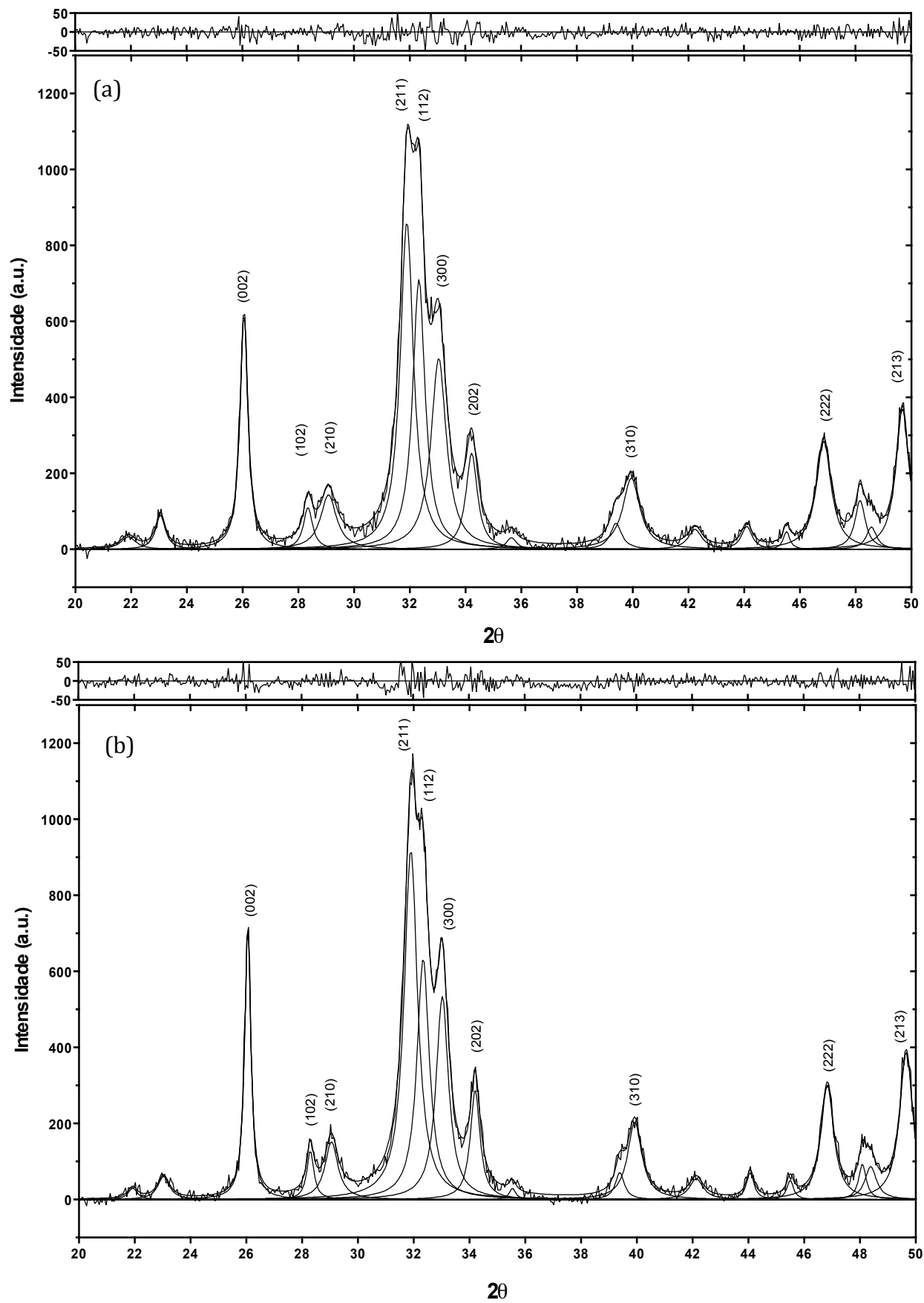


Fig. 15. Padrões de DRX das amostras de HA usados para cálculo de tamanho de cristalito pela Lei de Scherrer: (a) Sintetizada na presença de NR e (b) apenas THF

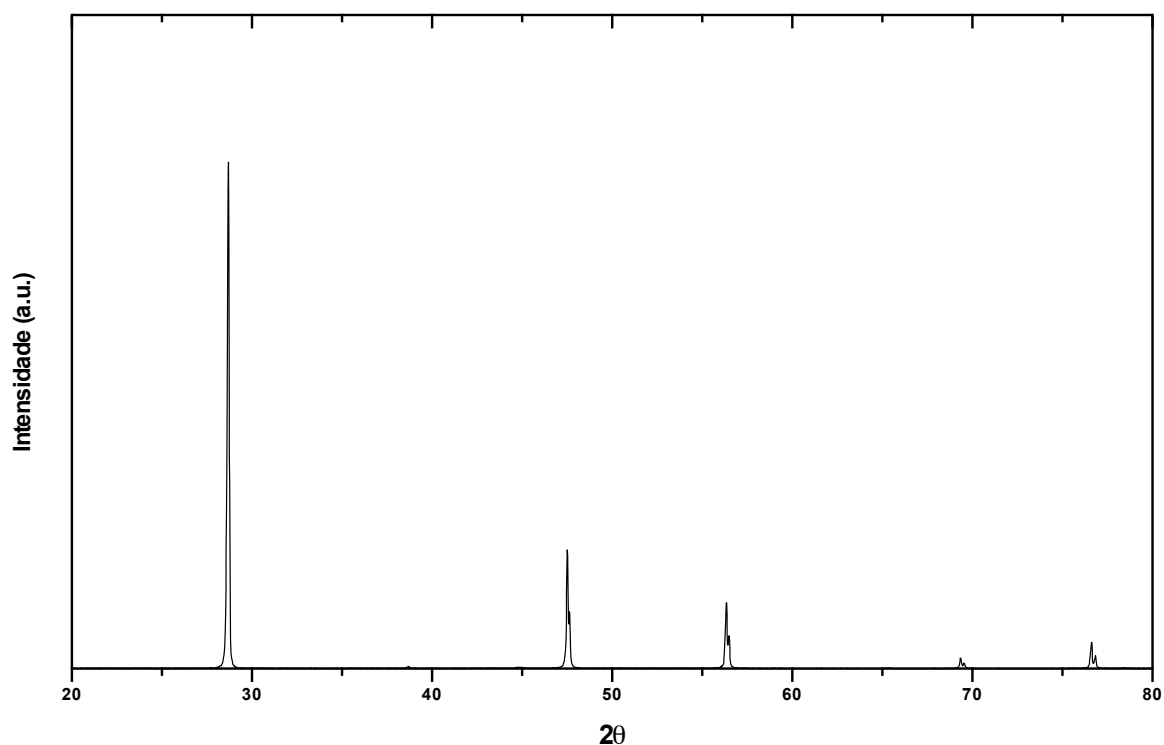


Fig. 16. Padrão de DRX do padrão de silício, utilizado para calcular o alargamento instrumental (β_{ins})

Onde $\beta_{obs} = \beta_{tam} + \beta_{inst}$, θ_{β} é o ângulo correspondente ao máximo de intensidade do pico, λ é o comprimento de onda ($\text{Cu K}\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$), t é o tamanho médio dos domínios cristalinos e K é uma constante adimensional normalmente tomada como valores entre 0,86-0,94. Deve-se notar que o tamanho de cristalito obtido pela lei de Scherrer deve ser tomado apenas como uma aproximação, pois são feitas diversas suposições para a validade deste método. Uma das principais fontes de erro está na determinação da constante K , pois é difícil determinar o exato formato dos cristalitos, por isso normalmente a constante é arredondada para 0.9. No entanto, apesar das fontes de erro, a Lei de Scherrer ainda é considerada uma poderosa ferramenta quando o objetivo é comparar diferentes amostras (LANGFORD, 1978).

Os picos em 26.05° ($\theta_{\beta}=(002)$) e 33.04° ($\theta_{\beta}=(300)$) foram avaliados com o objetivo de se descobrir se existe um crescimento preferencial ao longo do eixo 002. Essa tendência depende da temperatura da etapa de envelhecimento. Se sabe

que HA com formato acicular é formada em temperaturas elevadas ($T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$) (WANG et al., 2010 ; RODRIGUES-LOURENZO & VALLET REGÍ, 2000). Tal crescimento anisotrópico levaria a texturas preferenciais, levando a variações no tamanho de cristalito, observados como picos intensos em determinados ângulos. Os valores de largura a meia altura e “t” estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados de tamanho de cristalito obtidos pela Lei de Scherrer.

Método de síntese da amostra	(hkl)	θ_{β}	β_{tam}	$t(nm)$
Na presença de polímero	(002)	26.05	0.338	34.85
	(300)	33.03	0.664	14.78
Sem presença de polímero	(002)	26.06	0.264	51.01
	(300)	33.04	0.537	19.15

Como pode ser observado, o alargamento dos picos na amostra sintetizada na presença de NR é maior, representando um menor tamanho médio de cristalito, com dimensões de 14.78 - 34.85 nm, em comparação com a amostra sintetizada apenas em THF, com dimensões de 19.15 - 51.01 nm. Quando se adiciona um polímero em solução no momento da síntese, se coloca a disposição mais possíveis sítios de nucleação para a precipitação, portanto, para um mesma quantidade de material sintetizado é esperado um tamanho de cristalito menor (MOLLAZADEH et al., 2007). No caso da NR, se tem como grupos terminais da cadeia polimérica uma proteína e um fosfolípido, que possuem grupos químicos negativamente carregados, atraindo os íons cálcio, a partir dos quais ocorre a precipitação da HA. Essa interação da cadeia polimérica é útil não apenas para se obter um menor tamanho de cristalito, mas também para se obter uma distribuição mais homogênea de tamanhos, melhor dispersão e maior interação da matriz polimérica com as partículas, resultando em melhores propriedades mecânicas e biológicas (NUDELMAN & SOMMERDIJK, 2012).

5.3 Análise FTIR

A análise espectroscópica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) permitiu confirmar a ausência de impurezas na amostra e fazer diversas observações a respeito da estrutura química do material. No caso de fosfatos de cálcio essa análise é importante, em complemento a técnica de DRX, para comprovar a formação de HA através dos máximos de vibração de $[\text{OH}^-]$, obter informações a respeito da estequiometria da HA formada e sua estabilidade térmica. A HA biológica normalmente é deficiente em cálcio e apresenta substituição por CO_3^{2-} . Dois tipos de substituição são possíveis: (1) substituição direta de OH^- por CO_3^{2-} (Tipo A de substituição $(\text{CO}_3)^{2-} \leftrightarrow 2\text{OH}^-$) e (2) substituição de PO_4^{3-} em um grupo tetraedral por CO_3^{2-} (substituição do tipo B). A substituição de grupos pode provocar mudanças características em parâmetro de rede, cristalinidade, simetria cristalográfica, estabilidade térmica, morfologia, solubilidade, características químicas, físicas e biológicas. Os grupos químicos mais característicos do FTIR da hidróxiapatita sintética são PO_4^{3-} , OH^- , CO_3^{2-} , assim como HPO_4^{2-} , que caracteriza a HA não estequiométrica (Shi, 2006).

A borracha natural tem uma estrutura complexa com sobreposições de bandas. Através do FTIR é possível distinguir entre uma NR purificada ou não através de grupos amina e éster referentes a proteínas e lipídios. Recentemente o FTIR foi usado para caracterizar o percentual lipídico e proteico da borracha natural de forma quantitativa, sob a vantagem de ser um método não destrutivo (ROLERE et al., 2015)

Na Fig. 17 estão os espectros de FTIR da HA sintetizada *in situ*, da NR e do compósito 30% HA. No espectro referente à HA (Fig. 17 (a)) é observado o sinal próximo a 630 cm^{-1} , referente ao grupo $[\text{OH}^-]$, que comprova que o fosfato de cálcio sintetizado é realmente HA. Outro pico considerado característico da HA se encontra próximo à 3570 cm^{-1} , no entanto este pico não se encontra nítido devido

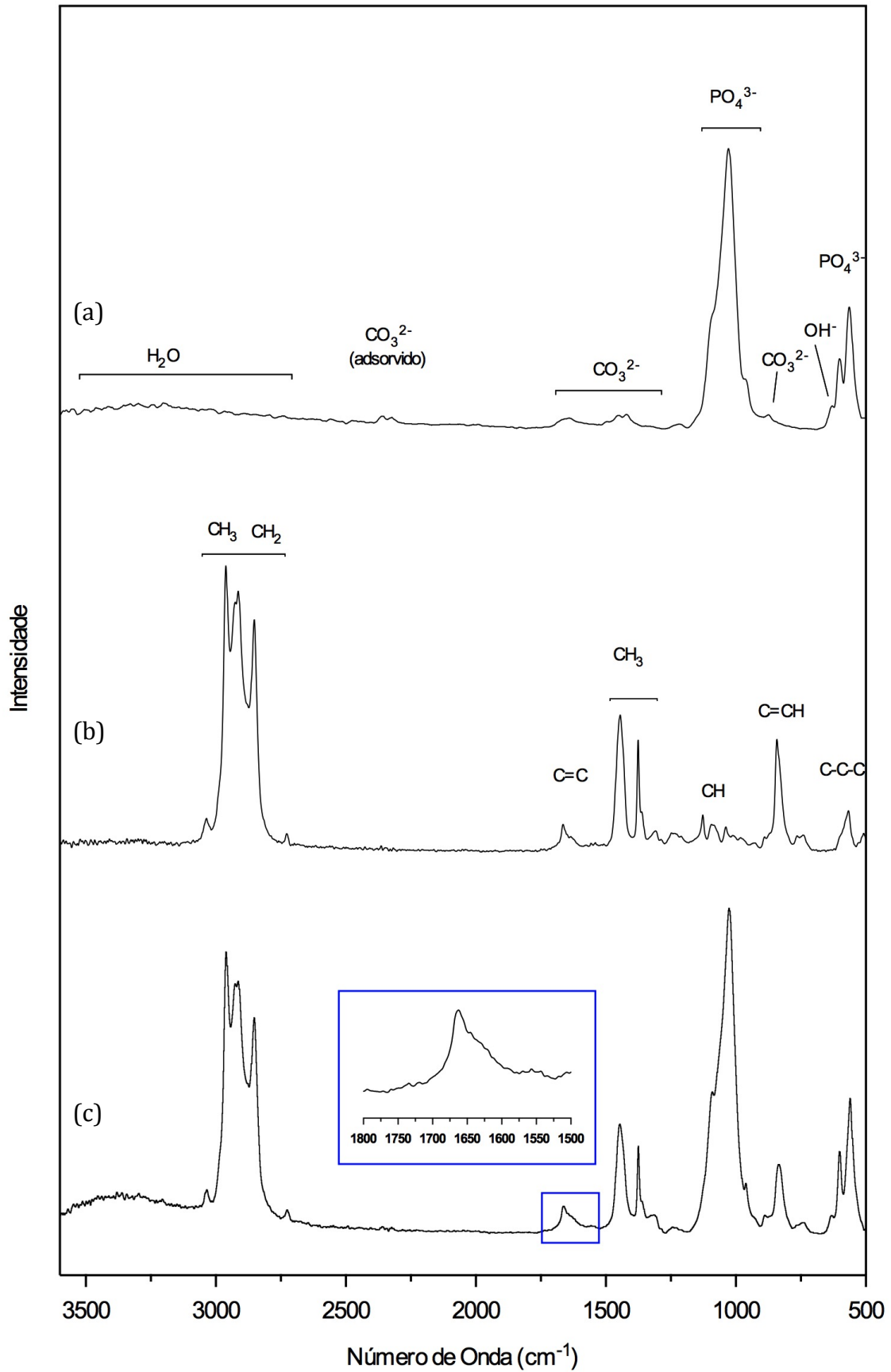


Fig. 17. Espectros de (a) HA sintetizada na presença de NR, (b) NR e (c) compósito 30% HA.

à banda referente à água adsorvida que se estende de 2600 a 3600 cm^{-1} . As bandas referentes a $[\text{PO}_4^{3-}]$ em 460 cm^{-1} , 560-600 cm^{-1} e 1000-1100 cm^{-1} são características de fosfatos de cálcio. Os sinais referentes a $[\text{CO}_3^{2-}]$ próximos a 860 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} são característicos de presença de substituição do tipo B, onde $[\text{CO}_3^{2-}]$ substitui os $[\text{PO}_4^{3-}]$ (MEEJOO et al., 2006). Também pode ser visto um pico referente à $[\text{CO}_3^{2-}]$ adsorvido. Não se observam picos referentes a $[\text{HPO}_4^{2-}]$, que seriam encontrados próximos a 880 cm^{-1} , que caracterizam HA deficiente em cálcio (KWON et al., 2003). A HA deficiente em cálcio possui menor estabilidade térmica, sofrendo degradação para β -TCP entre 600°C - 800 °C. Este resultado é coerente com aquele de TGA, em que HA não sofreu grandes perdas de massa em altas temperaturas, e sim uma pequena perda gradual, que pode ser relacionada a liberação de $[\text{CO}_3^{2-}]$.

Na Fig. 17(b) apresenta-se o espectro referente à borracha natural purificada. Entre 2670 cm^{-1} e 3050 cm^{-1} observa-se uma banda característica referente a estiramentos simétrico e assimétricos de CH_3 e CH_2 . Observa-se também estiramento simétrico C=C (1660 cm^{-1}) deformação assimétrica CH_3 (1300-1375 cm^{-1}), estiramento simétrico CH_2 (1241 cm^{-1} e 1084 cm^{-1}), dobramento fora de plano C=C-H (840 cm^{-1}) e dobramento no plano C-C-C (567 cm^{-1}). Em borrachas naturais não purificadas observam-se picos referentes a proteínas (amida I e II: 1541 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , estiramento N-H: 3283) e lipídios (1711 cm^{-1} e 1748 cm^{-1})(ROLERE et al., 2015). Como pode ser observado nos espectros da NR purificada e do compósito, estes picos não se encontram presentes, significando que o produto final possui teor reduzido de proteínas (observar região aumentada em Fig. 17(c)). É importante poder dispor de outros processos de purificação para a borracha natural além da centrifugação, uma vez que esta remove apenas as proteínas que se encontram dissolvidas no soro do látex, deixando presentes aquelas ligadas às partículas de borracha. Com o método de purificação por precipitação após a centrifugação é possível remover quantidades maiores de proteína caso se mostre necessário, e pode se escolher entre realizar uma ou várias etapas de precipitação, dependendo da quantidade de proteína deseja-se remover. Desta forma é possível utilizar a NR em aplicações em que esta seria descartada devido ao seu conteúdo proteico. No entanto, é provável

que a NR sem proteínas não possui as mesmas propriedades regenerativas do que a NR que foi apenas centrifugada, uma vez que uma das frações de proteínas do látex é angiogênica (BARREIROS et al., 2014 ; MRUÉ, 2013). Não foram observados sinais de NR na amostra de HA separada do polímero (Fig 17(a)). Isso pode ter ocorrido porque a análise foi feita apenas nas partículas que se mostraram desaglomeradas após 5 dias de agitação em clorofórmio, que provavelmente eram aquelas que não estavam ligadas à NR ou tiveram sua interação quebrada devido ao tempo de exposição ao clorofórmio.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Fig. 18 apresenta imagens de MEV por elétrons retroespalhados das superfícies dos filmes compósitos, contendo 10 %, 20% e 30% HA. Este modo de imagem foi utilizado para se obter uma visão geral da dispersão das partículas na matriz de NR devido ao maior contraste entre matriz e partícula, utilizando-se um aumento de 5.000x. No compósito de 10% HA (Fig. 18(a)), as partículas aparentam estar bem dispersas na matriz, sem presença de regiões de grande aglomeração. As amostras de 20% e 30% HA (Fig. 18. (b) e (c)) também apresentam boa dispersão, no entanto são observadas algumas regiões de concentração de partículas e dispersão menos homogênea que não foram encontradas na amostra de 10% HA. Todas as amostras aparentam ter uma superfície ondulada, provavelmente como característica do processo de evaporação de solvente, em que a superfície do filme solidifica antes do interior deixando o material com a superfície tensionada. Também são observados vazios e bolhas, que podem ser oriundos do $\text{NH}_4(\text{NO}_3)$ e da água formada durante a reação de síntese, posteriormente removidos na etapa de lavagem e evaporação, assim como da evaporação do THF. Uma evaporação mais lenta poderia evitar o excesso de deformação na superfície e vazios causados por bolhas aprisionadas, característicos de rápida evaporação em filmes poliméricos.

A Fig. 19 apresenta imagens por elétrons secundários das mesmas amostras no entanto, com um maior aumento (50.000x). Neste modo de imagem não se tem contribuição de elétrons de alta energia na formação da imagem, logo,

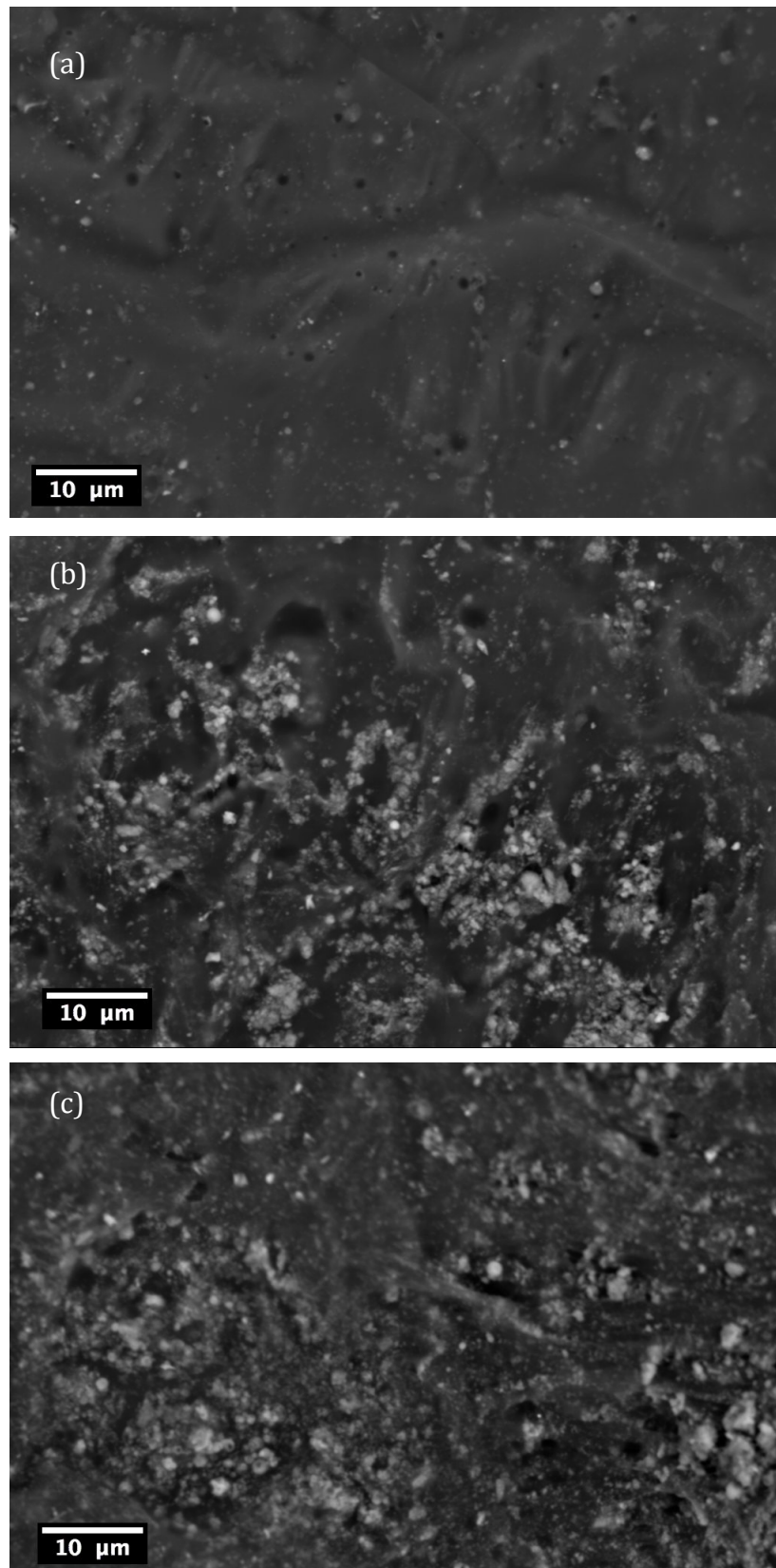


Fig. 18. Imagens de MEV por elétrons retroespalhados dos compósitos contendo (a) 10% HA, (b) 20% HA e (c) 30% HA. Aumento = 5.000 X

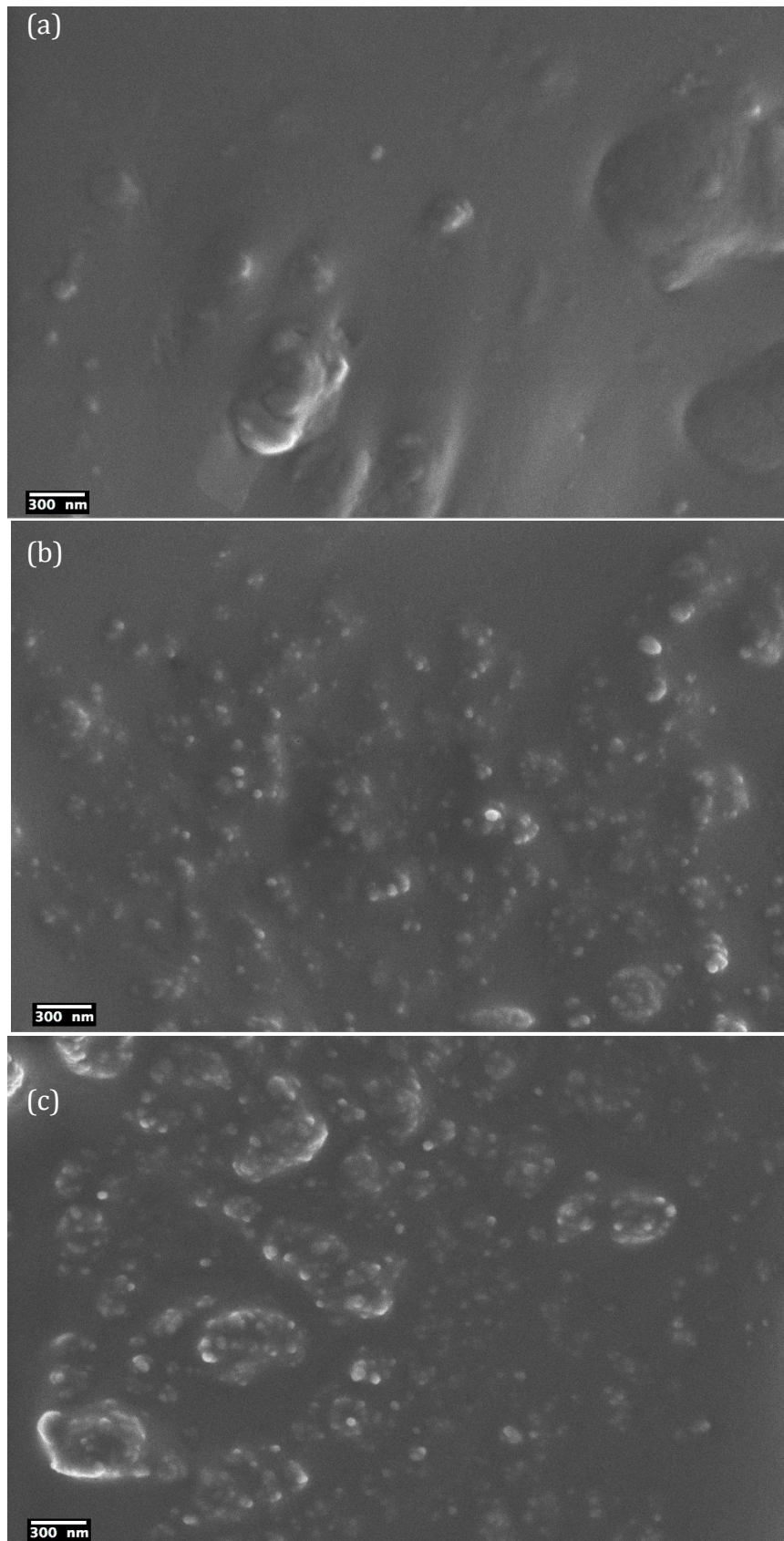


Fig. 19. Imagens de MEV por elétrons secundários dos compósitos contendo (a) 10% HA, (b) 20% HA e (c) 30% HA. Aumento = 50.000 X

são observadas apenas as partículas da superfície dos filmes. O compósito contendo 10% HA (Fig 19(a)) apresentou uma superfície lisa e com poucas regiões em que partículas puderam ser discernidas da matriz, provavelmente devido à boa dispersão das mesmas. No compósito contendo 20% HA (Fig 19(b)) também foram observadas regiões lisas, provavelmente correspondentes às regiões mais bem dispersas nas imagens por elétrons retroespalhados. No entanto, também estão presentes regiões com rugas em que as partículas são diferenciáveis da matriz. O compósito contendo 30% HA (Fig. 19 (c)) apresentou as mesmas regiões, no entanto em maior quantidade. Embora estas regiões tenham a aparência de aglomerados na Fig. 18, com maior aumento é possível observar que as regiões são formadas na verdade por partículas esféricas menores do que 100 nm que acompanham a rugosidade da superfície.

As partículas de HA separadas do compósito contendo 30% HA estão apresentadas na Fig. 20 e as partículas sintetizadas sem polímero estão apresentadas na Fig. 21. Devido à insolubilidade do filme compósito em solventes orgânicos após remoção de solvente, o método de separação consistiu na centrifugação do meio reacional para separação das partículas após 24 h de reação, e, uma vez que o material centrifugado aparentou conter NR, foi realizado um processo de dissolução em clorofórmio por 5 dias seguido de decantação. O material se mostrou menos solúvel do que antes da reação de síntese de HA, ainda restando produto aparentemente ligado à NR após os 5 dias de contato com o solvente, indicando algum grau de interação entre partículas e matriz polimérica. A fração que se mostrou mais dispersa em clorofórmio foi gotejada em um monocristal polido de silício e observada sem metalização. A amostra de HA-THF foi dispersa em álcool etílico anidro e gotejada no substrato de silício.

Foram encontrados dois tipos diferentes de regiões na amostra de HA-NR-THF sobre o cristal de silício. Uma bem dispersa, em muito menor proporção, com partículas separadas umas das outras, e outra formada por ilhas de partículas agrupadas em blocos.

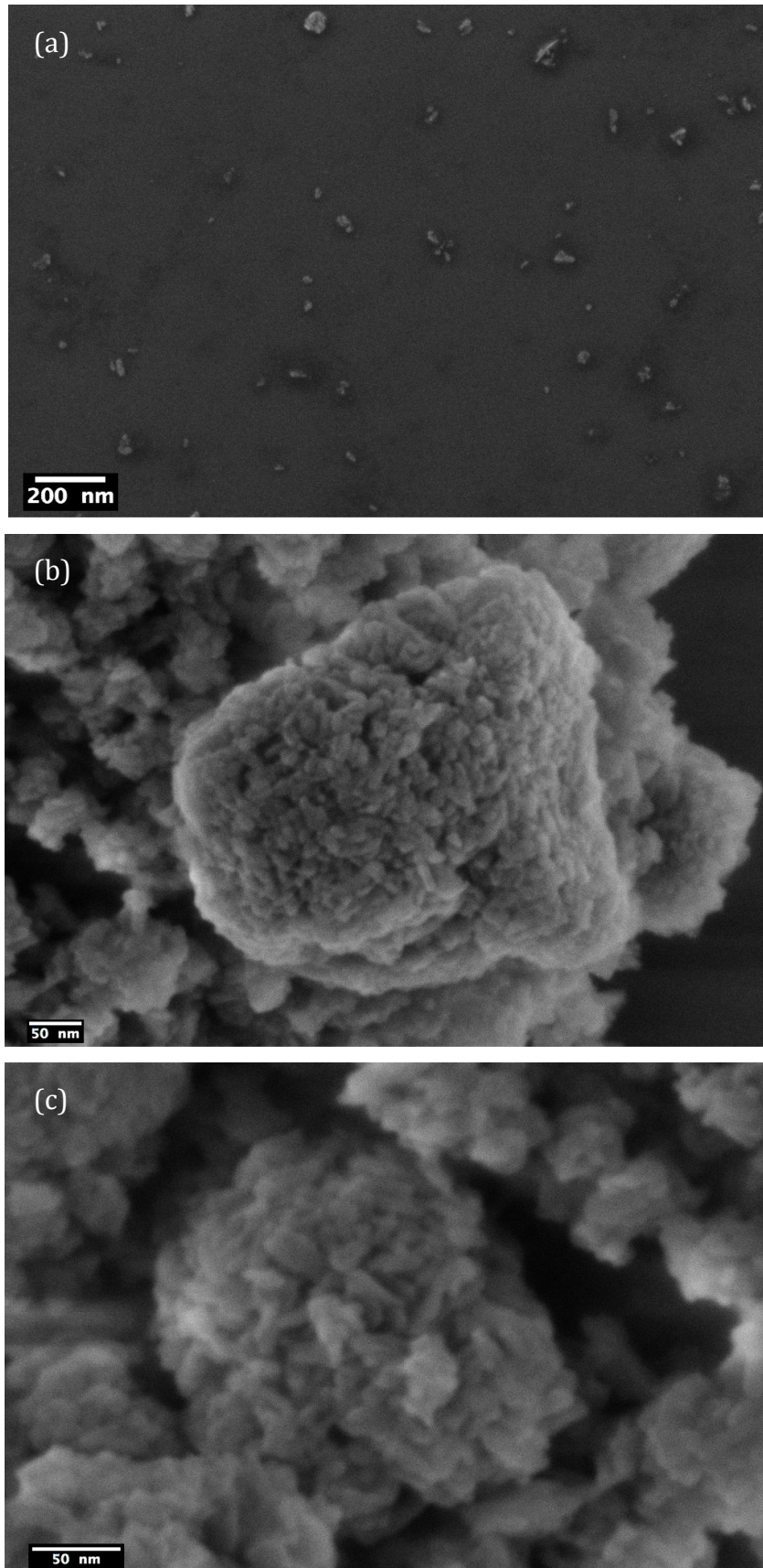


Fig. 20. Imagens de MEV por elétrons secundários das partículas de HA separadas do compósito contendo 30% HA: (a) região dispersa sobre substrato de silício(aumento de 100.000x); (b) e (c) regiões contendo blocos de partículas aparentam remoção incompleta de polímero (aumentos de 300.000x e 500.000x, respectivamente).

As partículas estão distribuídas desta maneira provavelmente devido a resquícios de NR, representando uma remoção incompleta da mesma, o que pode ser um indício de que houve uma forte interação entre a matriz de NR e as partículas de HA. A característica de insolubilidade da borracha natural em solventes que normalmente a dissolveriam devido à interação com partículas finamente dispersas é bem conhecida e extensivamente descrita na literatura para diversos tipos de cargas sob o nome de “fenômeno da borracha ligada” (*bound rubber phenomom*). Neste fenômeno, inicialmente observado para negro de fumo disperso em NR, a diminuição na solubilidade do material é causada devido à adsorção de moléculas de borracha na superfície das partículas, sendo uma consequência da atividade de superfície do reforço (MEISSNER, 1993).

Este fenômeno se torna mais pronunciado em compósitos contendo cargas nanométricas dispersas devido à maior área superficial (LEBLANC, 2002 ; MEISSNER, 1993). A insolubilidade observada para o compósito de 30 % HA em clorofórmio e os resquícios de polímero observados nas partículas podem ser devidos ao *bound rubber phenomom*, que, embora largamente descrito na literatura, nunca foi observado para partículas de HA. A interação da NR com as partículas de HA pode ter sido intensificada devido ao método de síntese empregado, em que a HA é formada na presença da NR, de forma muito mais íntima do que se fosse sintetizada separadamente e depois adicionada ao polímero.

As amostras HA-NR-THF e HA-THF apresentam tamanhos de cristalito compatíveis com aqueles obtidos com a Lei de Scherrer. Os cristalitos aparentam estar formando partículas separadas, ou seja, cada partícula corresponde a um domínio cristalino. Os cristalitos são levemente alongados possuindo uma direção preferencial de crescimento para ambas as amostras, mas este alongamento parece mais acentuado na amostra HA-THF (Fig. 21), o que também foi obtido utilizando a lei Scherrer. Também nota-se que as partículas da amostra HA-THF possuem bastante variação em seu formato e tamanho como pode ser observado na Fig. 21(b) e (c) onde são observados cristais desde agulhas até grãos esféricos. A amostra HA-NR-THF por outro lado apresenta cristalitos homogêneos, com tamanhos e formatos mais uniformes. Essa maior homogeneidade de tamanhos é

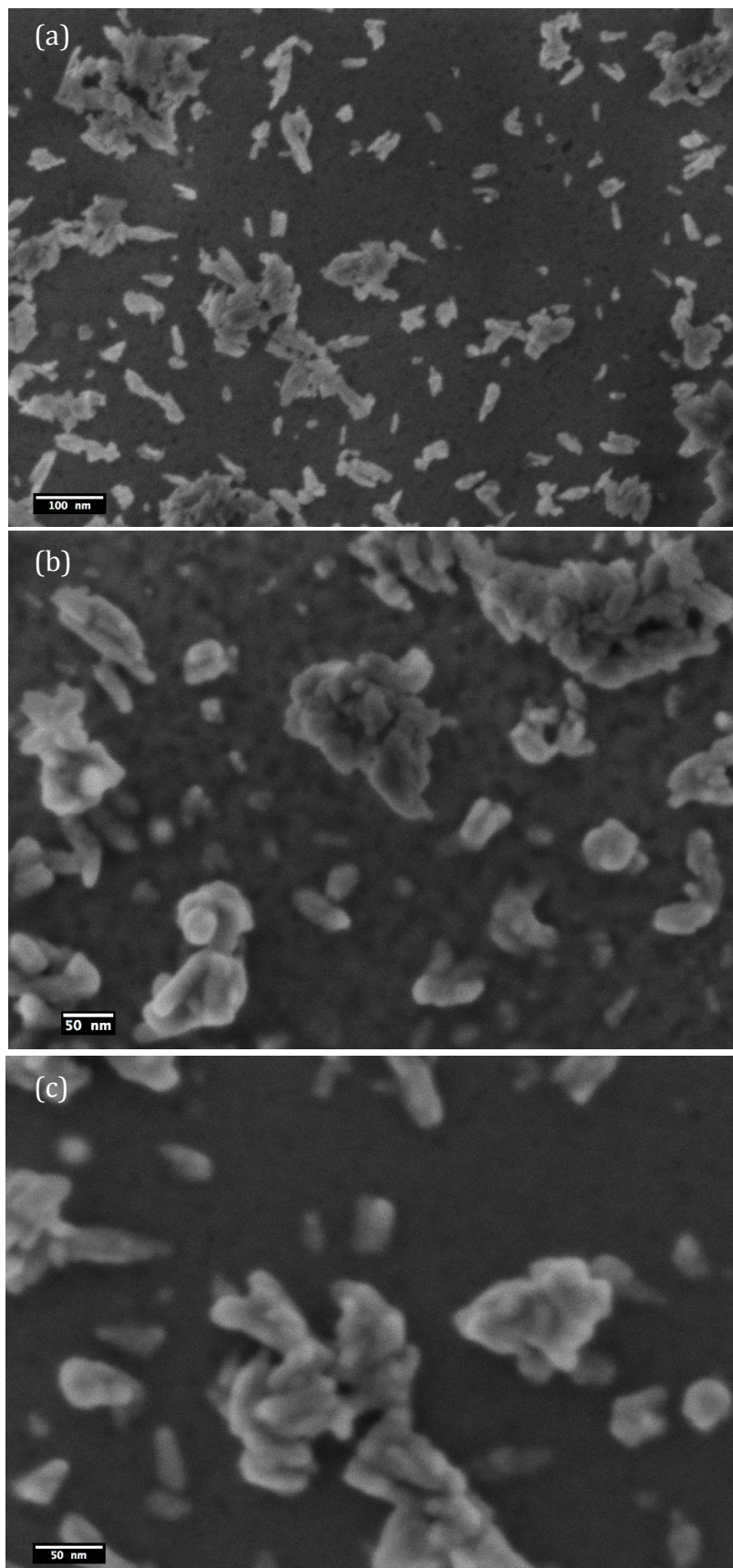


Fig. 21. Imagens de MEV por elétrons secundários das partículas de HA sintetizadas em THF: (a) aumento de 200.000x ; (b) aumento de 300.000x; (c) aumento de 400.000x.

reportada em HA sintetizada na presença de outras macromoléculas, e ocorre devido ao maior número de sítios de nucleação em comparação com uma síntese apenas em solvente, similarmente ao que acontece em organismos vivos (WOJAZINSKI et al., 2015 ; WANG et al., 2012). Durante a reação, a HA pode nuclear em sítios organizados pela estrutura da molécula.

5.5 Análise Termogravimétrica

A Fig. 22 mostra a análise termogravimétrica (TGA) e sua derivada pelo tempo (DTGA) de uma amostra com 30% HA analisada em atmosfera de ar sintético. O conteúdo teórico esperado de HA foi comparado com o valor experimental com o objetivo de se obter o rendimento da reação usando a análise por TGA. A perda de massa por evaporação da água adsorvida corresponde a aproximadamente 1,29%. Na atmosfera de ar sintético a degradação da NR ocorreu em duas etapas, como pode ser observado na curva DTGA, que apresenta dois picos exotérmicos. A degradação da NR não ocorre antes de 220 °C, e a partir de 500 °C já está completamente degradada, se apresentando como um processo em duas etapas (CANZHONG et al., 2013) com eventos com máximos em 375 °C e 466 °C. Não são observados picos de degradação de NH_4NO_3 , o que demonstra que o processo de remoção por lavagem em água foi eficiente. O gradual decréscimo em massa entre 500°C e 1000°C se deve à lenta eliminação de grupos carbonato ligados à HA, presença dos quais foi confirmada por FT-IR (seção 5.3). Não houve perda de massa significativa na região entre 600–1000°C, na qual conhecidamente HA se transforma em β -TCP (CIMDINA & BORODAJENKO, 2012 ; MEEJOO et al. 2006). A reação de decomposição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaO} + \text{H}_2\text{O}$ pode ser promovida por pequenas quantidades de impurezas ou não-estequiometria do pó de HA (AHN et al. 2001 ; HUNG et al., 2012). A HA sintetizada se mostrou termicamente estável até mais de 900 °C. Com o uso da curva DTGA pode-se afirmar que a perda de massa é lenta e quase insignificante em temperaturas elevadas, e ocorre gradualmente com o aumento da temperatura, sugerindo que a razão Ca/P é próxima àquela correspondente à da HA estequiométrica.

Para analisar o produto de HA da reação obtida por precipitação, a análise

TGA foi realizada para as composições de 10, 20 e 30% de HA em 3 pontos diferentes dos compósitos. O teor real de HA no material compósito pode ser determinado através da razão da massa final de HA a 750 °C com aquela a 220 °C, que corresponde à amostra contendo apenas HA e polímero (MEENAN et al., 2000). Os percentuais de HA experimentais foram plotados em relação aos valores

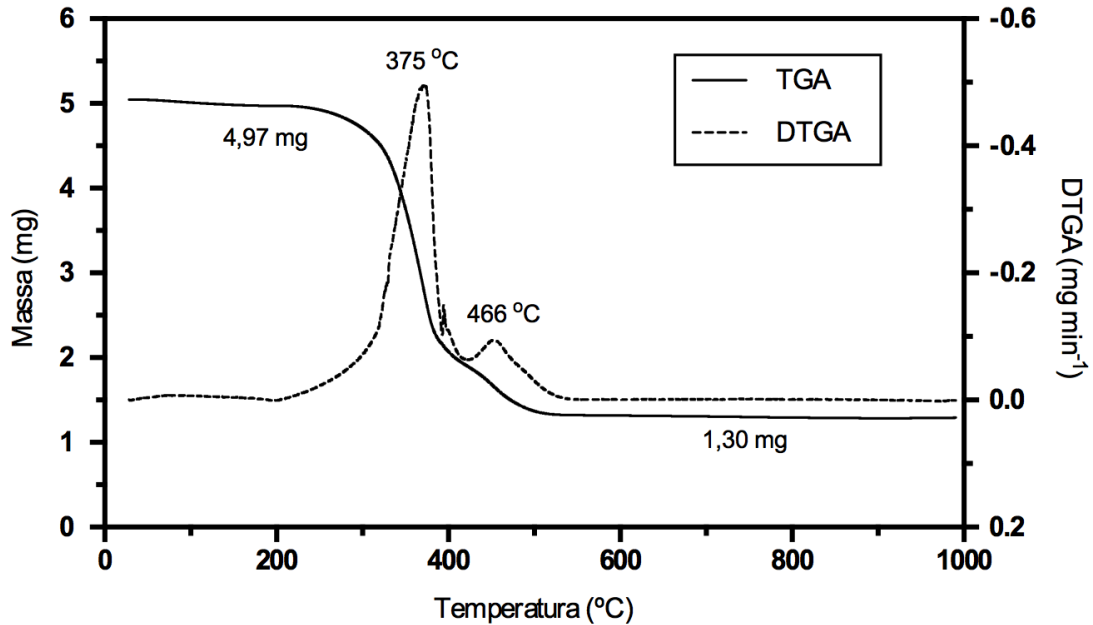


Fig. 22. Curva TGA/DTGA da amostra 30% HA

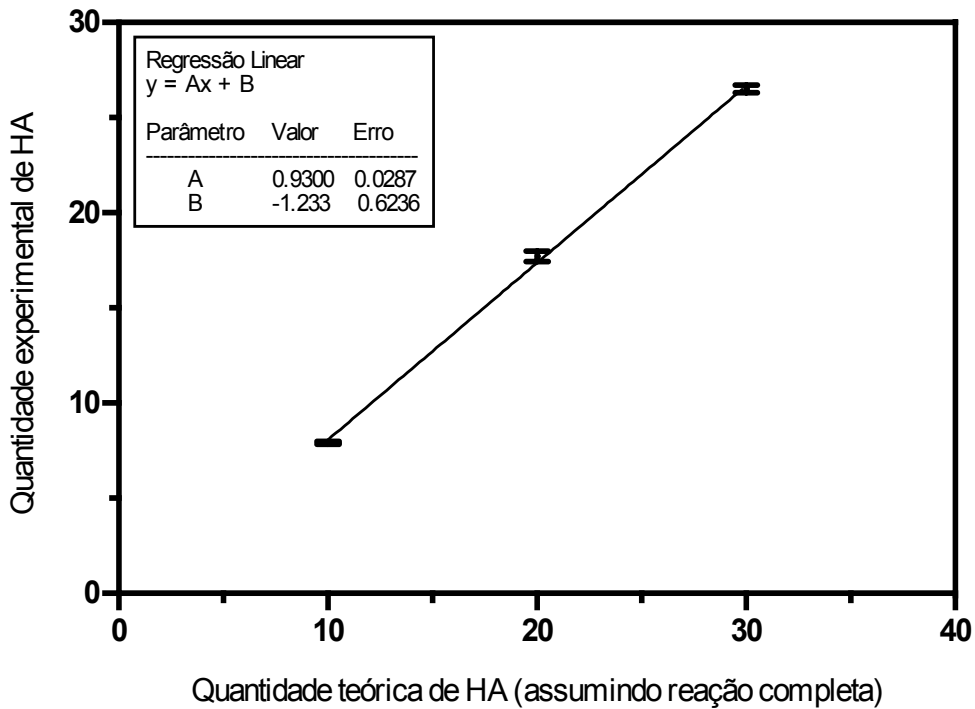


Fig. 23. O rendimento experimental e o calculado para a reação de síntese da HA (n=3).

teóricos (Fig. 23), que se referem a um valor que seria obtido caso os reagentes reagissem por completo e não houvessem erros experimentais. Não houve uma variação significativa observada para as amostras contendo diferentes quantidades de HA. A inclinação da reta gerada da plotagem foi 0,93, o que indica que o rendimento da reação foi aproximadamente 93% do calculado. Logo, pode-se afirmar que as amostras denominadas como contendo 10%, 20% e 30% HA (calculado) na verdade são amostras contendo aproximadamente 9,3%, 18,6% e 27,9% de HA.

5.6 Caracterização Mecânica

A análise por DMA foi utilizada para se obter uma relação entre o percentual de hidroxiapatita presente no compósito e o aumento da rigidez na forma de um ensaio de tração até a deformação máxima do aparelho. Foram utilizadas amostras retangulares recortadas dos filmes produzidos. Um ensaio de tração realizado até a falha não se mostra absolutamente necessário num primeiro

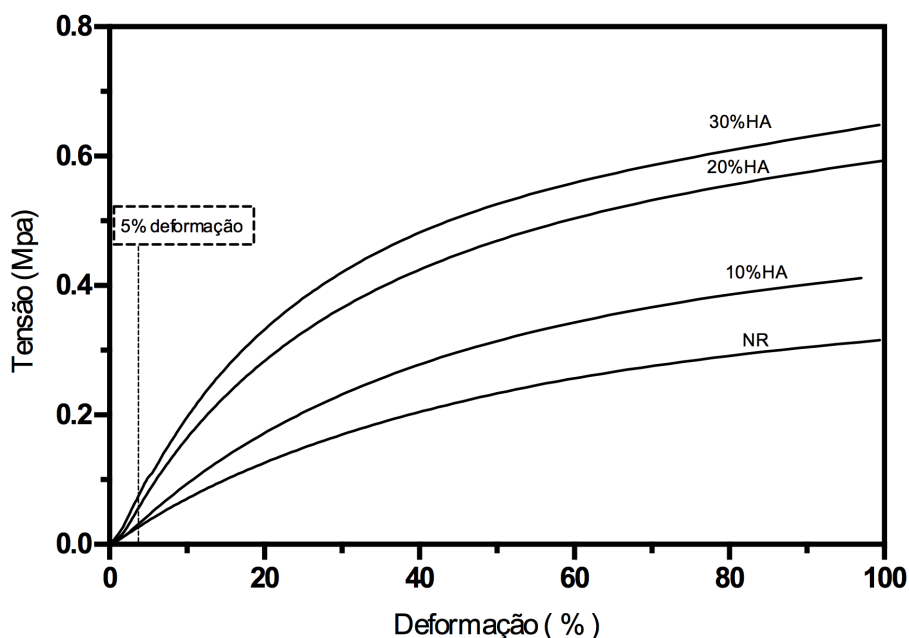


Fig. 24. Curvas Tensão x Deformação para a NR e o compósito contendo momento, uma vez que um biomaterial pouco provavelmente seria empregado até as altíssimas deformações observadas para a borracha natural. A borracha natural possui um módulo de elasticidade que varia conforme o percentual de deformação

da amostra, desde deformações muito pequenas, não possuindo uma ampla região elástica linear bem definida. Portanto, usualmente se usam valores de módulo de elasticidade pontuais indicados para diferentes deformações (GORDON, 1976). Foram escolhidas as deformações a 5%, como demonstrado na Fig. 24 para NR e os compósito HA/NR.

Na Fig. 25 estão apresentados os valores de módulo de elasticidade para todas as amostras. O módulo de elasticidade da NR foi de $0,75 \pm 0,01$ MPa. Todas as amostras contendo HA apresentaram aumento no módulo, significando que houve interação satisfatória das partículas com a matriz. O compósito contendo 10% HA apresentou o módulo de $0,99 \pm 0,02$ MPa. Houve um maior aumento proporcional ao percentual de HA para os compósitos contendo 20% HA e 30% HA, sendo $1,72 \pm 0,09$ MPa e $2,50 \pm 0,08$ MPa, respectivamente. É possível que isto ocorra devido a existência de um ponto crítico de concentração em que a proximidade entre as partículas é tal que permite que as cadeias poliméricas se liguem a mais de uma partícula, gerando uma rede tridimensional, aumentando a quantidade de borracha ligada e o módulo de elasticidade do material (LEBLANC, 2002). É importante notar que a produção de compósitos HA/NR por mistura física não

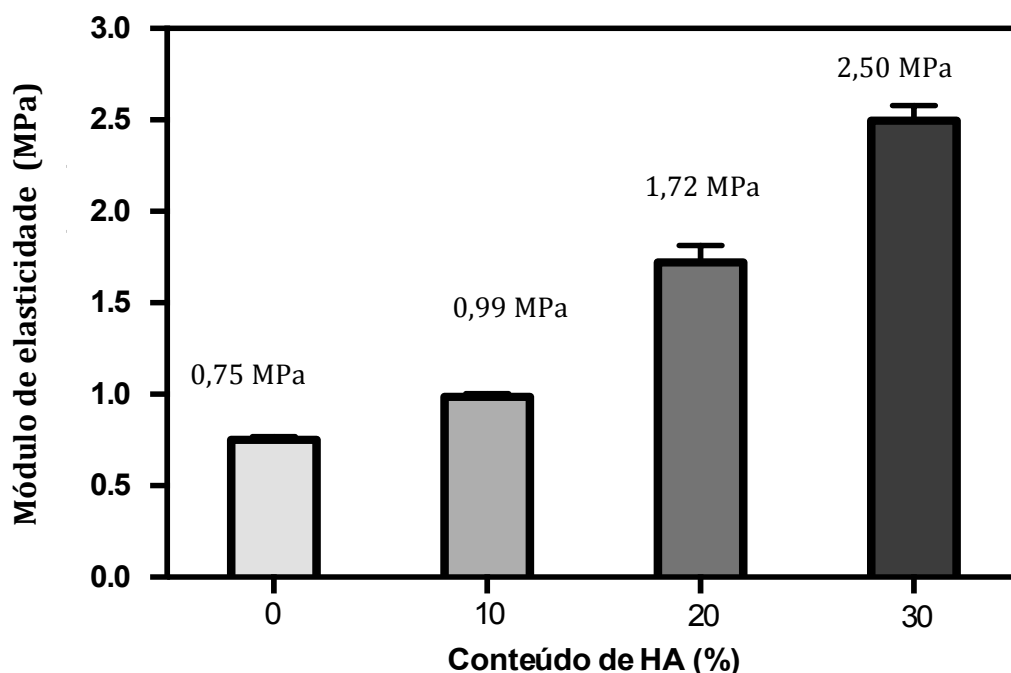


Fig. 25. Variação do módulo de elasticidade a 5% de deformação com o percentual teórico de HA.

gerou um aumento no módulo de elasticidade para compósitos contendo 10% HA (NASCIMENTO et al., 2014), podendo significar que o método de precipitação *in situ* proporcione maior interação e dispersão na matriz polimérica do que uma simples mistura física.

6. Conclusões

Compósitos HA/NR nas concentrações de 10%, 20% e 30% HA foram sintetizados *in situ* por uma reação de precipitação não aquosa à temperatura ambiente na presença de NR. As partículas se mostraram bem dispersas no meio durante a reação de síntese e não apresentaram segregação visível a olho nu. Diferentemente, a HA sintetizada em THF sem presença de NR gerou um produto aglomerado, indicando que a presença de NR durante a precipitação atuou de forma determinante na dispersão das partículas.

A análise por DRX mostra que a HA foi a única fase de fosfato de cálcio formada em todas as amostras, indicando que o controle do pH e estequiometria entre reagentes precursores foi suficiente para exercer controle sobre o produto formado. As partículas removidas do compósito contendo 30% HA foram comparadas quanto ao tamanho de cristalito com aquelas sintetizadas sem presença de NR utilizando a Lei de Scherrer, indicando que o produto formado na presença de borracha natural apresentou domínios cristalinos com tamanho médio inferior, e ambas as amostras apresentaram crescimento preferencial no eixo (002).

As imagens de MEV por elétrons retroespalhados da superfície dos filmes compósitos indicaram que a amostra contendo 10% HA apresenta melhor dispersão que as amostras contendo 20% e 30% HA, e existe a presença de vazios na amostra, provavelmente causada por bolhas aprisionadas durante a formação dos filmes por evaporação e remoção de $\text{NH}_4(\text{NH}_3)$. As imagens por elétrons secundários da amostra contendo 10% HA não revelaram muitos pontos na superfície em que partículas puderam ser discernidas da matriz devido à boa dispersão das partículas, enquanto as amostras contendo 10% e 20% HA apresentaram regiões com rugosidades contendo regiões com HA nanodispersa e outras regiões planas com menor visibilidade de partículas. As imagens por elétrons secundários das partículas de HA (HA-NR-THF e HA-THF) revelaram

nanopartículas com tamanhos compatíveis com aqueles obtidos pela Lei de Scherrer e com crescimento preferencial em uma direção, indicando que as partículas são domínios monocristalinos. As partículas HA-NR-THF possuem tamanho de cristalito visivelmente mais homogêneo do que as partículas HA-THF e aparentam estar embebidas no que parecem ser restos de NR. A boa dispersão das partículas, assim como o seu tamanho reduzido, podem ter gerado uma interação física entre partículas e macromoléculas forte o suficiente para se obter borracha ligada. O resultados da caracterização mecânica por DMA reforça a ideia de que houve boa dispersão das partículas, uma vez que todos os compósitos apresentaram um módulo de elasticidade superior ao da borracha natural pura, e o aumento no módulo de elasticidade mais acentuado para as concentrações maiores de HA indicam uma concentração crítica que marca a transição de um gel disperso para um gel coerente.

O percentual real de HA nos compósitos foi analisado por TGA, revelando que o rendimento da reação de síntese de HA ficou próxima de 93%, portanto os compósitos calculados para conter 10%, 20% e 30% HA na verdade possuem 9.3%, 18.6% e 27.9% HA, respectivamente. Foi observado ainda que a HA sintetizada apresentou boa estabilidade térmica até 1000 °C, o que é um sinal de pureza e de que apresenta razão Ca/P próxima à estequiométrica. De forma complementar, os espectros de FTIR da HA apresentaram bandas características de uma HA sem deficiência de cálcio e com substituição PO_4^{3-} por CO_3^{2-} , além de comprovar que o processo de purificação utilizado foi bem sucedido em reduzir o conteúdo proteico da NR, o que pode ser importante dependendo de sua aplicação médica.

7 Anexo:

Scaffolds Hidroxiapatita/Poli(lactídeo-co-glicolídeo/Borracha Natural por Inversão de Fase

7.1 Introdução

Após a caracterização dos compósitos HA/NR, a mesma reação de síntese foi utilizada na produção de *scaffolds* compósitos de HA dispersa em uma matriz formada por Poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e NR nas proporções em massa de 60%/40%, uma blenda patenteada sob o nome de CELLPRENE (MARQUES et al, 2011). A blenda CELLPRENE já foi caracterizada quanto às suas propriedades mecânicas e biocompatibilidade em trabalhos anteriores do LABIOMAT, apresentando resultados promissores. Foram obtidos resultados de citotoxicidade compatível com a de polímeros já amplamente usados na prática clínica (KIM et al., 2014), e quando a blenda foi aplicada em um dispositivo de expansão craniana em ratos, foi osteointegrada (FAILER et al., 2015). A dispersão de HA na matriz NR/PLGA poderia gerar um produto com aplicações direcionadas para a regeneração de tecidos ósseos, aliando as propriedades de bioatividade da HA às propriedades mecânicas e regenerativas da NR e à bioreabsorção do PLGA.

Nesta seção serão apresentados os procedimentos experimentais e resultados preliminares da caracterização de um *scaffold* contendo 10% HA na matriz PLGA/NR.

7.2 Materiais e métodos

7.2.1 Preparação dos *Scaffolds* Hidroxiapatita/Borracha Natural/Poli(lactídeo-co-glicolídeo)

Após caracterização dos compósitos HA/NR, partículas de HA e conhecimento de rendimento da reação, a síntese da HA na presença de NR foi utilizada na produção de *scaffolds* de HA/NR/PLGA com concentração de 10% HA. A matriz foi utilizada nas proporções 40% NR / 60% PLGA, já adequadamente caracterizada mecânica e biologicamente (FALER et al, 2015), patenteada sob o nome de CELLPRENE (MARQUES et al, 2011).

O material foi produzido utilizando-se uma rota adaptada, semelhante à da seção 5.1, no entanto com duas etapas adicionais. Após a síntese da HA na solução de NR em THF na concentração de 0.05 g/ml durante 24 h, foi adicionada uma solução de PLGA em THF na concentração 0.05g/ml e a mistura foi agitada por 3 h para homogeneização. O processo empregado inicialmente para obtenção de filmes foi semelhante ao usado com os compósitos HA/NR, vazando-se o material em uma placa de vidro de Petri e evaporando o solvente durante a noite. No entanto, observou-se uma separação de fases quase total entre borracha natural e PLGA, formando duas membranas completamente separadas uma da outra, como apresentado na Fig. 27, tornando este método inviável, sendo abandonado.

Para lidar com o problema de separação de fases durante evaporação, foi utilizado o método de inversão de fase (*wet-phase inversion*)(LAI et al, 1994), técnica de precipitação por imersão. Esta técnica envolve a moldagem de uma solução de polímero em um suporte inerte seguida pela imersão do suporte em um banho contendo um não-solvente do polímero. O contato entre os dois solventes faz a solução ser separada.

Neste processo a água foi utilizada como um banho coagulante para a mistura HA/NR/PLGA/THF. A mistura foi vazada em uma placa de Petri e mergulhada imediatamente em um Becker de 1L contendo água destilada. Uma vez

que água e THF são completamente miscíveis, ocorre uma remoção rápida do solvente. O processo está exemplificado no fluxograma da Fig. 26. Após imersão em água por 24 h o material foi seco em capela por 3 dias.

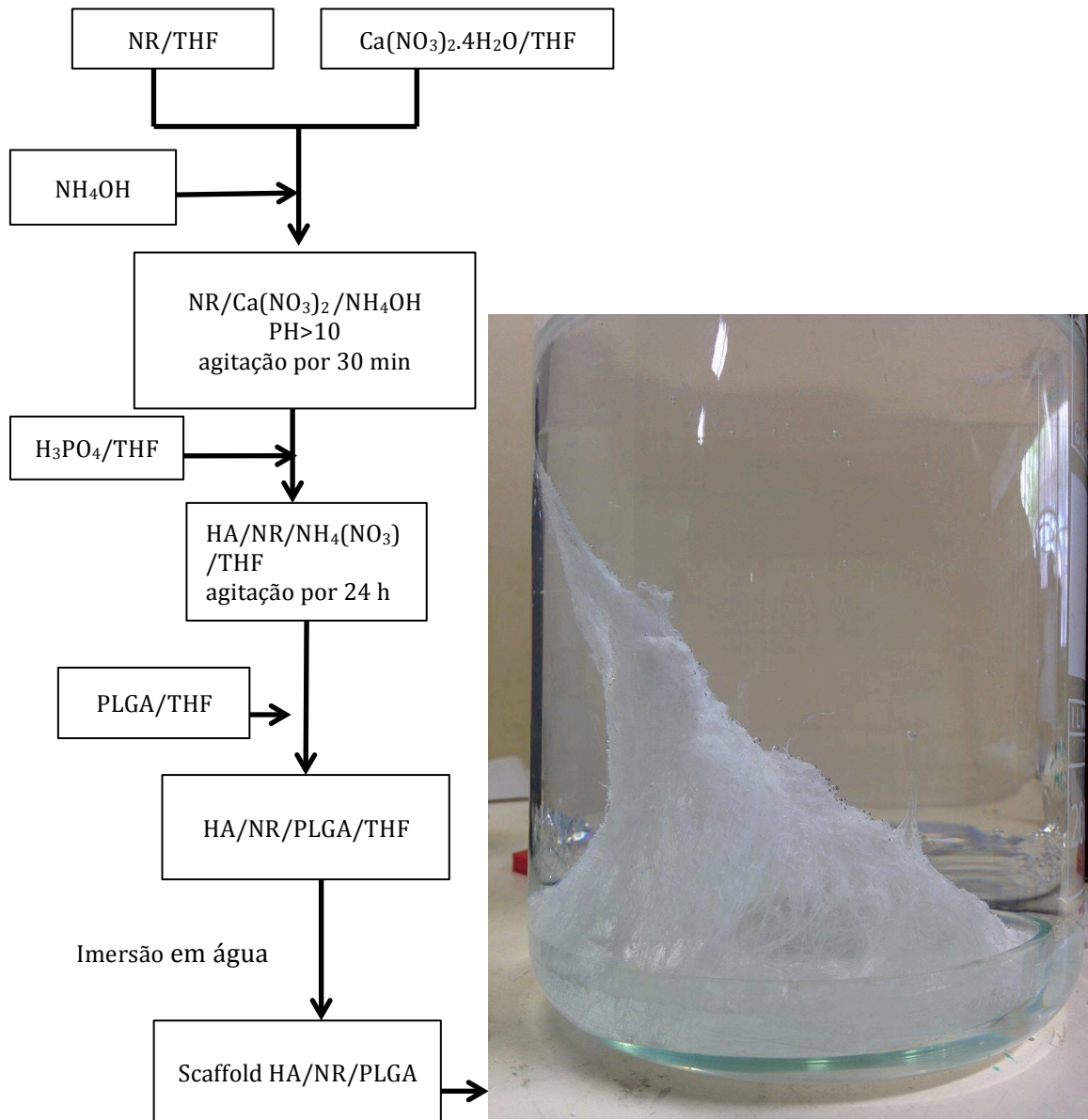


Fig. 26. Fluxograma contendo as etapas de preparação do composto HA/NR/PLGA.



Fig. 27. Separação entre PLGA e NR no filme obtido por evaporação do THF durante a noite.

7.2.2 Análise FT-IR

As amostras do material compósito, NR e HA foram analisadas com a ajuda de um Brucker Alpha equipado com acessório de Zn-Se no modo ATR no intervalo de $500-4000 \lambda^{-1}$ com resolução de 4 cm^{-1} .

7.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópios Carl Zeiss MEV EVO MA-50. As amostras foram cortadas e recobertas com carbono e foram feitas imagens por elétrons secundários e retroespalhados, à 5 e a 15 kv, respectivamente. Também foi realizado um mapeamento por EDS para os elementos Ca, P e O, com o objetivo de se observar a dispersão das partículas de HA no material.

7.3 Resultados

7.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O *scaffold* produzido apresentou uma estrutura desorganizada, com presença de poros e estruturas que lembram fibras (indicados com setas na Fig. 28(a)). De fato, a olho nu o *scaffold* aparentou um estrutura fibrosa, lembrando a de um *scaffold* formado por fiação. Como pode ser observado na Fig. 28, o material aparenta possuir alta quantidade de vazios, e estes aparentam ser interconectados. O poro indicado na Fig. 28 apresenta diâmetro de 90,34 μm , no entanto são observados diferentes tamanhos de poros, assim como estruturas fibrosas variadas. Em imagens obtidas com maior aumento foram observadas fibras com diâmetros inferiores a 200 nm, indicando diversos graus de complexidade na estrutura (Fig. 28(b) e (c)). Este tipo de estrutura não é reportada em materiais obtidos por inversão de fase, lembrando mais aquelas obtidas por métodos de fiação (LALIA et al 2013). Tamanhos de poro variados e interconectados são importantes pré-requisitos na aplicação de *scaffolds* para engenharia de tecidos. No caso de tecidos ósseos por exemplo, os poros maiores são importantes para acomodação das células, enquanto os poros pequenos possibilitam entrega de nutrientes, renovação do meio e melhor vascularização do tecido (BOSE et al., 2012).

Imagens feitas por elétrons retroespalhados revelam separação de fase entre o que parece ser uma região rica e outra pobre em HA, como observado na Fig. 29. É provável que a região rica em HA seja formada principalmente por NR, o que seria uma evidência de que houve uma forte interação entre as partículas de HA e a NR. É possível que se esteja observando o fenômeno de borracha ligada e a separação de fase observada seja fruto de uma diminuição de solubilidade da borracha natural devido à interação das macromoléculas com as partículas. Este efeito de borracha ligada poderia gerar uma separação de fase à medida que o solvente é removido da mistura, expulsando as cadeias poliméricas de PLGA devido ao alinhamento das cadeias poliméricas de NR entre as partículas de HA

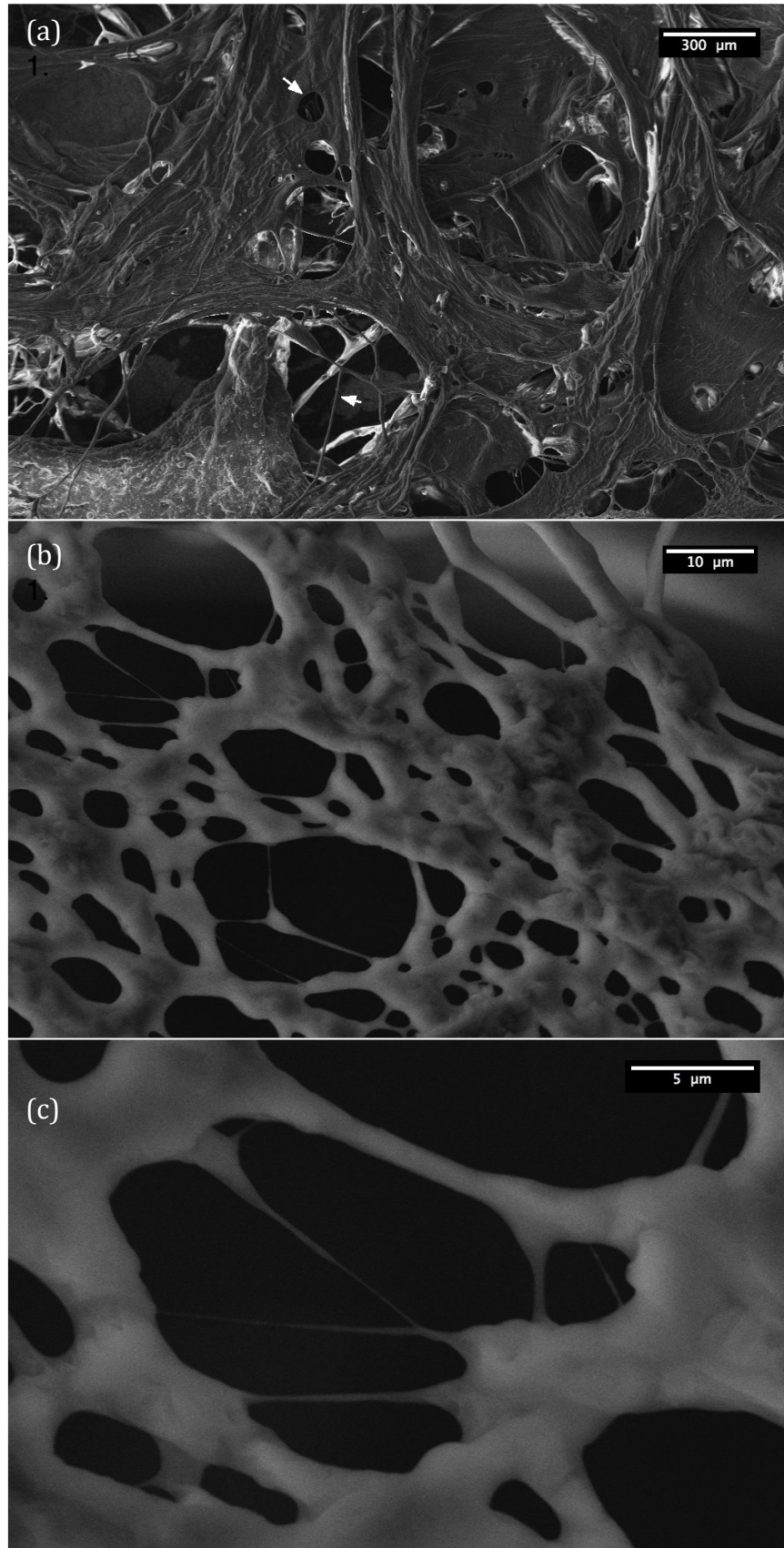


Fig. 28. Compósito contendo 10% HA : (a)Visão geral (b) detalhe de fibras e poros em menor aumento e (c) maior aumento (imagem por elétrons secundários).

Isso explicaria também a separação obtida ao se remover lentamente o THF por evaporação durante a noite (Fig. 27), obtendo-se duas membranas separadas que puderam ser destacadas uma da outra. O processo de inversão de fase, por fazer uma remoção rápida de solvente, pode ter causado uma separação de fases menos perceptível. Ao invés de uma separação visível a olho nu, foram obtidas regiões alternadas de uma fase formada principalmente por NR ligada à HA e outra por PLGA. No entanto, é difícil criar um mecanismo para o que causou a formação da estrutura observada. Existem diversos fatores atuando simultaneamente à medida que ocorre a repentina remoção de solvente. Estes fatores seriam:

- Diferenças nas taxas de remoção de THF nas diferentes fases;

- Diferenças nas contrações volumétricas entre as duas fases com a remoção do solvente;

- Diferenças de rigidez entre os dois polímeros;

Se um dos polímeros sofre maior contração volumétrica, em uma taxa diferente de remoção de solvente (coagulação) e o outro possui maior rigidez, podendo suportar a estrutura, talvez crie-se a oportunidade de formação de vazios.

Para se obter mais informações a respeito da separação de fase encontrada no scaffold foi realizado o mapeamento EDS para os elementos cálcio, fósforo e oxigênio (Fig. 30). A Fig. 30(a) apresenta uma imagem de elétrons retroespalhados da região analisada, apresentando ao centro uma região identificada como contendo um maior teor de HA. Nas Fig. 20(b) e (c), em que é feito o mapeamento de Ca e P, fica claro que a região discutida apresenta maior quantidade de HA, devido à quantidade superior destes elementos. O mapeamento por O (Fig. 30(d)) reforça a ideia de que a região pobre em HA é formada principalmente por PLGA, pois este polímero apresenta O em sua composição, apresentando maior sinal, assim como as partículas de HA. A matriz da região rica

em HA apresenta baixo sinal, o que é forte indicativo de que é formada principalmente por NR, um polímero que não apresenta O em sua composição.

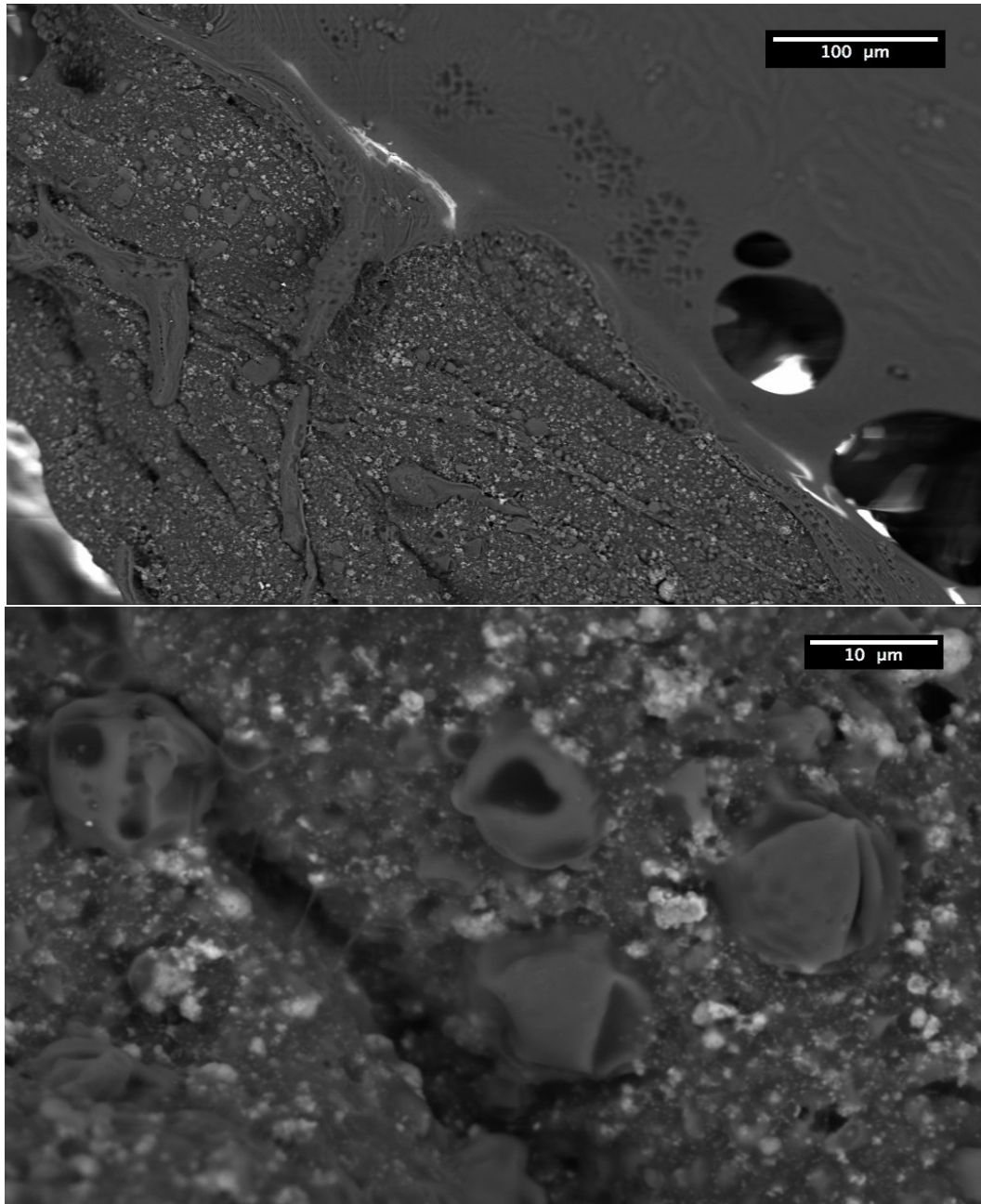


Fig. 29. Regiões do *scaffold* apresentando separação de fase

Em uma aplicação biológica o *scaffold* produzido apresentaria regiões mais bioativas, formadas pela região rica em HA e NR, e regiões bioabsorvíveis não bioativas, que teriam função de gerar um grau de porosidade crescente,

fornecendo acesso gradual às partículas de HA ao longo do tempo por parte das células. Os resultados obtidos são promissores, uma vez que uma estrutura complexa que é de interesse da engenharia de tecidos, foi obtida de forma espontânea pela simples coagulação em solvente. O *scaffold* aparenta possuir interconectividade e morfologia semelhante à de *scaffolds* formados por fibras, no entanto o processo durou poucos segundos e produziu 5 gramas de material, o que é bem contrastante com processos de fiação como *electrospinning* (LALIA et al., 2013). É possível que esta técnica possa ser utilizada em outros sistemas de polímeros, embora seja difícil ter certeza, uma vez que a NR apresenta um comportamento único devido às características de sua cadeia polimérica.

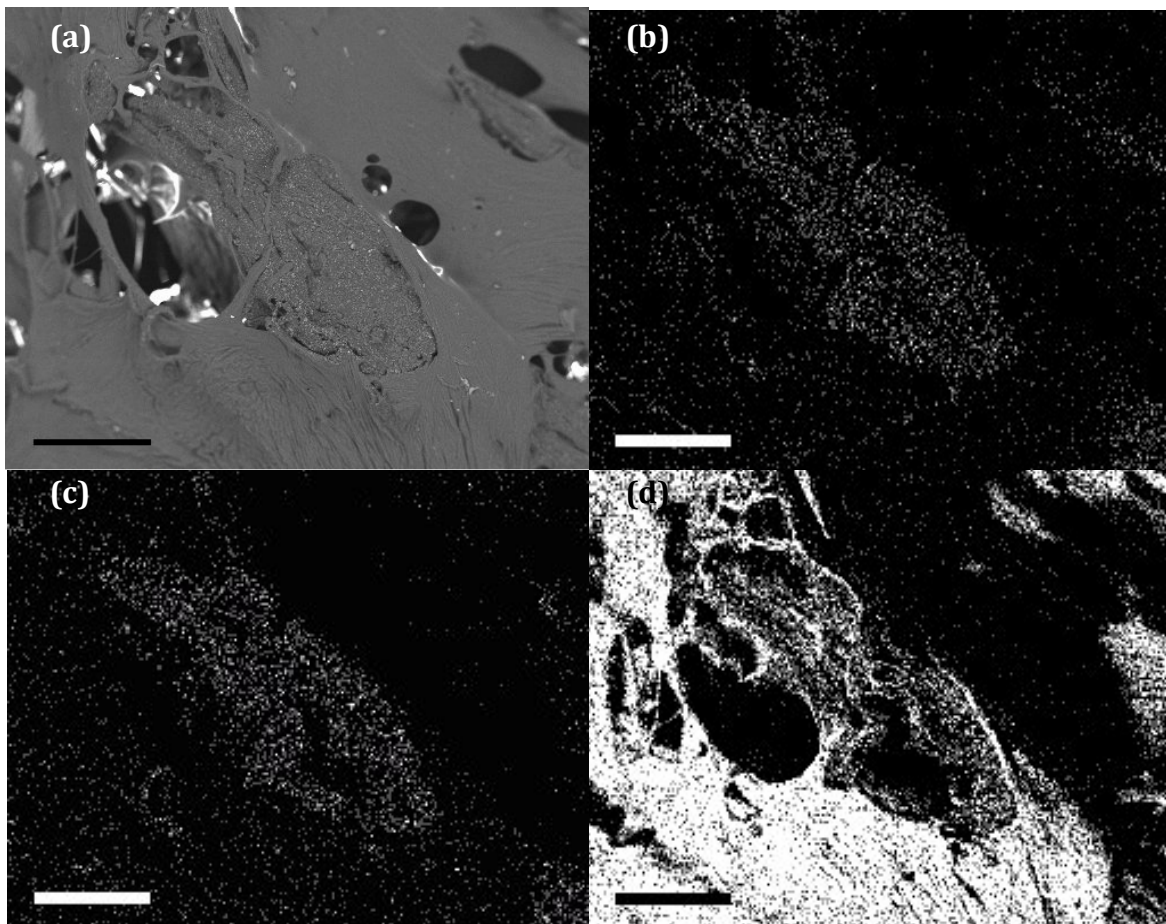


Fig. 30. Região do *scaffold* contendo separação de fases (a) analisada por mapeamento EDS de Ca (b), P(c) e O (d). Tamanho da barra de escala = 300 μm .

7.3.2 Caracterização FTIR.

Os espectros de FTIR do compósito 10%HA, assim como da blenda NR/PLGA pura foram analisados. A blenda polimérica (Fig. 31(a)) apresenta um somatório dos picos referente à NR, já apresentados na seção 5.6, acrescidos dos picos característicos do PLGA. Em 1760 cm^{-1} , observa-se o sinal referente ao alongamento da ligação C=O. Em 1185 cm^{-1} e a 1090 cm^{-1} se observam bandas relativas aos estiramentos C-O. A banda a 1185 cm^{-1} refere-se ao estiramento C-C(=O)-O. Por sua vez, a banda a 1090 cm^{-1} refere-se ao grupo O-C-C. Os sinais, portanto, são compatíveis com os descritos na literatura para o PLGA (ERBETTA et al., 2012).

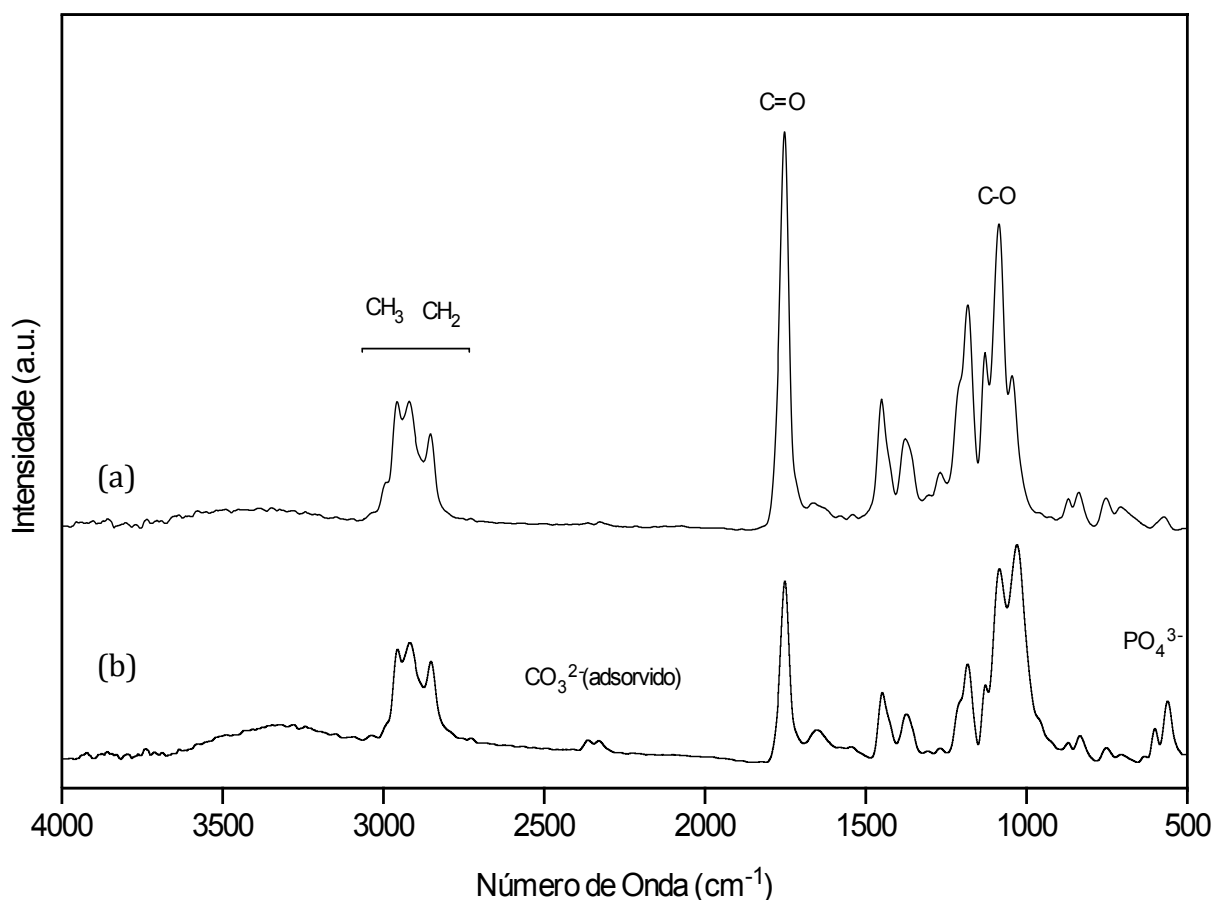


Fig.31. Espectros de FTIR (a) da blenda NR/PLGA e (b) do compósito contendo 10% HA.

Embora pouco intensas, as bandas de dobramento [OH⁻] foram observadas em 630 cm⁻¹, enquanto a banda relativa ao estiramento [OH⁻] aparece sobreposta com a banda relativa à água adsorvida entre 2600 cm⁻¹ e 3600 cm⁻¹ (Fig 31(b)). É possível se observar um sinal fraco em 1612 cm⁻¹ referente à substituição de grupos [PO₄³⁻] por [CO₃²⁻] na HA. O espectro não apresenta presença de bandas referentes a impurezas, indicando que a etapa de imersão em água foi suficiente para remover o NH₄(NO₃). Conforme esperado e já discutido na seção 5.6, que apresenta HA sintetizada pelo mesmo processo, as bandas presentes são características de uma HA estequiométrica parcialmente substituída por CO₂³⁻.

7.4 Conclusões

O mesmo processo desenvolvido de síntese de HA in situ na borracha natural foi utilizado na produção de um scaffold contendo 10% HA em uma matriz formada por NR e PLGA. O método de inversão de fase em água produziu um *scaffold* com alto grau de porosidade, apresentando uma estrutura com presença de fibras e poros de diversos tamanhos e com diversos graus de complexidade, como pode ser observado pelas imagens de MEV por elétrons secundários. Essa estrutura não usual provavelmente foi fruto da separação de fase observada entre uma fase formada por HA dispersa em NR e outra formada por PLGA pobre em HA, como pode ser observado nas imagens de mapeamento EDS dos elementos Ca, P e O, portanto os dois polímeros não estão formando uma blenda polimérica. A separação de fase observada é mais um indício da forte interação entre HA e NR proporcionada pelo método de síntese empregado e provavelmente o que se observa é o fenômeno de borracha ligada.

O *scaffold* apresentou elevada pureza, sem presença de traços de solvente ou coprodutos da reação de síntese da HA, como foi confirmado pela análise por FTIR. As bandas da HA indicam que o material sintetizado corresponde à uma HA com razão Ca/P próxima à estequiométrica com substituição por carbonato.

O método desenvolvido é promissor, uma vez que o *scaffold* produzido apresenta uma estrutura que é de interesse da engenharia de tecidos através de um método simples.

7 Sugestões para futuros trabalhos

- Estudo da síntese *in situ* de outros fosfatos de cálcio: Realizar reação semelhante à apresentada, modificando-se a razão Ca/P e o pH da reação para se obter outras fases de FCs com mesma dispersão e nanoestrutura.

- Caracterização biológica *in vitro* e *in vivo* dos compósitos HA/NR a fim de se obter a influência da adição de HA na NR e a aplicabilidade deste material.

- Realizar um estudo mais completo sobre a natureza da interação entre HA e macromoléculas de NR e do mecanismo de dispersão que as macromoléculas apresentaram na HA em THF. Este estudo poderia envolver medidas da quantidade de borracha ligada.

- Realização da mesma reação de síntese em borracha epoxidada variando-se o grau de epoxidação: a presença de grupos polares pode ser determinante na nucleação da hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio.

8 Referências Bibliográficas

Ahn, E. S.; Gleason, N. J.; Nakahira, A.; Ying, J. Y., Nanostructure Processing of Hydroxyapatite-based Bioceramics. *Nano Letters* **2001**, *1* (3), 149-153.

Balabanian, C. A.; Coutinho-Netto, J.; Lamano-Carvalho, T. L.; Lacerda, S. A.; Brentegani, L. G., Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. *Journal of Oral Science* **2006**, *48* (4), 201-205.

Barreiros, V. C. P.; Dias, F. J.; Iyomasa, M. M.; Coutinho-Netto, J.; de Sousa, L. G.; Fazan, V. P. S.; Antunes, R. d. S.; Watanabe, I.-s.; Issa, J. P. M., Morphological and morphometric analyses of crushed sciatic nerves after application of a purified protein from natural latex and hyaluronic acid hydrogel. *Growth Factors* **2014**, *32* (5), 164-170.

Barrère, F.; van Blitterswijk, C. A.; de Groot, K., Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine* **2006**, *1* (3), 317-332.

Bell, L. C.; Mika, H.; Kruger, B. J., Synthetic hydroxyapatite-solubility product and stoichiometry of dissolution. *Archives of Oral Biology* **1978**, *23* (5), 329-336.

Berzina-Cimdina, L.; Borodajenko, N., *Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*. InTech: 2012.

Blow, C. M., Polymer/particulate filler interaction—the bound rubber phenomena. *Polymer* **1973**, *14* (7), 309-323.

Bohner, M.; Lemaître, J., Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* **2009**, *30* (12), 2175-2179.

Borges, F. A.; Filho, E. d. A.; Miranda, M. C. R.; dos Santos, M. L.; Herculano, R. D.; Guastaldi, A. C., Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2015**, *26* (17), 1256-1268.

Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A., Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology* **2012**, *30* (10), 546-554.

Canzhong, H.; Yueqiang, W.; Yongyue, L.; Lingxue, K.; Zheng, P., Thermal degradation kinetics and mechanism of epoxidized natural rubber. In *Journal of Polymer Engineering*, 2013; Vol. 33, p 331.

Chen, X.; Yang, B.; Qi, C.; Sun, T.-W.; Chen, F.; Wu, J.; Feng, X.-P.; Zhu, Y.-J., DNA-templated microwave-hydrothermal synthesis of nanostructured hydroxyapatite for storing and sustained release of an antibacterial protein. *Dalton Transactions* **2016**, *45* (4), 1648-1656.

Collier, J. H.; Messersmith, P. B., PHOSPHOLIPID STRATEGIES IN BIOMINERALIZATION AND BIOMATERIALS RESEARCH. *Annual Review of Materials Research* **2001**, *31* (1), 237-263.

Combes, C.; Rey, C., Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6* (9), 3362-3378.

Cullity, B. D.; Stock, S. R., *Elements of X-Ray Diffraction, 3rd Edition*. Pearson: 2001.

Domingos, A. L. A.; Tucci Jr, S.; Garcia, S. B.; Bessa Jr, J. d.; Cologna, A. J.; Martins, A. C. P., Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. *International braz j urol* **2009**, *35*, 217-226.

Duncan, J.; MacDonald, J. F.; Hanna, J. V.; Shirosaki, Y.; Hayakawa, S.; Osaka, A.; Skakle, J. M. S.; Gibson, I. R., The role of the chemical composition of monetite on

the synthesis and properties of α -tricalcium phosphate. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *34*, 123-129.

Eiden-Aßmann, S.; Viertelhaus, M.; Heiß, A.; Hoetzer, K. A.; Felsche, J., The influence of amino acids on the biomineralization of hydroxyapatite in gelatin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, *91* (3), 481-486.

Erbetta, C. A. C.; Alves, R. J.; Resende, J. M.; Freitas, R. F. d. S.; Sousa, R. G. d., Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2012**, *3* (2), 208-225.

Ereno, C.; Guimarães, S. A. C.; Pasetto, S.; Herculano, R. D.; Silva, C. P.; Graeff, C. F. O.; Tavano, O.; Baffa, O.; Kinoshita, A., Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, *95A* (3), 932-939.

Faller, G.; dos Santos, L. A.; Marques, D.; Collares, M. V., Development and testing of an absorbable spring for cranial expansion in rabbits. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **2015**, *43* (7), 1269-1276.

Fernández, E.; Gil, F. J.; Ginebra, M. P.; Driessens, F. C. M.; Planell, J. A.; Best, S. M., Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. *J Mater Sci: Mater Med* **1999**, *10* (3), 169-176.

Ferreira, M.; Mendonça, R. J.; Coutinho-Netto, J.; Mulato, M., Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics* **2009**, *39*, 564-569.

Ginebra, M. P.; Traykova, T.; Planell, J. A., Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release* **2006**, *113* (2), 102-110.

Gordon, M., *The Physics of Rubber Elasticity* (Third Edition). L. R. G. Treloar, Clarendon Press, Oxford. 1975 pp. xii + 370. Price: £14.00. *British Polymer Journal* **1976**, *8* (1), 39-39.

Hench, L. L., Biomaterials. *Science* **1980**, *208*, 826-831.

Hench, L. L.; Wilson, J., Surface-active biomaterials. *Science* **1984**, *226*, 630-635.

Hoffman, A. S., Chapter I.2.1 - Introduction: The Diversity and Versatility of Biomaterials. In *Biomaterials Science (Third Edition)*, Academic Press: 2013; pp 63-64.

Hurley, P. E., History of Natural Rubber. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* **1981**, *15* (7), 1279-1287.

Kato, K.; Eika, Y.; Ikada, Y., In situ hydroxyapatite crystallization for the formation of hydroxyapatite/polymer composites. *Journal of Materials Science* **1997**, *32* (20), 5533-5543.

Kim, J. H.; Marques, D. R.; Faller, G. J.; Collares, M. V.; Rodriguez, R.; Santos, L. A. d.; Dias, D. d. S., Experimental comparative study of the histotoxicity of poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer and poly(lactic-co-glycolic acid)-poly(isoprene) blend. *Polímeros* **2014**, *24*, 529-535.

Kohjiya, S.; Ikeda, Y., Introduction. In *Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber*, Woodhead Publishing: 2014; pp xvii-xxvi.

Kwon, S.-H.; Jun, Y.-K.; Hong, S.-H.; Kim, H.-E., Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders. *Journal of the European Ceramic Society* **2003**, *23* (7), 1039-1045.

Lai, J.-Y.; Liu, M.-J.; Lee, K.-R., Polycarbonate membrane prepared via a wet phase inversion method for oxygen enrichment from air. *Journal of Membrane Science* **1994**, *86* (1), 103-118.

Lalia, B. S.; Kochkodan, V.; Hashaikeh, R.; Hilal, N., A review on membrane fabrication: Structure, properties and performance relationship. *Desalination* **2013**, *326*, 77-95.

Lamberti, M.; Buonanno, R.; Ritonnaro, C.; Giovane, G.; Crispino, V.; Feola, A.; Medici, N.; Sannolo, N.; Di Carlo, A.; Di Domenico, M., Molecular profile of sensitization in subjects with short occupational exposure to latex. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **2015**, *28* (5), 841-848.

Landi, E.; Celotti, G.; Logroscino, G.; Tampieri, A., Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society* **2003**, *23* (15), 2931-2937.

Leblanc, J. L., Rubber–filler interactions and rheological properties in filled compounds. *Progress in Polymer Science* **2002**, *27* (4), 627-687.

M.G. Raucci, V. D. A., V. Guarino, E. Sardella, S. Zeppetelli, P. Favia, L. Ambrosio Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 4090-4099.

Marques, D. R.; Santos, L. A. d.; Schopf, L. F.; Fraga, J. C. S. d., Analysis of Poly(Lactico-Glycolic Acid)/Poly(Isoprene) Polymeric Blend for application as biomaterial. *Polímeros* **2013**, *23*, 579-584.

Meejoo, S.; Maneeprakorn, W.; Winotai, P., Phase and thermal stability of nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. *Thermochimica Acta* **2006**, *447* (1), 115-120.

Meenan, B. J.; McClorey, C.; Akay, M., Thermal analysis studies of poly(etheretherketone)/hydroxyapatite biocomposite mixtures. *J Mater Sci: Mater Med* **2000**, *11* (8), 481-489.

Meissner, B., Bound rubber theory and experiment. *Journal of Applied Polymer Science* **1993**, *50* (2), 285-292.

Mendonça, R. J.; Maurício, V. B.; de Bortolli Teixeira, L.; Lachat, J. J.; Coutinho-Netto, J., Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Phytotherapy Research* **2010**, *24* (5), 764-768.

Mercado-Pagán, Á. E.; Stahl, A. M.; Shanjani, Y.; Yang, Y., Vascularization in Bone Tissue Engineering Constructs. *Annals of Biomedical Engineering* **2015**, *43* (3), 718-729.

Mollazadeh, S.; Javadpour, J.; Khavandi, A., In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly(vinyl alcohol) matrix. *Ceramics International* **2007**, *33* (8), 1579-1583.

Mrue, F. Therapeutic proteins from latex. United States Patent 8603489, 2013.

Nascimento, R. M.; Faita, F. L.; Agostini, D. L. S.; Job, A. E.; Guimarães, F. E. G.; Bechtold, I. H., Production and characterization of natural rubber–Ca/P blends for biomedical purposes. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *39*, 29-34.

Nudelman, F.; Sommerdijk, N. A. J. M., Biomineralization as an Inspiration for Materials Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (27), 6582-6596.

Olszta, M. J.; Cheng, X.; Jee, S. S.; Kumar, R.; Kim, Y.-Y.; Kaufman, M. J.; Douglas, E. P.; Gower, L. B., Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2007**, *58* (3–5), 77-116.

Rao, A.; Cölfen, H., 2 - Morphology control and molecular templates in biomineralization A2 - Aparicio, Conrado. In *Biomineralization and Biomaterials*, Ginebra, M.-P., Ed. Woodhead Publishing: Boston, 2016; pp 51-93.

Retzepi, M.; Donos, N., Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clinical Oral Implants Research* **2010**, *21* (6), 567-576.

Rippel, M. M.; Lee, L.-T.; Leite, C. A. P.; Galembeck, F., Skim and cream natural rubber particles: colloidal properties, coalescence and film formation. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *268* (2), 330-340.

Rodríguez-Lorenzo, L. M.; Vallet-Regí, M., Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites. *Chemistry of Materials* **2000**, *12* (8), 2460-2465.

Rolere, S.; Liengprayoon, S.; Vaysse, L.; Sainte-Beuve, J.; Bonfils, F., Investigating natural rubber composition with Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid and non-destructive method to determine both protein and lipid contents simultaneously. *Polymer Testing* **2015**, *43*, 83-93.

Sadat-Shojai, M.; Khorasani, M.-T.; Dinpanah-Khoshdargi, E.; Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia* **2013**, *9* (8), 7591-7621.

Sakdapipanich, J.; Rojruthai, P., Molecular Structure of Natural Rubber and Its Characteristics Based on Recent Evidence. *Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life, Prof. Reda Sammour (Ed.), InTech* **2012**.

Sansatsadeekul, J.; Sakdapipanich, J.; Rojruthai, P., Characterization of associated proteins and phospholipids in natural rubber latex. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2011**, *111* (6), 628-634.

Schmidt, D. R.; Waldeck, H.; Kao, W. J., Protein Adsorption to Biomaterials. In *Biological Interactions on Materials Surfaces: Understanding and Controlling*

Protein, Cell, and Tissue Responses, Puleo, A. D.; Bizios, R., Eds. Springer US: New York, NY, 2009; pp 1-18.

Šupová, M., Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J Mater Sci: Mater Med* **2009**, *20* (6), 1201-1213.

Takeuchi, A.; Tsuge, T.; Kikuchi, M., Preparation of porous β -tricalcium phosphate using starfish-derived calcium carbonate as a precursor. *Ceramics International* **2016**.

Tal, H.; Moses, O.; Kozlovsky, A.; nemcovsky, C., *Bioresorbable Membranes for Guided Bone Regeneration*. Prof. Haim Tal (Ed.) InTech. **2012**

Ter Brugge, P. J.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A., Effect of calcium phosphate coating composition and crystallinity on the response of osteogenic cells in vitro. *Clinical Oral Implants Research* **2003**, *14* (4), 472-480.

Venkatesan, J.; Kim, S. K., Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering--a review. (1550-7033 (Print)).

Wang, K.; Zhou, C.; Hong, Y.; Zhang, X., A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus* **2012**, *2* (3), 259-277.

Wang, P.; Li, C.; Gong, H.; Jiang, X.; Wang, H.; Li, K., Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. *Powder Technology* **2010**, *203* (2), 315-321.

Wang, Y.; Azaïs, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriel, P.; Pehau-Arnaudet, G.; Babonneau, F.; Giraud-Guille, M.-M.; Nassif, N., The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat Mater* **2012**, *11* (8), 724-733.

Weiner, S.; Wagner, H. D., THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science* **1998**, *28* (1), 271-298.

Wititsuwannakul, D. W., R, Biopolymers. Vol. 2: Polyisoprenoids. Wiley-VCH: 2001; pp 151–201.

Wojasiński, M.; Duszyńska, E.; Ciach, T., Lecithin-based wet chemical precipitation of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloid and Polymer Science* **2015**, 293 (5), 1561-1568.

Wolff, S.; Wang, M.-J.; Tan, E.-H., Filler-Elastomer Interactions. Part VII. Study on Bound Rubber. *Rubber Chemistry and Technology* **1993**, 66 (2), 163-177.

Yuan, H.; de Groot, K., Calcium Phosphate Biomaterials: An Overview. In *Learning from Nature How to Design New Implantable Biomaterials: From Biomineralization Fundamentals to Biomimetic Materials and Processing Routes: Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, held in Alvor, Algarve, Portugal, 13–24 October 2003*, Reis, R. L.; Weiner, S., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, 2005; pp 37-57.

Yuan, H.; Yang, Z.; Li, Y.; Zhang, X.; De Bruijn, J. D.; De Groot, K., Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci: Mater Med* **1998**, 9 (12), 723-726.

Zborowski, S. A. C.; Mrue, F., Biomembrane suitable for use in substitution, reconstruction, induction of angiogenesis, neoformation or regeneration of human or animal organs or tissues. Google Patents: 2006.

Zhao, J.; Liu, Y.; Sun, W.-b.; Zhang, H., Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chemistry Central Journal* **2011**, 5, 40-40.