

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

LARISSA SOUZA MENDES

A circular inset showing a scanning electron micrograph (SEM) of numerous spherical mesoporous silica nanoparticles. Each particle has a distinct porous, cage-like structure with visible internal channels. The particles are distributed across the circular field of view.

**Síntese de nanopartículas de sílica
mesoporosa e aplicações como
biomaterial**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
ARARAQUARA
2012

LARISSA SOUZA MENDES

**Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosa e
aplicações como biomaterial**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto
Co-orientador: Marco Antônio Utrera Martines

**Araraquara
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

M538s Mendes, Larissa Souza
 Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosa e aplicações
 como biomaterial / Larissa Souza Mendes. - Araraquara : [s.n],
 2012
 107 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química
 Orientador : Reinaldo Marchetto
 Coorientador : Marco Antônio Utrera Martines

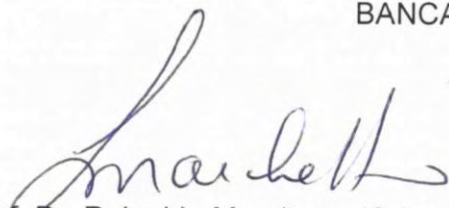
 1. Biotecnologia. 2. Peptídeo de crescimento osteogênico.
 3. Liberação controlada. 4. Adsorção de moléculas. I. Título.

LARISSA SOUZA MENDES

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 03 de fevereiro de 2012.

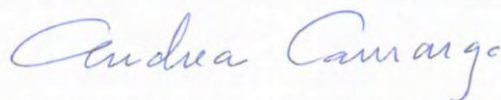
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Reinaldo Marchetto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Marlus Chorilli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Andrea Simone Stucchi de Camargo Alvarez Bernardez
Instituto de Física - USP, São Carlos

DADOS CURRICULARES

Larissa Souza Mendes

1. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 24/09/1985, Guaraçaí – SP

Filiação: Ivanil Souza Mendes e Aparecida Monteiro Mendes

RG: 42.792.814-x/ SSP 28/10/1999

CPF: 348.742.728-19

Endereço residencial: Avenida Itápolis, 2422

Vila Bela Vista – Araraquara – SP

CEP: 14.800-040

Telefone: (16) 3114-0228

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2010 – Atual

Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Título: Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosa e aplicações como biomaterial

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Bolsista: CAPES

.

2005 – 2009

Graduação em Ciências Biológicas

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - FEIS

Universidade Estadual Paulista – UNESP

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Artigos completos publicados em periódicos: 1

3.2 Trabalhos completos publicados em anais de eventos: 1

3.3 Resumos publicados em anais de eventos: 17

4. PRÊMIOS RELEVANTES:

2009 Menção Honrosa com o trabalho:

“Precipitação de hidroxiapatita na superfície de matriz de sílica mesoporosa a partir de cloreto de cálcio e fosfato de sódio diácido”

XV Reunião de Iniciação Científica da FEIS/UNESP., Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - FEIS/UNESP

2008 Menção Honrosa com o trabalho:

“Síntese e Caracterização de Biomaterial Mesoporoso Funcionalizado com 3-aminopropiletoxissilano (APTES)”,

XV Reunião de Iniciação Científica da FEIS/UNESP., Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - FEIS/UNESP

DEDICATÓRIA

*À **Deus**, por me manter em pé todas as vezes que quis cair,*

*Aos meus pais, **Ivanil e Aparecida**, onde quer que estejam, espero que estejam orgulhosos pelos caminhos e decisões que eu segui em vossa ausência física, pois sei que “a morte não é tudo. Não é o final...tudo permanece exatamente como foi. Eu sou eu, você é você, e a antiga vida que vivemos tão maravilhosamente juntos permanece intocada, imutável...”*

*Às minhas amigas, **Ju, Mi e Di** (a morena bruta), **Roberta**, minha madrinha **Susy** e minhas irmãs **Dai e Dessa**, aos meus sobrinhos, **Pedro e João Vitor**, irmãs **Agmar e Marta**, por compreender minha ausência nesses últimos anos,*

*Ao meu grande amor, **Hudson**, por me apoiar, compreender e se mostrar prestativo até nas discussões sobre síntese de peptídeos e deixar que a caminhada não seja individual, onde podemos nos encher de felicidade e dizer que essa caminhada é NOSSA.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, pela confiança em mim, uma desconhecida interiorana; pela disposição em interpretar e buscar soluções frente resultados inesperados, pela paciência a minha ansiedade. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Utrera Martines, que para mim é mais que um professor, é um amigo que não mediu forças a me ajudar desde o momento que nos conhecemos; me "iniciou" no meio científico, ensinou bons procedimentos e para mim ;e um exemplo de profissional.

Ao Prof.Sidney e Prof. Lucas Rocha por ceder seu laboratório e compartilhar técnicas para preparação das partículas de sílica.

Ao Prof. Eduardo Maffud, pela carta de aceite, pelas discussões de corredor e por ter acreditado em mim.

Aos meus colegas do Grupo de Síntese, Estrutura e Aplicações de Peptídeos e Proteínas, em especial, ao Anderson, Caroline, Davi Pardal, Edson Araketu, Eduardo Lentilha, Graziely, Hermanito Esteban, Luiz, Paulo e ao Prof. Saulo, pelas novas amizades, pelo convívio amigo e pela ajuda direta no desenvolvimento deste trabalho, principalmente nas purificações e uso do HPLC "RoboCop".

À grande colega de trabalho e amiga Dr(a). Sybele, pela ajuda na síntese do peptídeo, puro e marcado, por me deixar participar das cirurgias dos animais; por compartilhar as novas informações sobre biomateriais e nunca medir esforços para me ajudar.

Ao meu grande amigo Mauro, que com seus maracujás "amarelos de formato ovóide" tentava entender porque a área das partículas era maior que a da sua casa (rs).

À todos os docentes e servidores do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

À Dr(a) Beatriz Cury por me ajudar a definir os parâmetros dos ensaios de liberação.

À Prof.(a) Dr(a) Carminha, da Unicamp, pelas discussões via email, mesmo não sendo sua linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edison Pecoraro que sempre me atendeu e me ajudou a “pensar” melhor sobre os meus resultados.

Aos técnicos Tarik e Ricardo, pelas medidas de microscopia eletrônica de varredura e medidas de porosidade; e conversas paralelas.

Aos colegas Ricardo Santim e Michael Jones, pelas medidas de difração de raios X.

À minha amiga Juliana Jorge, que mesmo com a distância imposta entre nós, continuou trocando suas informações e experiências, mantendo-se sempre presente quando o assunto é discutir resultados.

Às minhas roomates, Selma, Luciana, Laurianne, principalmente a Silvia pelas discussões dos resultados obtidos e pela companhia.

À família De Lazari por ter-me “adotado” e sempre estar dispostos a me ajudar, seja com o que for.

Ao LNLS pelas medidas de SAXS.

Ao LMA-IQ pelas imagens de Microscopia Eletrônica Varredura.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca por todo apoio necessário durante esses anos.

À Capes, pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química e aos seus funcionários.

*“O seu tempo é limitado, então não o gaste vivendo a vida de um outro alguém.
Não fique preso pelos dogmas, que é viver com os resultados da vida de outras pessoas.
Não deixe que o barulho da opinião dos outros cale a sua própria voz interior.
E o mais importante: tenha coragem de seguir o seu próprio coração e a sua intuição. Eles
de alguma maneira já sabem o que você realmente quer se tornar...”*

Steve Jobs

RESUMO

Materiais mesoporosos têm sido largamente estudados devido às suas características e potenciais aplicações. A sílica mesoporosa apresenta elevada área de superfície específica ($\sim 1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) e tamanho de poros usualmente em torno de 2-30 nm, atraindo atenção para aplicações em catálise, adsorção e troca iônica. O peptídeo de crescimento osteogênico (OGP) é um tetradecapeptídeo endógeno, cuja forma ativa gera ligações covalentes com as proteinases, mostrando ser um bom agente anabólico e estimulador hematopoiético. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi à preparação de materiais inorgânicos mesoporosos, a partir de sílica e de um surfactante não-iônico como agente direcionador de estrutura, incorporados com OGP, para atuarem como biomateriais na regeneração óssea. O peptídeo foi sintetizado pelo método em fase sólida (SPFS; estratégia Fmoc); foi purificado e caracterizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Espectrometria de Massas e Análise de Aminoácidos. Os materiais sólidos foram caracterizados por Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IR), Difração de Raios X (XRD), Espalhamento de Raios X à Baixo Ângulo (SAXS), Adsorção-dessorção de Nitrogênio a 77K (BET), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). A bioatividade *in vitro* desses materiais em Simulated Body Fluid (SBF) foi verificada por FTIR, SEM e XRD, e a adsorção e liberação do peptídeo marcado com 5,6-carboxifluoresceína da matriz mesoporosa foi monitorada por Espectroscopia de Fluorescência. Ficou evidente que a composição do material refletiu em diferentes características físicas, onde a área de superfície específica foi de 880, 484, 220 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, para a LMSiO, LMSiCaP I e II, respectivamente, que por sua vez influenciou na porcentagem de incorporação do peptídeo (99% na LMSiO, 55% na LMSiCaP I e nenhuma adsorção na LMSiCaP II). O teste de liberação do peptídeo em SBF demonstrou ser dependente da composição das partículas, da quantidade de peptídeo incorporada e da degradação do material, onde a amostra LMSiCaP I liberou 50% do seu conteúdo peptídico em aproximadamente 4 horas enquanto a LMSiO precisou de mais que 30 horas. Os dados demonstraram que tanto o material de sílica pura (LMSiO) quanto de sílica com apatita (LMSiCaP I e II) apresentou bioatividade *in vitro* e degradação em

função do tempo frente a fluídos biológicos, que é uma importante prospectiva para bio-aplicações.

Palavras-chave: sílica mesoporosa; peptídeo de crescimento osteogênico (OGP); bioatividade; adsorção de moléculas; liberação controlada.

ABSTRACT

Mesoporous materials have been widely studied due to their characteristics and potential applications. The mesoporous silica has a high specific surface area ($1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) and pore size is usually around 2-30nm, and it has attracted much attention for applications in catalysis, adsorption and ion exchange. The Osteogenic Growth Peptide (OGP) is an endogenous tetradecapeptide, which generates the active form covalent bonds with proteases, showing to be a good anabolic agent and hematopoietic stimulator. In this sense, this work presents the preparation of inorganic mesoporous materials from silica and a nonionic surfactant as a structure director agent incorporated with OGP to act as biomaterials in bone regeneration. The peptide was synthesized by solid-phase method (SPFS; Fmoc strategy), purified and characterized by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Mass Spectrometry and Aminoacid Analysis. The solids were characterized by Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-ray Diffraction (XRD), Small Angle X-ray Scattering (SAXS), Adsorption-desorption of Nitrogen at 77K (BET), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The *in vitro* bioactivity of these materials in Simulated Body Fluid (SBF) was studied by Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-ray Diffraction (XRD), and loading and release of the peptide labeled with 5,6-carboxyfluorescein of mesoporous matrix was monitored by Fluorescence Spectroscopy. It was evident that the composition of the material reflects different physical characteristics, where the specific are was 880, 484, 220 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ for LMSiO, LMSiCaP I e II, respectively, which in turn influenced the percentage of incorporation of the peptide (99% in LMSiO, 55% in LMSiCaO I e no adsorption in LMSiCaP II). The results have showed that both the pure silica material (LMSiO) and silica with apatite (LMSiCaP I e II) have *in vitro* bioactivity and show degradation as a function of time in front of the biological fluids, which is an important prospective for bio-applications.

Keywords: mesoporous silica; osteogenic growth peptide; bioactivity; loading molecules; controlled release.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Processo de reparação da fratura, por formação de novo tecido ósseo a partir do endóstio e do perióstio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).	26
Figura 1.2.	Fórmula estrutural do peptídeo OGP (NCBI, 2012).	29
Figura 1.3.	Domínios funcionais no peptídeo OGP. A porção C-terminal participa do reconhecimento e ligação ao receptor macromolecular e sinalização da via mitogênica. A porção N-terminal compreende o domínio que participa da ligação às OGPBs (BAB; CHUREV, 2002).	30
Figura 1.4.	Mecanismo de formação da sílica mesoporosa (HOFFMANN et al., 2006).	32
Figura 3.1.	Fluxograma representando resumidamente o trabalho desenvolvido.	42
Figura 3.2.	Diagrama da estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida.	47
Figura 3.3.	Formula estrutural da fluoresceína.	49
Figura 3.4.	Esquema do sistema de liberação do peptídeo OGP.	54
Figura 4.1.1.	Espectros de FT-IR de sílica pura e com fosfato de cálcio sintetizada por sol-gel a partir de P123, onde (↑) indicam bandas Si-O-Si, (o) Si-OH e (*) P-O.	57
Figura 4.1.2.	Padrões de XRD para as amostras LMSiO (a), LMSiCaP I (b) e LMSiCaP II (c). As difrações referentes a HA estão assinaladas por (*); β-TCP (o).	59
Figura 4.1.3.	Isoterma de adsorção (circulo sólido)/dessorção (circulo aberto) de nitrogênio da sílica mesoporosa pura calcinada, obtida a partir de P123.	61
Figura 4.1.4.	Isoterma de adsorção (circulo sólido)/dessorção (circulo aberto) de nitrogênio da amostra de sílica mesoporosa LMSiCaP I calcinada, obtida a partir de P123.	62
Figura 4.1.5.	Isoterma de adsorção (circulo sólido)/dessorção (circulo aberto) de nitrogênio da amostra de sílica mesoporosa LMSiCaP II calcinada, obtida a partir de P123.	63
Figura 4.1.6.	Representação esquemática da estrutura dos materiais mesoporosos hexagonais (MARKER et al., 1996).	63
Figura 4.1.7.	Difratogramas de SAXS das amostras de sílica mesoporosa LMSiO, LMSiCaP I e II	65
Figura 4.1.8.	Imagens de TEM da amostra LMSiO, perpendicular e paralelo (insert) ao eixo dos poros.	67

Figura 4.1.9.	Imagens fornecidas por SEM das amostras de sílica: LMSiO (a), LMSiCaP I (b) e LMSiCaP II (c); e suas respectivas curvas de distribuição de tamanho de partículas.	68
Figura 4.2.1.	Cromatogramas do peptídeo OGP bruto e após purificação, respectivamente.	71
Figura 4.2.2.	Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP-CF bruto (a) e purificado (b).	73
Figura 4.2.3.	Espectro de Massas da fração purificada do peptídeo OGP-CF.	74
Figura 4.3.1.	Espectros de FTIR das amostras LMSiO (a), LMSiCaP I (b) e LMSiCaP II (c) após imersão em SBF por diferentes períodos (7-28 dias).	76
Figura 4.3.2.	Imagens de SEM das amostras LMSiO e LMSiCaP I após imersão em SBF por 7 (a, a'), 21 (b, b') e 28 dias (c, c').	78
Figura 4.3.3.	Imagens de SEM da amostra LMSiCaP II após imersão em SBF por 7 (a), 21 (b) e 28 dias (c).	79
Figura 4.3.4.	Padrões de XRD das amostras LMSiO, LMSiCaP I e LMSiCaP II após 28 dias de imersão em SBF.	81
Figura 4.3.5.	Espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF (a) e Curva padrão OGP-CF em solução tampão Tris (b).	84
Figura 4.3.6.	Curvas de adsorção do peptídeo OGP para as amostras de sílica.	85
Figura 4.3.7.	Curvas de adsorção do peptídeo OGP-CF pelas amostras LMSiO e LMSiCaP I.	86
Figura 4.3.8.	Perfis de liberação cumulativa de OGP-CF a partir das amostras de LMSiO.	90
Figura 4.3.9.	Perfis de liberação cumulativa de OGP-CF a partir das amostras de LMSiCaP.	90
Figura 4.4.1.	Imagens de Microscopia Óptica (10x) e SEM (1000x e 600x) dos <i>pellets</i> de LMSiO após 1, 4 e 8 dias de imersão em SBF, respectivamente.	93
Figura 4.4.2.	Imagens de Microscopia Óptica (10x) e SEM (600x) dos <i>pellets</i> de LMSiCaP I após 1, 4 e 8 dias de imersão em SBF, respectivamente.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Composição química (%mol) das amostras de sílica mesoporosas	44
Tabela 4.1.	Dados obtidos por SAXS e BET.	66
Tabela 4.2.	Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP.	71
Tabela 4.3.	Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP-CF.	73
Tabela 4.4.	Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e da solução SBF.	75
Tabela 4.5.	Parâmetros experimentais dos perfis de liberação.	91
Tabela 4.6.	Dados do ensaio de perda de massa realizado nas pastilhas.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

1. Aminoácidos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Phe (F)	Fenilalanina
Gly (G)	Glicina
Gln (Q)	Glutamina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Pro (P)	Prolina
Tyr (Y)	Tirosina
Thr (T)	Treonina

2. Outras

α2-M	Macroglobulina α
ACN	Acetonitrila
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
C18	Grupo Octadecil
CF	5,6-carboxifluoresceína
DCM	Diclorometano
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ES-MS	Espectrometria de Massa
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonila
FS	Espectroscopia de Fluorescência
FSM	Folded Sheet Materials (Materiais com Poros Intercalados)
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxicarbonatoapatita

HMS	Hollow Mesoporous Silica Spheres (Esferas de Sílica Mesoporosa)
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	High Performande Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
ICDD	International Centre for Diffraction Data
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL	Interleucina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MBG	Vidro Bioativo Mesoporoso
MCM	Mobil Composition of Matter (Composição Mobil da Matéria)
MSU	Michigan State University (Universidade do Estado de Michigan)
MTS	Micelle Template Structures (Estruturas Moldadas por Micelas)
Nf	Número de mols adsorvido por grama de adsorvente
OGP	Osteogenic Growth Peptide (Peptídeo de crescimento osteogênico)
OGP-BP	Proteínas Ligantes do Peptídeo de Crescimento Osteogênico
OGP-CF	Osteogenic Growth Peptide marcado do 5,6-carboxifluoresceína
P123	Pluronic 123
PBS	Solução Tampão Fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PEO	Poli(óxido de etileno)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PPO	Poli(óxido de propileno)
rhBMP	Proteína Morfogenética Óssea Humana Recombinante
SAXS	Espalhamento de Raios X à Baixo Ângulo
SBA	Santa Barbara Amorphous
SBF	Simulated Body Fluid (Fluido Corpóreo Simulado)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
t_{50%}	Tempo Necessário para Liberar 50% do Fármaco
t-Bu	t-butílico
TCP	Fosfato tricálcio
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TEOS	Tetraetilortosilicato

TGF	Fator de Crescimento Transformador
TFA	Ácido Trifluoracético
TIS	Triisopropilsilano
Tris	Tris(hidroximetil)metilamina
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
XRD	Difração de Raios X

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Fisiologia do tecido ósseo	23
1.2. Fatores de crescimento na reparação óssea	27
1.3. Materiais Mesoporosos	31
1.3.1. Aplicações em Biotecnologia.....	35
2. OBJETIVOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Síntese de nanopartículas de sílica pura e sílica-fosfato de cálcio mesoporosos	43
3.2. Caracterização	44
3.2.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	44
3.2.2. Difração de raios X (XRD).....	44
3.2.3. Medidas de porosidade e de superfície específica (BET)	45
3.2.4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	45
3.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	45
3.2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	46
3.3. Síntese do Peptídeo OGP[1-14]	46
3.3.1. Síntese do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína	48
3.3.2. Purificação	49
3.3.3. Caracterização.....	50
3.4. Análises <i>in vitro</i>	51
3.4.1. Estudo da bioatividade <i>in vitro</i> para regeneração óssea em solução de SBF .	51
3.4.2. Adsorção do peptídeo OGP e OGP-CF às nanopartículas de sílica	52
3.4.2.1. Cinética de adsorção do peptídeo	52

3.4.2.2. Incorporação de OGP e OGP-CF.....	52
3.4.2.3. Liberação do peptídeo OGP-CF em solução SBF.....	53
3.4.2.4. Estudo de degradação <i>in vitro</i> em SBF.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Caracterização das nanopartículas de sílica pura e com fosfato de cálcio	56
4.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	56
4.1.2. Difração de raios X.....	58
4.1.3. Medida de porosidade e de superfície específica	60
4.1.4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo.....	63
4.1.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	66
4.1.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	68
4.2. Síntese e purificação do peptídeo OGP e OGP-CF	69
4.3. Análises <i>in vitro</i>	74
4.3.1. Estudo da bioatividade <i>in vitro</i> em solução de SBF	74
4.3.2. Adsorção do peptídeo OGP e OGP-CF às nanopartículas de sílica	82
4.3.3. Cinética de adsorção do peptídeo.....	84
4.3.4. Incorporação de peptídeo OGP-CF.....	86
4.3.5. Liberação do peptídeo OGP-CF em solução SBF	88
4.3.6. Estudo de degradação <i>in vitro</i> em SBF	91
5. CONCLUSÕES	96
6. PERSPECTIVAS.....	97
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

Deficiências esqueléticas, especialmente decorrentes de traumas, tumores ou desenvolvimento anormal, são comuns, e são normalmente tratadas por intervenção cirúrgica e enxerto para restaurar a função mecânica e reconstruir a área afetada. Devido a problemas como disponibilidade limitada, dificuldade de armazenamento e um tempo cirúrgico maior, no caso dos enxertos autógenos e alógenos, pesquisadores buscam materiais sintéticos que facilitem a reparação óssea visando o restabelecimento rápido das funções fisiológicas (PINTO et al., 2007).

Um grande número de trabalhos vem utilizando materiais mesoporosos ordenados em diversas aplicações (TAGUCHI; SCHÜTH, 2005; BECK; VARTULI, 1996). As pesquisas com materiais mesoporosos têm resultado em biomateriais com duas aplicações principais na área médica: emprego como sistemas carreadores de fármacos e na regeneração de tecido ósseo.

A sílica mesoporosa com estrutura hexagonal, SBA-15, apresenta elevada área superficial (na faixa de $690-1040\text{m}^2.\text{g}^{-1}$) e tamanho de poros usualmente em torno de 4,6 a 30nm, sendo assim um material adequado para incorporar e liberar uma grande variedade de moléculas, inclusive aquelas que apresentam atividades terapêuticas.

Vidros mesoporosos bioativos (MBGs) têm sido sintetizados com sucesso exibindo uma propriedade bioativa maior e uma relação estrutura/composição diferente em relação aos vidros convencionais. Além do mais, tanto o grande volume de poro quanto os mesoporos uniformes dos MBGs torna possível uma imobilização direta e altamente eficiente de proteínas e fármacos dentro dos MBGs, que são muito importantes nas aplicações médicas (ZHAO et al., 2008).

Dentre as moléculas que podem ser carreadas pelos MBGs, os moduladores de fator de crescimento ósseo têm se destacados por atuarem em pequenas concentrações e por atuarem como mediadores locais sobre as células osteoprogenitoras. Neste contexto, o Osteogenic Growth Peptide (OGP), peptídeo de crescimento osteogênico, tem atraído interesse clínico como um agente anabólico e estimulador hematopoiético.

Nessas condições, o efeito simulatório extra da inclusão de um fator de crescimento e a capacidade osteogênica do material são interessantes propriedades para a regeneração óssea. De acordo com Woo et al. (2001) a eficácia de um fator de crescimento não é apenas dependente de sua atividade, mas também influenciada pelo método de liberação, ou seja, o material carreador. Carreadores aumentam a retenção do peptídeo no local do tratamento por um tempo suficiente para permitir a atividade e, posteriormente, pode fornecer uma base para o crescimento ósseo.

Neste trabalho, os materiais mesoporosos de sílica foram obtidos por método envolvendo micelas de surfactantes e de precursores inorgânicos. Devido a natureza biocompatível das apatitas, foram realizadas sínteses com preparação simultânea de sílica e apatita mesoporosos com diferentes concentrações de sílica. A escolha deste sistema visa reunir as características texturais, de estabilidade e resistência da sílica mesoporosa com a biocompatibilidade das apatitas. As alterações dos parâmetros estruturais, superficiais, texturais e de distribuição de tamanho de poros foram avaliadas neste trabalho por meio de medidas de espectroscopia na região do infravermelho e adsorção e dessorção de nitrogênio (N_2). As imagens de microscopia eletrônica de varredura forneceram informações morfológicas das amostras. Além disso, medidas de microscopia eletrônica de transmissão e de espalhamento de raios X a baixos ângulos foram utilizadas com o objetivo de se tentar elucidar a estrutura de poros do material puro e verificar a ocorrência de possíveis alterações causadas pela introdução da apatita na estrutura da sílica.

Após a caracterização, os materiais foram imersos em soluções do peptídeo OGP para incorporação desta molécula e os ensaios preliminares de liberação do peptídeo a partir das amostras mesoporosas foram realizados em uma solução que simula o fluido corpóreo. Os resultados obtidos foram comparados com os ensaios de degradação dos materiais.

Mesmo com os materiais disponíveis no mercado atualmente e dos avanços conquistados no desenvolvimento de novos biomateriais para engenharia tecidual, ainda busca-se materiais bioativos com características e propriedades mecânicas similares ao autoenxerto ósseo. Assim, o que motivou este trabalho foi preparar materiais mesoporosos com propriedades bioativas e capazes de carrear um

peptídeo osteoindutor, para futuramente promover a regeneração de fraturas no tecido ósseo em tempo menor.

1.1. Fisiologia do tecido ósseo

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto e serve de suporte para as partes moles e proteção dos órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana, torácica e no canal raquidiano. Atua alojando e protegendo a medula óssea, formadora das células do sangue. Possui propriedades mecânicas, como alta resistência a fratura e flexibilidade, proporcionando apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, constituindo um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (GARTNER; HIATT, 2003).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo de sustentação, formado por células e por material extracelular calcificado, denominado matriz óssea, em constante processo de remodelamento. Sua macroestrutura é constituída pelo osso cortical (compacto), osso trabecular (esponjoso), medula óssea e vasos sanguíneos. O osso cortical é encontrado nas diáfises dos ossos longos e na superfície externa dos ossos planos, e possui a função de proteção dos tecidos e órgãos vitais, devido à resistência a incidência de cargas. Já o osso trabecular é encontrado nas extremidades e cavidades medulares de ossos longos, bem como nas vértebras e no centro de ossos planos, sendo menos resistente, atuando nas funções metabólicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O osso é composto de três tipos de células (osteoblastos, osteoclastos, osteócitos), uma matriz extracelular mineralizada (composta de 65% de hidroxiapatita e fosfato tricálcio) e uma matriz extracelular orgânica (composta de 35% de colágeno e outras proteínas como glicoproteínas, proteoglicanas, osteocalcina, osteopontina e fatores de crescimento). Estas proteínas contribuem para a abundância de sinais no interior da matriz extracelular. As fibras de colágeno flexíveis e resistentes reforçadas com cristais de hidroxiapatita são importantes para o requisito de força compressiva e alta resistência do osso à fratura (STEVENS, 2008).

As células ósseas estão envolvidas nos processos de osteogênese, manutenção e remodelação óssea. Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I e V, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea, sendo, portanto, as células responsáveis pela expressão gênica dessas proteínas de forma a promover um equilíbrio de troca iônica, principalmente de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , iniciando a mineralização da matriz (GARTNER; HIATT, 2003). Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito. A matriz se deposita ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canálculos. Os osteócitos secretam fatores de crescimento que facilitam o recrutamento de pré-osteoblastos para a remodelação do esqueleto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Já os osteoclastos são células móveis, gigantes, ramificadas, que se originam de precursores mononucleados provenientes da medula óssea, responsáveis pela reabsorção óssea.

Apesar da sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito plástico e possui alta capacidade de se remodelar mediante diversas situações a que é submetido, tais como lesões, fraturas e perdas ósseas. O processo de regeneração óssea se inicia a partir de importantes reações biológicas, desencadeadas pela própria lesão do tecido.

O acometimento de uma lesão no tecido ósseo, traumática ou cirúrgica, é seguido por sequência histológica definida, destinada a reparar a lesão. Nos locais de fratura óssea, ocorre hemorragia, pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas (GERIS et al., 2008). A reparação se inicia após a remoção, pelos macrófagos, do coágulo sanguíneo e dos restos celulares e da matriz. A nível histológico, o perióstio e o endóstio próximos à área fraturada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que constitui um colar em torno da fratura que penetra entre as extremidades ósseas rompidas (Figuras 1.1a e 1.1b). Nesse anel ou colar conjuntivo e também no conjuntivo que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam, bem como por ossificação intramembranosa. Desta forma, no local de reparação, podem ser encontradas ao mesmo tempo áreas de cartilagem, áreas de ossificação intramembranosa e áreas de ossificação endocondral (GARTNER; HIATT, 2003). Esse processo evolui de

modo a aparecer, após certo tempo, um calo ósseo que envolve as extremidades do osso fraturado (Figura 1.1c e 1.1d).

A nível celular, o remodelamento ósseo depende da atividade integrada de dois tipos de células: os osteoblastos, para produção de tecido ósseo novo, e os osteoclastos, para reabsorção óssea, ambos os eventos cruciais ao processo no decorrer do crescimento ósseo normal, ou após lesão. Durante o processo de neoformação óssea, na ossificação intramembranosa, as células mesenquimais presentes na medula óssea se diferenciam em osteoblastos e iniciam a síntese de matriz osteóide, formando assim o osso primário ou imaturo. As fibras de colágeno são depositadas randomicamente formando uma estrutura entrelaçada não mineralizada. Conforme ocorrem as trocas iônicas entre os tecidos e o fluído sanguíneo, a matriz vai sendo mineralizada e este osso vai sendo reabsorvido e sendo substituído por osso secundário ou lamelar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Mesmo representando apenas 1% da matriz extracelular orgânica, os fatores de crescimento têm se tornado de grande interesse para entender os processos fisiopatológicos de regeneração óssea e osteointegração.

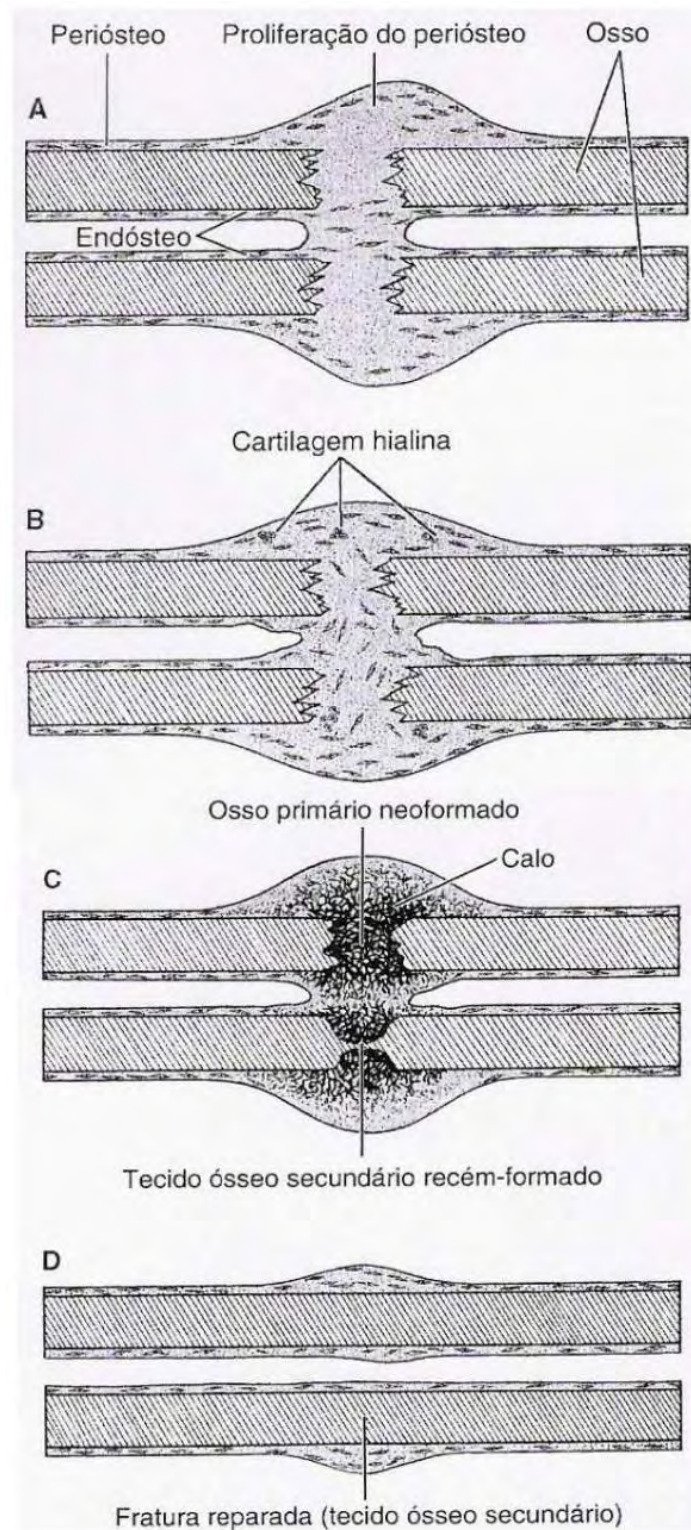


Figura 1.1. Processo de reparação da fratura, por formação de novo tecido ósseo a partir do endosteio e do periosteio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

1.2. Fatores de crescimento na reparação óssea

O processo de reparação óssea é um conjunto complexo de eventos biológicos regulados por células específicas, pela matriz extracelular e por diferentes fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento e citocinas são importantes reguladores do processo de cura e são produzidos por células presentes no local de regeneração e liberados nesta área por tecidos vizinhos (extremidades ósseas danificadas, músculos, medula, periósteo) (GERIS et al., 2008). Os fatores de crescimento, combinados às suas proteínas de ligação, agem como reguladores locais das funções celulares, estimulando a diferenciação, proliferação, migração, adesão celular e expressão gênica. Em casos de lesão óssea, fraturas, tratamentos de tumores ósseos, defeitos congênitos e outras patologias, o osso danificado não se regenera espontaneamente. É necessário um auto-enxerto ou osso alogênico para restaurar a integridade estrutural e funcional, no entanto, efeitos adversos estão associados a estas técnicas, como por exemplo, a necessidade de um segundo sítio cirúrgico para a obtenção do enxerto, o que pode, muitas vezes, contra-indicar o procedimento e o fato de não haver células para que ocorra a fase I da osteogênese, respectivamente (PINTO et al., 2007). Assim, a liberação de fatores de crescimento nos locais lesionados pode complementar a terapia convencional de reparação óssea (WOZNEY; SEEHERMAN, 2004).

Os fatores de crescimento são secretados por uma grande variedade de células para regular o processo de cura de ferimentos. Vários fatores de crescimento têm sido usados para melhorar os resultados clínicos em cirurgias cardíacas, ortopédicas, plásticas, oral e periodontal, onde se pode citar:

- Fator de crescimento transformador beta (TGF- β): estimula o recrutamento e proliferação de células mesenquimais, sua diferenciação em osteoblastos e/ou condrócitos, e atua na produção de matriz extracelular (TSIRIDIS et al., 2007).
- Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF): regula a síntese de DNA e a proliferação celular; regula a reparação inicial da fratura e cura de ferimento, através da reabsorção óssea e degradação de colágeno; inibe a aposição de matriz (colágeno tipo I); estimula os osteoblastos a produzir interleucina (IL-6), que recruta osteoclastos (KOFRON; LAURENCIN, 2006).

- Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF): mediando efeitos de hormônios, fatores de crescimento, citocinas e morfogênese durante a cura da fratura, estimulando a proliferação de osteoblastos e a produção de matriz óssea (SOO-HONG; SHIN, 2007).
- Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF): secretado pelos osteoblastos, estimula a angiogênese, que é um fator essencial para a formação óssea, sendo importante na formação e manutenção dos vasos sanguíneos; regula a migração, proliferação, sobrevivência e atividade de células endoteliais, osteoclastos e osteoblastos (KOFRON; LAURENCIN, 2006).
- Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs): fatores de diferenciação celular que induzem a diferenciação de células mesenquimais em osteoprogenitoras.

Estudos *in vivo* usando BMPs associadas a sistemas de liberação têm demonstrado a capacidade dessas proteínas em induzir o crescimento ósseo e estimular a reparação de fraturas. Como exemplo, a utilização de rhBMP (proteína morfogenética óssea recombinante humana) incorporada em implantes de PLGA (ácido poli láctico-co-glicólico) acelerou a cura de fraturas em fêmur de ratos (LEE et al., 1994) e promoveu a formação óssea em defeitos críticos em diáfises umeral (ZEGZULA et al., 1997) e a cicatrização de defeitos críticos em crânio de ratos quando em cimentos de fosfato de cálcio (BODDE et al., 2008).

O conceito de osteoindução foi primeiro descrito por Urist (1965) quando observou a neoformação óssea no interior de matrizes ósseas desmineralizadas. Desde então, estas proteínas têm sido descritas como fatores responsáveis pela neoformação óssea (EPPLEY et al., 2005), pois por meio de quimiotaxia, as BMPs atraem células mesenquimais para o local da formação óssea e induz a conversão destas células em uma linhagem préosteoblástica. No entanto, há um certo questionamento sobre a relação custo-eficácia das BMPs, devido à grande quantidade necessária ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, dose terapêutica do INFUSE) para se obter uma regeneração óssea eficaz em comparação às técnicas cirúrgicas convencionais (EPSTEIN, 2011) que pode limitar seu uso em relação aos demais materiais.

Desta forma, peptídeos, biomoléculas constituídas por dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas (MACHADO et al., 2004), são quimicamente versáteis e têm demonstrado interesse científico

quando o assunto é moléculas osteoindutoras ou modeladoras de fatores de crescimento.

Recentemente, uma classe de sequências peptídicas tem sido sintetizada diretamente pela Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS), incluindo *motifs* indutores da medula óssea. Dentre os de interesse na engenharia óssea, a sequência peptídica reguladora de fator de crescimento ósseo, no caso o OGP, foi escolhida devido à propriedade de osteoindução.

O OGP é um peptídeo de ocorrência natural cuja estrutura primária é idêntica à sequência C-terminal 89-102 (Ala-Leu-Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly) da Histona H4 (Figura 1.2). É um tetradecapeptídeo endógeno presente fisiologicamente no soro humano, em concentração micromolar (BAB et al., 1992). Seu pequeno tamanho e linearidade, que o faz susceptível a proteólise, aliada à baixa concentração, sugere uma proteína de ligação para o OGP, OGPBP-OGP (OGPBP: OGP *binding protein*), que promove sua proteção contra proteólise e a manutenção da concentração deste peptídeo na circulação (BAB; CHOREV, 2002).

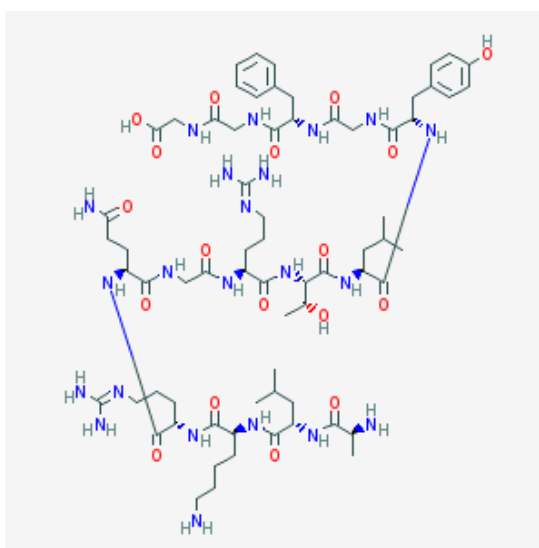


Figura 1.2. Fórmula estrutural do peptídeo OGP. (NCBI, 2012)

A maioria do OGP sérico encontra-se ligado não covalentemente a α_2 -macroglobulina (α_2 -M) do soro, em ambas as formas, nativa e ativada. A forma ativada gera ligações covalentes com as proteinases, em um processo que envolve uma mudança conformacional, tornando a molécula mais compacta, diminuindo, dessa forma, a disponibilidade do OGP para o sistema. A forma nativa aumenta

imediatamente a disponibilidade do OGP para o sistema circulatório (GAVISH et al., 1997), onde sua concentração é aumentada durante uma injúria local ao tecido ósseo, medula óssea ou a reações osteogênicas sistêmicas (BAB et al., 1992). Estudos indicaram que o OGP se liga as OGPBPs via motivos diferentes daqueles que são reconhecidos pelos anticorpos anti-OGP (Figura 1.3) (GREENBERG et al., 1995).

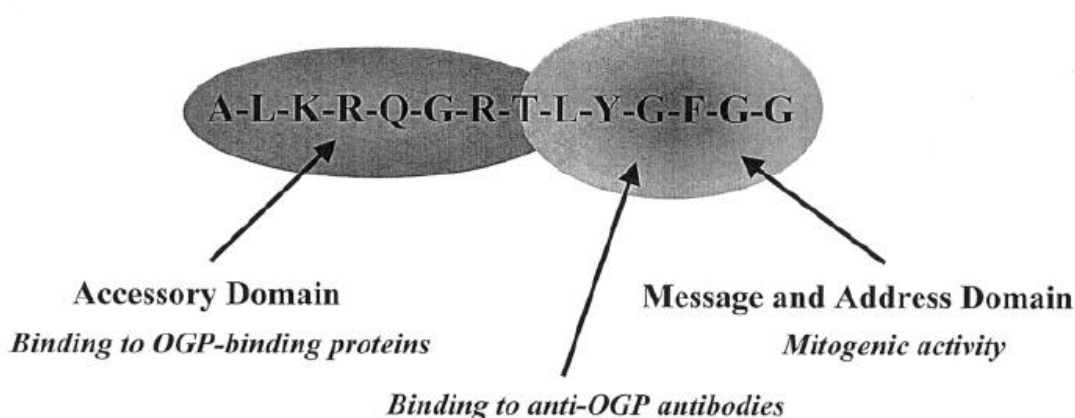


Figura 1.3. Domínios funcionais no peptídeo OGP. A porção C-terminal participa do reconhecimento e ligação ao receptor macromolecular e sinalização da via mitogênica. A porção N-terminal compreende o domínio que participa da ligação às OGPBPs (BAB; CHUREV, 2002).

In vitro, o OGP e seus derivados possuem excelente potencial mitogênico para células de linhagem osteoblástica e fibroblástica (BAB et al., 1992; GREENBERG et al., 1993), favorecem o aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e da mineralização da matriz óssea (ROBINSON; BAB; NEVO, 1995; BAB; CHOREV, 2002) e ainda regulam diretamente a diferenciação de células mesenquimais de medula em osteoblastos, favorecendo assim a neoformação óssea (CHEN et al., 2007; VANELLA et al., 2010).

In vivo, o OGP regula a expressão dos fatores de crescimento de transformação TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, fator de crescimento fibroblástico FGF-2, fator de crescimento insulínico IGF-1 e do colágeno tipo I (BRAGER et al., 2000), favorece a reparação da medula óssea recém transplantada ou irradiada, com aumento considerável das células hematopoiéticas (GUREVITCH et al., 1996), e ainda com a vantagem de ser prontamente sintetizado, pode substituir ou suplementar a terapia convencional, a qual é muito cara. Defeitos ósseos tratados

com *scaffolds* de PLGA com OGP sintético adsorvido foram reparados em um menor tempo em relação aos animais que receberam o OGP por via sistêmica; este estudo apontou um importante resultado na via de administração destes peptídeos, revelando um efeito terapêutico mais eficaz quando aplicado localmente (SHUQIANG et al., 2008). Estudos com administração via sistêmica do OGP relata o estímulo da ossificação endocondral em locais de fratura tanto em ratos quanto em coelhos, reduzindo o tempo de reparação óssea (SUN; ASHHURST, 1998; BRAGER et al., 2000; GABET et al., 2004)

Muitos materiais podem ser utilizados como carreadores para liberação de moléculas de interesse biológico, como os moduladores de fator de crescimento no tecido ósseo. Entre eles, pode ser citados os materiais bioativos mesoporosos, governado pela natureza química das paredes dos poros, área de superfície específica e a relação diâmetro dos poros-molécula hospedeira (VALLET-REGÍ et al., 2007).

1.3. Materiais Mesoporosos

Um grande número de processos e reações químicas tem lugar na interface entre um meio fluido e um sólido poroso, e o resultado final dessa interação depende das características do sistema poroso e do sólido. Este eixo tem conduzido ao desenvolvimento de metodologias específicas para as sínteses de materiais com porosidade mais adequada para a função que se deseja.

O aumento do número de processos para obtenção de materiais porosos, que utilizam condições brandas, promoveu o desenvolvimento de matrizes (inorgânicas ou híbridas nanoestruturadas) a partir da utilização de conjuntos de surfactantes auto organizáveis como agentes direcionadores de estruturas, permitindo assim, a construção de uma nova classe de materiais nanoestruturados em escala mesoscópica (ROCHA, 2010).

De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), os materiais porosos são classificados em três classes: microporosos (diâmetro do poro entre 0,2-2,0 nm); mesoporosos (2,0-50,0 nm); macroporosos (acima de 50,0 nm) (SING et al., 1985). O tamanho dos materiais mesoporosos permite não

somente o fácil acesso de moléculas com tamanho acima de certa extensão, mas também o controle de funções dependendo da geometria do poro.

Materiais microporosos e macroporosos são grandemente usados como adsorventes, mas eles são incapazes de adsorver um grande espectro de moléculas orgânicas de interesse por causa da distribuição do tamanho de poro como, por exemplo as zeólitas, que apesar da sua importância industrial, absorvem somente aquelas moléculas suficientemente pequenas para penetrar em seu sistema de poros (VALLET-REGÍ; VILLAREJO, 2006). Os poros dos materiais mesoporosos permitem não somente o fácil acesso pelas moléculas com certo tamanho, como também, a possível contratibilidade em funções dependendo da geometria do poro.

A síntese de materiais mesoporosos ordenados requer o emprego de moléculas de surfactantes em solução aquosa. Nessas condições, quando a concentração do surfactante em dissolução alcança um valor crítico, denominado concentração micelar crítica, as moléculas formam agregados denominados micelas, cuja forma e tamanho depende essencialmente da natureza e composição química da molécula de surfactante, de sua concentração e da temperatura, junto com fatores como o pH da solução e a concentração total salina (Figura 1.4). As micelas, por sua vez, agrupam formando estruturas supramicelares, e a natureza das distintas fases micelares variam em função da concentração e temperatura (VALLET- REGI; VILLAREJO, 2006).

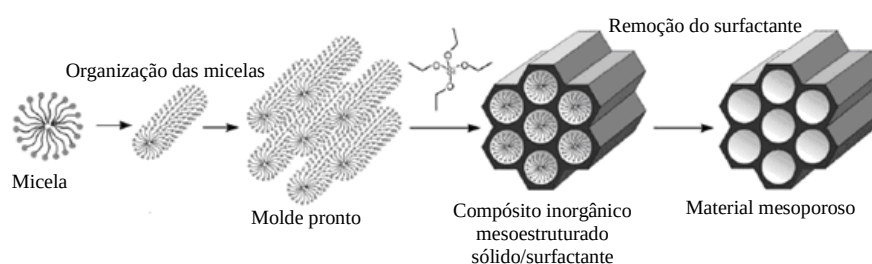


Figura 1.4. Mecanismo de formação da sílica mesoporosa (HOFFMANN et al., 2006).

De maneira geral, os agentes surfactantes podem classificar-se em: catiônicos, aniônicos, neutros e não iônicos (HOFFMANN et al., 2006). Assim, os surfactantes catiônicos podem conter as cadeias hidrofóbicas unidas ao mesmo átomo de nitrogênio da cabeça polar, ou cada uma das cadeias unidas a um átomo

de nitrogênio distinto. Os surfactantes aniônicos contêm um grupo sulfônico ou um fosfato como cabeça polar. O emprego de um tipo de surfactante tem grande importância na síntese de materiais mesoporosos, já que a natureza da fase que se obtém está condicionada em boa medida pela interação que se estabelece entre as espécies químicas em solução e o surfactante. No caso dos surfactantes não iônicos, por exemplo, aqueles em que a cabeça polar formam grupos polióxido de etileno, prevalece a interação entre átomos de oxigênio do grupo éter e átomos de hidrogênio pertencentes a grupos silano, Si-OH, dos oligômeros de silício, a um pH moderado. Em um pH fortemente ácido (abaixo do ponto isoelétrico do silício, pH = 2) há que se considerar a possibilidade de protonação dos grupos Si-OH. Em todos os casos é necessário considerar que o pH da dissolução determina a carga das espécies químicas que vão formar o esqueleto inorgânico do material, e portanto condiciona o mecanismo de interação com o surfactante (VALLET- REGI; VILLAREJO, 2006).

Foi assim que em 1990, Yanagisawa e colaboradores reportaram a preparação de sílica mesoporosa com distribuição de poro uniforme como resultado da intercalação de cátion cetiltrimetilamônio entre camadas de kanemita polissilicato, seguida pela calcinação para remoção do surfactante. Este novo material foi chamado de FSM-16 (Folded Sheet Materials). Este material tem grande estabilidade térmica e hidrotérmica devido ao alto grau de condensação nas paredes das sílicas desses materiais. Inagaki, Fukushima e Kuroda (1993) relataram que o diâmetro de poro da FSM-16 pode também ser controlado pela variação do comprimento da cadeia alquil do surfactante catiônico. Uma significativa descoberta na pesquisa de materiais mesoporosos foi quando cientistas da Móbil Oil Company divulgaram a família M41S de mesoporosos silicato/aluminossilicato onde um surfactante de cadeia longa foi usado como “*template*” ou agente formador de poros durante a síntese sol-gel (BECK et al., 1992). Entre estes materiais, os mais conhecidos estão a MCM-41 (com estrutura hexagonal), MCM-48 (com estrutura cúbica) e MCM-50 (com estrutura lamelar) (HOFFMANN et al., 2006). Estes materiais têm poros estruturados uniformemente, grande área de superfície específica e volume de poro específico que resultou no interesse mundial pelos materiais mesoporosos (VINU; HOSSAIN; ARIGA, 2005).

Huo e colaboradores (1994) noticiaram a síntese de materiais mesoporosos, usando surfactantes catiônicos e aniônicos em condições ácidas. Tanev, Chibwe e Pinnavaia (1994) prepararam sílica HMS (Hollow Mesoporous Silica Spheres) usando uma amina neutra como “*template*”. Em comparação com a MCM-41, mesoestruturas de HMS geralmente possuem estrutura hexagonal desordenada e paredes finas, estabilidade térmica superior e menor tamanho cristalino que torna a mesoporosidade textural um acesso improvável para o confinamento na rede mesoporosa. Bagshaw, Prouzet e Pinnavaia (1995) relataram a síntese de um material mesoporoso desordenado chamado MSU-1 (Michigan State University) usando óxido de polietileno (PEO) como agente direcionador de estrutura. O MSU-1 possui paredes finas e pequeno tamanho de partículas com considerável mesoporosidade devido aos poros formados entre as partículas serem relativamente pequenos, que o distingue da MCM-41.

Já em 1998, foi desenvolvida uma rota de preparação de sílica mesoporosa ordenada a partir do emprego de moldes à base de surfactante não-iônico ou de copolímeros polietoxilados e polipropoxilados como o Pluronic® P123 ($\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$) agentes direcionadores de estrutura (ZHAO et al., 1998). A formação de sílica se dá à temperatura ambiente, a partir da adição do TEOS em solução fortemente ácida (HCl 2M) contendo o surfactante não-iônico ou o copolímero. Esse material foi desenvolvido na Universidade de Santa Bárbara, nos Estados Unidos, e denominado SBA-15 (Santa Barbara Amorphous number 15) (ZHAO et al., 1998).

O SBA-15, de maneira similar ao MCM-41, possui uma rede hexagonal de mesoporos. Este material apresenta estreita distribuição de tamanho de poros, usualmente na faixa de 4,6 a 30nm e áreas superficiais na faixa de 690 a 1040 m².g⁻¹. Devido à maior espessura das paredes de seus poros (3,1 a 6,4nm) ele apresenta uma melhor estabilidade hidrotérmica quando comparado ao MCM-41 (CIESLA; SCHÜTH, 1999). Diferente do MCM-41, o SBA-15 pode possuir além dos mesoporos primários, mesoporos secundários e microporos não ordenados entre suas paredes (SOUSA et al., 2008).

Materiais do tipo HMS são obtidos através do emprego de aminas com cadeias carbônicas longas e precursor de fase inorgânica à base de alcóxido. Por outro lado, se o composto à base de amina for substituído por surfactante à base de

etóxido, o material obtido será classificado como MSU. Nestes dois casos, a interação entre o surfactante e a fase inorgânica se dá por ligações de hidrogênio. Os materiais obtidos através de reações que levam à formação de híbrido orgânico-inorgânico são denominados MTS-1 (SOLLER-ILLIA et al., 2003).

O método sol-gel, empregado na síntese dos materiais mesoporosos, surgiu no fim da década de 90 e pode ser visto como uma sequência de processos inter-relacionados. Estes processos envolvem a síntese de uma rede inorgânica obtida pela mistura de alcoóxidos e água, na presença de solvente e catalisador, seguida por hidrólise, gelatinização, remoção de resíduos orgânicos e água dos poros do gel sólido por tratamento a baixas temperaturas. Finalmente, a densificação do gel seco por tratamento térmico pode levar a materiais porosos (xerogéis) ou densos, na forma de pós ou monólitos (RUBIO; OTEO, 1997). Sua hidrólise é rápida, principalmente em compostos cujo grupo alquil (R) é pequeno, porém alguns alcoóxidos como os de silício possuem uma baixa reatividade (comparados aos alcoóxidos de titânio) sendo necessária a adição de catalisadores ao processo para promover um aumento na velocidade das reações de hidrólise e condensação (WALLINGTON; PILON; WRIGHT, 1997).

Materiais mesoporosos de sílica e do sistema ternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ obtidos por processo sol-gel têm demonstrado excelente bioatividade. Desde as fases iniciais de pesquisa de biomateriais, ficou claro que uma elevada área superficial do material bioativo desempenha um papel importante na bioatividade (HENCH, 1971). Tanto uma carga de superfície negativa como um substrato poroso tem sido relatado ser importante para a formação de hidroxiapatita (HA) (HENCH, 2006; ANDERSSON et al., 2005; SOUSA; SOUZA; SOUSA, 2008).

1.3.1. Aplicações em Biotecnologia

Os materiais mesoporosos bem ordenados têm sido muito estudados nas universidades e laboratórios industriais devido ao interesse comercial de seus usos como adsorventes, em catálises, suporte para adsorção de biomoléculas (VINU; HOSSAIN; ARIGA, 2005).

A estrutura dos materiais mesoporosos baseados em silício é formada por uma rede de tetraedros SiO_4 conectados entre si mediante os átomos de oxigênio

dos vértices. Naturalmente, esta é uma característica compartilhada pelos silicatos cristalinos como as zeolitas, ou por sílicas amorfas. Os grupos Si-OH nas propriedades do material. Estes grupos são capazes de reagir com uma grande variedade de compostos químicos formando ligações covalentes do tipo Si-O-R que permite fixar, na superfície do material, diferentes espécies químicas (VALLET-REGÍ; VILLAREJO, 2006).

A característica porosa desses materiais é de importância tecnológica potencial, pois pode ser usada para confinar uma variedade de moléculas para muitos processos químicos e biológicos. Como a rede de sílica mesoporosa apresenta transparência óptica no visível, perto da região UV, os materiais com grupos funcionais opticamente ativos são candidatos promissores para aplicações ópticas incluindo filtros, sensores, lasers, fotocatalise, adsorventes (BECK; VARTULI, 1996), suportes para catalisadores e dispositivos para liberação controlada de fármacos (VALLET-REGÍ et al., 2001). A obtenção de materiais incorporados com moléculas de corantes ou íons luminescentes (ROCHA, 2010) torna-se extremamente interessante para aplicações ópticas e fotônicas. As propriedades da superfície e os tamanhos das partículas podem permitir a atuação como sensores dentro de células tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SLOWING et al., 2007). Outra importante aplicação é catálise e remediação ambiental (VINU; HOSSAIN; ARIGA, 2005).

A nanotecnologia biomédica está assumindo um papel de grande importância para aplicações em diagnóstico, terapêutica, biologia molecular e bioengenharia.

Um dos materiais em destaque para aplicações biomédicas e que tem sido extensamente estudado é a sílica nanoestruturada. Este sistema também pode ser modificado com biomoléculas, como enzimas, proteínas e DNA (BHARALI et al., 2005), para aplicações biológicas. A superfície modificada com estas biomoléculas permite o reconhecimento específico entre as espécies livres e as imobilizadas, podendo proporcionar informações diagnósticas ou servir como um processo de separação ou purificação (SLOWING et al., 2007).

A engenharia óssea está passando por extensiva pesquisa devido ao seu excelente potencial reparador de doenças ou danos teciduais via regeneração em vez de substituição. Essa técnica permite reconstruir uma estrutura semelhante promovendo apropriado apoio para a ancoragem de células *in vitro*. Um ideal apoio

para a regeneração óssea pode ser uma rede porosa altamente interconectada, onde os poros e interconexões devem ser suficientemente grandes para que ocorra penetração celular e vascularização para o centro de regeneração do tecido no implante. Além disso, a biocompatibilidade, osteocondutividade e a bioatividade do material podem ser geneticamente influenciadas pelas células osteoprogenitoras (BASTOS et al., 2004). Além do mais, a textura da superfície pode promover a adesão celular e absorção de metabólitos biológicos.

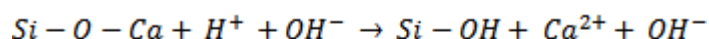
Vidros bioativos (*bioglass*) têm atraído muita atenção desde o primeiro relato por Hench et al. em 1971. Um material é dito bioativo quando é capaz de formar apatita em sua superfície em contato com fluidos fisiológicos *in vivo* ou SBF *in vitro*. Nessa apatita formada, osteoblastos podem se aderir, crescer e se proliferar, o que significa que o material é bioativo e pode ser implantado (VALLET-REGÍ et al., 2006).

A composição inorgânica do osso humano é hidroxiapatita (HA). Quando implantado no corpo humano, a superfície de uma cerâmica bioativa induz a biomineralização do fosfato de cálcio através da interação com o plasma sanguíneo, que é a primeira fase que interage com a superfície do implante logo após sua inserção em defeitos teciduais. As espécies iônicas inorgânicas dissolvidas no plasma, uma solução saturada em relação aos fosfatos de cálcio, apresentam um grande potencial de precipitação neste meio (ZHAO et al., 2008).

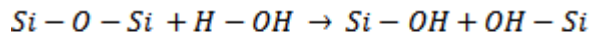
É conhecido que os vidros bioativos podem apresentar adesão ao osso e/ou ao tecido mole. Assim, aqueles que apresentam composições de até 53% de SiO_2 têm adesão ao osso e ao tecido mole. A porcentagem de SiO_2 entre 53% e 60% resulta em adesão apenas ao osso e em concentrações acima de 60% não há formação de ligação com o tecido, assumindo o material comportamento bioinerte, que ao ser implantado no organismo, apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição, havendo apenas formação de uma membrana de tecido fibroso ao redor do material com o propósito de isolá-lo, prevenindo assim possíveis interações adicionais (HENCH; PASCHALL, 1973; KOKUBO, 2008). No entanto, com o aumento da área de superfície do material, que pode ser conseguido pelo processo sol-gel, esse intervalo de concentração de SiO_2 pode ser estendido conservando-se ainda elevados índices de bioatividade (SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011).

Existem dois principais protocolos *in vitro* para prever o comportamento dos materiais no interior do corpo humano. O teste mais simples é o protocolo estático, baseado na introdução do material teste em SBF; e o dinâmico, onde o SBF é continuamente trocado por meio de uma bomba peristáltica (VALLET-REGÍ et al., 2007). Os mecanismos de formação de apatita em SBF em materiais contendo grupos Si-OH em suas superfícies tem sido estudados em detalhe. Takadama et al. (2001; 2002) descreveu cinco estágios de formação de HA em vidros bioativos, que estão resumidos a seguir:

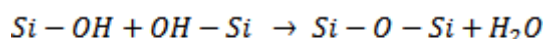
Estágio 1: rápida troca iônica entre íons Ca^{2+} pertencentes à superfície do material com íons H^+ da solução, ocasionando aumento do pH do meio e formação de grupos silanol (Si-OH):



Estágio 2: liberação de sílica solúvel do material para a solução na forma $\text{Si}(\text{OH})_4$, sendo resultado da quebra de ligações siloxano (Si-O-Si) e contínua formação de grupos silanol:



Estágio 3: policondensação dos grupos silanol formando uma camada porosa rica em sílica na superfície do material exaurida de íons Ca^{2+} :



Estágio 4: aumento da concentração de íons na solução com o passar do tempo, ocorrendo posterior formação de um filme amorfo, rico em Ca^{2+} e PO_4^{3-} na superfície do material, quando o ponto de saturação da solução é alcançado. A alta área superficial da camada rica em sílica age como uma fonte de sítios para a nucleação heterogênea do filme, que cresce pela incorporação de mais íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} presentes na solução;

Estágio 5: formação da HA na superfície do material em consequência da cristalização do filme amorfo, rico em íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , pela incorporação dos ânions OH^- e CO_3^{2-} presentes na solução.

Hench e Paschall (1973) avaliaram a influência da sílica na bioatividade do Bioglass® e concluíram que a alta densidade dos grupos silanóis (Si-OH) existentes

na superfície da sílica amorfa é considerada responsável pelo crescimento da hidroxiapatita.

Em função de sua capacidade de adsorção e biocompatibilidade, os materiais de sílica têm sido empregados na produção de implantes artificiais por causa das propriedades osteogênicas de seus compósitos (AREVA et al., 2007), além de serem aptos em armazenar e liberar gradualmente fármacos. Esses materiais estão sendo utilizados para melhorar a biocompatibilidade de diversos sistemas de liberação controlada de fármacos. Dentre os materiais baseados em sílica, os materiais mesoporosos têm sido muito investigados como suportes de fármacos devido sua natureza atóxica, ajustável diâmetro de poros e elevada área superficial com muitas interações do tipo Si–OH.

Estudos usando sílica mesoporosa como adsorvente da gentamicina, um antibiótico usualmente empregado na traumatologia, mostraram que após implante em fêmur de ratos este material promoveu integração óssea, crescimento de tecido cortical e esponjoso que permitiu que o defeito ósseo fosse restaurado. Além do mais, o nível de gentamicina local foi superior a concentração inibitória mínima, sendo sensível para a maioria dos microrganismos (VALLET-REGÍ et al., 2002).

A incorporação de albumina bovina (BSA) em partículas de SBA-15 foi mostrada ser dependente do tamanho dos poros, onde o máximo de proteína incorporada foi 0,15g de BSA por grama de SBA-15. Já os ensaios de liberação mostraram um comportamento *burst*, onde aproximadamente 90% de BSA adsorvida foram liberados dentro de 24 horas (SONG; HIDAJAT; KAWI, 2005). Utilizando amostras de SBA-15 como carreador de osteostatina, que corresponde a sequência (107-111) da porção C-terminal da proteína relacionada ao hormônio paratireoidiano (PTHrP), foi demonstrado que houve aumento no crescimento celular e na expressão de vários produtos osteoblásticos, como fosfatase alcalina em cultura de células osteoblásticas (LOZANO, et al., 2010).

Além das aplicações comerciais no reparo de defeitos dos ossos, esta família de biomateriais poderia ser usada para revestir implantes metálicos, proteínas e/ou células de ativação para regeneração do tecido (ZHAO et al., 2008).

A possibilidade de combinar as propriedades de biocompatibilidade e liberação controlada de moléculas é um objetivo muito atrativo que pode ser

compartilhado com o uso de sílica mesoporosa devido basicamente às suas propriedades texturais extrínsecas, que pode induzir à bioatividade, juntamente com a opção de preencher os poros com agentes biológicos, tais como fatores de crescimento.

2. OBJETIVOS

Este trabalho objetivou desenvolver materiais bioativos a base de sílica mesoporosa para aplicação em sistemas carreadores de moléculas de interesse biológico, como o peptídeo OGP (osteogenic growth peptide), de forma a promover a osteoindução. Para tanto visou-se:

- Otimizar as condições de síntese de sílica mesoporosa pura e contendo hidroxiapatita, empregando materiais mesoporosos a partir de sílica, com arranjo hexagonal regular e alinhamento dos poros lineares e uniformes.
- Obter o peptídeo OGP por SPFS e utilizar a moléculas 5,6-carboxifluoresceína como sua sonda fluorescente.
- Analisar a eficiência da 5,6-carboxifluoresceína, bem como a utilizar a Espectroscopia de Fluorescência na monitoração da incorporação às partículas de sílica mesoporosa.
- Avaliar a liberação controlada do peptídeo OGP-5,6-carboxifluoresceína por Espectroscopia de Fluorescência, após incorporação nos sólidos.
- Avaliar a bioatividade *in vitro* em SBF destes materiais e o padrão de degradação em função do tempo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais foram estudados a partir de três sistemas: a) sílica mesoporosa pura; b) sílica mesoporosa e fosfato de cálcio; c) sílica mesoporosa pura e com fosfato de cálcio funcionalizadas com OGP. A Figura 3.1 apresenta o fluxograma mostrando de forma resumida o desenvolvimento do trabalho.

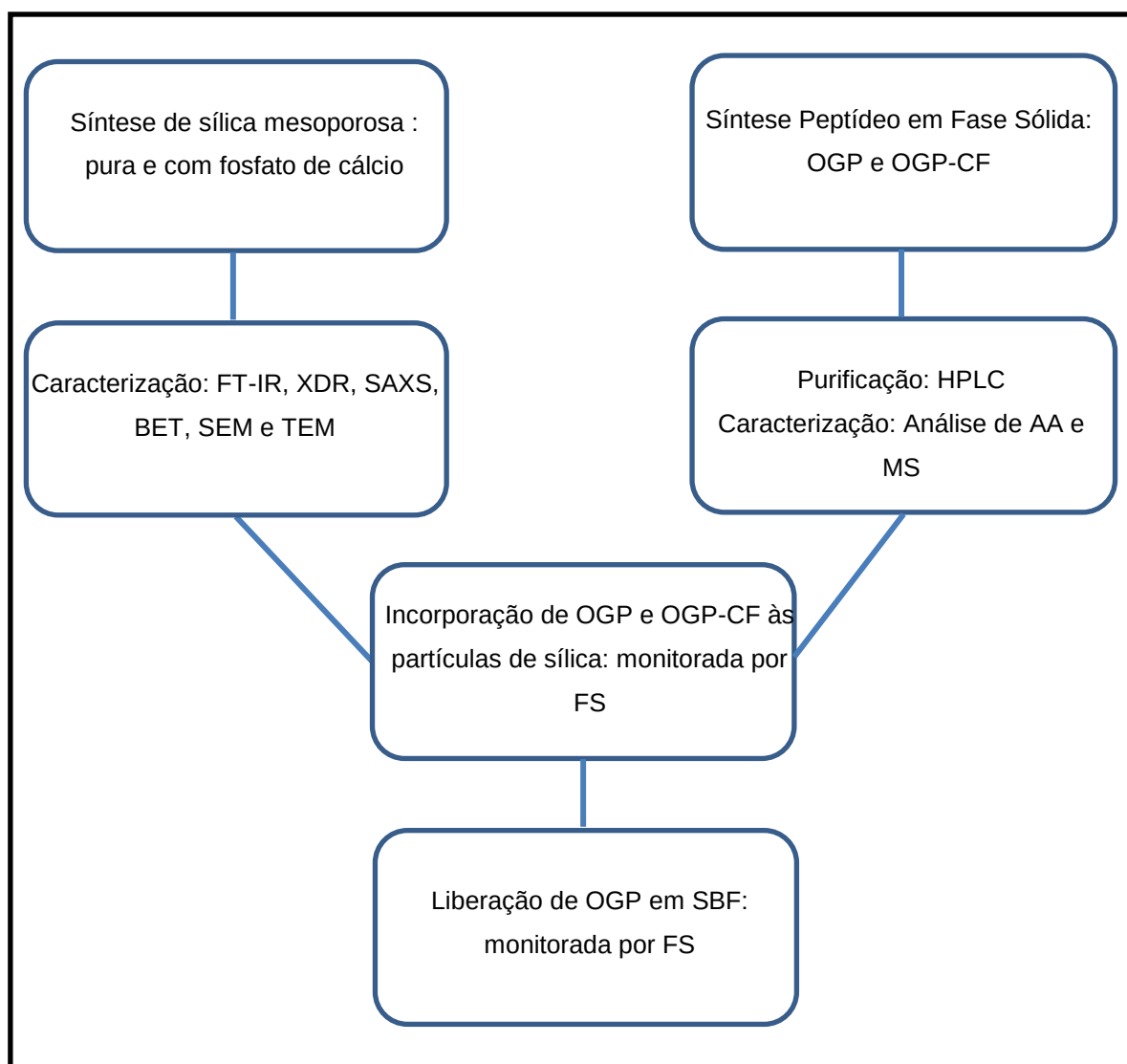


Figura 3.1. Fluxograma representando resumidamente o trabalho desenvolvido.

3.1. Síntese de nanopartículas de sílica pura e sílica-fosfato de cálcio mesoporosos

As nanopartículas de sílica mesoporosa foram preparadas a temperatura ambiente, a partir de soluções contendo bloco copolímero como agente direcionador de estrutura e tetraetilortossilicato $\text{Si}(\text{OEt})_4$ (TEOS) como fonte de sílica. Para tanto, foram realizadas três sínteses, cujos produtos finais foram denominados **LMSiO**, **LMSiCaP I**, e **LMSiCaP II** respectivamente.

1. Inicialmente foram dissolvidos 1,5g do copolímero não-iônico polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno (Pluronic® P123, BASF) como agente direcionador de estrutura, em 50 mL de água deionizada, ajustando o pH em 1,5 com solução de HCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$. Após dissolução completa do tensoativo em temperatura ambiente, foi adicionado, sob agitação intensa, tetraetilortossilicato $\text{Si}(\text{OEt})_4$ (TEOS, Acros) como fonte de sílica. A etapa final da condensação foi produzida pela adição de solução de fluoreto de sódio (2,5ml, NaF $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$), seguido do tratamento hidrotérmico da amostra a 65°C por 24h. O produto obtido foi lavado, seco e calcinado a uma temperatura de 200°C por um período de 6h e depois a 600°C por mais 6h, até a completa eliminação do agente direcionador de estrutura. Esse produto foi denominado LMSiO.

2. Para se obter partículas de sílica com fosfato de cálcio mesoporosos, optou-se por uma adaptação da proposta de Díaz et al. (2006). O primeiro passo da síntese (dissolução do P123) foi realizado nos mesmos parâmetros acima detalhados. Após dissolução completa do tensoativo, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foi adicionado e a solução foi mantida em agitação por 3h a 40°C . Sob agitação intensa, a mesma quantidade de TEOS foi adicionado. A solução foi mantida em agitação por 24h e então, sob tratamento hidrotérmico a 80°C por 24h. O produto foi seco em estufa a 80°C por 12h. Após este período, o produto foi imerso em uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($0,06 \text{ mol.L}^{-1}$), seguido de um segundo tratamento hidrotérmico a 80°C por 24h, onde foi denominada LMSiCaP I.

3. Para obtenção do LMSiCaP II, os mesmos procedimentos descritos acima foram adotados, porém empregando quantidade maior de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a $0,13 \text{ mol.L}^{-1}$. Os dois produtos foram lavados, secos e calcinados a uma temperatura de 700°C por um período de 6h.

A composição (expressa em %mol) dos materiais de sílica mesoporosa sob estudo nesse trabalho estão listadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição química (%mol) das amostras de sílica mesoporosas.

Amostras	SiO₂ (%mol)	CaO (%mol)	P₂O₅ (%mol)
LMSiO	100	0	0
LMSiCaP I	80	15	5
LMSiCaP II	50	30	20

3.2. Caracterização

3.2.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos usando um espectrômetro FT-IR 8.300 – SHIMADZU. As pastilhas foram preparadas com mistura em KBr (1:100). Cento e vinte e oito escaneamentos foram acumulados numa resolução de 4 cm⁻¹, e os resultados foram utilizados na identificação de grupos funcionais.

3.2.2. Difração de raios X (XRD)

Os padrões de XRD, para determinar a estrutura cristalina, foram obtidos usando um Difratorômetro de Raios X Shimadzu XRD-6000, com um filtro de níquel e sob radiação de Cu (K α) a 40 kV e a 30 mA, com varredura angular entre 15° a 70° com passo de 0,02 s (2 θ) e tempo de aquisição de contagem de 3 s para cada amostra. As amostras foram fixadas sobre um suporte de vidro. A identificação das fases de apatita presentes nos materiais foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas padrões da base de dados ICDD – PDF-2 (International Centre for Diffraction Data – Powder Diffraction File-2).

3.2.3. Medidas de porosidade e de superfície específica (BET)

A área de superfície específica foi determinada pelo método de BET na razão de pressão relativa de 0,05 - 0,2 e a distribuição de tamanho de poros pela relação polinomial deduzida do modelo de Broekhoff e Boer (BdB) (PROUZET et al., 1999; BROEKHOFF; BOER, 1968). Os materiais obtidos foram caracterizados em um equipamento Micromeritics 2010 e 2020.

3.2.4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) das amostras foram realizadas na linha SAXS no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS Campinas, Brasil), utilizou-se uma fenda assimétrica e monocromador de silício (111), com feixe monocromático ($\lambda = 1,488 \text{ \AA}$) e foco horizontal. A intensidade espalhada foi coletada com um “imaging plate” localizado a 849,64 mm da amostra. A distância corresponde ao intervalo do vetor q de $0,018$ a $0,39 \text{ \AA}^{-1}$. Os “beam-stoppers” horizontal e vertical foram usados para absorver o feixe de raios X direto e refletido, respectivamente. A maioria dos padrões exibe pico de difração simples os quais foram atribuídos à distância de correlação dos poros. A distância de correlação do centro de poro a outro centro de poro é chamada de “d-spacing”. O efeito da absorção foi corrigido para todas as amostras.

3.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em um equipamento de alta resolução FEG-VP Zeiss modelo Supra 35, com um canhão de emissão como fonte de elétrons.

3.2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As medidas de TEM foram realizadas em um aparelho Philips CM20, com tensão de aceleração 200kV. A preparação da amostra foi realizada por suspensão em etanol, depositadas e secas em grades de Cu recobertas por carbono.

3.3. Síntese do Peptídeo OGP[1-14]

O peptídeo OGP foi sintetizado manualmente pela metodologia da fase sólida (SPFS) (MERRIFIELD, 1984), que se baseia no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica ligada covalentemente pelo seu aminoácido carboxi-terminal aos sítios

reativos existentes em um suporte sólido (resina). Empregou-se o protocolo de síntese Fmoc (Figura 3.2), que utiliza o grupamento base-lábil 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (FIELDS; NOBILE, 1999; CHAN; WHITE, 2000). Partiu-se de 1g de resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de 0,55 mmol/g) (Novabiochem) e DIC/HOBt (Fluka e Advanced Chem Tech, respectivamente) como agentes de condensação. Os aminoácidos com o grupo N-terminal protegidos por Fmoc utilizados na síntese foram adquiridos da Novabiochem.

Na etapa de condensação de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar, em relação ao grau de substituição inicial de 3 equivalentes para cada Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para DIC (diisopropilcarbodiimida) e HOBt (1-hidroxibenzotriazol), em uma mistura de DCM (diclorometano):DMF (dimetilformamida) (1:1) (ambos Synth). Na desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo Fmoc), foi empregada uma solução de piperidina 20% (v/v) (Merck) em DMF.

A eficiência das etapas de condensação foi monitorada pelo teste de Kaiser (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (presença de grupos aminos livres), o processo de acoplamento era repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

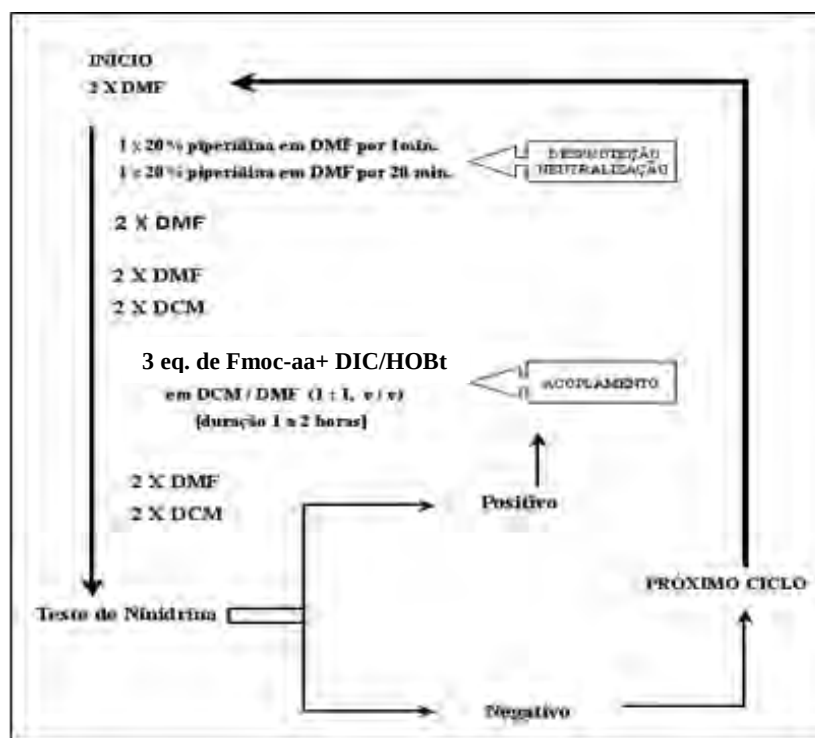


Figura 3.2. Diagrama da estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida

Após os acoplamentos dos resíduos de aminoácidos a massa total de peptidil-resina foi de 1,73 g, a qual foi dividida em duas partes, onde uma delas foi utilizada para o acoplamento da carboxifluoresceína (CF).

A clivagem final do peptídeo e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada utilizando 1 ml de solução de clivagem (94,5% TFA, 2,5% EDT, 0,5% Tioanisol e 2,5% água ultrapura) para 100 mg de peptidil-resina, a 25°C por 2 horas. O peptídeo bruto OGP foi precipitado e lavado com éter etílico gelado e centrifugado (seis vezes). Os reagentes desta solução foram adquiridos respectivamente da Fluka, Sigma e Acros; a água ultrapura foi obtida através do sistema de filtração Barnstead, equipado com cartuchos para retenção de sais e de compostos orgânicos.

Após o procedimento de clivagem foi realizada a extração com ácido acético 10% em sistemas de seringas de polipropileno de 5 ml, equipadas com um filtro de polietileno poroso acopladas a um sistema de vácuo com frasco coletor para o peptídeo extraído. O extrato bruto do peptídeo foi liofilizado, onde ao final foram obtidos 160 mg de material branco e floculoso.

O material obtido foi purificado utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e caracterizado por meio da análise de aminoácidos e espectrometria de massas (ES-MS positivo)

3.3.1. Síntese do peptídeo OGP marcado com carboxifluoresceína

Para realizar os experimentos envolvendo o peptídeo OGP e Espectroscopia de Fluorescência foi necessário marcar a sequência de aminoácidos com uma molécula capaz de se excitar pela absorção de radiação UV-Vis. Para tanto, foi escolhido a molécula 5,6-carboxifluoresceína (CF, Sigma®) (Figura 3.3), para que fosse acoplada ao término da síntese com os mesmos padrões de acoplamento para os aminoácidos. Este procedimento se fez necessário devido à ausência de fluorescência intrínseca na sequência do OGP.

A síntese do peptídeo OGP marcado com CF foi desenvolvida pela metodologia da fase sólida nos mesmos moldes que a síntese descrita anteriormente, sendo utilizada a massa reservada para o acoplamento da CF. O protocolo sintético empregado para marcação da peptidil-resina foi o mesmo adotado durante todo processo sintético, utilizando CF e DIC/HOBt (Fluka®), como agentes de condensação, com um excesso molar em relação ao grau de substituição da peptidil-resina (0,16 mmol/g) de cinco equivalentes para cada reagente em uma mistura de DMF/DCM 9:1; a reação de acoplamento ocorreu a temperatura ambiente por 2 h.

A clivagem final do OGP-CF da respectiva resina (200 mg) e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada com uma solução contendo 95% TFA, 2,5% Tioanisol e 2,5% água deionizada, a 25°C por 2 h sob agitação.

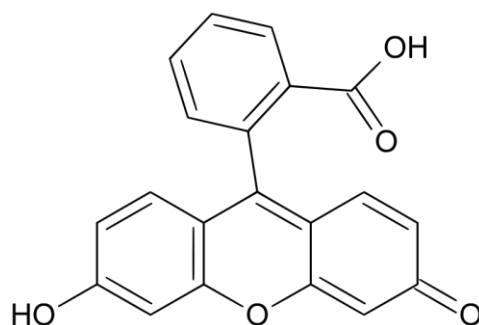


Figura 3.3. Fórmula estrutural da fluoresceína.

O peptídeo bruto OGP-CF foi precipitado e lavado com éter etílico gelado e centrifugado (seis vezes), foi extraído empregando uma mistura acetonitrila e água deionizada (1:1) a qual foi posteriormente concentrada em rotaevaporador. O extrato bruto do peptídeo foi liofilizado e o valor da massa obtida OGP-CF foi de 87 mg.

3.3.2. Purificação

Cromatografia líquida de alta eficiência

Os produtos isolados foram analisados e purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na escala analítica e semi-preparativa, respectivamente. Primeiro, o material bruto foi analisado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A, com uma coluna C18 de fase reversa (Kromasil, 150 x 4,6 mm; d = 5 µm; 300 Å). Nesta análise foram utilizados solventes A (água ultrapura contendo 0,045% de TFA) e B (acetonitrila, Mallinckrodt, contendo 0,036% de TFA) empregando um gradiente de 5 a 95% de B em 30 min com fluxo de 1,0 ml.min⁻¹, com detecção em 220 nm.

Após análise, o peptídeo bruto foi purificado em modo semi-preparativo utilizando um Cromatógrafo System Gold BECKMAN, com coluna C18 de fase reversa (Phenomenex, 250 x 21,20 mm; d = 5 µm; 100 Å). Foram utilizados os solventes A e B empregando um gradiente ajustado de acordo ao perfil e ao pico de eluição obtidos no cromatograma analítico, que foi de 15 a 60% de B em 120 min

com fluxo de 5 mL.min⁻¹ para o peptídeo não marcado e 20 a 60% de B em 120 min com fluxo de 3 mL.min⁻¹ para o peptídeo marcado, com detecção em 220 nm.

3.3.3. Caracterização

Espectrometria de massas

Análises das massas dos peptídeos foram realizadas por injeção direta em um aparelho Fison Plataform ESI (*"eletrospray ionization"*), com injeção direta com uma bomba Shimadzu LC-10AD, sistema este controlado por uma Workstation Compaq modelo AP 200. A técnica baseia-se em um analisador quádruplo que ioniza a amostra utilizando um eletrospray, obtendo-se ao final um espectro com picos na qual é possível determinar a razão massa molecular/carga (m/z).

Análise de aminoácidos

Os peptídeos foram previamente pesados (aproximadamente 1,0mg) e hidrolisados em 1 ml de HCl 6 mol.L⁻¹ e 160 µL de Fenol 5% em água a 110°C por 72 horas em atmosfera de N₂ sob agitação. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido posteriormente em tampão de diluição citrato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 2,2 e filtrado em unidade GV Millex (0,22 µm) (Millipore) antes de ser injetado no aparelho.

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo Cromatógrafo Líquido Shimadzu LC-10A/C-47A equipado com três bombas LC 10AT, injetor automático SIL 10AF e detectores de UV SPD 10A e fluorescência RF 10A, empregando o método de funcionalização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA). O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de eluição de cada aminoácido e o fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração da amostra. Para cálculo da proporção relativa dos aminoácidos das amostras determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média.

3.4. Análises *in vitro*

3.4.1. Estudo da bioatividade *in vitro* para regeneração óssea em solução de SBF

Preparação do *Simulated Body Fluid* (SBF)

A preparação da solução do SBF foi efetuada em um béquer utilizando 500mL de água ultra-pura em agitação, onde adicionou-se os reagentes abaixo listados, obedecendo as etapas descritas por Kokubo et al. (2006).

1. Cloreto de Sódio (NaCl);
2. Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3);
3. Cloreto de Potássio (KCl);
4. Monohidrogênio Fosfato de Potássio tri-hidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$);
5. Cloreto de Magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
6. Solução de HCl a $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$;
7. Cloreto de Cálcio (CaCl_2);
8. Sulfato de Sódio (Na_2SO_4);
9. Tris-hidroximetil aminometano ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) (Tris).

O pH foi corrigido com HCl $1,0 \text{ mol. L}^{-1}$ para um pH de 7,35. O conteúdo foi transferido a um balão volumétrico, onde se fez a quantidade de 1L com água ultra-pura. Após agitação do balão o conteúdo foi passado para um frasco de polietileno e conservado em geladeira.

Teste de bioatividade *in vitro*

A avaliação da bioatividade *in vitro* das nanopartículas foi realizada em solução SBF, como descrito por Kokubo et al. (2006). Amostras de sílica LM-SiO e LM-SiCaP I (0,1g) foram imersas nesta solução (100 ml) (YAN et al., 2006), e colocadas em banho a 37°C . Cada amostra foi imersa em SBF por 1, 7, 14, 21 e 28

dias, sem mudança na solução, mantidas em agitação constante. Após esses períodos as amostras foram secas em estufa a 60°C e analisadas por FT-IR e SEM.

3.4.2. Adsorção do peptídeo OGP e OGP-CF às nanopartículas de sílica

3.4.2.1. Cinética de adsorção do peptídeo

Para determinar o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio (nanopartículas e solução) foram feitos testes pela imersão de 0,05 g das amostras LMSiO, LMSiCaP I e LMSiCaP II em 5 ml da solução do OGP 10^{-4} mol.L⁻¹ em solução tampão Tris pH 7,4, em triplicata para garantir a reprodutibilidade ao longo do trabalho experimental. O monitoramento foi feito a cada 10 minutos durante 90 minutos, onde 0,4 ml do sobrenadante foi coletado, para análise do peptídeo remanescente em solução em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, com λ_{exc} em 492nm e λ_{em} em 520nm, permitindo a análise da intensidade de fluorescência x tempo. A mesma quantidade de sobrenadante tirada foi repostada com solução nova e a diluição foi considerada nos cálculos.

A capacidade de troca iônica é um importante processo verificado nos métodos de extração líquido-sólido. Esta é normalmente calculada por meio da determinação do N_f . Esse parâmetro corresponde à capacidade máxima de adsorção do adsorbato por grama de sílica, determinada pela equação (1), onde: N_a é o número de mols iniciais do analito em solução; N_s o número de mols do analito restante na solução; e w , a massa de sílica utilizada.

$$Nf = \frac{Na - Ns}{w} \quad (\text{eq.1})$$

3.4.2.2. Incorporação de OGP e OGP-CF

O peptídeo OGP-CF foi utilizado para avaliar a performance de incorporação das amostras LM-SiO e LM-SiCaP I e posterior liberação *in vitro* em solução de SBF.

Após o conhecimento do tempo máximo de adsorção, foram realizados os experimentos com diferentes concentrações de OGP. De acordo com Spreafico et al. (2006) a quantidade de 10^{-11} mol de OGP promove uma melhor atividade da fosfatase alcalina, maior formação e mineralização de nódulos de osso neoformado, porém Saska (2011) mostrou que concentrações acima apresentam uma resposta mais imediata do organismo, além de melhorar a sensibilidade do método de quantificação.

Assim, 50 mg do material sólido foi imerso em 5 ml das soluções, 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol.L⁻¹, de OGP-CF em solução tampão Tris 0,01 mol.L⁻¹ e pH 7,4, mantendo agitação por 30 minutos, determinado em 3.4.2.1, em temperatura ambiente. Após esse período, foram coletados 0,4 ml do sobrenadante de cada sistema, em triplicata, para determinação do peptídeo remanescente em solução, por Espectroscopia de Fluorescência, em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, com λ_{exc} em 492 nm e λ_{em} em 520 nm, permitindo a análise da intensidade de fluorescência x tempo. A determinação da quantidade de peptídeo incorporada foi dada pela curva padrão do peptídeo marcado livre em solução tampão Tris 0,01 mol.L⁻¹.

Já o material sólido, foi filtrado e lavado com tampão Tris por cinco vezes, para eliminar o excesso de solução do peptídeo e possíveis moléculas não adsorvidas, e seco a temperatura ambiente.

A mesma sequência de imersões foi realizada para a incorporação do peptídeo OGP não marcado nas amostras de sílica para posteriores análises de proliferação e citotoxicidade em culturas de células ósseas.

3.4.2.3. Liberação do peptídeo OGP-CF em solução SBF

Determinados os parâmetros dos ensaios, os estudos de liberação do OGP-CF *in vitro* foram realizados de acordo com as etapas seguintes. Após as amostras LMSiO e LMSiOCaP I carregadas de OGP-CF se consagrarem totalmente secas, porções de 25 mg foram compactadas usando uma pressão uniaxial (0,5 MPa) para se obter pastilhas com dimensões de 7 mm x 1 mm. O perfil de liberação foi obtido pela imersão desses discos em 15 ml de solução SBF pH 7,4. A temperatura foi

mantida constante a 37°C, com um auxílio de um termômetro em um sistema a parte. A fim de evitar limitações da taxa de liberação por limitações de difusão externas, manteve-se agitação contínua, 100rpm, durante os ensaios de liberação (Figura 3.4).

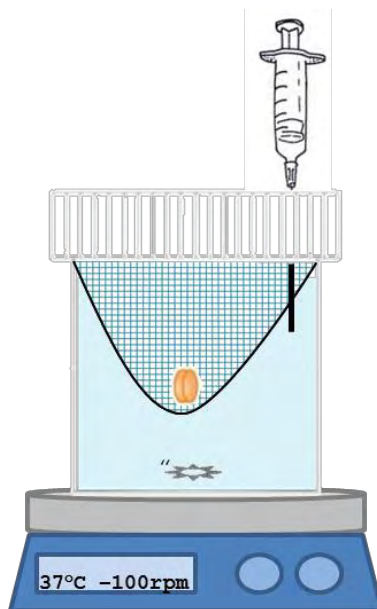


Figura 3.4. Esquema do sistema de liberação do peptídeo OGP.

A liberação *in vitro* do peptídeo OGP-CF das amostras LMSiO e LMSiCaP I foi monitorado por um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, com λ_{exc} em 492nm e λ_{em} em 520nm., em triplicata para cada amostra. As intensidades de fluorescência foram obtidas pela amostragem pontual de 0,4 ml de solução em tempos pré-determinados, até o sistema ficar constante. A cada amostragem, o mesmo volume retirado para análise foi repostado no sistema com solução pura e a diluição foi considerada nos cálculos. A concentração de peptídeo foi obtida através da curva padrão do peptídeo marcado livre em solução SBF.

3.4.2.4. Estudo de degradação *in vitro* em SBF

Para analisar o comportamento das pastilhas frente à SBF, no período de liberação do peptídeo, foram realizadas análises microscópicas da superfície das pastilhas. Os pós das amostras LMSiO e LMSiOCaP I foram compactados, como

descrito anteriormente, imersos em 10 ml de SBF e colocados em banho a 37°C, em períodos de 1 a 8 dias. Após cada período, as pastilhas foram retiradas da solução, congeladas e liofilizadas para análise em um Microscópio óptico trinocular com amplitude de 200 vezes acoplado a uma câmera da marca Samsung, modelo SDC-415ND e software Image Tool e por SEM em um equipamento FEG-VP Zeiss.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados os resultados de caracterização química e estrutural das amostras de sílica mesoporosa pura e sílica mesoporosa e fosfato de cálcio antes da incorporação do peptídeo, os resultados obtidos com a síntese do peptídeo OGP utilizando a SPFS e os ensaios de incorporação e liberação de OGP utilizando as amostras mesoporosas como carreador, bem como a discussão e interpretação desses resultados.

4.1. Caracterização das nanopartículas de sílica pura e com fosfato de cálcio

4.1.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros dos materiais LMSiO, LMSiCaP I e LMSiCaP II, calcinados e sintetizados a partir de Pluronic P123 são mostrados na Figura 4.1.1.

Em todos os espectros, uma banda larga na região de 3.450 cm^{-1} é atribuída ao estiramento simétrico de grupos OH, $\nu_s(\text{H-O-H})$ e $\nu_s(\text{SiO-H})$, e o pico em torno de 1.635 cm^{-1} é devido à deformação de grupos OH, $\delta(\text{H-O-H})$ (SOUSA, 2009).

Em geral, unidades tetraédricas SiO_x exibem estiramentos nas seguintes regiões: ν_1 , $750\text{-}830\text{ cm}^{-1}$; ν_2 , $300\text{-}400\text{ cm}^{-1}$; ν_3 , $800\text{-}1.000\text{ cm}^{-1}$; ν_4 , $450\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. Tanto no espectro referente à LM-SiO quanto LM-SiCaP I e II, pode-se observar frequências vibracionais de compostos do tipo tetraédrico MO_4 onde $\text{M} = \text{Si}$ (NAKAMOTO, 1997).

Os espectros apresentam as principais atribuições características da sílica na região próxima a 1091 cm^{-1} correspondente a $\nu_{as}(\text{Si-O-Si})$, 813 cm^{-1} associados a $\nu_s(\text{Si-O-Si})$, 460 cm^{-1} a deformação $\delta(\text{O-Si-O})$. A banda atribuído ao estiramento $\nu_s(\text{Si-OH})$ é observada em torno de 970 cm^{-1} em sólidos tratados termicamente a 600°C (MASUDA; KAWASHITA, KOKUBO, 2007).

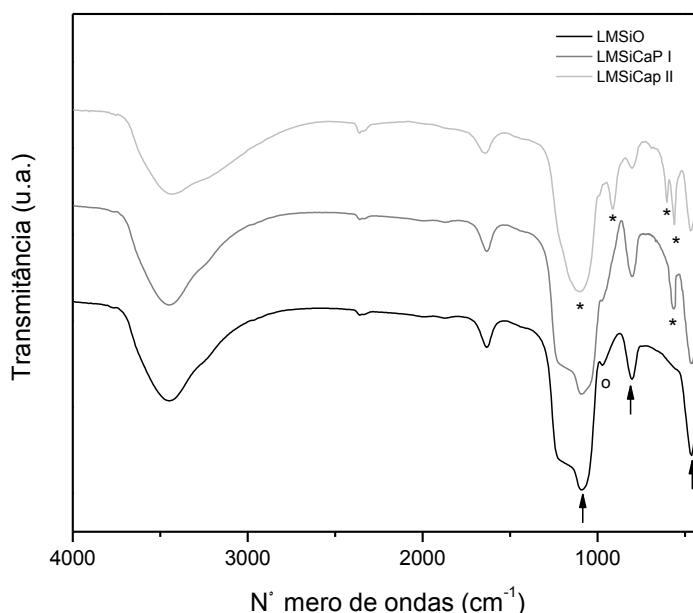


Figura 4.1.1. Espectros de FT-IR de sílica pura e com fosfato de cálcio sintetizada por sol-gel a partir de P123, onde (†) indicam bandas Si-O-Si, (o) Si-OH e (*) P-O.

No espectro de HA (não apresentado), foram observados os picos correspondentes aos grupos PO_4^{3-} na região de 1089, 960, 603, e 563 cm^{-1} , cujos comprimentos de onda estão de acordo com a literatura (REHMAN; BONFIELD, 1997). Algumas bandas de absorção de sílica são difíceis de identificação devido à sobreposição das bandas de absorção da HA, em especial na região de 1.185-1.000 cm^{-1} , onde bandas de vibração Si-O-Si geralmente são mais fortes e em torno de 960 cm^{-1} , região de absorção dos grupos Si-OH. Ao analisar o espectro da amostra LM-SiCaP I e II, algumas bandas de estiramento apresentam-se de acordo ao padrão da HA.

No espectro que representa a amostra LMSiCaP I além das bandas características de sílica já mencionadas, são observadas bandas de absorção na região de 613 e 560 cm^{-1} que foram atribuídas a grupos PO_4^{3-} (SOUSA; SOUZA; SOUSA, 2008).

No entanto no espectro correspondente a amostra LMSiCaP II as bandas que se apresentaram a 1089, 933, 613 e 566 cm^{-1} foram atribuídas a $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ e

$\nu_4\text{PO}_4^{3-}$, respectivamente (ANDERSSON et al., 2005). A presença dessas bandas sugere a formação de fosfato de cálcio na estrutura porosa dessas amostras.

4.1.2. Difração de raios X

Os raios X são radiações eletromagnéticas que possuem elevadas energias e curtos comprimentos de onda. Quando um feixe de raios X incide sobre um material sólido, uma fração deste feixe se dispersa, ou se espalha, em todas as direções pelos elétrons associados a cada átomo ou íon que se encontra na trajetória do feixe. Assim, a técnica de difratometria de raios X é amplamente usada para identificação de materiais cristalinos.

Os difratogramas de raios X das amostras de sílica e sílica com fosfato de cálcio estão representados na Figura 4.1.2. As difrações foram identificadas através da coleção de padrões de difração do ICDD, PDF-2 (*International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File-2*).

O difratograma 4.1.2a apresenta a estrutura amorfa da amostra LMSiO, onde somente uma difração larga entre 16° e 30° 2θ característica da estrutura amorfa da sílica e nenhuma difração característica cristalina foi visualizada.

Sabe-se que as apatitas apresentam cinco fases distintas: DCPD ou bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), OCP ou fosfato octacálcio [$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$], β -TCP ou β -Tricálcio fosfato ou β -whitloquita [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], HA ou hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$] e ACP ou fosfato de cálcio amorfo (KOKUBO, 2008).

Assim, os difratogramas que correspondem as amostras LMSiCaP I e II apresentam difrações que corresponde a fase apatita, com vários picos entre 25° e 50° 2θ , com um pico máximo em torno de 32° 2θ . No difratograma 4.1.2b, foi observado difrações características de β -TCP, com um máximo em $31,01^\circ$ 2θ (021) e uma fase secundária de HA, com uma difração correspondente a reflexão (211) (JCPDS #01-70-2065 e #01-73-0293, respectivamente). Quando a razão atômica Ca/P não é exatamente 1,5, correspondente ao TCP, pode aparecer impurezas, onde a principal é HA, que corresponde a uma razão acima de 1,5 (KOKUBO, 2008). No difratograma 4.1.2c, as principais fases correspondem ao ICDD padrão para HA com um máximo em $31,72^\circ$ 2θ correspondente a reflexão (211) (JCPDS #01-73-

0293), mostrando que se trata de uma HA semicristalina ou uma camada amorfa na superfície. As sobreposições e o alargamento dos picos das fases de apatita indicam uma baixa cristalinidade, e os padrões de XRD observados para HA nestas amostras são muito similares ao padrão de XRD de apatitas de tecido ósseo, mostrando baixa cristalinidade (DANILCHENKO et al., 2004).

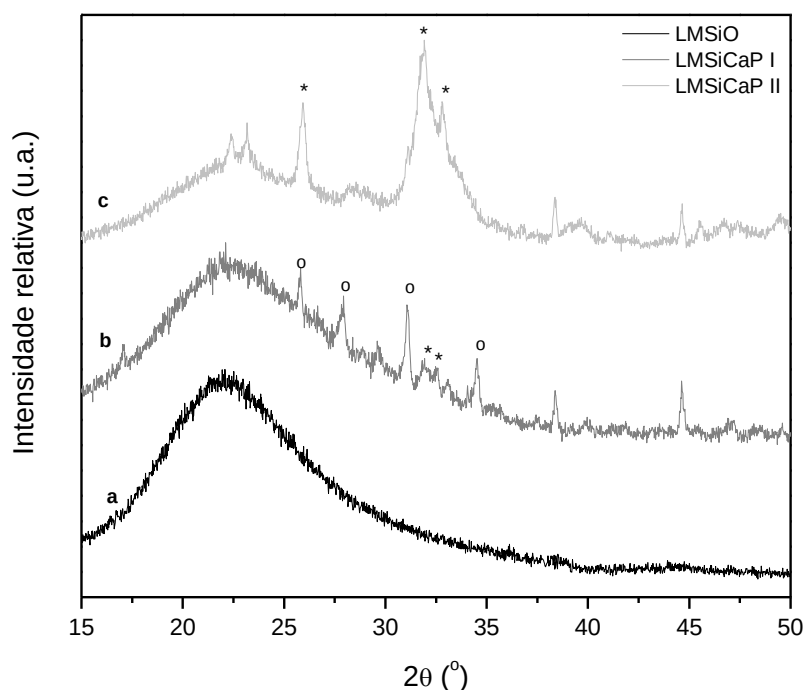


Figura 4.1.2. Padrões de XRD para as amostras LMSiO (a), LMSiCaP I (b) e LMSiCaP II (c). As difrações referentes a HA estão assinaladas por (*); β -TCP (o).

Estudos indicam que a dissolução controlada de materiais bioativos é a principal importância para a estimulação da função celular, reabsorção e regeneração óssea (SALDAÑA et al., 2009). O β -TCP é caracterizado pela alta taxa de dissolução, que acelera a reabsorção do material e estimula a resposta imunológica. Vidros bioativos estão sujeitos a uma dissolução parcial em solução fisiológica, seguido pela precipitação de uma camada de Ca-P, que promove a atividade celular e formação óssea, na superfície de sílica (PADILLA et al., 2006).

4.1.3. Medida de porosidade e de superfície específica

A superfície de área específica é definida como sendo a superfície de área por unidade de massa ou volume de um material, e sugere a extensão da superfície do material disponível a interações físicas e químicas. Esta superfície é normalmente determinada pela absorção física de um gás ou pela absorção química de um corante como o azul de metileno (REED, 1995).

Em estudos de caracterização, na determinação da superfície de área específica de pós cerâmicos, metálicos ou poliméricos, utiliza-se normalmente o método BET, que leva esse nome em homenagem aos seus idealizadores, Brunauer, Emmet e Teller. O método consiste na absorção física de um gás inerte a baixa temperatura, que passa rapidamente através da amostra, sendo o N₂ no ponto de ebulição (77,4 K) em geral o mais utilizado (BROEKHOFF; BOER, 1968).

Para análise da porosidade das amostras de sílica pura e com fosfato de cálcio foi realizado análise usando isoterma de adsorção/dessorção de N₂. As curvas de adsorção-dessorção de nitrogênio e dD/dV em função do diâmetro de poro, apresentadas nas Figuras 4.1.3, 4.1.4 e 4.1.5, permitem observar o tamanho médio de poros da sílica mesoporosa.

As isotermas são características de materiais mesoporosos, mostrando que são do tipo IV (ZHAO et al., 1998; MANSANO et al., 2008; IZQUIERDO-BARBA et al., 2009). Assim, as amostras exibem uma estrutura característica de materiais mesoporosos estruturados por micelas (MTS), onde em determinado valor da pressão relativa P/P_0 o volume aumenta bruscamente, formando um *loop* de histerese, (BECK et al., 1992). A presença de histerese é devido ao preenchimento incompleto dos mesoporos e quanto menor sua inclinação mais homogênea é a distribuição do tamanho dos poros.

Comparando-se os valores da área da superfície específica das amostras LMSiO e LMSiCaP I e II, pode-se observar que houve diminuição significativa com a diminuição da porcentagem de sílica.

A isoterma de adsorção da amostra de sílica mesoporosa pura (Figura 4.1.3) exhibe histerese do tipo H1, na curva de adsorção e dessorção entre a pressão

parcial P/P_0 de 0,4-0,7, característica de poros uniformes (MANSANO et al., 2008; IZQUIERDO-BARBA et al., 2009) com canais 1 D cilíndricos. A porosidade desta amostra apresenta tamanho médio de poros de 60 Å. A amostra apresenta também uma distribuição fina de poros, típica de materiais MTS e alta área de superfície ($880 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$).

A amostra LMSiCaP I apresenta um isoterma com histerese do tipo H1, entre a pressão parcial P/P_0 de 0,4-0,7, também característico de material mesoporoso, com contribuições microporosas, com canais cilíndricos (Figura 4.1.4). Pode-se observar que com o aumento da porcentagem de fosfato de cálcio, e consequentemente menor sílica, houve redução no valor da área de superfície, sendo neste caso igual a $484 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Além disso, a distribuição dos diâmetros dos poros esteve entre 50-300 Å, aproximadamente, devido ao crescimento do fosfato de cálcio.

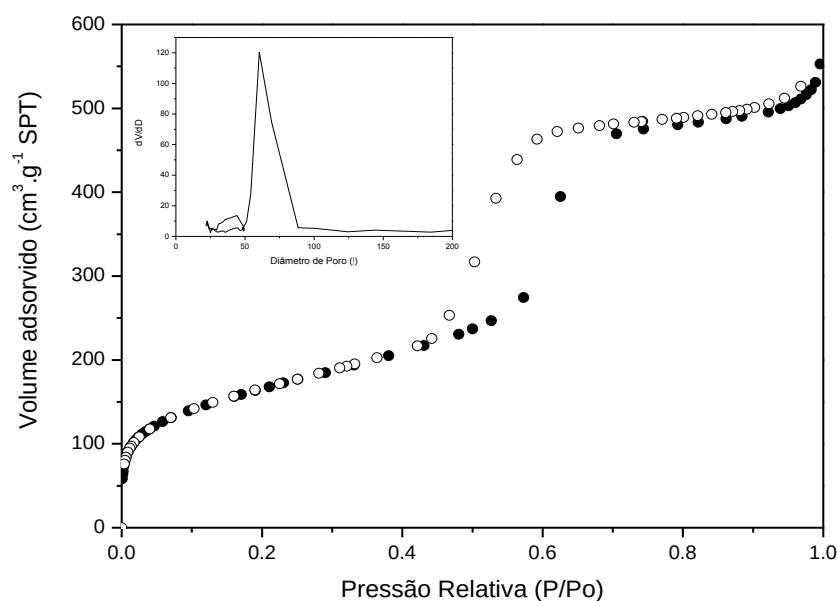


Figura 4.1.3. Isotherma de adsorção (círculo sólido)/dessorção (círculo aberto) de nitrogênio da sílica mesoporosa pura calcinada, obtida a partir de P123.

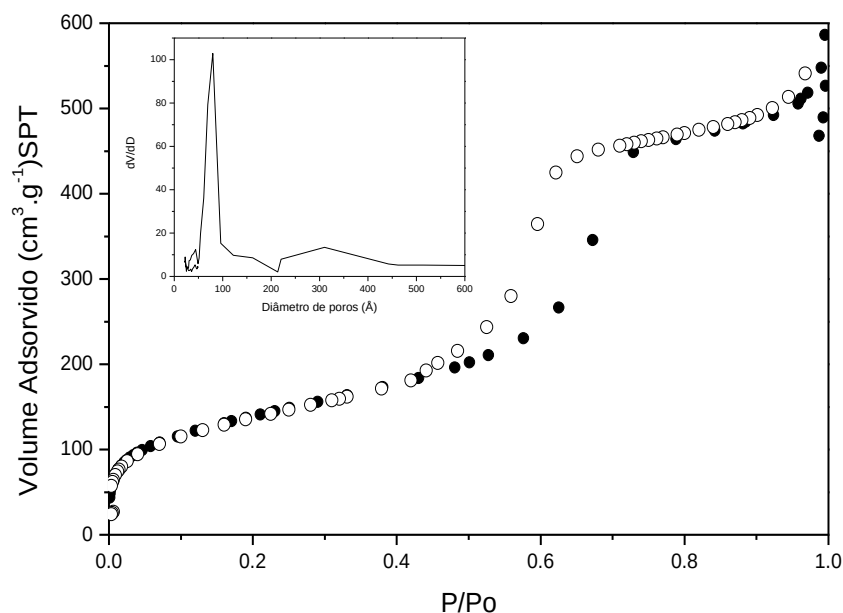


Figura 4.1.4. Isotherma de adsorção (circulo sólido)/dessorção (circulo aberto) de nitrogênio da amostra de sílica mesoporosa LMSiCaP I calcinada, obtida a partir de P123.

Em contraste, a amostra LM-SiOCaP II (Figura 4.1.5) apresenta uma isoterma com histerese do tipo H3, entre a pressão parcial P/P_0 de 0,7-0,9. De acordo com Santilli et al. (1993), a estrutura mesoporosa não definida, apresentando mais de um tipo de mesoporo, e este tipo de histerese é associado a presença de poros no formato de fenda, cone e/ou pirâmides. Essas partículas possuem área de superfície de $220 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Poucas informações podem-se obter sobre a distribuição dos poros, o que também não é aconselhável se fazer. O que pode-se notar é que, esta amostra possui uma distribuição de diâmetro de poro mais ampla, entre 100-500 Å, indicando o crescimento dos cristais de apatita nos mesoporos menores, que não sendo detectados pela técnica de adsorção de N_2 , aumentam a média do tamanho do diâmetro dos poros (DIAZ et al, 2006).

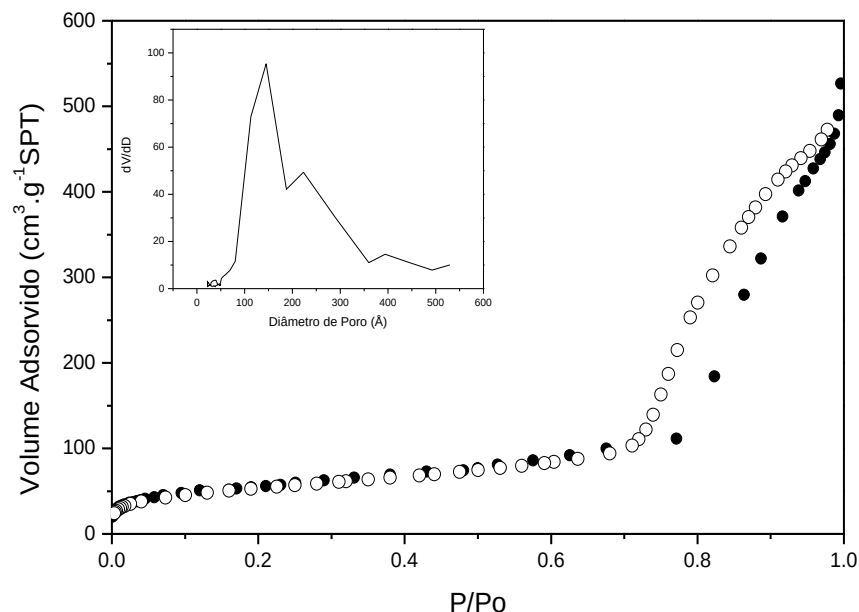


Figura 4.1.5. Isoterma de adsorção (círculo sólido)/dessorção (círculo aberto) de nitrogênio da amostra de sílica mesoporosa LMSiCaP II calcinada, obtida a partir de P123.

4.1.4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo

Esta técnica quando aplicada a materiais mesoporosos fornece as dimensões médias da unidade de repetição da estrutura. No caso de materiais de sílica mesoporosa, deve-se considerar que o arranjo dos átomos nos materiais mesoporosos não é cristalino, assim o único elemento de ordem estrutural é a disposição periódica dos canais paralelos, portanto, as reflexões observadas no difratograma são atribuídas a essa disposição (ROCHA, 2010).

Sua estrutura interna é constituída de um arranjo de cilindros mesoporosos e é caracterizada por valores de espaçamento interplanar d_{100} e parâmetro de célula unitária a_0 (Figura 4.1.6).

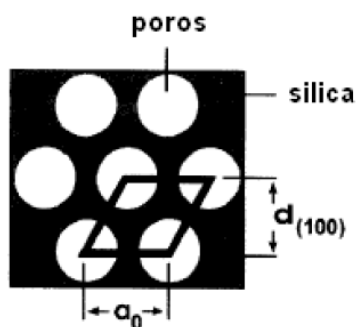


Figura 4.1.6. Representação esquemática da estrutura dos materiais mesoporosos hexagonais (MARKER et al., 1996).

Sendo que d pode ser calculado pela equação (2), onde q é o valor correspondente máximo do pico avaliado.

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad \text{eq. (2)}$$

De acordo com Craievich (2002), para uma estrutura 2D hexagonal, o parâmetro de célula é calculado pela equação (3).

$$a_0 = \frac{2d_{100}}{\sqrt{3}} \quad \text{eq. (3)}$$

A caracterização por SAXS das sílicas mesoporosas pura e com fosfato de cálcio estão apresentadas na Figura 4.1.7.

As amostras de sílica mesoporosa preparada em pH 1,5 (LMSiO e LMSiCaP I) apresentam uma estrutura hexagonal bem ordenada e a qualidade total da estrutura pode ser estimada pela intensidade da linha de difração.

Foram observados três sinais de difração correspondentes aos planos com Índice de Miller (hkl) de (100), (110) e (200). Esses sinais de difração observados são atribuídos à disposição periódica dos canais paralelos e são típicos de materiais mesoporosos com arranjo hexagonal.

A amostra de sílica mesoporosa pura, LMSiO, exibe um padrão de uma estrutura hexagonal bem definida, contendo uma difração principal próximo a $2,0 \text{ nm}^{-1}$ com o espaçamento interplanar d_{100} igual a 3,08 nm, (110) a $d_{110} = 1,77 \text{ nm}$ e (200) a $d_{200} = 1,53 \text{ nm}$, correspondendo a um valor de célula unitária a_0 igual a 3,55 nm.

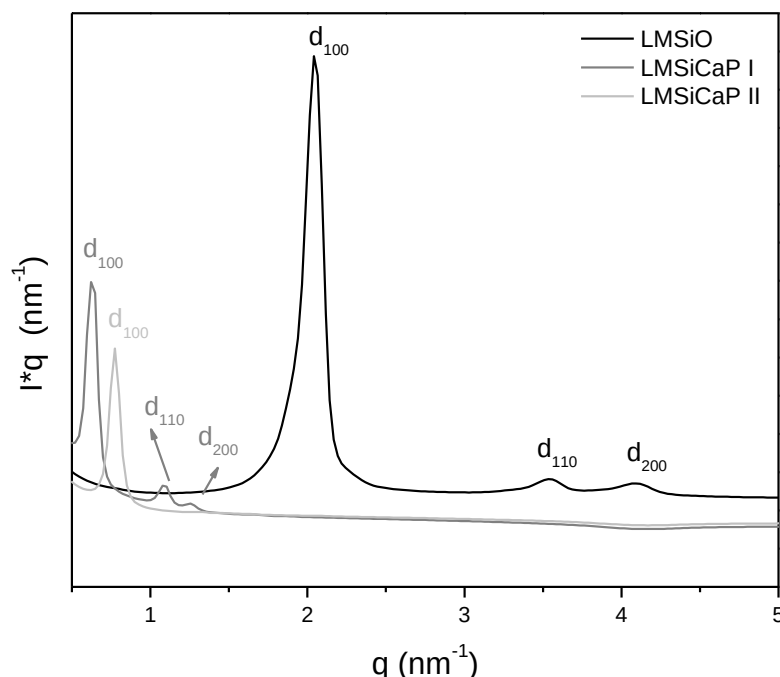


Figura 4.1.7. Difratomogramas de SAXS das amostras de sílica mesoporosa LMSiO, LMSiCaP I e II.

A amostra de sílica LMSiCaP I também exibe um padrão de uma estrutura hexagonal. É possível observar um perfil de difração contendo uma difração principal em baixo ângulo próximo a $0,6 \text{ nm}^{-1}$, com espaçamento interplanar d_{100} igual a 10,15 nm, $d_{110} = 5,77 \text{ nm}$ e $d_{200} = 4,98 \text{ nm}$, e parâmetro de célula unitária a_0 igual a aproximadamente 11,7 nm. Estes resultados confirmam a presença de uma estrutura neste material similar ao perfil da LMSiO.

No difratograma que representa a amostra LMSiCaP II foi observado somente um pico de difração em torno de $0,77 \text{ nm}^{-1}$, correspondente a d_{100} igual a 8,11 nm e $a_0 = 9,37 \text{ nm}$. A ausência das demais reflexões bem definidas indica que esta amostra apresenta uma ordem estrutural menor que a amostra de sílica pura (SOUSA; SOUZA; SOUSA, 2008).

A partir dos valores do espaçamento interplanar d_{100} , pode-se observar um aumento deste parâmetro devido ao aumento do diâmetro de poros, quando se compara as amostras LMSiO e LMSiCaP, respectivamente. Além disso, verifica-se que ocorre uma tendência do fosfato de cálcio em ocupar os poros de menor diâmetro, reduzindo a sua contribuição estatística e causando um aparente aumento médio no diâmetro de poros.

A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos por SAXS, que corroboram com os dados de BET.

Tabela 4.1. Dados obtidos por SAXS e BET.

Amostra	d_{100}	a_0	D_p (nm)	S_{BET} (m ² .g ⁻¹)	Estrutura
LMSiO	3,08	3,55	6,0	879,0	Hexagonal
LMSiCaP I	10,15	11,7	7,9	484,0	Hexagonal
LMSiCaP II	9,91	9,37	10,0-50,0	220,0	--

4.1.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A Figura 4.1.8 mostra imagens de TEM com o feixe incidente na direção perpendicular e paralela (*insert*) ao eixo dos poros para a amostra LMSiO.

A micrografia ilustra muito bem a organização dos canais da sílica mesoporosa. Verificaram-se poros alinhados com estruturas hexagonais definidas.

Aproveitou-se a escala para confirmar os resultados obtidos pelas técnicas descritas anteriormente através do programa de análise de imagens Image J. O diâmetro de poro determinado pela técnica BET foi de 5,9 nm, enquanto que por TEM obteve-se um valor do diâmetro de poro de aproximadamente 6,3 nm para amostra LMSiO. Ao comparar com a caracterização por SAXS verifica-se que a distância interplanar da amostra é de 3,55 nm enquanto por TEM é de aproximadamente 4,0 nm.

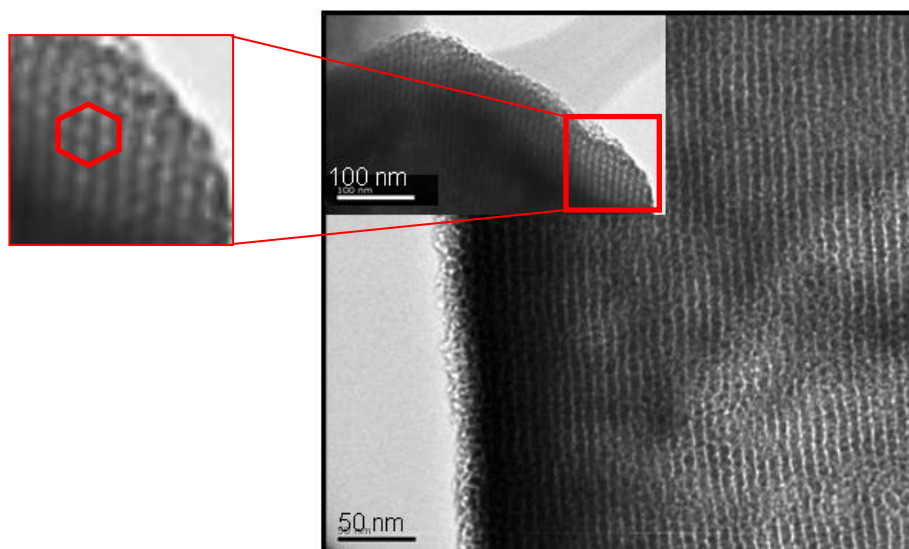


Figura 4.1.8. Imagens de TEM da amostra LMSiO, perpendicular e paralelo (insert) ao eixo dos poros.

Este tipo de imagem foi obtida porque durante a passagem dos elétrons através de uma lâmina fina do sólido mesoporoso, ocorre espalhamento dos elétrons em praticamente todas as direções. Se o feixe de elétrons incide perpendicularmente ao eixo dos tubos paralelos, a projeção da densidade de espalhamento é periódica e linhas paralelas equidistantes são observadas. Chenite e colaboradores mostraram que a estrutura hexagonal é regular o suficiente para projetar linhas paralelas equidistantes e que a distância entre essas linhas é dada pela equação (3), onde a é a distância do centro de um tubo ao centro do outro (CHENITE; LE PAGE, 1995).

Assim, se o feixe de elétrons não incidir perpendicularmente ao eixo dos tubos, essa estrutura desaparece porque a projeção da densidade de espalhamento não será mais periódica. Por outro lado, quando o feixe de elétrons incide na direção paralela ao eixo dos tubos, a estrutura hexagonal dos poros pode ser observada.

4.1.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As imagens de SEM das amostras de sílica são apresentadas nas Figuras 4.1.9a, b e c, abaixo.

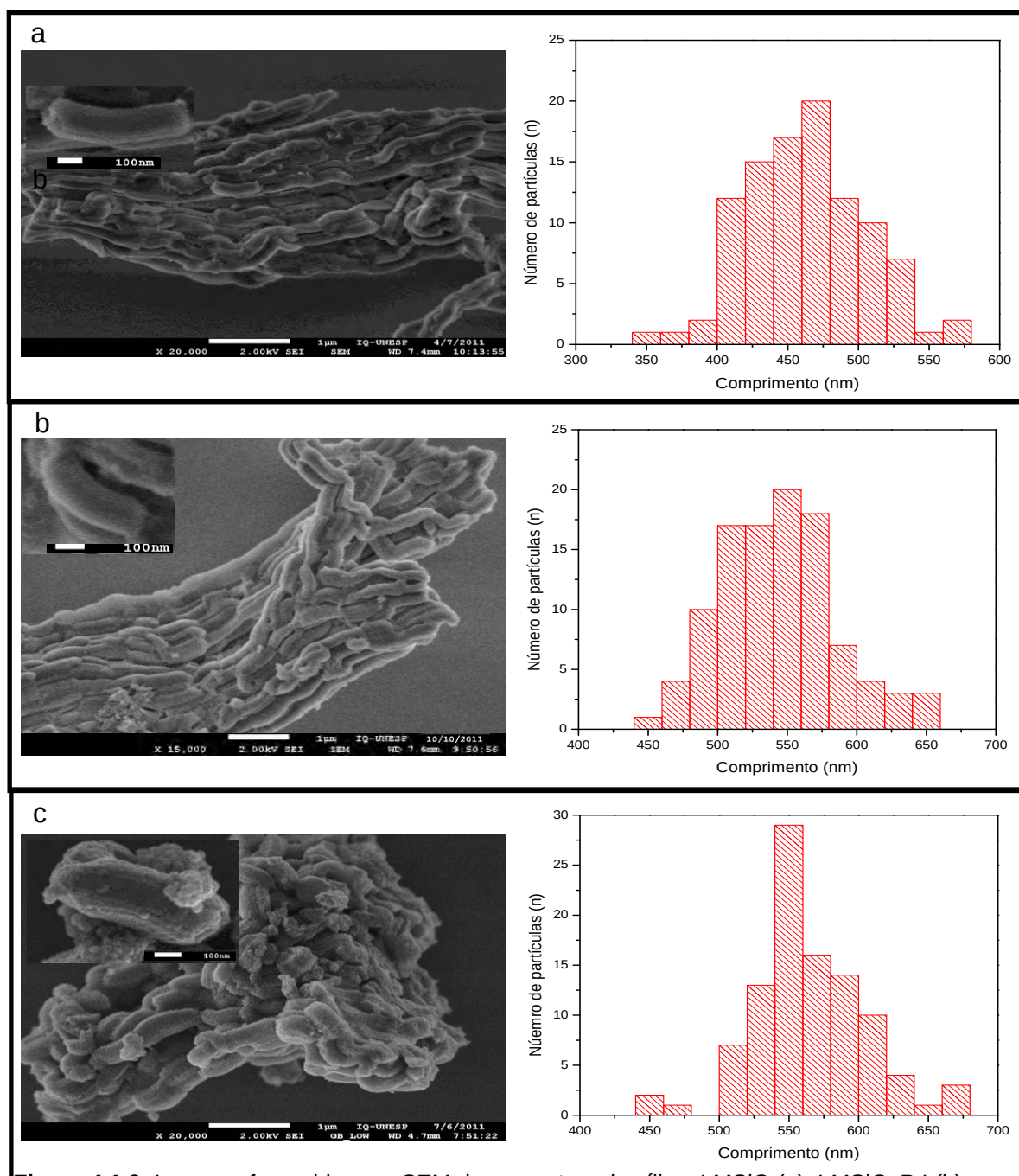


Figura 4.1.9. Imagens fornecidas por SEM das amostras de sílica. LMSiO (a), LMSiCaP I (b) e LMSiCaP II (c); e suas respectivas curvas de distribuição de tamanho de partículas.

As imagens exibem partículas submicrométricas do tipo bastonete rígido que é semelhante aos materiais denominados MTS (BECK et al., 1992).

Ambas as sínteses promoveram a formação de partículas cilíndricas na forma de bastonetes e/ou vermicular e domínios em forma de cordas (*rope-like*). É interessante observar que a imagem “a” mostra que amostra LMSiO apresenta superfície densa, enquanto a imagem “b” e “c”, referente à amostra LMSiCaP I e II, mostra uma superfície heterogênea formada pela composição sílica/apatita.

O comprimento médio das partículas foi calculado utilizando-se o programa de análise de imagens Image J. Para isso, foram utilizadas as imagens que forneceram melhor visualização e contraste de imagem (aumento de 20.000 vezes). Foram efetuadas 100 medidas em cada imagem. O comprimento médio calculado para as partículas foi de 462 nm, 544 nm, 564 nm para LMSiO, LMSiCaP I e LMSiCaP II, respectivamente, e sua distribuição está representada nos histogramas da Figura 4.1.9.

4.2. Síntese e purificação do peptídeo OGP e OGP-CF

Para a obtenção da sequência peptídica estudada neste trabalho empregou-se um método de síntese química conhecido como Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS). Este nome é devido ao fato de que o grupo α -carboxílico do aminoácido C-terminal encontra-se covalentemente ligado a um suporte polimérico ou resina (MERRIFIELD, 1963). Um reagente químico, denominado ativador ou agente de acoplamento é utilizado para ativar o grupo carboxílico de um aminoácido, o qual sofre ataque nucleofílico do grupo α -amino de um aminoácido ou do aminoácido N-terminal de um fragmento peptídico ligado à resina, resultando deste modo na formação de uma ligação amida (peptídica) entre eles.

A estratégia de síntese utilizada foi a Fmoc/tBu, isto é, os grupos α -amino dos aminoácidos estão protegidos por uma molécula estável ao TFA e lábil a bases orgânicas, como a piperidina. Nesta estratégia, as cadeias laterais reativas dos aminoácidos trifuncionais, estão protegidas por grupos t-butílicos ou derivados, os quais são estáveis à bases orgânicas e lábeis ao TFA.

A SPFS é empregada para a obtenção de peptídeos sintéticos devido a sua praticidade, rapidez e possibilitar a síntese individual ou em paralelo. Essa inovadora metodologia conduziu Bruce Merrifield ao Prêmio Nobel de Química em 1984.

A síntese do peptídeo OGP, foi desenvolvida utilizando 1,0 g de resina Fmoc-Gly-Wang (grau de substituição de $0,55 \text{ mmol.g}^{-1}$) em seringa de polipropileno de 10 mL, equipada com um filtro de polietileno poroso acoplada a um sistema à vácuo com frasco coletor de resíduos.

Ao término da síntese, a massa obtida foi de 1,73 g, a qual foi dividida em duas partes, sendo uma delas utilizada para o acoplamento da CF. Uma das partes da peptidil-resina resultante foi submetida ao processo de clivagem utilizando 1 mL de solução de clivagem (94,5% TFA, 2,5% EDT, 0,5% tioanisol e 2,5% água deionizada) para cada 100 mg de peptidil-resina, a 25°C por 2 h sob agitação. Após o procedimento de clivagem, foi realizada a extração do peptídeo OGP com ácido acético 10% em sistemas de seringas de polipropileno de 5 mL, equipadas com um filtro de polietileno poroso acopladas a um sistema de vácuo com frasco coletor. O extrato bruto foi liofilizado e o produto foi submetido à análise em HPLC em modo analítico.

A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do OGP, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa.

O composto bruto foi purificado em modo semi-preparativo com um programa gradiente na faixa de 15 a 60% de solvente B em 120 minutos com fluxo de 5 ml por minuto. O material foi detectado em um comprimento de onda de 220 nm, sendo as frações puras caracterizadas em modo analítico com programa isocrático de 25% de solvente B com fluxo de 1 ml por minuto. Obtiveram-se três frações (1a, 1b e 2a), que diferiram no tempo de retenção e na pureza. A fração 1a foi repurificada, obtendo-se um material com pureza considerável (Figura 4.2.1).

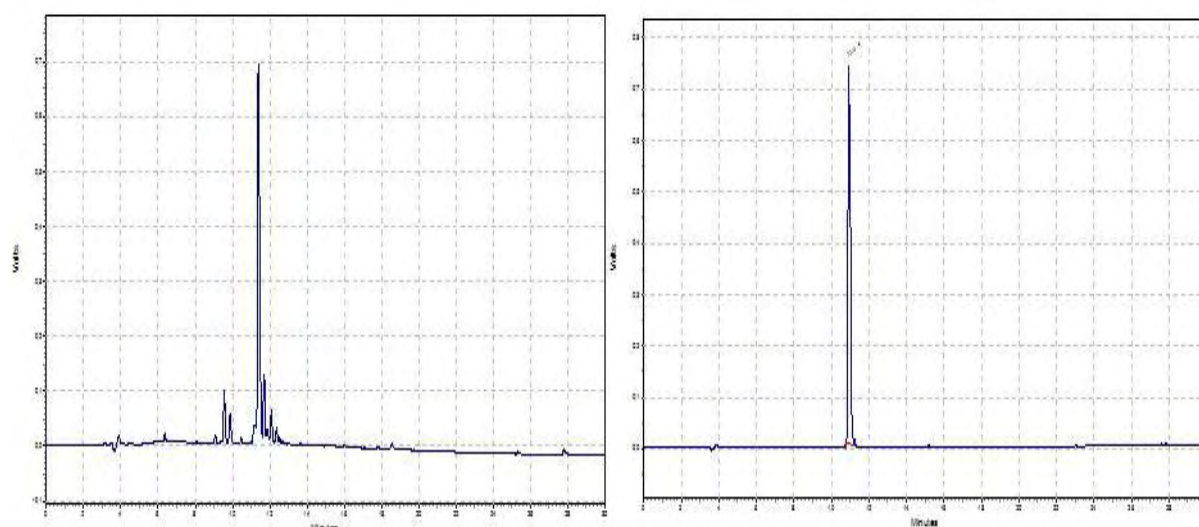


Figura 4.2.1. Cromatogramas do peptídeo OGP bruto e após purificação, respectivamente.

O rendimento da purificação foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. A Tabela 4.2 mostra os valores de rendimento da purificação e a pureza relativa do peptídeo. O rendimento da purificação foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. O resultado de pureza relativa do peptídeo indica que os métodos desenvolvidos com essa finalidade foram satisfatórios.

Tabela 4.2. Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP.

Peptídeo	Massa – bruto (mg)	Massa – purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
OGP	63,0	39,7	63	100

A identidade molecular do peptídeo OGP foi confirmada por determinação da correspondente massa molecular, 1.523,8 g/mol, determinada pela técnica ES-MS positivo [ES $m/z = 763 (M + 2H)^{+2}$].

Os resultados obtidos por intermédio da análise de aminoácidos para determinação da proporção relativa de cada um dos aminoácidos utilizados na síntese do OGP foram condizentes com o teórico esperado.

Os resultados mostraram que os procedimentos utilizados desde a síntese até a purificação foram obtidos com sucesso, levando à obtenção da sequência desejada, sendo confirmada através dos dados de pureza relativa, massa molecular e análise de aminoácidos do peptídeo OGP sintetizado.

A síntese do peptídeo OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína foi desenvolvida pela metodologia da fase sólida nos mesmos moldes que a síntese descrita anteriormente. Da massa total, uma parte (968 mg) foi utilizada para acoplar a carboxifluoresceína (CF). Decorrido o acoplamento da CF foi realizado o processo de clivagem de uma fração da peptidil-resina, marcada, seguido da extração do peptídeo, OGP-CF, em sistema de seringa de polipropileno de 10 ml, equipada com um filtro de polietileno poroso acoplada a um sistema de vácuo com frasco coletor para o peptídeo extraído. O extrato bruto do peptídeo foi liofilizado e o valor da massa obtida OGP-CF foi de 87 mg.

A partir de então, o peptídeo foi submetido à análise em CLAE em modo analítico, resultando no perfil cromatográfico do extrato bruto apresentado na Figura 4.2.2a. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos na análise do OGP-CF, foi definida a condição relativa à concentração de solvente para purificação do peptídeo em escala semi-preparativa, com um programa de 20 a 60% de B em 120 min com fluxo de 3,0 ml.min⁻¹. O cromatograma obtido após o processo de purificação está representado na Figura 4.2.2b.

O perfil cromatográfico do OGP-CF puro apresentou um pico único em relação ao cromatograma observado a partir da análise do extrato bruto. O parâmetro tempo de retenção do OGP-CF purificado foi mantido em relação ao pico correspondente ao OGP-CF bruto.

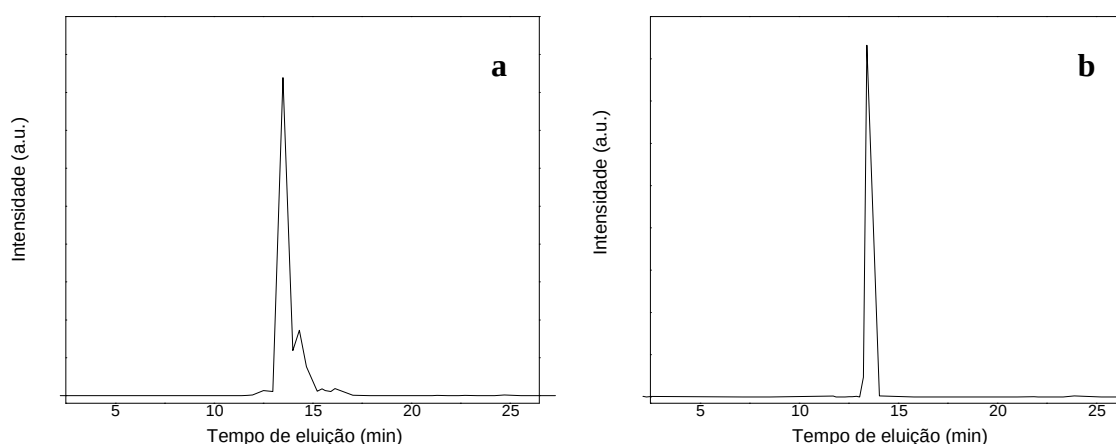


Figura 4.2.2. Cromatogramas obtidos em escala analítica do peptídeo OGP-CF bruto (a) e purificado (b).

O rendimento da purificação foi calculado através de uma relação com a massa do peptídeo em seu estado bruto. O valor de rendimento da purificação e o valor da massa do OGP-CF (Tabela 4.3), embora baixos, é coerente com o processo de purificação de peptídeos. Os resultados de pureza relativa do peptídeo indicam que os métodos desenvolvidos com essa finalidade foram satisfatórios.

Tabela 4.3. Rendimento da purificação e pureza relativa do OGP-CF.

Peptídeo	Massa – bruto (mg)	Massa – purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza relativa (%)
OGP-CF	87,0	29,0	33,3	95

A análise do espectro de massas obtido no modo positivo (Figura 4.2.3) confirmou a obtenção do produto esperado. A valor da massa molecular obtida [ES $m/z = 942,00 (M+2H)^{+2}$, $628,51 (M+3H)^{+3}$ e $471,72 (M+4H)^{+4}$] foi correspondente ao valor teórico esperado (1.882,50).

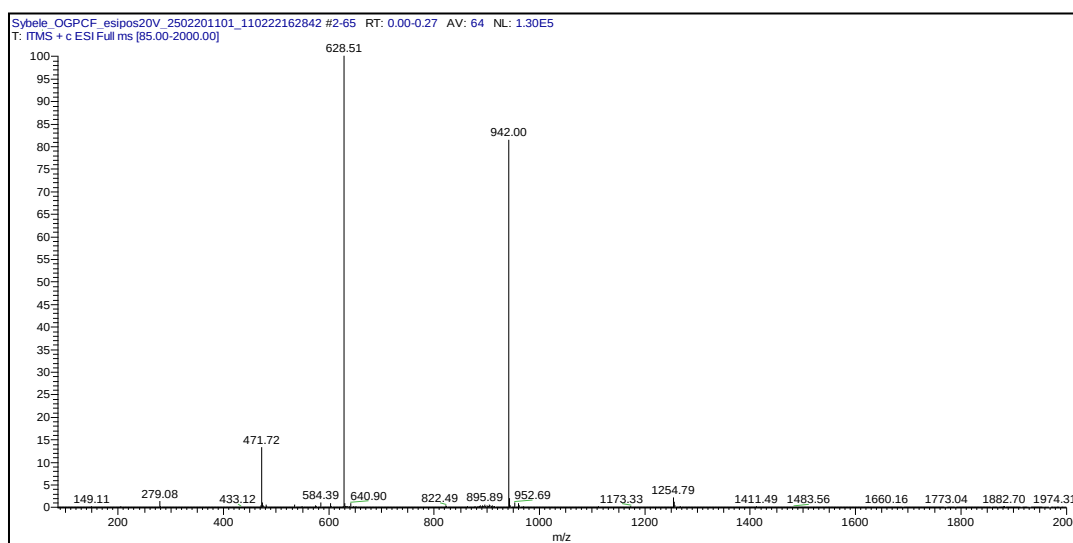


Figura 4.2.3. Espectro de Massas da fração purificada do peptídeo OGP-CF.

4.3. Análises *in vitro*

4.3.1. Estudo da bioatividade *in vitro* em solução de SBF

A bioatividade é definida como a capacidade de um material em provocar uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na formação de uma adesão entre os tecidos e o material (VALLET-REGÍ et al., 2007). Uma característica comum dos implantes bioativos é a formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) na superfície. A HA é equivalente, em composição e estrutura, à fase mineral do osso. A interface entre o implante bioativo e o osso é próximo do que ocorre naturalmente entre ossos, tendões e ligamentos (HENCH; WILSON, 1993).

Kokubo e seus colaboradores (1990) desenvolveram uma solução que tem a composição química e pH próximo às concentrações do plasma, onde os testes *in vitro* podem ser realizados através da imersão das amostras nesta solução. Esta solução é denominada de *Simulated Body Fluid* (SBF). Essa solução passou por algumas correções, e pelos resultados obtidos em dez diferentes institutos, a solução SBF corrigida (Tabela 4.4) foi proposta e aprovada em junho de 2007 pela Organização Internacional de Normalização (*International Organization for Standardization* – ISO) como a solução indicada para se avaliar *in vitro* a capacidade

de formação de HA na superfície de materiais destinados a implantes (norma ISO 23317: 2007).

Após o desenvolvimento desta solução, foi possível aproximar as condições de bioatividade do organismo *in vitro* e, portanto, diminuir a necessidade de sacrifício de cobaias.

Tabela 4.4. Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e da solução SBF.

	Concentração iônica (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁺
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma Humano	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Após os períodos de imersão em SBF, análises de FTIR e de SEM, foram empregadas para averiguar a formação de HA.

As Figuras 4.3.1 (a, b e c) mostram os espectros de FTIR das amostras LMSiO, LMSiCaP I e II após vários períodos de imersão em SBF até um máximo de 1 mês.

Na Figura 4.3.1a, deformação gradual pode ser observada nos espectros, que é referente a redução da intensidade do pico característico da sílica na região de 1090 cm⁻¹ e a formação de algumas bandas novas entre 740 e 520 cm⁻¹. Pode-se notar que, nesta amostra, o início da formação de bandas correspondentes a absorção de fosfato estão em 603 e 560cm⁻¹, sendo observadas após 14 dias de imersão em SBF. Além do mais, após 28 dias foi observado a formação de algumas bandas na região de 1451cm⁻¹, correspondentes a ligações do tipo C-O.

Analisando os espectros da Figura 4.3.1b pode-se observar a formação de bandas bem definidas referentes ao fosfato em 967, 603 e 560 cm⁻¹, logo em 14 dias de imersão na solução SBF. No espectro referente a 28 dias de imersão, as bandas referentes ao fosfato se tornaram mais intensas e foi observada uma banda em 883 cm⁻¹, que está associada à ligação C-O.

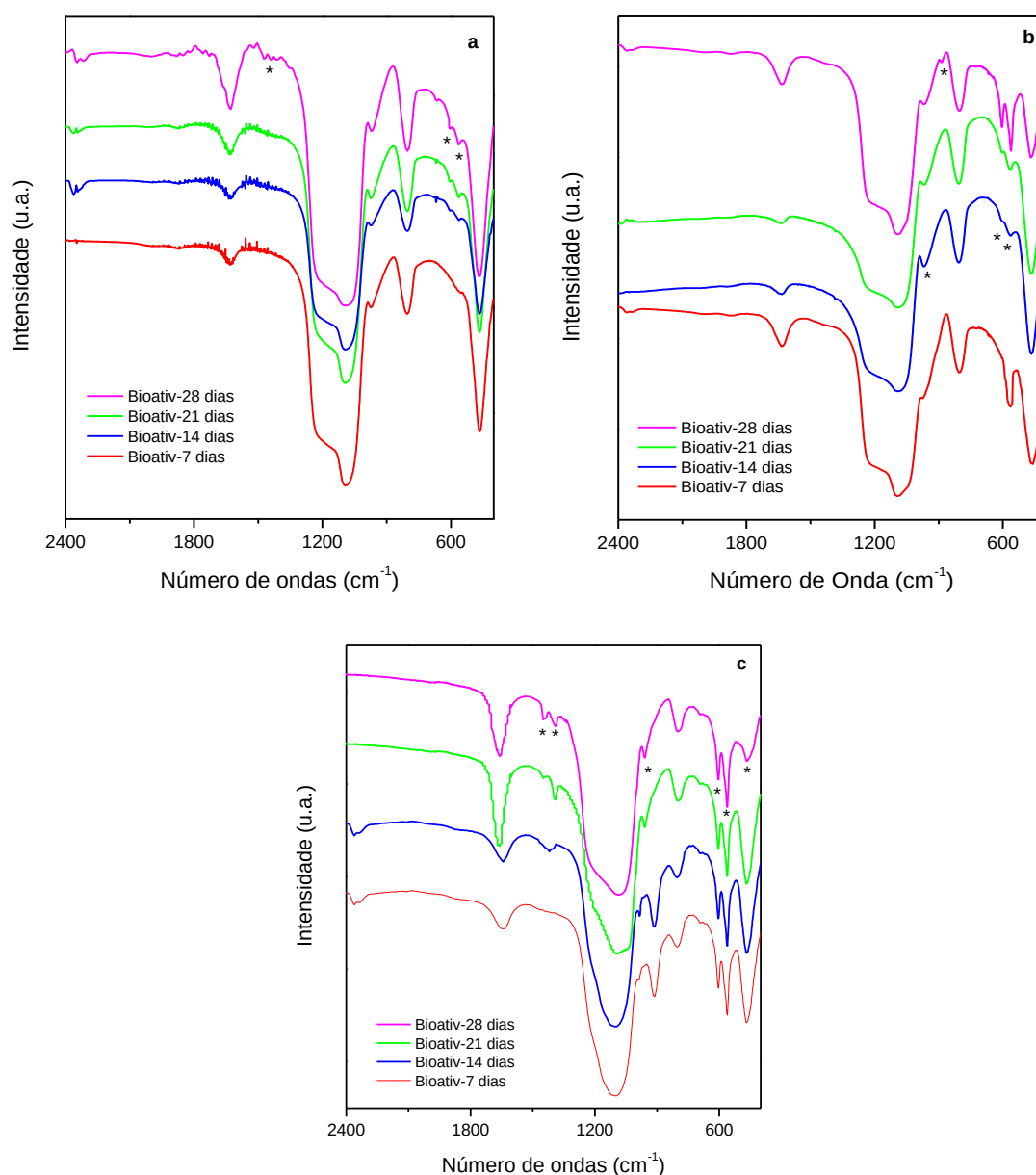


Figura 4.3.1. Espectros de FTIR das amostras LMSiO (a), LMSiCaP I (b) e LMSiCaP II (c) após imersão em SBF por diferentes períodos (7-28 dias).

Nos espectros da amostra LMSiCaP II em diferentes períodos de imersão, bandas encontradas na região de 955, 603, 560 e 464 cm^{-1} foram atribuídas à ligação P-O, que foram observadas nos 7 dias iniciais do ensaio. Com 14 dias de imersão, foi observado o surgimento de uma banda próximo a 1432 cm^{-1} , onde nos espectros referentes a 21 e 28 dias de imersão se tornou mais definida e deslocada a 1451 e 1418 cm^{-1} , atribuídas a ligação C-O.

Com essas medidas pode-se observar que com a imersão em SBF todas as amostras mostraram o surgimento de uma camada de fosfato de cálcio. Com o

aumento do tempo de imersão, outras bandas referentes a HA foram gradualmente identificadas, indicando a evolução da precipitação de HA nas amostras como uma função do tempo de imersão (YAN et al., 2006; VALLET-REGÍ et al., 1999).

A Figura 4.3.2 mostra, através de imagens de SEM, as mudanças sofridas pelas amostras de sílica mesoposora, após determinados períodos de imersão em SBF.

Antes da imersão em SBF, as partículas da amostra LMSiO mostravam-se regulares e com superfície homogênea (Figura 4.1.9a). Após 7 dias de imersão (Figura 4.3.2a), o material manteve sua estrutura original, sem nenhuma alteração significativa. Numerosas partículas delgadas começaram a aparecer entre as partículas de sílica em 21 dias (4.3.2b) e o material manteve seu formato original. Após 28 dias, pode-se observar pequenas partículas com formato de agulha (*needle-like*) e se apresentam mais constantes entre as partículas cilíndricas.

Após a imersão em um período de 7 dias, a imagem 4.3.2a' mostra pequenas partículas esféricas entre as partículas cilíndricas da amostra LMSiCaP I. Com 21 dias de imersão, começou a sofrer uma degradação das suas partículas cilíndricas, ao mesmo tempo que partículas nanométricas globulosas se aglomeravam. Com 28 dias de imersão, somente partículas esféricas, com tamanhos variados, cobrem a superfície da amostra e de acordo com Vallet-Regí et al. (1999), essas partículas consistem de numerosos cristais em formato de agulha (*needle-like*) como os de apatita.

Em relação a amostra LMSiCaP II, logo na primeira semana (Figura 4.3.3a) houve o aparecimento de pequenas partículas esféricas. É importante observar que as nanométricas partículas esféricas apareceram e se aglomeraram. Após 21 dias, essas partículas globulosas tornaram-se mais frequentes e em 28 dias de imersão, pode-se observar um arranjo predominante sobre a amostra, composto por diminutos cristais semelhantes aos cristais de apatita após ensaios de bioatividade *in vitro* usando a solução SBF (YAN et al., 2006; PADILLA et al., 2006).

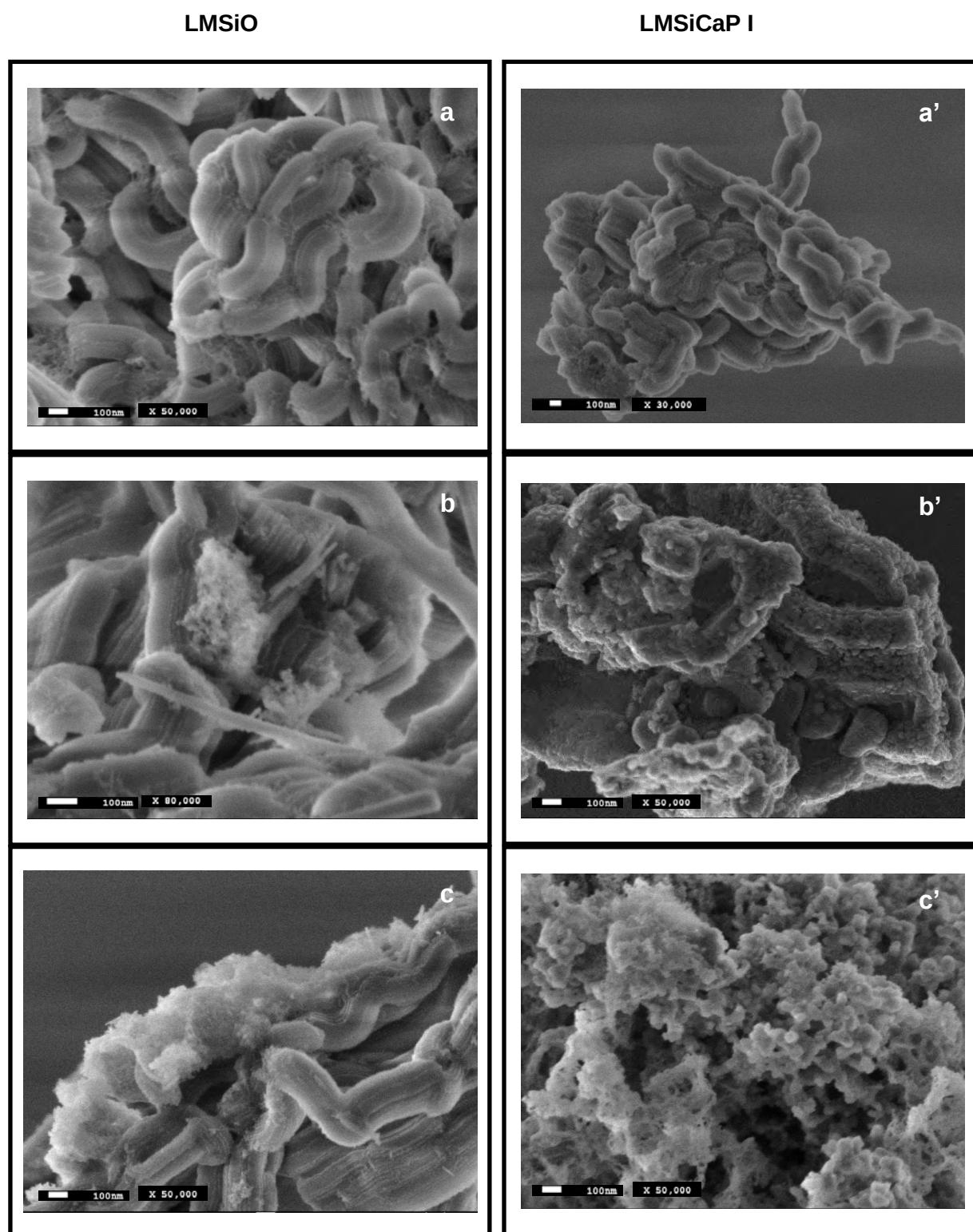


Figura 4.3.2. Imagens de SEM das amostras LMSiO e LMSiCaP I após imersão em SBF por 7 (a, a'), 21 (b, b') e 28 dias (c, c').

LMSiCaP II

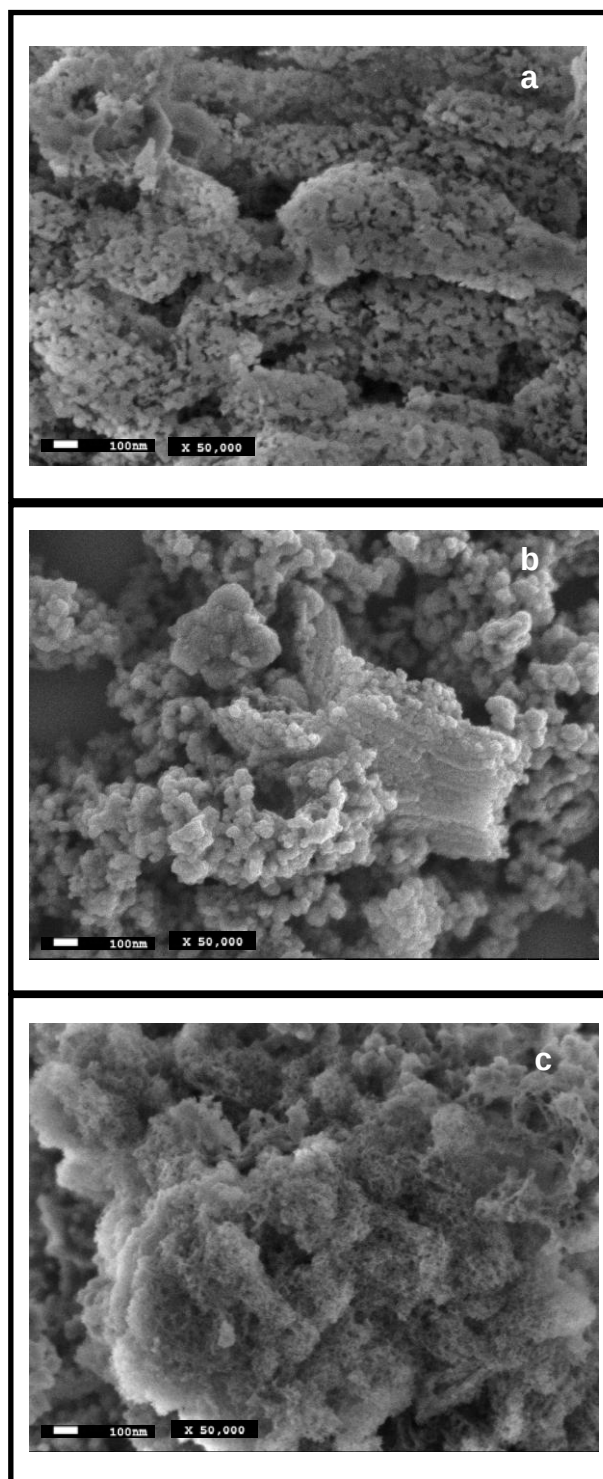


Figura 4.3.3. Imagens de SEM da amostra LMSiCaP II após imersão em SBF por 7 (a), 21 (b) e 28 dias (c).

Os padrões de XRD das amostras após 28 dias imersas em solução SBF estão apresentados nas Figura 4.3.4 e devem ser comparados com os difratogramas das amostras traçados antes da imersão em SBF (Figura 4.1.2).

Os difratogramas, após 28 dias de imersão, mantiveram uma difração larga entre 15 e 25° 2 θ , representando a característica amorfa da sílica.

O difratograma correspondente a amostra LMSiO apresentou um máximo em 26,2° 2 θ correspondendo a reflexão (002) da HA (JCPDS # 00-09-0432), porém houve o aparecimento de outros picos. Vale lembrar que esta amostra não possui Ca nem P em sua composição. Este resultado confirma o aparecimento de HA após a imersão em SBF, corroborando os resultados de FT-IR para o mesmo período de imersão.

No difratograma correspondente a amostra LMSiCaP I, o máximo é observado em torno de 32° 2 θ , que corresponde a reflexão (211) da HA (JCPDS #00-009-0432). Houve um aumento da intensidade das difrações (002) em função do tempo de imersão em SBF, que é característica de apatita cristalizada a partir de soluções que simulam o plasma humano (VALLET-REGÍ et al.,1999). Pode-se observar que os picos (112), (300), (202), (310), (222), (312) e (213) se tornaram mais evidentes. Interessante é que os picos atribuídos ao β -TCP não foram mais visualizados, indicando a sua dissolução no meio aquoso.

A amostra LMSiCaP II apresentou máximos em torno de 32° 2 θ no difratograma após 28 dias em SBF, que corresponde aos picos (211) e (112) da HA (JCPDS #9-0432). O difratograma mostra o aparecimento de um pico em 22° 2 θ correspondente a (200) e aumento da intensidade dos picos (002), (211), (300), (202), (212), (310), (222), (312), (213) correspondentes a HA cristalina, evidenciam a formação de HA na amostra quando imersa em SBF.

As variações observadas nas amostras com diferentes concentrações de sílica após a imersão em SBF estão de acordo com o mecanismo de nucleação e crescimento de uma camada de apatita sobre vidros bioativos (Kokubo, 1997).

Os resultados conhecidos para os biovidros e cerâmicas vítreas geralmente sugerem que a precipitação da camada superficial rica em Ca e P é induzida pela presença de SiO₂ (VALLET-REGÍ et al., 1999).

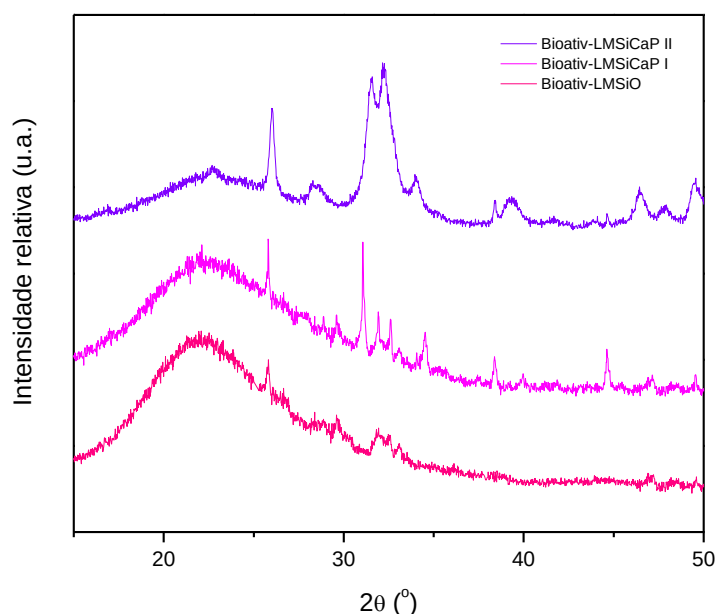


Figura 4.3.4. Padrões de XRD das amostras LMSiO, LMSiCaP I e LMSiCaP II após 28 dias de imersão em SBF.

Em um trabalho com bioatividade *in vitro* de materiais que não continham cálcio e fósforo, Kokubo, Kim e Kawashita (2003) mostraram que vidros que não continham tais elementos também podem ser bioativos. Para estes autores, a formação de uma camada de sílica hidratada na superfície do material é a característica que mais influencia a bioatividade do material.

O aparecimento de bandas de absorção do fosfato e carbonato nos espectros das amostras após a imersão em SBF, não só confirma a formação de apatita como também identifica o material como hidroxicarbonato de apatita (HCA), semelhante às apatitas biológicas (LEGEROS, 1981).

De acordo com LeGeros (1981), a morfologia globular observada nas imagens de SEM após a imersão em SBF está relacionada à presença de hidroxicarbonato de apatita (HCA). A concentração de íons carbonato (CO_3^-) na molécula de HA define sua morfologia, variando de cristais aciculares a globulares. A morfologia da camada de Ca-P encontrada no presente trabalho está de acordo com a forma esférica da HCA, nas amostras LMSiCaP I e II, também observada por Li et al. (1992). Esta camada de HCA deve ter uma espessura e uma estabilidade

adequada, pois vai influenciar na adesão de células, orientando, por exemplo, a formação de tecido conjuntivo (LI et al., 1992).

Os difratogramas de XRD mostraram deslocamento das difrações com o aparecimento da difração da apatita e difrações mais nítidas, após imersão em SBF, indicando duas ocorrências: mudança na composição do material original e crescimento de cristais de HA em função do tempo de imersão. O padrão de difração apresentado pela amostra LMSiCaP II após 28 dias em SBF é similar ao observado em HA sintética (LEGEROS, 1981).

A composição do vidro é o principal fator relacionado à bioatividade. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que as áreas superficiais dos materiais em conjunto com as características químicas locais também contribuem para uma formação da camada de Ca-P. É importante recordar que a solução SBF é acelular, ou seja, não existe a influência de proteínas e células no meio, devendo, portanto, o estudo ser conduzido apenas com o intuito de se avaliar o potencial de bioatividade do material, e não como um teste conclusivo sobre essa questão.

As amostras estudadas mostraram um comportamento bioativo *in vitro*, sendo observada a formação de HA quando imersos em SBF. Devido às diferentes concentrações de sílica é de se esperar que os materiais bioativos apresentem índices de bioatividade variados, ou seja, diferentes tempos para o estabelecimento de ligação com o tecido.

4.3.2. Adsorção do peptídeo OGP e OGP-CF às nanopartículas de sílica

A espectroscopia de luminescência foi escolhida para monitorar o comportamento do peptídeo em solução frente às partículas de sílica, pois é uma ferramenta analítica extremamente sensível e tem sido amplamente aplicada na resolução de problemas que requerem baixos limites de detecção, podendo ser facilmente encontrados na literatura muitos trabalhos mostrando análises em nível de traços (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A luminescência envolve vários tipos de fenômenos ópticos, sendo que os mais difundidos referem-se à fluorescência molecular, à fosforescência e à quimiluminescência.

O fenômeno fotoluminescência ocorre quando uma molécula é excitada através da absorção de fótons de luz ($h\nu_{\text{ex}}$) e promovida para um estado eletrônico de maior energia, cujo retorno ao estado fundamental é acompanhado pela emissão de radiação eletromagnética (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A luminescência molecular é dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. A energia eletrônica responsável pela transição fluorescente não envolve uma mudança no número quântico do spin do elétron, e passa do nível $S_0 \rightarrow S_1$, emitindo radiação desde o nível excitado S_1 para algum dos níveis vibracionais do estado eletrônico S_0 . Como consequência, a fluorescência possui tempos de vida extremamente curtos, com a luminescência cessando quase que imediatamente, por volta de 10^{-9} a 10^{-6} s (ns a μ s) (SOTOMAYOR et al., 2008). A fluorescência é emitida em comprimentos de onda maiores àqueles de excitação, deslocando-se entre 50 e 150 nm, quando comparado ao comprimento de onda da luz usado para a excitação da molécula, conhecido como *deslocamento de Stokes* (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996).

Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto, T_n) (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996). Contudo, este tipo de transição é menos provável que a transição envolvendo dois estados singletos (fluorescência), pois processos paralelos de desativação como a conversão interna e externa e o relaxamento vibracional podem competir com a fosforescência. Como consequência direta disso, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que torna o procedimento experimental fluorimétrico bastante simples, além de possuir grande sensibilidade (SOTOMAYOR et al., 2008)..

Como o peptídeo estudado não apresenta fluorescência intrínseca, para tornar possível o emprego da técnica, foi acoplada à extremidade N-terminal do peptídeo, sonda fluorescente, como descrito anteriormente.

Primeiramente, foi traçado um espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF livre para determinar o comprimento de onda máximo de emissão (Figura 4.3.5a), sendo fixado o monocromador de excitação a 492 nm (λ máximo de absorção). Desta forma, fixando os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) em 492 nm e de emissão (λ_{em}) em 520 nm, foi obtida a curva padrão de fluorescência do OGP-CF (em tampão Tris a temperatura ambiente) para auxiliar na quantificação do peptídeo adsorvido nos materiais analisados (Figura 4.3.5b).

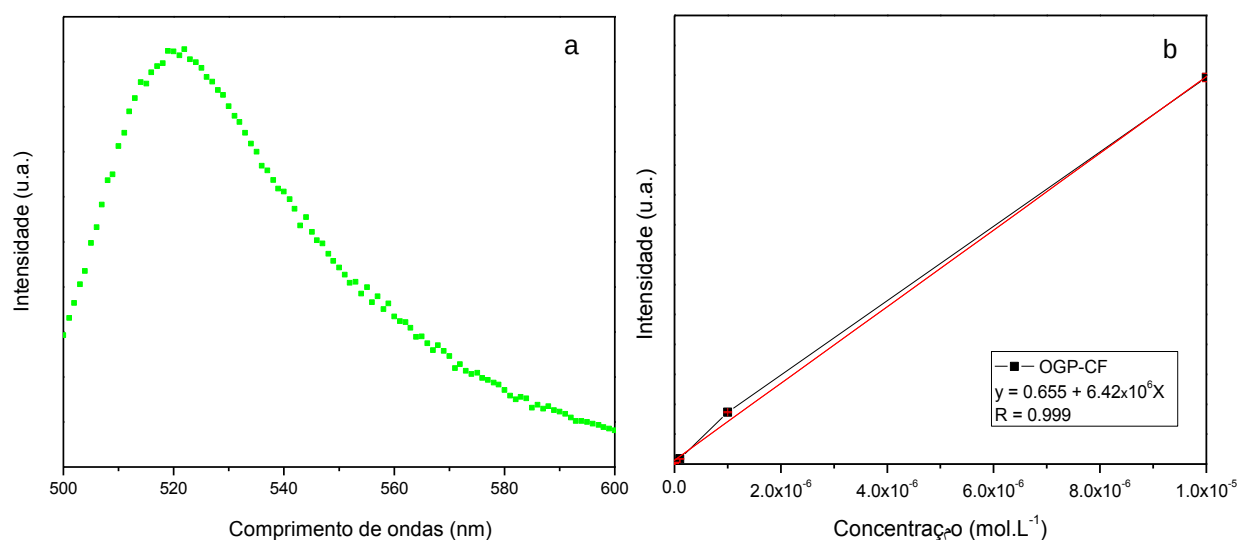


Figura 4.3.5. Espectro de fluorescência do peptídeo OGP-CF (a) e Curva padrão OGP-CF em solução tampão Tris (b).

4.3.3. Cinética de adsorção do peptídeo

A Figura 4.3.6 apresenta as curvas de adsorção do OGP-CF em uma solução com concentração 10^{-4} mol.L⁻¹ pelas amostras de sílica LM-SiO e LMSiCaP I, expressas em N_f (mols adsorvidos/grama de sílica) em função do tempo.

A análise dos gráficos revela que a LMSiO atinge o equilíbrio aproximadamente em 20 minutos, provavelmente pela melhor afinidade da superfície negativa da sílica com o peptídeo, de carga positiva, em pH 7,4. Já a amostra LMSiCaP I atinge o equilíbrio próximo a 30 minutos com um percentual de mols adsorvidos significativamente inferior quando comparado à amostra de sílica

pura. Este fato pode ser atribuído a menor área de superfície específica desta amostra e a quantidade de grupos silanóis livres.

Em relação a amostra LMSiCaP II, os resultados mostraram que o peptídeo não foi adsorvido durante o período de monitoramento. Isso pode ser atribuído a dois fatores: a menor área de superfície específica apresentada por essa amostra em relação às outras e a porcentagem de apatita presente nesta amostra, que pode estar impedindo a adsorção das moléculas de peptídeo nos grupos Si-OH. Assim, a possibilidade de controlar a porcentagem de sílica nas amostras pode ser vantajoso de acordo com a aplicação do material. Uma fina camada de Ca-P pode ser suficiente, por exemplo, para criar sítios de nucleação para mineralização de apatita. Como este trabalho visa obter um material bioativo e carreador do peptídeo OGP, o fato da amostra LMSiCaP II não adsorver esta molécula, a exclui dos demais ensaios.

Os resultados mostram que a cinética de adsorção é bastante satisfatória para as amostras empregadas. Esse comportamento cinético deve-se ao fato da homogeneidade dos poros, da distribuição homogênea e da exposição dos sítios de adsorção na superfície do material (ARCOS et al., 2009; VALLET-REGÍ et al., 2007).

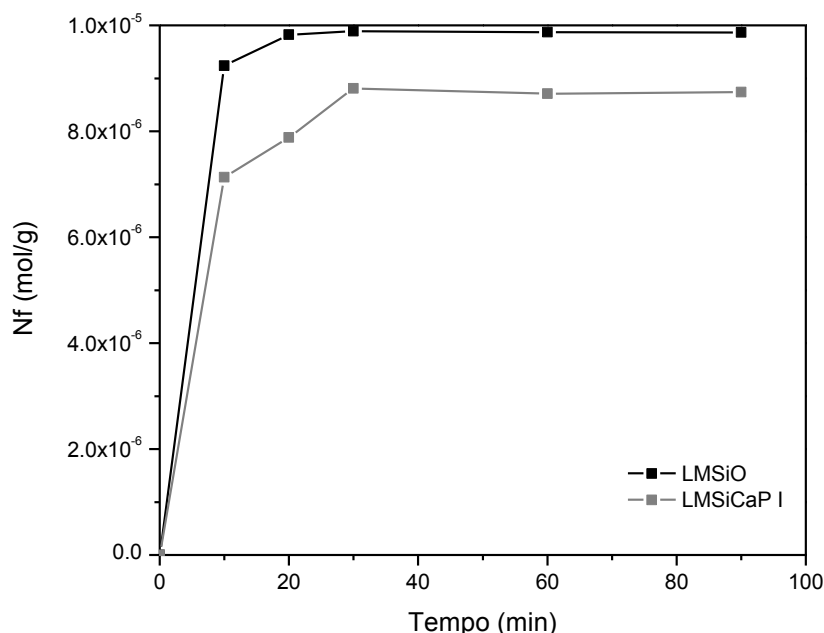


Figura 4.3.6. Curvas de adsorção do peptídeo OGP-CF para as amostras de sílica.

4.3.4. Incorporação de peptídeo OGP-CF

O número de mols de OGP-CF adsorvidos por grama de sílica em soluções com diferentes concentrações de peptídeo está apresentado na Figura 4.3.7.

As amostras foram imersas nas soluções com diferentes concentrações de OGP-CF e mantidas de acordo com os resultados do tempo máximo de adsorção, sendo 20 minutos para a amostra LMSiO e 30 minutos para LMSiCaP I.

O gráfico mostra que a amostra LMSiO adsorveu $9,9 \times 10^{-8}$, $9,7 \times 10^{-7}$ e $9,7 \times 10^{-6}$ mol.g⁻¹ de peptídeo marcado, quando utilizando soluções 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} mol.L⁻¹, respectivamente. Estes valores representam 99%, 97% e 97,8% dos mols de OGP-CF presentes nas soluções iniciais, respectivamente. Isto mostra que a adsorção por parte desta amostra foi satisfatória.

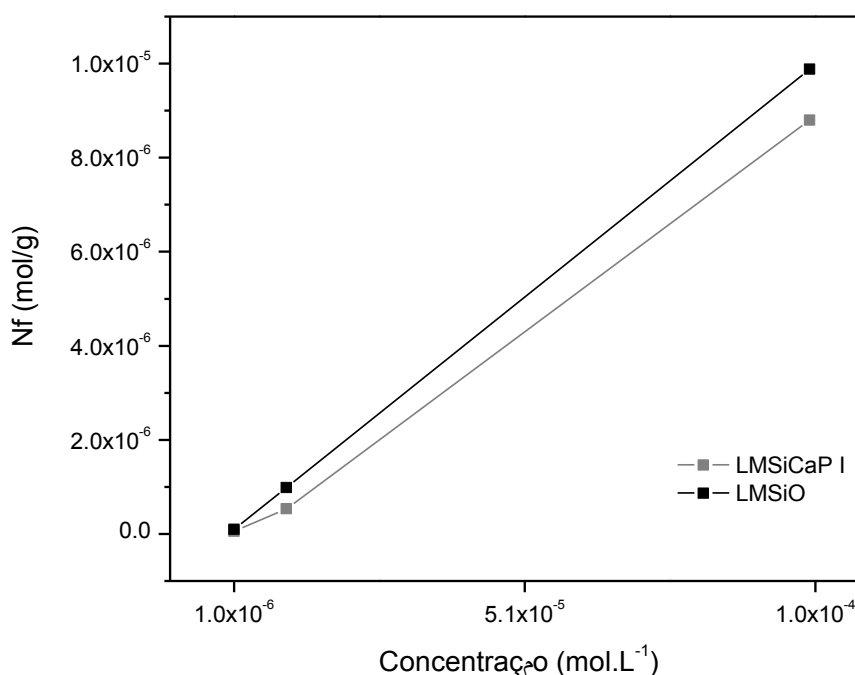


Figura 4.3.7. Curvas de adsorção do peptídeo OGP-CF pelas amostras LMSiO e LMSiCaP I.

A amostra LMSiCaP I adsorveu uma quantidade de $8,7 \times 10^{-8}$, $5,3 \times 10^{-7}$ e $5,5 \times 10^{-6}$ mol.g⁻¹ de peptídeo, a partir das soluções 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} mol.L⁻¹, respectivamente, o que corresponde a 87%, 53% e 55% do total de peptídeo. Mesmo que a quantidade de mols adsorvido por esta amostra tenha sido menor que a amostra LMSiO, a incorporação manteve-se satisfatória visto que mais da metade

do OGP-CF foi adsorvido e que a liberação por parte de um dispositivo de $6,0 \times 10^{-12}$ mol de OGP é suficiente para estimular a proliferação das células osteoblásticas (BAB et al., 1992; SASKA, 2011).

Após o período de incorporação o material sólido foi separado e, em seguida, lavado para retirar excessos de OGP-CF na superfície do material. As soluções resultantes do procedimento de lavagem foram medidas para determinação da concentração do peptídeo por Espectroscopia de Fluorescência, de forma obter a quantidade incorporada em cada amostra. Foi observado que as amostras perderam cerca de 1,5% dos mols adsorvidos. Mesmo com valores relativamente pequenos de perda de peptídeo durante o procedimento de lavagem das amostras, essa é uma importante etapa, pois ela assegura a eliminação de uma fração de fármaco não absorvida, que fica aderida na superfície das amostras, o que poderia resultar em valor superestimado nos primeiros instantes dos ensaios de liberação (SOUSA, 2009).

Os resultados mostram que a capacidade de adsorção pode ser muito dependente das propriedades da superfície do material. Além disso, pode-se considerar que, devido as pequenas dimensões da molécula peptídica (comparativamente à albumina bovina, 6×10 nm), os poros das amostras são suficientes para alojá-la, não influenciando sua adsorção (VALLET-REGÍ et al., 2007).

Os perfis dos isoterma apresentados por BET mostraram que as amostras diferem quanto a área de superfície específica e volume de poro. Neste sentido, pode haver uma incorporação do peptídeo favorável na amostra LMSiO, sugerindo uma interação entre o peptídeo e a sílica mesoporosa. As moléculas de peptídeo contém uma porção N-terminal que pode interagir com os grupos silanóis da sílica por ligação de hidrogênio. Também foi observado que a presença de HA na matriz de sílica afeta a porcentagem de peptídeo adsorvido nas amostras mesoporosas.

Desta forma, a diferença na quantidade de OGP-CF adsorvida pelas diferentes amostras pode ser atribuída a área de superfície específica, que foi reduzida pela presença de HA (LMSiCaP I), e da distribuição homogênea dos poros.

4.3.5. Liberação do peptídeo OGP-CF em solução SBF

O teste de dissolução é o processo em que uma substância sólida se dissolve e é controlada pela afinidade entre a substância sólida e o solvente (BANAKAR, 1992). Desta forma, deve se levar em consideração o meio *in vivo* onde o material deverá atuar, onde o teste tem que ser capaz de representar a performance da molécula *in vivo*. Dentre as substâncias sólidas, pode-se incluir: comprimidos (revestidos ou não), cápsulas, suspensões orais, *pellets*, entre outros.

Com o aumento do interesse nos ensaios de dissolução, percebeu-se que este além de aumentar a Correlação *in vivo* e *in vitro*, diminui razoavelmente o tempo de ensaio, o investimento e também o número de cobaias, além de ser muito difundido no controle de qualidade (GRAY, 2004).

Os sistemas de dissolução estão cada vez mais personalizados, pois cada sistema que surge, há também a necessidade de desenvolver um aparato que venha a condizer com a terapêutica do fármaco. Assim, por não haver aparato específico para análise de dissolução de moléculas biológicas, como peptídeo, em cimento ósseo, optou-se em utilizar a metodologia de dissolução de comprimidos adaptado para o sistema em estudo.

O meio de dissolução é um dos mais importantes fatores, sendo que sua seleção deve considerar a solubilidade e faixa de dosagem, de forma a respeitar a *Sink Condition*. Neste trabalho, a solução SBF foi escolhida por possuir concentração iônica semelhante ao plasma sanguíneo e pelo fato do peptídeo OGP ser solúvel neste meio. Outro fator importante é a temperatura, que de acordo com a UNITED STATES PHARMACOPEIA 29 (USP, 2006) deve estar entre 36,5 e 37,5°C.

Os perfis de liberação cumulativos plotados em função do tempo são apresentados nas Figuras 4.3.8 e 4.3.9, para LMSiO e LMSiCaP I, respectivamente.

Pode-se ver nestes gráficos que a quantidade de peptídeo liberado é considerada alta. Este fato pode estar relacionado com a interação entre o peptídeo e os materiais de sílica mesoporosos por ligação de hidrogênio devido a afinidade da porção N-terminal do peptídeo com os grupos silanol presente nas amostras (LOZANO et al., 2010). A matriz de sílica é insolúvel em um pH igual a 7,4, assim a liberação é essencialmente devido ao transporte difusivo do peptídeo através da rede mesoporosa ordenada.

A velocidade de liberação de um fármaco pode ser inferida pela inclinação da reta que ajusta os pontos de porcentagem de massa liberada em função do tempo, no início do ensaio de liberação (SOUSA, 2009). Quanto maior a inclinação da reta maior a cinética de liberação. Observou-se que em relação à amostra LMSiO, a maior velocidade de liberação de OGP-CF, 18,29%massa/hora, foi na amostra que possuía maior quantidade mols adsorvidos, LMSiO- 10^{-4} , quando analisado as duas primeiras horas de teste. Assim, pode-se dizer que o início da liberação neste material foi dependente da concentração do peptídeo adsorvido nas partículas de sílica. E de acordo com Vallet-Regí, Balas e Arcos (2007) este perfil está associado ao processo de difusão ou dissolução e geralmente segue uma cinética de primeira ordem em relação à concentração do adsorbato.

A amostra LMSiCaP I mostrou a mesma velocidade de liberação em todas as amostras, independente da quantidade de OGP-CF incorporada, cerca de 18%massa/hora, quando comparadas as primeiras horas de liberação, sendo que esse valor permaneceu o mesmo até o sistema atingir o *platô*. Porém, quando se compara as amostras LMSiO e LMSiCaP I, observa-se que esta última libera seu conteúdo peptídico em um menor tempo. Este fato pode ser atribuído a composição do material, sílica e apatita, e a maior perda de massa das pastilhas no processo de degradação.

Mesmo, com as lavagens do material poroso após os experimentos de adsorção do peptídeo, o fenômeno conhecido como *burst release* ou liberação repentina, que acontece devido a presença de OGP-CF na superfície das partículas que pode resultar em um valor superestimado nos primeiros instantes dos ensaios de liberação (SOUSA; SOUZA; SOUZA, 2008) foi observado. Vallet-Regí, Balas e Arcos atribuíram esse perfil a uma liberação rápida no período inicial seguida por uma liberação mais lenta, que pode ser útil quando altas doses da molécula carregada é necessário.

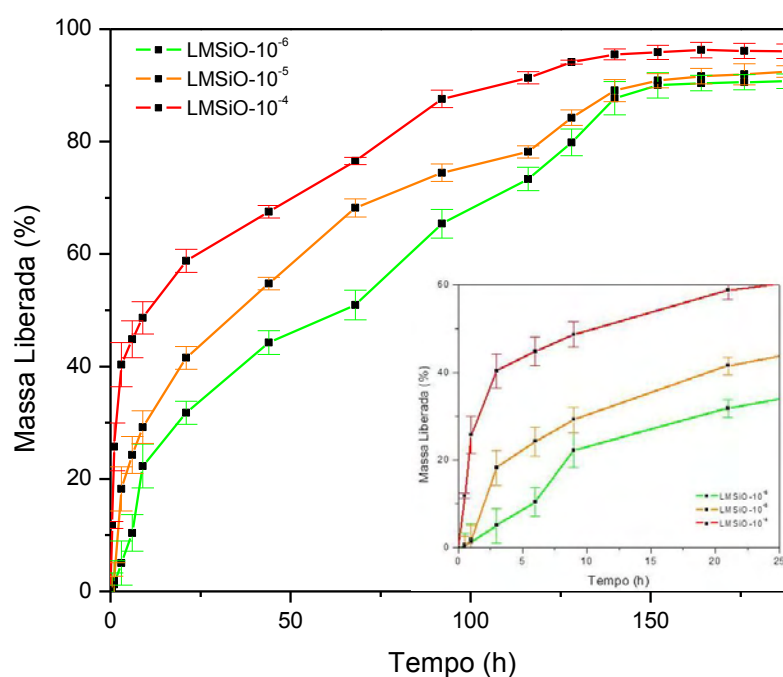


Figura 4.3.8. Perfis de liberação cumulativa de OGP-CF a partir das amostras de LMSiO; insert destacando a liberação nas primeiras 24 horas .

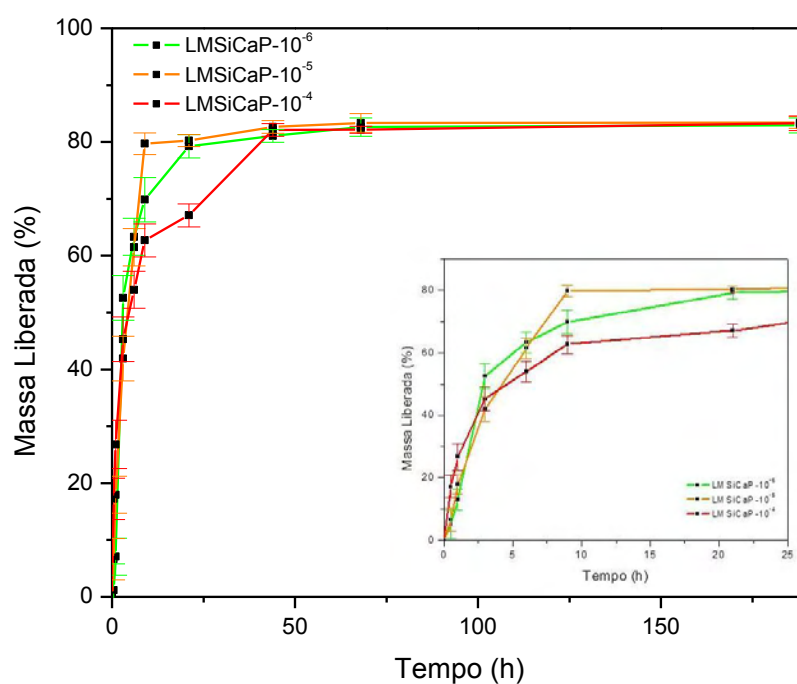


Figura 4.3.9. Perfis de liberação cumulativa de OGP-CF a partir das amostras de LMSiCaP I; insert destacando a liberação nas primeiras 24 horas.

A Tabela 4.5 apresenta os valores de $t_{50\%}$, que corresponde ao tempo necessário para liberar 50% do peptídeo contido nas amostras. Comparando os valores de $t_{50\%}$ para a amostra LMSiO e LMSiCaP I é possível notar que a presença da apatita interfere na cinética de liberação do OGP-CF. Vale destacar que a solução utilizada para os ensaios de liberação foi a mesma dos testes de bioatividade *in vitro*. Assim, analisando as porcentagens de OGP-CF liberadas no final dos ensaios, pode-se observar que a LMSiO liberou uma porcentagem maior que a LMSiCaP I, que pode estar relacionado à precipitação da camada de HA quando imersa em SBF, devido ao maior Índice de bioatividade que esta última apresentou *in vitro* em relação a amostra de sílica pura.

Tabela 4.5. Parâmetros experimentais dos perfis de liberação.

	LMSiO			LMSiCaP I		
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
$t_{50\%}(h)$	10,0	34,0	63,0	4,0	4,2	3,9

4.3.6. Estudo de degradação *in vitro* em SBF

A ideia do teste de degradação *in vitro* é tentar prever o comportamento de degradação do material durante a liberação do peptídeo, porém, a reprodução em laboratório das condições presentes no processo de degradação *in vivo* é impossível. A degradação *in vivo* envolve uma série de fatores que podem afetar a cisão hidrolítica das cadeias, e que vão desde a aplicação de tensões, até a existência de respostas celulares e enzimáticas (HOFFMAN, 1992).

Para os testes optou-se pelo uso da solução SBF, pois é um meio tamponado que permite uma avaliação mais aproximada do comportamento que ocorrerá com o implante *in vivo*. Outro fator importante é a temperatura do banho, que deve ser mantida próxima de 37°C, simulando a temperatura corporal.

Como os materiais a base de sílica apresentam um período de degradação prolongado e como a intenção deste ensaio não é definir o tempo de degradação total, foi definido o intervalo durante os testes de liberação. Esta concessão foi feita

por tratar-se de um estudo preliminar e por não haver disponibilidade de pastilhas em número suficiente para todos os tempos de teste.

Primeiramente, foi avaliada a perda de massa sofrida pelas amostras durante este período. Neste ensaio, a massa das pastilhas foi calculada pela média de 3 peças a cada intervalo, 1, 4 e 8 dias, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Dados do ensaio de perda de massa realizado nas pastilhas.

Período (dia)	Massa (g)	
	LMSiO	LMSiCaP I
0	0,025	0,0250
1	0,025	0.0243
4	0.024	0.0230
8	0,0238	0.0200

Através dos dados obtidos, pode-se observar que a amostra LMSiO perdeu menos massa que a LMSiCaP I, onde ao final do período analisado, 8 dias, essa redução foi de 4,8 e 20%, respectivamente. Este comportamento deve-se ao fato da presença de apatita na composição da LMSiCaP I e sua notável solubilidade em SBF em relação à sílica. As imagens de microscopia mostram uma gradual alteração das amostras. Pode-se notar que a amostra LMSiO (Figura 4.4.1) permanece mais intacta, perdendo o contorno circular e apresentando fissuras nas imagens de 8 dias. Já a amostra LMSiCaP I, apresenta fissuras logo no primeiro dia de teste, perdendo o contorno e se tornando menos espesso (Figura 4.4.2). Outro destaque é a formação de uma camada de pequenas estruturas sobre as pastilhas, que pode ser atribuída a formação de HA. Vale destacar que a perda de material ocorre principalmente na região periférica das pastilhas.

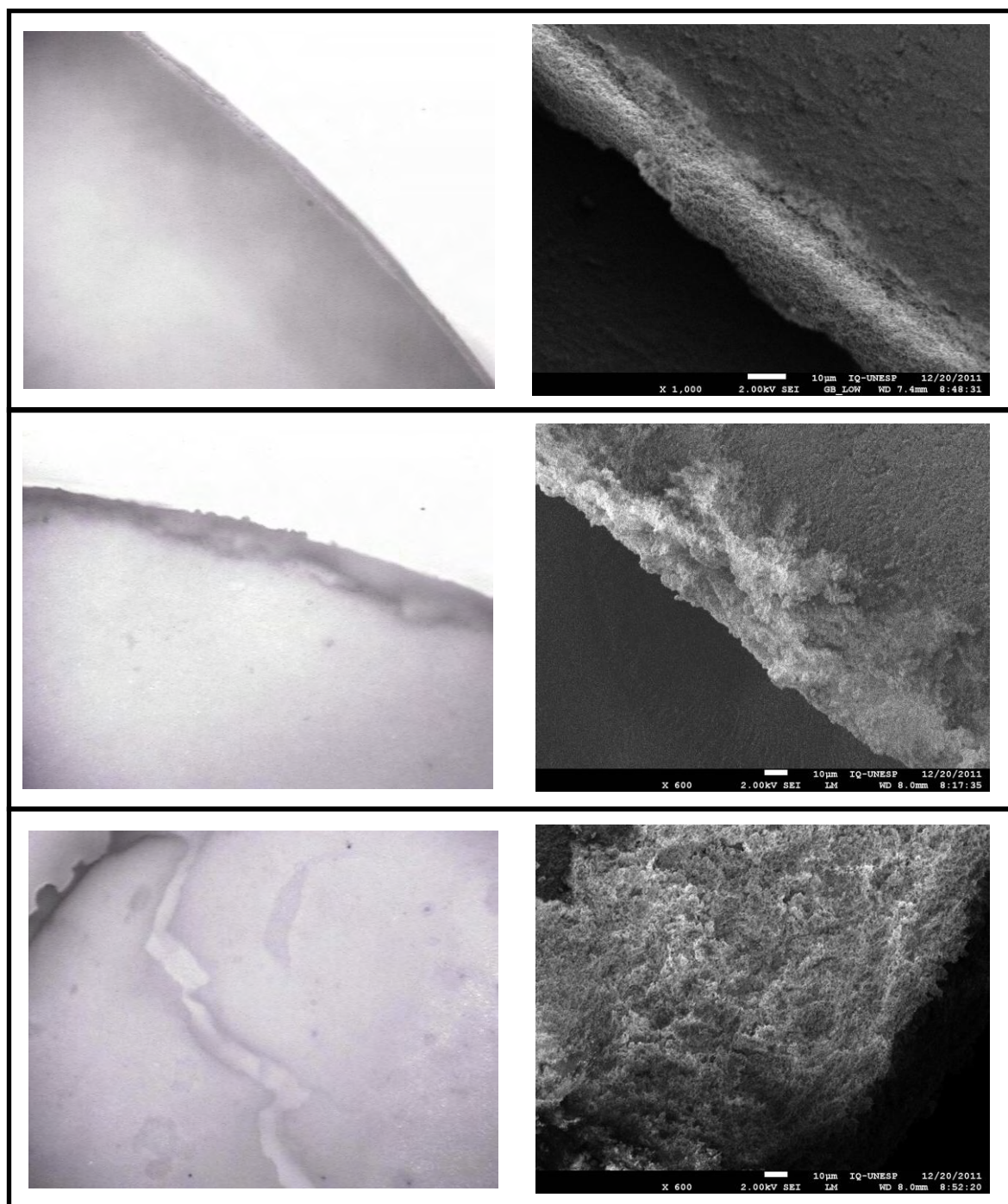


Figura 4.4.1. Imagens de Microscopia Óptica (10x) e SEM (1000x e 600x) das pastilhas de LMSiO após 1, 4 e 8 dias de imersão em SBF, respectivamente.

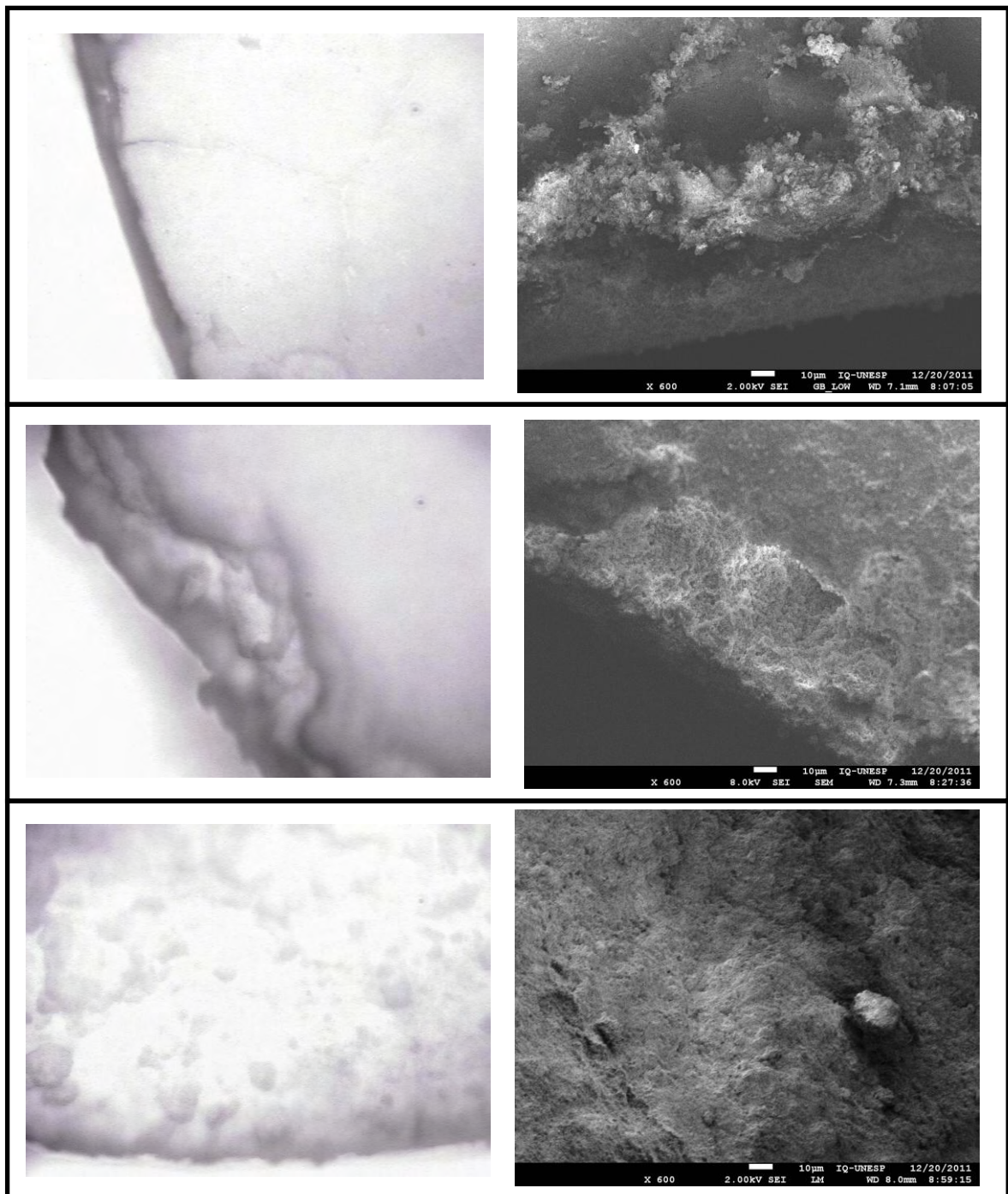


Figura 4.4.2. Imagens de Microscopia Óptica (10x) e SEM (600x) das pastilhas de LMSiCaP I após 1, 4 e 8 dias de imersão em SBF, respectivamente.

He et al. (2010) mostraram os estudos de vários pesquisadores sobre a dissolução de matrizes de sílica derivadas do processo sol-gel, e concluíram que essa dissolução se passa em duas etapas: erosão da superfície e lenta degradação

do material. Aparentemente, as matrizes de sílica derivadas do processo sol-gel, sílicas mesoporosas ordenadas e vidros mesoporosos bioativos mostram taxas de degradação da ordem de dias a meses. Viitala, Jokinen e Rosenholm (2007) estudaram a degradação da sílica cujo tempo variou de 4 dias (para os monólitos) a aproximadamente 80 dias (para as micropartículas). Por outro lado, He et al. (2010) observaram uma degradação *in vitro* extraordinariamente rápida (2 h) de sílica mesoporosa obtida a partir de tetraetilortossilicato, quando imerso em SBF à temperatura de 37 °C. Além do mais, géis a base de sílica são facilmente erodidos, tanto *in vitro* em tampão Tris quanto *in vivo*, onde a erosão ocorreu através da formação de ácido silícico (TEOLI et al., 2006), de forma semelhante a materiais secos, que possuem ausência de toxicidade local e sistêmica quando injetados no organismo (URGER et al., 1983).

5. CONCLUSÕES

A síntese de biomateriais com composições diferentes, tendo como matriz uma sílica mesoestruturada, foi estudada e caracterizada.

A metodologia utilizada para obtenção de materiais mesoporosos ordenados foi eficaz, para posterior incorporação de moléculas do peptídeo OGP. A utilização da 5,6-carboxifluoresceína como sonda fluorescente do peptídeo OGP foi eficiente e a Espectroscopia de Fluorescência apresentou sensibilidade suficiente para o monitoramento de incorporação e liberação *in vitro* de OGP.

As amostras LMSiO, LMSiCaP I e II mostraram bioatividade *in vitro* quando imersas em SBF. Os resultados das análises de FTIR, SEM e XRD mostraram que a camada formada sobre a superfície das amostras é uma apatita similar às apatitas biológicas.

A incorporação de HA na sílica levou a uma mudança significativa nas propriedades estruturais deste sistema, indicando que o crescimento de cristais bloqueia os espaços disponíveis da sílica mesoporosa e, devido a este fato, ocorre uma redução nas características texturais como área de superfície e volume de poro. Assim, essa redução refletiu na capacidade de adsorção máxima das partículas, onde a amostra com maior área de superfície adsorveu maior quantidade de mols de peptídeo de acordo com a Espectroscopia de Fluorescência.

A liberação do peptídeo OGP marcado com 5,6-carboxifluoresceína das partículas ocorreu de forma controlada e foi demonstrado que a composição das partículas, bem como a degradação do material e a concentração de peptídeo incorporado, influenciam no perfil de liberação. Os resultados indicam que as amostras, LMSiO e LMSiCaP I, são potenciais em adsorver o peptídeo OGP, o que os tornam importantes candidatos em sistemas de carreadores de moléculas.

Assim, espera-se que os sistemas sílica-OGP e sílica-HA-OGP promovam a proliferação celular *in vitro* e conseqüentemente apresentem biocompatibilidade *in vivo* em futuras aplicações no reparo de defeitos ósseos e engenharia tecidual.

6. PERSPECTIVAS

Como proposta para estudos futuros utilizando os sistemas neste trabalho desenvolvidos, pode-se citar:

- Preparação de cimentos ósseos injetáveis para reparação de tecido ósseo lesionado.
- Estudar e definir qual o mecanismo de liberação de OGP-CF a partir das pastilhas e dos cimentos, bem como a liberação/interação com os íons da solução de SBF.
- Avaliar as propriedades osteoindutoras e a citotoxicidade destes materiais na presença de OGP utilizando cultura primária de células osteogênicas.
- Realizar análises físico-químicas para compreensão função dos cimentos frente ao metabolismo ósseo.
- Estudo *in vivo* empregando o mesmo protocolo cirúrgico adequado, para analisar a biocompatibilidade e melhor compreensão dos efeitos osteoindutivos deste peptídeo *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, J.; AREVA, S.; SPLIETHOFF, B.; LINDÉN, M. Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite. **Biomaterials**, v. 26, p. 6827-6835, 2005.
- ARCOS, D.; LÓPEZ-NORIEGA, A.; RUIZ-HERNÁNDEZ, E.; TERASAKI, O.; VALLET-REGÍ, M. Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery. **Chemistry of Materials**, v. 22, p. 1000-1009, 2009.
- AREVA, S.; AEAERITALO, V.; TUUSA, S.; JOKINEN, M.; LINDEN, M.; PELTOLA, T. Sol-gel-derived TiO_2 - SiO_2 implant coatings for direct tissue attachment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 1633-1642, 2007.
- BAB, I.; GAZIT, D.; CHOREV, M.; MUHIRAD, A. S.; HTEYER, A.; GREENBERG, Z.; NAMDAR, M.; KAHN, A. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. **EMBO Journal**, v. 11, p. 1867-1873, 1992.
- BAB, I.; CHOREV, M. Osteogenic growth peptide: from concept to drug design. **Biopolymers**, v. 66, p. 33-48, 2002.
- BAGSHAW, S. A.; PROUZET, E.; PINNAVAIA, T. J. Templates of mesoporous molecular-sieves by nonionic polyethylene oxide surfactants. **Science**, v. 269, p. 1242-1244, 1995.
- BANAKAR, U. V. **Pharmaceutical dissolution testing**. New York: Marcel Dekker, 1992.
- BASTOS, I. N.; PLATT, G. M.; ANDRADE, M. C.; SADER, M. S.; SOARES, G. A. Estudo da solução similar à corpórea para revestir biomateriais. In: ENCONTRO DE MODELAGEM COMPUTACIONAL, 7., 2004, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo: IPRJ/UFRJ, 2004. v. 1, p. 1-8.
- BECK, J. S.; VARTULI, J. C. Recent advances in the synthesis, characterization and applications of mesoporous molecular sieves. **Current Opinion in Solid State Materials Science**, v. 1, p. 76-87, 1996.
- BECK, J. S.; VARTULI, J. C.; ROTH, W. J.; LEONOWICZ, M. E.; KRESGE, C. T.; SCHMIT, K. D.; CHU, C. T. W.; OLSON, D. H.; SHEPPARD, E. W.; McCULLEN, S. B.; HIGGINS, J. B.; SCHLENKER, J. L. A new family of mesoporous molecular-sieves prepared with liquid-crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10834-10843, 1992.
- BHARALI, D. J.; KLEJBOR, I.; STACHOWIAK, E. K.; DUTTA, P.; ROY, I.; KAUR, N.; BERGEY, E. J.; PRASAD, P. N.; STACHOWIAK, M. K. Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for *in vivo* gene delivery and expression in the brain. **PNAS**, v. 102, n. 32, p. 11539-11544, 2005.

BODDE, E. W. H.; BOERMAN, O. C.; RUSSEL, F. G. M.; MIKOS, A. G.; SPAUWEN, P. H. M.; JANSEN, J. A. The kinetic and biological activity of different loaded rhBMP-2 calcium phosphate cement implants in rats. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 87, n. 3, p. 780-791, 2008.

BRAGER, M. A.; PATTERSON, M. J.; CONNOLLY, J. F.; NEVO, Z. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 18, n. 1, p. 133-139, 2000.

BROEKHOFF, J. C. P.; DE BOER, J. H. Studies on pore systems in catalysts XIII. Pore distributions from the desorption branch of a nitrogen sorption isotherm in the case of cylindrical pores B. Applications. **Journal of Catalysis**, v. 10, p. 377-390, 1968.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis**: a practical approach. New York: Oxford University Press, 2000.

CHEN, Z. X.; CHANG, M.; PENG, Y. L.; ZHAO, L.; ZHAN, Y. R.; WANG, L. J.; WANG, R. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. **Regulatory Peptides**, v. 142, n. 1-2, p. 16-23, 2007.

CHENITE, A.; LE PAGE, Y. Directing TEM imaging of tubules in calcined MSM-41 type mesoporous materials. **Chemistry of Materials**, v. 7, p. 1015-1019, 1995.

CIESLA, U.; SCHÜTH, F. Ordered mesoporous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 27, p. 131-149, 1999.

CRAIEVICH, A. F. Synchrotron SAXS studies of nanostructured materials. **Materials Research**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2002.

DANILCHENKO, S. N.; MOSEKE, C.; SUKHODUB, L. F.; SULKIO-CLEFF, B. X-ray diffraction studies of bone apatite under acid demineralization. **Crystal Research and Technology**, v. 39, n. 1, p. 71-77, 2004.

DÍAZ, A.; LÓPEZ, T.; MANJARREZ, J.; BASALDELLA, E.; MARTÍNEZ-BLANES, J. M.; ODRIÓZOLA, J. A. Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous ordered silica. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 173-179, 2006.

EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 16, n. 6, p. 981-989, 2005.

EPSTEIN, N. E. Pros, cons, and costs of INFUSE in spinal surgery. **Surgical Neurology International**, v. 2, p. 10, 2011.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxy-carbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 35, p. 161-214, 1999.

GABET, Y.; MÜLLER, R.; REGEV, E.; SELA, J.; SHTEYER, A.; SALISBURY, K.; CHOREV, M.; BAB, I. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 65-73, 2004.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**: em cores. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GAVISH, H.; BAB, I.; TARTAKOYSKY, A.; CHOREV, M.; MANSUR, N.; GREENBERG, Z.; NAMDAR-ATTAR, M.; MUHLRAD, A. Human alpha(2)-macroglobulin is an osteogenic growth peptide binding protein. **Biochemistry**, v. 36, n. 48, p. 14883-14888, 1997.

GERIS, L.; GERISCH, A.; SLOTEN, J. V.; WEINER, R.; OOSTERWYCK, H. V. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 251, n. 1, p. 137-158, 2008.

GRAY, V. Future direction for dissolution testing in the pharmaceutical industry. **Dissolution Technology**, v. 11, n. 3, p. 13-14, 2004.

GREENBERG, Z.; CHOREV, M.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; NAMDAR, M.; MANSUR, N.; BAB, I. Mitogenic action of osteogenic growth peptide (OGP) - role of amino and carboxy-terminal regions and charge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1178, n. 3, p. 273-280, 1993.

GREENBERG, Z.; CHOREV, M.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; NAMDAR-ATTAR, M.; CASAP, N.; TARTAKOVSKY, A.; VIDSON, M.; BAB, I. Structural and functional characterization of osteogenic growth peptide from human serum - identity with rat and mouse homologs. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 8, p. 2330-2335, 1995.

GUREVITCH, O.; SLAVIN, S.; MUHLRAD, A.; SHTEYER, A.; GAZIT, D.; CHOREV, M.; VIDSON, M.; NAMDAR-ATTAR, M.; BERGER, E.; BLEIBERG, I.; BAB, I. Osteogenic growth peptide increases blood and bone marrow cellularity and enhances engraftment of bone marrow transplants in mice. **Blood**, v. 88, p. 4719-4724, 1996.

HE, Q.; SHI, J.; ZHU, M.; CHEN, Y.; CHEN, F. The three-stage *in vitro* degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 131, p. 314-320, 2010.

HENCH, L. L. The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**, v. 19, p. 967-978, 2006.

HENCH, L. L.; PASCHALL, H. A. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 7, n. 3, p. 25-42, 1973.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore : Word Scientific, 1993.

HENCH, L. L.; SPLINTER, R. J.; ALLEN, W. C.; GREENLEE, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal Biomedical Material Research Symposium**, v. 2, p. 117-141, 1971.

HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J.; FRÖBA, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 3216-3251, 2006.

HOFMANN, G. O. Biodegradable implants in orthopaedic surgery – a review on the state-of-the-art. **Clinical Materials**, v. 10, p. 75-80, 1992.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HUO, Q.; MARGOLESE, D. I.; CIESLA, U.; FENG, P.; GIER, T. E.; SIEGER, P. L. R.; PETROFF, P. M.; SCHUETH, F.; STUCKY, G. D. Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 317-321, 1994.

INAGAKI, S.; FUKUSHIMA, Y.; KURODA, K. Synthesis of highly ordered mesoporous materials from a layered polysilicate. **Journal of Chemistry Society and Chemistry Community**, v. 8, p. 680-682, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 23317**: implants for surgery: *in vitro* evaluation for apatite-forming ability of implant materials. 2007.

IZQUIERDO-BARBA, I.; SOUSA, E.; DOADRIO, J. C.; DOADRIO, A. L.; PARIENTE, J. P.; MARTÍNEZ, A.; BABONNEAU, F.; VALLET-REGÍ, M. Influence of mesoporous structure type on the controlled delivery of drugs: release of iuprofen from MCM-48, SBA-15 and functionalized SBA-15. **Journal of Sol-Gel Science and Technological**, v. 50, p. 421-429, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAISER, E.; COLLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phases synthesis of peptides. **Anal Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KOFRON, D. M.; LAURENCIN, T. C. Bone tissue engineering by gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 4, p. 555–576, 2006.

KOKUBO, T. Nobel bioactive materials. **Anales de Química - International Edition**, v. 93, p. 49-55, 1997.

KOKUBO, T. **Bioceramics and their clinical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2008.

KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, p. 2161-2175, 2003.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. **Journal Biomedical Material Research**, v. 24, p. 721-724, 1990.

LEE, S. C.; SHEA, M.; BATTLE, M. A.; KOZITZA, K.; RON, E.; TUREK, T.; SCHAUB, R. G.; HAYES, W. C. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, n. 10, p. 1149-1156, 1994.

LEGEROS, R. Z. Apatites in biological systems. **Progress in Crystal Growth and Characterization Materials**, v. 4, n. 1-2, p. 1-45, 1981.

LI, P.; OHTSUKI, C.; KOKUBO, T.; NAKANISHI, K.; SOGA, N.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T. Apatite formation induced on sílica gel in a simulated body fluid. **Journal of American Ceramic Society**, v. 75, p. 2094-2097, 1992.

LOZANO, D.; MANZANO, M.; DOADRIO, J. C.; SALINAS, A. J.; VALLET-REGÍ, M.; GÓMEZ-BARRENA, E.; ESBRIT, P. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 797-803, 2010.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MANSANO, M.; AINA, V.; AREÁM, C. O.; BALAS, F.; CAUDA, V.; COLILLA, M.; DELGADO, M. R.; VALLET-REGÍ, M. Studies on MSM-41 mesoporous sílica for drug delivery: effect of particle morphology and amine functionalization. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p. 30-37, 2008.

MARKER, B.; OBERHAGEMANN, U.; VORTMANN, S.; GIES, H. Influence of the sorbate type on the XRD peak intensities of loaded MCM-41. **Microporous Mesoporous Materials**, v. 6, p. 375-383, 1996.

MASUDA, N.; KAWASHITA, M.; KOKUBO, T. Antibacterial activity of silver-doped sílica glass microspheres prepared by a sol-gel method. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 83B, p. 114-120, 2007.

MERRIFIELD, R. B. **Solid phase peptide synthesis**. 2th ed. New York: Pierce Chemical, 1984.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 265-269.

National Center for Biotechnology Information. **Osteogenic growth peptide – compound summary**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=25079049>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

PADILLA, S.; ROMÁN, J.; SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; VALLET-REGÍ, M. Hydroxyapatite/SiO₂–CaO–P₂O₅ glass materials: in vitro bioactivity and biocompatibility. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 331-342, 2006.

PINTO, J. G. S.; CIPRANDI, M. T. O.; AGUIAR, R. C.; LIMA, P. V. P.; HERNANDEZ, P. A. G.; SILVA, A. N. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 12, n. 3, p. 79-84, 2007.

PROUZET, E.; COT, F.; NABIAS, G.; LARBOT, A.; KOOYMAN, P.; PINNAVAIA, J. Assembly of mesoporous silica molecular sieves based on nonionic ethoxylated sorbitan esters as structure directors. **Chemistry of Materials**, v. 11, p. 1498-1503, 1999.

REHMAN, I.; BONFIELD, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**, v. 8, p. 1-6, 1997.

ROBINSON, D.; BAB, I.; NEVO, Z. Osteogenic growth peptide regulates proliferation and osteogenic maturation of human and rabbit bone marrow stromal cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 5, p. 690-696, 1995.

ROCHA, L. A. **Materiais meso-estruturados luminescentes**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

RUBIO, F.; RUBIO, J.; OTEO, J. L. A DSC study of the drying process of TEOS derived wet silica gels. **Thermochimica Acta**, v. 307, p. 51-56, 1997.

SALDAÑA, L.; SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; IZQUIERDO-BARBA, I.; BENSIAMAR, F.; MUNUERA, L.; VALLET-REGÍ, M.; VILABOA, N. Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1294-1305, 2009.

SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. Análise da textura de materiais cerâmicos a partir das isotermas de adsorção de gases. **Cerâmica**, v. 39, p. 11-16, 1993.

SASKA, S. **Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea**. 2011. 257 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SHUQIANG, M.; KUNZHENG, W.; XIAOQIANG, D.; WEI, W.; MINGYU, Z.; DAOCHENG, W. Osteogenic growth peptide incorporated into PLGA scaffolds accelerates healing of segmental long bone defects in rabbits. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 61, n. 12, p. 1558-1560, 2008.

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. **Pure Application of Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v. 25, p. 1-11, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7th ed. Philadelphia: Saunders College, 1996.

SLOWING, I. I.; TREWYN, B. G.; GIRI, S.; LIN, V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. **Advanced Functional Materials**, v. 17, p. 1225-1236, 2007.

SOLER-ILLIA, G. J. A. A.; SANCHEZ, C.; LEBEAU, B.; PATARIN, J. Chemical strategies to design textured materials: from microporous and mesoporous oxides to nanonetworks and hierarchical structures. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 11, p. 4093-4138, 2003.

SONG, S. W.; HIDAJAT, K.; KAWI, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. **Langmuir**, v. 21, p. 9568-9575, 2005.

SOO-HONG, L.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 339-359, 2007.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DIAS, I. L.; LANZA, M. R. V.; MOREIRA, A. B.; KUBOTA, L. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

SOUSA, A.; SOUZA, K. C.; SOUSA, E. M. B. Mesoporous silica/apatite nanocomposite: special synthesis route to control local drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 671-679, 2008.

SOUSA, A.; SOUZA, K. C.; REIS, S. C.; SOUSA, R. G.; WINDMOLLER, D.; MACHADO, J. C.; SOUSA, E. M. B. Positron annihilation study of pore size in ordered SBA-15. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 42-44, p. 4800-4805, 2008.

SPREAFICO, A.; FREDIANI, B.; CAPPERUCCI, C.; LEONINI, A.; GAMBERA, D.; FERRATA, P.; ROSINI, S.; DI STEFANO, A.; GALEAZZI, M.; MARCOLONGO, R. Osteogenic growth peptide effects on primary human osteoblast cultures: potential relevance for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 1007-1020, 2006.

STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials Today**, v. 5, p. 18-25, 2008.

SUN, Y. Q.; ASHHURST, D. E. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits. **Cell Biology International**, v. 22, n. 4, p. 313-319, 1998.

TAGUCHI, A.; SCHUTH, F. Ordered mesoporous materials in catalysis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 77, p. 1-45, 2005.

TAKADAMA, H.; KIM, H-M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Mechanism of biomineralization of apatite on a sodium silicate glass: TEM-EDX study *in vitro*. **Chemistry of Materials**, v. 13, p. 1108-1113, 2001.

TAKADAMA, H.; KIM, H-M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. X-ray photoelectron spectroscopy study on the process of apatite formation on a sodium silicate glass in simulated body fluid. **Journal of American Ceramic Society**, v. 85, p. 1933-1936, 2002.

TANEV, P. T.; CHIBWE, M.; PINNAVAIA, T. J. Titanium-containing mesoporous molecular-sieves for catalytic-oxidation of aromatic-compounds. **Nature**, v. 368, p. 321-323, 1994.

TEOLI, D.; PARISI, L.; REALDON, N.; GUGLIELMI, M.; ROSATO, A.; MORPURGO, M. Wet sol-gel derived silica for controlled release of proteins. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 295-303, 2006.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, p. S11-S25, 2007.

UNGER, K.; RUPPRECHT, H.; VALENTIN, B.; KIRCHER, W. The use of porous and surface modified silicas as drug delivery and stabilizing agents. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9, p. 69-91, 1983.

UNITED States Pharmacopeia. 29th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 698, p. 893-899, 1965.

VALLET-REGÍ, M.; VILLAREJO, A. L. D. **Liberación de fármacos en matrices biocerámicas**: avances y perspectivas. Madrid: Realigraf, 2006.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; COLILLA, M.; MANZANO, M. Bone-regenerative bioceramic implants with drug and protein controlled delivery capability. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 163-191, 2008.

VALLET-REGÍ, M.; RAMILA, A.; DELREAL, R. P.; PEREZ-PARIENTE, J. A new property of MCM-41: drug delivery system. **Chemistry of Materials**, v. 13, p. 308-311, 2001.

VALLET-REGÍ, M.; ROMERO, A. M.; RAGEL, C. V.; LEGEROS, R. Z. XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 44, n. 4, p. 416-421, 1999.

VALLET-REGÍ, M.; ARCOS, D.; CLAVEL-SAINZ, M.; RAGEL, C. V.; MESEGUER-OLMO, L. **Metodo para la obtención de implantes bioactivos útiles como sistemas de liberación controlada**. WO 02/102430 A1, 27 dic. 2002. 30 p.

VANELLA, L.; KIM, D. H.; ASPRINIO, D.; PETERSON, S. J.; BARBAGALLO, I.; VANELLA, A.; GOLDSTEIN, D.; IKEHARA, S.; ABRAHAM, N. G. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. **Bone**, v. 46, n. 1, p. 236-243, 2010.

VIITALA, R.; JOKINEN, M.; ROSENHOLMA, J. B. Mechanistic studies on release of large and small molecules from biodegradable SiO₂. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, p. 382-390, 2007.

VINU, A.; HOSSAIN, K. Z.; ARIGA, K. Recent advances in functionalization of mesoporous sílica. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, p. 347-371, 2005.

WALLINGTON, S. A.; PILON, C.; WRIGTH, J. D. Sol-gel composites for optical sensing of solvents. **Journal of Sol-gel Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 1127-1132, 1997.

WOO, B. H.; FINK, B. F.; PAGE, R.; SCHRIER, J. A.; JO, Y. W.; JIANG, G.; DELUCA, M.; VASCONEZ, H. C.; DELUCA, P. P. Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 747-1753, 2001.

WOZNEY, J. M.; SEEHERMAN, H. J. Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 392-398, 2004.

YAN, X.; HUANG, X.; YU, C.; DENG, H.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; QIAO, S.; LU, G.; ZHAO, D. The *in vitro* bioactivity of mesoporous bioactive glasses. **Biomaterials**, v. 27, p. 3396-3403, 2006.

YANAGISAWA, T.; SCHIMIZU, T.; KIRODA, K.; KATO, C. The preparation of alkyltrimethylammonium-Kanemite complexes and their conversion to microporous materials. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 63, p. 988-992, 1990.

ZEGZULA, H. D.; BUCK, D. C.; BREKKE, J.; WOZNEY, J. M.; HOLLINGER, J. O. Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 79, n. 12, p. 1778-1790, 1997.

ZHAO, D.; HUO, Q.; FENG, J.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. **Journal American Chemistry Society**, v. 120, p. 6024-6036, 1998.

ZHAO, L.; YAN, X.; ZHOU, X.; ZHOU, L.; WANG, H.; TANG, J.; YU, C. Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 210-215, 2008.