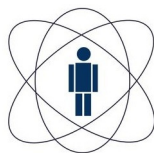


CBPF - CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS



TESE DE DOUTORADO

Caracterização da superfície de biocerâmicas e mecanismos de interação com proteínas

LUISA AZEVEDO SCUDELLER

Orientadores - Dr. Alexandre Malta Rossi
- Dr. Alexandre Mello de Paula Silva
- Dr. David G. Castner

Rio de Janeiro - RJ

Março de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais,
Luis e Ana e à minha irmã Alice.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Especialmente: À minha família sempre presente e dando força.

Aos meus pais, Luis Scudeller e Ana Scudeller e minha irmã Alice Scudeller pelo amor incondicional e gigante apoio.

Ao Nico, que apesar da distância e em cada contratempo, sempre teve amor, paciência na espera e me apoiou na finalização deste etapa.

Aos meus orientadores Alexandre Malta Rossi, Alexandre Mello de Paula Silva e David G. Castner pelos conhecimentos, discussões e orientação.

Aos colegas de laboratório: Elvis Lopez, Bene Regis, Rogelio Ospina, pesquisadores do CBPF que de alguma forma fizeram parte do meu doutorado e todos os outros que passam e utilizam o laboratório, não só pela constante ajuda, mas também por tornarem o dia-a-dia no laboratório mais prazeroso, pelas risadas e amizade.

Às meninas do laboratório de células por todo apoio na ajuda do manuseio dos aparatos experimentais, ensinamentos químicos e biológicos fundamentais para o desenvolvimento da tese e pelas boas risadas.

Ao Francisco de Assis, Silvia Alburquerque e Cleonice Martins pelas medidas e materiais. À Elena Mavropoulos e Andrea Costa pela ajuda fundamental para o fechamento do artigo e pela paciência com minhas crises.

A todos os amigos, impossíveis de nomear aqui pela quantidade, pelo apoio fora do CBPF, pela distração constante, pela amizade verdadeira e todo o carinho demonstrados.

Ao pessoal de NESAC/BIO - Seattle (técnicos, pesquisadores e alunos) que me

acolheu, ajudou e ensinou não só o trabalho, mas também um pouco da vida americana.

À CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dentre os materiais utilizados na substituição e regeneração do tecido ósseo e dentário, os fosfatos de cálcio, principalmente a hidroxiapatita (HA), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, são os mais utilizados devido à sua biocompatibilidade com células e tecidos e atividade osteocondutora. Uma das formas de potencializar a resposta biológica da hidroxiapatita é a sua associação com proteínas e peptídeos e com isso pode-se estimular a adesão, a migração, a proliferação celular, a vascularização e a reconstituição acelerada de tecidos funcionais tornando os implantes mais bioativos.

Este trabalho teve como proposta estudar as características físico-químicas da superfície de fosfatos de cálcio nano estruturados com diferentes substituições (substituição do Ca^{2+} por Sr^{2+} e Zn^{2+}), cristalinidade e constituição (OCP) e compreender os mecanismos de interação destes biomateriais com proteínas envolvidas nos processos de regeneração do tecido ósseo tais como a osteocalcina e a insulina. Para o estudo da caracterização dos materiais foram usadas técnicas de análise físico-químicas tais como Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X (XPS), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raios X em Incidência Rasante (GIXRD), Potencial Zeta (PZ), espalhamento dinâmico de luz para medidas de tamanho de partícula, método Brunauer-Emmett-Teller (BET) para determinação de área superficial e porosidade e análise termogravimétrica. A interação das proteínas com a superfície de cada material foi estudada utilizando algumas das técnicas já citadas anteriormente, além de Espectroscopia de Massas de Íons Secundários por Tempo de Voo (ToF-SIMS), Dicroísmo Circular (CD) e Imunomarcagem.

No estudo da osteocalcina foi observado que a proteína nativa (hOC) altera sua estrutura secundária ao interagir com íons de cálcio em solução, ao passar de um enovelamento aleatório para uma estrutura tipo α -hélice, o que não ocorre quando

a mesma está descarboxilada (hdOC). Na presença do cálcio da HA a osteocalcina descarboxilada adsorve menos (5 %) que a proteína na forma nativa (7 %), o que pode ser explicado pela ausência dos aminoácidos Gla, conhecidos por se ligarem ao Ca. Neste caso, ambas as proteínas mantêm sua forma estrutural ativa, o que não acontece quando a adsorção ocorre em uma superfície sem cálcio, como a do substrato de silício. Ao adsorver em Si, ambas proteínas tiveram seus aminoácidos cisteína expostos, o que mostra que a proteína perdeu sua conformação estrutural. As amostras de HA com cristalinidades diferentes se comportaram da mesma forma, indicando que a cristalinidade não afeta a adsorção. Mudanças na composição do fosfato de cálcio afetam o processo de adsorção das duas proteínas, com o OCP adsorvendo diferentes quantidades de hOC e hdOC, 4,2 % e 4,9 %, respectivamente, mas com ambas proteínas tendo a mesma orientação: $\alpha 1 > \alpha 2 > \alpha 3$. No caso da HAp90, ambas osteocalcinas adsorveram de forma igual (4,8 %), mas alteraram sua orientação ($\alpha 1 > \alpha 2 > \alpha 3$ para hdOC e $\alpha 2 > \alpha 1 \approx \alpha 3$ para hOC). A razão Ca/P da superfície da HA, que foi outra questão analisada, mostrou ter influência apenas para a adsorção com a osteocalcina na sua forma ativa, uma vez que a quantidade de hOC adsorvida na amostra HAp (Ca/P=1,64) foi de 7 % e na amostra HAp90 (Ca/P=1,30) foi de 4,8 %, valor igual à adsorção da hdOC em ambos substratos.

A interação da insulina com a superfície de nanopartículas de hidroxiapatita sem substituições iônicas (HAp90) e com substituições do cálcio (Ca^{2+}) por estrôncio (Sr^{2+} - SrHA) e zinco (Zn^{2+} - ZnHA) ocorre por um processo de adsorção física controlado por forças eletrostáticas de superfícies e seguiu uma isoterma de Freundlich. A presença do zinco aumentou a capacidade da superfície de adsorver a proteína (6,6 %), enquanto que o estrôncio inibiu a adsorção (4,3 %). Para a HAp90 a adsorção foi de 5 %. Medidas de XPS mostraram uma alteração de energia da ligação do radical COOH, que variou de até 1 eV para baixas energias de ligação, sugerindo a ligação dos íons Ca^{2+} da superfície com estes radicais da insulina. Apesar da insulina não

alterar a estrutura cristalina e o tamanho de cristalito das amostras e apresentar fraca interação, experimento de CD mostraram que esta interação modifica a estrutura secundária da proteína no caso da ZnHA e HAp90, mudando de α -hélice para Turn e β -sheet, respectivamente.

Experimentos de adsorção da insulina humana e bovina em filmes de HA indicaram que a insulina humana é adsorvida segundo isoterma de Langmuir-Freundlich enquanto a bovina segue isoterma de Freundlich. Uma possível explicação dada foi que a insulina bovina tem preferência pelo plano (002), uma vez que este foi encontrado como direção preferencial de crescimento para os filmes utilizados no experimento com insulina bovina, ou que a mesma se comporta de forma diferente da insulina humana, apesar de ambas terem praticamente o mesmo tamanho, peso molecular e estrutura secundária.

ABSTRACT

Among the materials used for the replacement and regeneration of bone and tooth tissue, calcium phosphates, especially hydroxylapatite (HA), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, are the most used due to its biocompatibility with cells and tissues activity osteoconductive. One way to enhance the biological activity of hydroxyapatite is its association with proteins and peptides and thus can stimulate adhesion, migration, cell proliferation, vascularization, and accelerated reconstitution of functional fabrics making implants more bioactive.

This work was proposed to study the physical and chemical characteristics of the surface of nano-structured calcium phosphates with different substitution (Ca^{2+} substitution by Sr^{2+} and Zn^{2+}), crystallinity and constitution (OCP) and understand the mechanisms of interaction of these biomaterials with proteins involved in the regeneration processes of bone tissue such as osteocalcin and insulin. To study the characterization of materials we used physicochemical analytical techniques such as X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Grazing Incidence X-Ray Diffraction (GIXRD), Zeta Potential (ZP), dynamic light scattering for particle size, Brunauer-Emmett-Teller (BET) method for determination of surface area and porosity and thermogravimetric analysis. The proteins-surface interaction of each material was studied using some of the techniques mentioned above and Time-of-Flight Secondary Ions Mass Spectroscopy (ToF-SIMS), Circular Dichroism (CD) and immunostaining.

In the osteocalcin study it was observed that the native protein (hOC) alters its secondary structure when interact with calcium ions in solutions, when changing from a random folding to an α -helix type structure, which does not occur when the protein is decarboxylated (hdOC). In the presence of calcium, HA, the decarboxylated osteocalcin protein adsorbs less (5 %) than its native form (7 %), which

can be explained by the lack of Gla-amino acids, known to bind Ca. Both proteins maintain its structural shape active when adsorbed in Hap, which does not happen when the adsorption occurs on a calcium-free surface, such as silicon substrate. When adsorbed on Si, both proteins had their cysteine amino acids exposed, which shows that the protein lost its structural conformation. The samples with different crystallinity behaved in the same way, indicating that the crystallinity does not affect adsorption. On the other hand, the composition affects the adsorption of two proteins, with OCP adsorbing different amounts of hOC and hdOC, 4.2 % and 4.9 %, respectively, but with both proteins having the same orientation: $\alpha_1 > \alpha_2 > \alpha_3$. In the case of HAp90, both osteocalcines adsorbed equally (4.8 %), but changed their orientation ($\alpha_1 > \alpha_2 > \alpha_3$ for hdOC and $\alpha_2 > \alpha_1 \approx \alpha_3$ for hOC). The Ca/P ratio of the surface that was another issue analyzed was shown to have influence only for the adsorption of the osteocalcin in its active form, since the amount of hOC adsorbed in the HAp sample (Ca/P=1.64) was 7 % and in the HAp90 sample (Ca/P=1.30) was 4.8 %, equal to the adsorption of hdOC on both substrates.

Increased insulin concentration in the powder HAp90, SrHA and ZnHA was a typical physical adsorption process controlled by surfaces electrostatic forces and followed a Freundlich isotherm. The presence of zinc increased the capacity to adsorb protein (6.6 %), whereas the strontium inhibits adsorption (4.3 %). The adsorption fo HAp90 was 5 %. XPS measurements showed that there is a change of energy related to COOH bond, decreased by at least 1 eV, which may indicate an interaction of this protein terminal with surface Ca^{2+} . Although insulin does not change the crystal structure and the crystallite size of the samples and provide weak interaction, CD experiment showed that this weak interaction is sufficient to alter the protein secondary structure in the case of ZnHA and HA, changing the α -helix to turn and β -sheet, respectively.

When studying insulin interaction with HA films, it was observed that human

insulin adsorbs less than bovine insulin. The both system also followed different isotherms with Langmuir-Freundlich for the first case and Freundlich to the second. One possible given explanation was that insulin prefers the (002) plane, since this has been found as preferred growth direction for the films used in the experiment with bovine insulin, or bovine insulin behaves differently of human insulin although both have almost the same size, molecular weight and secondary structure.

Conteúdo

1	Introdução	1
2	Objetivos	4
3	Revisão Bibliográfica	5
3.1	Fosfatos de Cálcio	5
3.1.1	Hidroxiapatita - HA	6
3.1.2	Substituições iônicas na Hidroxiapatita	8
3.1.3	Fosfato octacálcico - OCP	11
3.2	Proteínas	12
3.2.1	Osteocalcina	17
3.2.2	Insulina	19
3.2.3	Isotermas de adsorção	22
3.3	Interação de proteínas com superfícies	24
3.4	Técnicas Analíticas	31
3.4.1	Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X (XPS)	31
3.4.2	Espectroscopia de Massa de Íons Secundários por Tempo de Voo (ToF-SIMS)	35
3.4.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	43
3.4.4	Difração de Raios X (DRX)	45

3.4.5	Análise Química - Espectrofotometria	48
3.4.6	Tamanho de partícula	52
3.4.7	Brunauer-Emmett-Teller - BET	54
3.4.8	Potencial Zeta	57
3.4.9	Análise Térmica	59
3.4.10	Dicroísmo circular	61
3.4.11	Imunomarcção	64
4	Materiais e Métodos Experimentais	67
4.1	Síntese da Hidroxiapatita	67
4.2	Síntese da Hidroxiapatita dopada com zinco e estrôncio	68
4.3	Síntese do Fosfato Octacálcico	68
4.4	Produção de filmes de hidroxiapatita em substrato de titânio	68
4.5	Preparação da Osteocalcina e Insulina	69
4.6	Adsorção da Osteocalcina na Hidroxiapatita	70
4.7	Adsorção da Insulina na Hidroxiapatita	71
4.8	Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X (XPS)	71
4.9	Espectroscopia de Massas de Íons Secundários por Tempo de Voo (ToF-SIMS)	72
4.10	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	73
4.11	Difração de Raios X (DRX)	74
4.12	Análise Química	75
4.13	Tamanho de Partícula e Propriedades Texturais	76
4.13.1	Tamanho de partícula	76
4.13.2	BET	76
4.14	Potencial Zeta	76
4.15	Análise Térmica	77
4.16	Dicroísmo Circular	77

4.17	Imunomarcacão	78
5	Resultados	79
5.1	Caracterizacão Físico-Química dos Fosfatos de Cálcio	79
5.1.1	Composicão Química	79
5.1.2	Estrutura e fases cristalinas	84
5.1.3	Características Morfológicas e Texturais	94
5.1.4	Estequiometria da superfície	99
5.2	Adsorcão de osteocalcina em fosfatos de cálcio e silício	123
5.2.1	Interaçao da Osteocalcina com íons Ca	124
5.2.2	Adsorcão da osteocalcina em silício e HAp	127
5.2.3	Adsorcão em HAp90, HAp5 e OCP	134
5.2.4	Adsorcão em HAp90 e HAp	141
5.3	Adsorcão de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio	143
5.3.1	Composicão e Estequiometria da Superfície	144
5.3.2	Isotermas de Adsorcão	169
5.3.3	Carga da Superfície	173
5.3.4	Efeito da adsorcão na estrutura da Insulina	174
5.4	Adsorcão de insulina em filme de hidroxiapatita sobre titânio	177
5.4.1	Ligacão da Insulina com a Superfície e Isotermas de Adsorcão	177
5.4.2	Imunomarcacão	197
6	Conclusões e perspectivas	199
A	Anexos	227

Lista de Tabelas

3.1	Diferentes fases de alguns fosfatos de cálcio e suas respectivas razões Ca/P, adaptada de [23].	6
3.2	Picos dos íons positivos usados no PCA para as proteínas adsorvidas em pó.	42
3.3	Bandas de FTIR características das ligações peptídicas. Adaptado de [138].	44
3.4	Estabilidade da solução coloidal para cada faixa de potencial zeta. Adaptado de [150].	58
5.1	Resultados da análise química para os materiais estudados.	80
5.2	Porcentual de massa perdida por cada amostra para faixas de temperatura. RT significa temperatura ambiente.	82
5.3	Posição (θ), largura de linha a meia altura (β) do pico referente ao plano (002) e tamanho de cristalito (D_v) de cada amostra.	85
5.4	Parâmetros de rede dos pós e dos filmes estudados.	85
5.5	Tabela com as características físico-químicas do material <i>bulk</i>	95
5.6	Razões (Ca+M)/P, M/(Ca+M), Ca/P e O/P determinadas pela análise química por XRF (interior e superfície) e pelo XPS (superfície) das amostras sem tratamento com solução tampão Tris. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	101

5.7	Energia de ligação da deconvolução de cada pico presentes nas amostras de HAp90, ZnHA e SrHA. Dentro do erro experimental, todos os elementos apresentam a mesma deconvolução. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	106
5.8	Razões (Ca+M)/P, M/(Ca+M) e O/P determinadas pela análise de XPS (superfície) antes e após o tratamento com solução tampão Tris. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	108
5.9	Razões (Ca+M)/P, M/(Ca+M) e O/P determinadas pela análise química por XRF (interior e superfície) e pelo XPS (superfície). Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	109
5.10	Energia de ligação da deconvolução de cada pico presentes nas amostras de HAp90, ZnHA, SrHA, HAp5 e OCP. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	112
5.11	Porcentagens de cada pico fotoelétrico e a razão Ca/P para os filmes depositados sobre Ti. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	118
5.12	Energia de ligações de cada pico fotoelétrico das amostras em pó e dos filmes. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. . . .	118
5.13	Energia de ligação da deconvolução de cada pico presentes nos filmes de HAF1 e HAF2. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	121
5.14	Cobertura de superfície e afinidade de ligação da hOC e hdOC à 22 °C na presença e na ausência de 3 mM de Ca^{2+} em 20 mM Tris com 150 mM NaCl, pH 7,4. Medida feita por Selvi Srinivasan, pesquisadora da University of Washington em Seattle.	127
5.15	Energia de ligação de cada pico presente nas amostras de HAp e silício. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	129

5.16	Porcentagem de cada pico e a razão Ca/P nas amostras de HAp e silício. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	129
5.17	Energia de ligação de cada pico presente nas amostras de HAp5, HAp90 e OCP. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	136
5.18	Porcentagem de cada pico e a razão Ca/P nas amostras de HAp5, HAp90 e OCP. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. .	137
5.19	Parâmetros de rede e tamanho de cristalito para as amostras com e sem insulina.	144
5.20	Energia de ligação de cada pico presentes nas amostras de HAp90 com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. .	148
5.21	Porcentagem de cada pico presentes nas amostras de HAp90 com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. . .	149
5.22	Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, C e N em amostras de HAp90, após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	152
5.23	Concentração relativa dos elementos O, Ca, P, C e N na amostra SrHA determinada por XPS após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	157
5.24	Concentração relativa dos elementos O, Ca, P, C e N na amostra ZnHA determinada por XPS após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	158
5.25	Energia de ligação de cada pico presentes nas amostras de SrHA com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. .	159

5.26	Energia de ligação de cada pico presentes nas amostras de ZnHA com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. .	160
5.27	Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, Sr, C e N em amostras de SrHA, após adsorção em soluccões contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	163
5.28	Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, Zn C e N em amostras de ZnHA, após adsorção em soluccões contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	166
5.29	Parâmetros cinéticos das isotermas de adsorção da insulina na HAp90, SrHA e ZnHA determinados a partir das equações de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich.	172
5.30	Quantificação da estrutura secundária da proteína pura e após ser adsorvida na superfície dos pós.	175
5.31	Tabela com os parâmetros de rede e do tamanho de cristalito para as amostras com e sem insulina.	179
5.32	Energia de ligação de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. . .	181
5.33	Porcentagem de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	182
5.34	Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, C e N em amostras de HAF1, após adsorção em soluccões contendo diferentes concentrações de insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	185
5.35	Energia de ligação de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas. . .	188

5.36	Porcentagem de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina humana. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	189
5.37	Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, C e N em amostras de HAF2, após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina humana. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.	192
5.38	Ajustes encontrados para a adsorção de insulina humana e bovina em filme de HA em titânio para os três modelos de isoterma estudados. .	196

Lista de Figuras

3.1	Estrutura da HA mostrando o plano “c” e o plano “ab”, adaptado de [29].	8
3.2	Estrutura cristalina da HA dopada com zinco que entra no plano “c”, adaptado de [29].	9
3.3	Estrutura cristalina da SrHA, com o estrôncio no plano “ab” da HA, adaptado de [29].	11
3.4	Célula unitária da OCP com a camada hidratada intercalada por camadas de apatita, sendo P5 e P6, grupos fosfatos e P1, P2, P3 e P4 grupos ortofosfatos, adaptado de [53].	12
3.5	Exemplo de um polipeptídio. Em amarelo temos a ligação peptídica e em cinza, um aminoácido. As cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas em rosa. Uma extremidade, o N-terminal, termina com um grupo amino, e a outra, C-terminal, termina com um grupo carboxila. Imagem removida de [55].	13
3.6	Listagem dos diferentes aminoácidos encontrados nas proteínas, separados por suas características químicas. São apresentadas as abreviações de 3 letras e 1 letra. Imagem removida de [55].	14
3.7	Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína. Imagem retirada de [56].	15

3.8	Representação da estrutura secundária da proteína. Em a) α -hélice [57], b) folha β paralela e antiparalela [58] e c) volta β [59].	16
3.9	Sequência primária dos aminoácidos para a osteocalcina em várias espécies, [66].	17
3.10	Esquema da osteocalcina porcina (RSCB Protein Data Base Structure 1Q8H, http : //www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId = 1q8h) mostrando as três estruturas α -hélices (em roxo), a ponte dissulfídica (azul claro), os aminoácidos Gla (azul escuro), Asn (vermelho), His (verde) e Phe (amarelo).	18
3.11	Sequência primária dos aminoácidos na insulina humana e bovina, mostrando as duas cadeias e as pontes de dissulfeto.	20
3.12	Esquema da insulina humana na forma de dímero (RSCB Protein Data Base Structure 1GUJ, http : //www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId = 1guj) (a e c) e de hexâmero (RSCB Protein Data Base Structure 2WS6, http : //www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId = 2ws6) (b e d). Na parte de cima temos a forma esquemática das α -hélices e na parte de baixo os átomos ligados, sendo que a cor verde é o carbono, a cor azul é o nitrogênio, vermelho é o oxigênio e amarelo o enxofre.	21
3.13	Isoterma de adsorção de insulina nas amostras estudadas por Zhu <i>et al</i> [92].	30
3.14	Princípio básico de funcionamento da técnica de XPS baseada no efeito fotoelétrico, [120].	32
3.15	Exemplo de um espectro de XPS com picos fotoelétricos e picos Auger.	33
3.16	Esquema do funcionamento da técnica ToF-SIMS mostrando a formação de íons secundários que podem ser íons dissociados ou moléculas, dependendo da distância de incidência do feixe primário.	36

3.17	Esquema mostrando como funciona o <i>Principal Components Analysis</i> , adaptado de [134].	39
3.18	Ilustração esquemática da análise de PCA de uma matriz de dados com os score e loading representando as amostras e variáveis, respectivamente, do sistema no espaço recém-definido [123].	40
3.19	Modos vibracionais ativos na região do Infravermelho [136].	43
3.20	Esquema de configuração da técnica refletância total atenuada (ATR), modificada de [139].	45
3.21	Esquema ilustrando o princípio básico da difração de raios X em um plano cristalino, retirado de [140].	46
3.22	Esquema da incidência em uma difração convencional e incidência raste, mostrando como o ângulo de incidência influencia na interação do feixe com o filme.	48
3.23	Esquema do experimento de absorção atômica por chama em que a luz passa pela chama e um monocromador até chegar ao detector. Figura retirada de [141].	50
3.24	Esquema da espectrofotometria por UV-Vis com a) feixe duplo e b) feixe simples. Em ambos a luz passa por um monocromador e incide na amostra antes de chegar ao detector. Figuras retiradas de [142]. . .	51
3.25	Em a) esquema de difração da luz para vários tamanhos de partícula, modificada de [143] e em b) esquema da técnica de difração a laser para medida de tamanho de partícula, modificada de [144].	53
3.26	Esquema do processo de adsorção e dessorção do gás na superfície da amostra pelo processo de BET, adaptado de [147].	55

3.27	Esquema da adsorção de moléculas de gás na superfície de uma amostra mostrando (a) o modelo de adsorção monocamada assumido pela teoria de Langmuir e (b) o modelo de adsorção multicamada assumido pela teoria BET, [146].	56
3.28	Gráfico gerado pela equação de BET, [148].	57
3.29	Desenho esquemático das cargas ligadas à superfície da amostra e o potencial em cada camada, adaptado de [151].	59
3.30	Esquema da técnica de termogravimetria em que a amostra é aquecida enquanto sua massa é medida, modificada de [152].	60
3.31	Esquema da técnica de análise térmica diferencial em que a temperatura da amostra comparada com uma referência enquanto ambas são aquecidas, modificada de [152].	61
3.32	Espectro de CD para uma proteína contendo estrutura de α -hélice (verde), folha- β (azul) e aleatória (vermelho) [155].	63
3.33	Esquema da técnica de imunofluorescência direta e indireta, adaptado de [162].	66
5.1	Gráfico de TGA e DTA em função da temperatura para as amostras de a) HAp5, b) HAp90, c) OCP, d) ZnHA e e) SrHA.	83
5.2	Padrão de difração da ZnHA, SrHA, HAp5 e HAp90 mostrando as fases da hidroxiapatita.	84
5.3	Padrão de difração da HAp com os traços gerados pelos padrões conhecidos da HA (em preto), do hidróxido de cálcio (em vermelho) e do ácido fosfórico (em azul).	86
5.4	Padrão de difração da OCP mostrando somente planos da OCP. . . .	88

5.5	Padrão de difração dos filmes de HA depositados sobre titânio, aquecido a 400 °C e posteriormente tratadas com tampão Tris. Em cores preta e vermelha filmes utilizados nos experimentos de adsorção da insulina bovina (HAF1) e humana (HAF2), respectivamente.	89
5.6	FTIR das amostras como preparada, sem o tratamento com solução tampão. a) Espectro de FTIR das amostras HAp90, ZnHA e SrHA na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} mostrando picos característicos de uma hidroxiapatita. Deconvolução na região de 450-750 cm^{-1} das amostras b) HAp90, c) ZnHA e d) SrHA.	90
5.7	Espectro de FTIR das amostras HAp5, HAp90, OCP, SrHA e ZnHA: a) região de 4000 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} , b) região de 1350 cm^{-1} a 400 cm^{-1}	92
5.8	Deconvolução na região de 450-750 cm^{-1} das amostras a) HAp90, b) ZnHA e c) SrHA após o tratamento de 3 h com a solução tampão Tris.	93
5.9	Espectros de FTIR de filme de HA depositados sobre Ti na região de 4000 cm^{-1} a 750 cm^{-1} com as bandas características de fosfato e OH, mostrando que temos hidroxiapatita.	94
5.10	Área de poro acumulada em função do diâmetro médio das amostras ZnHA, SrHA e HAp90.	96
5.11	Distribuição do tamanho de partícula para as amostras de SrHA, HAp5, HAp90, ZnHA e OCP.	98
5.12	Espectro de XPS das amostras HAp90, SrHA e ZnHA com a identificação dos elementos presentes na superfície.	100
5.13	Espectro XPS de alta resolução da amostra HAp90 como produzida: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo.	103
5.14	Espectro XPS de alta resolução da amostra SrHA como produzida: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) estrôncio.	104

5.15	Espectro XPS de alta resolução da amostra ZnHA como produzida: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) zinco.	105
5.16	Espectro XPS das amostras OCP, HAp5, ZnHA, SrHA e HAp90 com a identificação dos elementos presentes na superfície.	107
5.17	Espectro XPS de alta resolução da amostra HAp90: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.	111
5.18	Espectro XPS de alta resolução da amostra HAp5: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.	113
5.19	Espectro XPS de alta resolução da amostra OCP: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.	114
5.20	Espectro XPS de alta resolução da amostra SrHA: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) estrôncio. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.	115
5.21	Espectro XPS de alta resolução da amostra ZnHA: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) zinco. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.	116
5.22	Espectro de XPS dos filmes HAF1 e HAF2 tratados termicamente a 400 °C e com tampão Tris por 3 h usados na adsorção com insulina bovina e humana, respectivamente.	117

5.23	Espectro XPS de alta resolução dos picos de a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo, do filme controle para a adsorção com insulina bovina (HAF1), mostrando a deconvolução e a ligação referente a cada deconvolução.	119
5.24	Espectro XPS de alta resolução dos picos de a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo, do filme controle para a adsorção com insulina humana (HAF2), mostrando a deconvolução e a ligação referente a cada deconvolução.	120
5.25	Espectro de Dicroísmo de (a) 20 μ M hdOC (b) 20 μ M hOC em 20 mM Tris com 150 mM NaCl em pH 7,4 antes e depois de tratamento com 5 mM Ca^{2+} a 25 °C.	125
5.26	(a) Titulação de CD para a hOC; (b) mudança na elipticidade molar em 222 nm relativo à hOC sem Ca^{2+} com variação da concentração de Ca^{2+} de 0 to 5 mM em 20 mM Tris com 150 mM NaCl em pH 7,4 a 25 °C.	125
5.27	(a) Porcentagem de proteína ligada à HAp e (b) isoterma de equilíbrio de adsorção. O experimento foi realizado com hOC (verde) e hdOC (vermelhor) ligado à HAp à 22 °C na presença (■) e na ausência (●) de 3 mM de Ca^{2+} em 20 mM Tris com 150 mM NaCl, pH 7,4. Medida feita por Selvi Srinivasan, pesquisadora da University of Washington em Seattle.	126
5.28	Espectros de XPS a) após a adsorção de ambas as proteínas em substrato de silício e b) antes e após a adsorção na HAp.	128
5.29	% atômica de N no espectro de XPS para a hOC e hdOC adsorvidas em silício e em HAp.	130
5.30	Gráficos score (a) e loading (b) para PC1 das proteínas hOC e hdOC adsorvidas em Si e em HAp.	131

5.31	Gráficos score (a) e loading (b) para PC1 das proteínas hOC e hdOC adsorvidas em HAp.	132
5.32	Razão entre os picos das regiões de α -hélices $\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 1/\alpha 3$ e $\alpha 2/\alpha 3$ para adsorção em a) HAp e em b) Si e em c) a razão do aminoácido Cys/(soma dos aminoácidos) normalizados.	133
5.33	% atômica de nitrogênio dividido pela área superficial das amostras para a hOC e a hdOC adsorvidas na HAp90 (cristalina), HAp5 (menos cristalina) e OCP.	135
5.34	Gráfico do <i>score</i> (a) e do <i>loading</i> (b) para PC1 da adsorção das hdOC e hOC adsorvidas na HAp90, HAp5 e OCP. PC1 capturou 68 % da variância total dos dados.	138
5.35	Gráfico de PC1 x PC2 (a), PC1 loading (b) e PC2 loading (c) da adsorção de hOC e hdOC em amostras cristalinas de hidroxiapatita (HAp90) e OCP. PC1 e PC2 capturam 93 % e 5 % da variância total dos dados, respectivamente.	139
5.36	Razão entre os picos das regiões de α -hélices $\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 1/\alpha 3$ e $\alpha 2/\alpha 3$ para adsorção em a) HAp5, em b) HAp90 e em c) OCP.	140
5.37	% atômica de N para hOC e hdOC adsorvidas em HAp90 e HAp. . .	142
5.38	Gráfico de PC1 x PC2 (a), PC1 loading (b) e PC2 loading (c) para a adsorção de hOC e hdOC em HAp e em HAp90.	143
5.39	Difratogramas de Raios X da SrHA, HAp90 e ZnHA antes e após a adsorção 1,0 mg/mL de insulina: a) região $10^\circ < \theta < 55^\circ$ e b) região $29^\circ < \theta < 37^\circ$	145
5.40	Espectro de FTIR das amostras a) HAp90, b) SrHA e c) ZnHA mostrando as bandas da hidroxiapatita e da proteína, com o zoom de cada espectro mostrando as bandas de amida I e II da proteína. . . .	146

5.41	Espectro de XPS da amostra de HAp90, antes e depois da adsorção da insulina em soluções com diferentes concentrações da proteína. . .	148
5.42	Espectros de XPS mostrando as energias de ligação para diferentes componentes dos elementos a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p e e) N 1s. Amostra HAp90 após a adsorção com 1,2 mg/mL de insulina. .	151
5.43	Espectro de XPS da amostra de SrHA antes e depois da adsorção da insulina para várias concentrações da proteína.	155
5.44	Espectro de XPS da amostra de ZnHA antes e depois da adsorção da insulina para várias concentrações da proteína.	156
5.45	Espectros de XPS mostrando as energias de ligação para diferentes componentes dos elementos a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p, e) Sr 3p e f) N 1s. Amostra SrHA após a adsorção com 1,2 mg/mL de insulina.	161
5.46	Espectros de XPS mostrando as energias de ligação para diferentes componentes dos elementos a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p, e) Zn 2p e f) N 1s. Amostra ZnHA após a adsorção com 1,2 mg/mL de insulina. B.E. é a energia de ligação.	162
5.47	Isoterma de adsorção da insulina determinada pela técnica de XPS a partir do % atômico de nitrogênio relativo aos demais elementos (Ca, P e C).	169
5.48	Curva da adsorção de proteína calculada pelo % atômico de nitrogênio medido pelo XPS ajustada pela isoterma de Freundlich.	170
5.49	Potencial Zeta para HAp90, SrHA e ZnHA, com e sem insulina. . . .	173
5.50	Curvas de dicroísmo circular da insulina pura (0,2 mg/mL) e adsorvida na superfície dos pós de HAp90, SrHA e ZnHA (1,0 mg/mL). . .	175
5.51	Espectro de FTIR das amostras de hidroxiapatita com e sem insulina a) bovina e b) humana.	178

5.52	Difração das amostras dos filmes (HAF1 e HAF2) de hidroxiapatita sem e com insulina.	179
5.53	Survey das amostras HAF1 pura e com insulina bovina adsorvida mostrando os picos de cada elemento.	180
5.54	Alta resolução dos picos do a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p e e) N 1s, para a filme de HA com 0,8 mg/mL de insulina bovina.	184
5.55	Survey das amostras HAF2 pura e com insulina humana adsorvida mostrando os picos de cada elemento.	188
5.56	Alta resolução dos picos do a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p e e) N 1s, para a filme de HA com 0,8 mg/mL de insulina humana.	191
5.57	Curva da adsorção de proteína calculada pelo % atômico de nitrogênio para amostra com insulina humana e bovina, ajustado com a curva de Langmuir-Freundlich e Freundlich, respectivamente.	195
5.58	Figura da técnica de imunomarcacão para os filmes de HA crescidos sobre titânio. Em a) HAF2 e c) HAF1, somente tratado com tampão e em b) e d) o filme com proteína humana e bovina, respectivamente, adsorvida na concentração de 0,8 mg/mL.	198

Lista de Abreviaturas

- B.E. - *Binding Energy* (Energia de Ligação)
- BET - Brunauer-Emmett-Teller
- CD - *Circular Dichroism* (Dicroísmo Circular)
- CPS - Contagem por Segundo
- DRX - Difração de Raios X
- DTA - *Differential Thermal Analysis* (Análise térmica diferencial)
- FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)
- HA - Hidroxiapatita
- HAF1 - Série 1 de filmes de hidroxiapatitas sobre titânio (experimento com insulina bovina)
- HAF2 - Série 2 de filmes de hidroxiapatitas sobre titânio (experimento com insulina humana)
- HAp - Hidroxiapatita produzida em Seattle
- HAp5 - Hidroxiapatita com baixo grau de cristalinidade

-
- HAp90 - Hidroxiapatita cristalina
 - hdOC - Osteocalcina humana descarboxilada
 - hOC - Osteocalcina humana
 - NP - Nanopartículas
 - OC - Osteocalcina
 - OCP - Fosfato octacálcico
 - PC - *Principal Component* (Componente Principal)
 - PCA - *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)
 - PZ - Potencial Zeta
 - RT - *Room Temperature* (Temperatura Ambiente)
 - SrHA - Estrôncio Apatita - Hidroxiapatita substituída por estrôncio
 - TGA - *Thermogravimetric Analysis* (Análise termogravimétrica)
 - ToF-SIMS - *Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry* (Espectroscopia de Massas de Íons Secundários por Tempo de Voo)
 - UV-Vis - Espectroscopia de Ultra Violeta Visível
 - XPS - *X-ray Photoelectron Spectroscopy* (Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X)
 - XRF - *X-ray Fluorescence* (Fluorescência por Raios X)
 - ZnHA - Zinco Apatita - Hidroxiapatita substituída por zinco

Capítulo 1

Introdução

Os biomateriais que possuem propriedades de biocompatibilidade com o tecido vivo são usados na medicina para reparar ou substituir tecidos humanos [1, 2]. Devido às fortes demandas por novas matrizes biocompatíveis e nano estruturadas para uso clínico, a pesquisa em biomateriais tem crescido e se diversificado. Nesta área, as aplicações têm se concentrado em duas direções: i) desenvolvimento de matrizes biocompatíveis para carreamento e liberação controlada de proteínas, genes, fármacos e drogas antitumorais e ii) biomateriais para a regeneração de tecidos que sofreram trauma ou doenças degenerativas [3–5].

Dentre os materiais utilizados na substituição e regeneração do tecido ósseo, os fosfatos de cálcio são os mais utilizados devido à sua biocompatibilidade com células e tecidos e atividade osteocondutora. Junta-se a isto a sua capacidade de associação com moléculas, íons e metais e a possibilidade de seu processamento em diferentes formatos e porosidades [3, 4, 6]. Um destes fosfatos que tem recebido grande atenção na pesquisa de materiais é a hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Na sua forma sintética, a hidroxiapatita, HA, é um material nano estruturado que pode ser sintetizado com diferentes estequiometrias e substituições catiônicas e aniônicas. Ela se coloca como uma alternativa ao seu equivalente de origem natural - a fase

mineral do osso - por não apresentar potencial de contaminação biológica e risco de doenças transmissíveis e autoimunes [7–13].

Uma das formas de potencializar a atividade biológica da hidroxiapatita é a sua associação a moléculas que atuam nos processos de regeneração do tecido ósseo. Com a associação da HA com proteínas e peptídeos pode-se estimular a adesão, a migração, a proliferação celular, a vascularização e a reconstituição acelerada de tecidos funcionais tornando os implantes mais bioativos. A interação de proteínas com a superfície do biomaterial é complexa, pois depende das características físico-químicas e topográficas da superfície, tais como estrutura e estequiometria, conteúdo de impurezas, carga de superfície, hidrofobicidade e hidrofiliicidade e porosidade. O estudo da interação de proteínas com a superfície é importante não só para produzir biomateriais mais eficientes no reparo tecidual, mas também para o entendimento dos processos de biomineralização estimulado por biomateriais [14, 15]. É conhecido na literatura que a adsorção de proteínas na superfície dos biomateriais é o primeiro evento que ocorre quando um implante entra em contato com o corpo humano, logo, essa camada proteica adsorvida na superfície constituirá a interface que iniciará os processos biológicos de interação com as células e tecidos, [16].

Tendo isto em vista, um dos grandes desafios da pesquisa atual em materiais para uso biomédico reside em associar os biomateriais a proteínas, peptídeos e fatores de crescimentos osteoindutores e as células osteoprogenitoras. Para isto, é necessário desenvolver estudos detalhados sobre as características físico-químicas da superfície do biomaterial assim como de técnicas de sua funcionalização. A associação de biomoléculas à superfície do biomaterial sendo executada de forma controlada pode estimular a osteogênese nas regiões de tecidos lesados propiciando a formação de estruturas semelhantes aos ossos, facilitando a mobilização, expandindo e integrando populações de células regenerativas internas e fomentando o reparo de lesões ou a renovação de tecidos degenerados.

Neste contexto, este trabalho tem como proposta conhecer as características físico-químicas da superfície de fosfatos de cálcio nano estruturados com diferentes substituições e entender os mecanismos de interação destes biomateriais com proteínas importantes tais como a osteocalcina e a insulina. Para este estudo foram usadas técnicas de análise de composição e estrutura, como difração de raios X em incidência rasante (GIXRD), espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de Massas de Íons Secundários por Tempo de Voo (ToF-SIMS). Além disso, técnicas de caracterização químicas como tamanho de partícula, espectrofotometria, Brunauer-Emmett-Teller (BET), potencial zeta (PZ), análise térmica e técnicas para estudo da proteína: dicroísmo circular (CD) e imunomarcação, também foram usadas.

O capítulo 2 se apresenta com os objetivos do trabalho. No capítulo 3 será apresentada uma revisão bibliográfica na qual se descreve a hidroxiapatita e o efeito das substituições em sua estrutura, a estrutura e função de cada proteína e uma explicação das técnicas experimentais utilizadas neste trabalho e citadas acima. Já no capítulo 4 serão mostrados os materiais e métodos e no capítulo 5 os resultados obtidos. Por fim, no capítulo 6 as conclusões do trabalho serão apresentadas.

Capítulo 2

Objetivos

Este trabalho tem como principal proposta compreender a interação de fosfatos de cálcio com proteínas e para isso o trabalho foi dividido nas seguintes partes:

- caracterização da superfície dos pós de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HAp, HAp90 e HAp5) não dopada e dopada com zinco (ZnHA) e estrôncio (SrHA), fosfato octacálcio (OCP) e filmes de HA sobre substrato de titânio, normalmente usado como substrato em aplicações médicas;
- avaliação de como a cristalinidade e a composição do fosfato de cálcio pode influenciar a adsorção da osteocalcina, proteína não colagenosa mais abundante nos ossos e que serve como um marcador biológico para a avaliação clínica de doença óssea, tanto na sua forma nativa como descarboxilada;
- estabelecimento da influência da substituição do cálcio na HA por metais quanto à interação com a insulina, proteína responsável pela regulação do metabolismo dos carboidratos e gorduras, ao capturar a glicose do sangue, transformando-a em energia;
- avaliação da diferença entre insulina humana e bovina quanto à interação com filme fino de HA produzido sobre titânio.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3.1 Fosfatos de Cálcio

Por definição, fosfato de cálcio é o nome dado aos constituintes minerais que contem íons de cálcio (Ca^{2+}), fosfatos (PO_4^{3+}), metafosfatos (PO_3^-) ou pirofosfatos ($P_2O_7^{4-}$) e, ocasionalmente, hidrogênio e íons hidroxila.

Como os ortofosfatos de cálcio são os principais constituintes dos ossos e dentes, biocerâmicas destes materiais (cerâmicas biocompatíveis, ou seja, que reduzem à rejeição do corpo a este material e que induzem a formação e proliferação de matéria viva sobre este material) vêm sendo usadas durante décadas em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas através de recobrimentos, reposição e reparação de tecido ósseo e por isso há um grande interesse em estudar suas propriedades físico-químicas [17–21].

Um dos parâmetros mais importantes para distinguir as diferentes fases possíveis dos fosfatos de cálcio é a razão Ca/P, em que geralmente, quanto menor a razão, mais ácido e solúvel é o material, [22]. Na Tabela 3.1 é possível encontrar as diferentes fases e a razão Ca/P de cada uma.

Tabela 3.1: Diferentes fases de alguns fosfatos de cálcio e suas respectivas razões Ca/P, adaptada de [23].

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$Ca_4O(PO_4)_2$	2,00
Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$	1,50
Fosfato Tricálcico ($\alpha, \alpha', \beta, \gamma$) (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,50
Fosfato Octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,00
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,00
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$CaHPO_4$	1,00
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$Ca_2P_2O_7$	1,00
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,00
Fosfato heptacálcico (HCP)	$Ca_7(P_5O_{16})_2$	0,70
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$Ca_4H_2P_6)_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,50
Metafosfato de cálcio (α, β, γ) (CMP)	$Ca(PO_3)_2$	0,50

Uma combinação de dois fatores é necessária para a produção de materiais com características adequadas às diferentes aplicações tecnológicas: modificação da morfologia e propriedades químicas do material biocerâmico; e a associação da cerâmica com metais ou moléculas que afetam as suas atividades biológicas. Para isso, é necessário ter o completo domínio da produção do material, bem como caracterizar detalhadamente a estrutura e a química de sua superfície.

3.1.1 Hidroxiapatita - HA

Dentre os fosfatos de cálcio, a biocerâmica mais usada em aplicações biomédicas é a hidroxiapatita (HA) por sua biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna

um potencial substituinte do osso humano/animal em implantes e próteses [24]. Além disso, a HA pode ser usada como condutora de drogas para tratamento de doenças, como tumores ósseos, diabetes etc e na remoção de metais pesados em águas e solos, já que a mesma possui uma alta capacidade de adsorver e/ou absorver metais, moléculas, etc [25].

A HA tem uma estrutura hexagonal, com parâmetros de rede de $a = b = 0,9423$ nm e $c = 0,6875$ nm [26,27]. Sua célula unitária contém 10 íons cálcio, sendo quatro no sítio I (CaI) e seis no sítio II (CaII). O sítio I forma uma coluna na direção do eixo “c”, tendo os cátions de cálcio coordenados com 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes PO_4 e também a outros 3 átomos de oxigênio relativamente distantes. Já o sítio II é formado por triângulos equiláteros de cálcio, perpendiculares à direção “c”.

As colunas constituídas por triângulos de íons óxidos e de íons cálcio estão ligadas entre si por íons fosfatos, sendo dois oxigênios desse fosfato situados na direção perpendicular à direção “c” e os outros dois na direção paralela à “c”, Figura 3.1a. Os átomos OH estão localizados a $0,9 \text{ \AA}$ abaixo do plano formado pelo triângulo de cálcio, [28].

No plano ab, perpendicular à direção “c”, os átomos CaI formam um hexágono, posicionado nos planos $z = 0$ e $z = 1$, com o plano equatorial sendo em $z = 1/2$, definindo a geometria da célula unitária. Já os átomos CaII, formam pares de triângulos posicionados em $z = 1/4$ e $z = 3/4$ com um ângulo de 60° entre eles. Seis tetraedros de PO_4 ocupam o interior da célula unitária e são distribuídos de forma que três deles fiquem no plano $z = 1/4$ e os outros três no plano $z = 3/4$, formando também um ângulo de 60° entre eles, Figura 3.1b, [29].

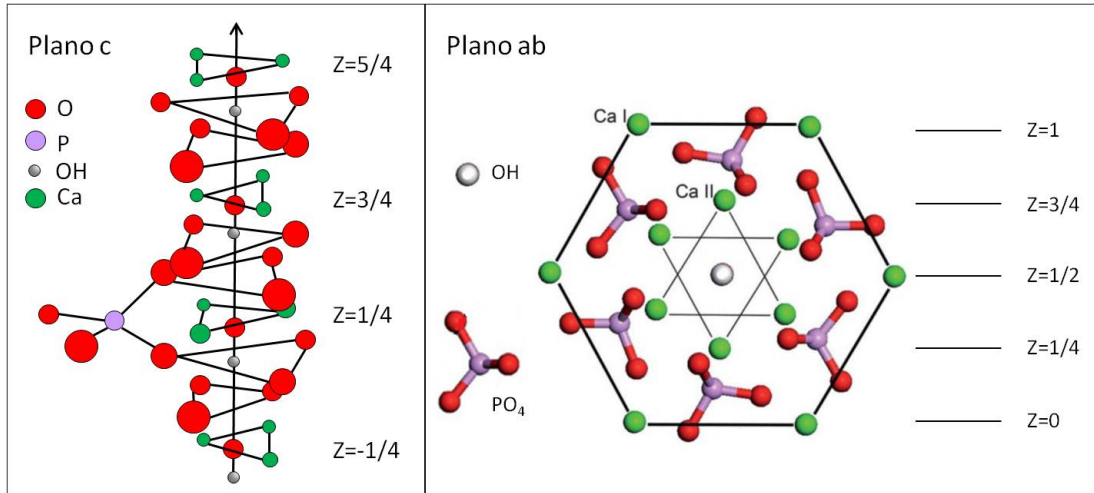


Figura 3.1: Estrutura da HA mostrando o plano “c” e o plano “ab”, adaptado de [29].

3.1.2 Substituições iônicas na Hidroxiapatita

A geometria da HA permite que substituições catiônicas e aniônicas ocorram com facilidade, sendo capaz de incorporar em sua estrutura metade dos elementos da tabela periódica. Íons Ca^{2+} podem ser substituídos pelos cátions K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} etc enquanto os grupos fosfatos são substituídos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições irão alterar os parâmetros da HA pura, como cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura da superfície, a estabilidade e solubilidade, o que altera a degradação e o seu comportamento in vivo, [30].

Íons como Zn^{2+} e Sr^{2+} são usados para substituir os sítios catiônicos na estrutura da HA com a finalidade de melhorar a osteointegração, a bioatividade, a estabilidade química, a apoptose de osteoclastos e a estimulação de osteoblastos da HA no meio fisiológico.

A substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+}

Zinco é o traço metálico mais abundante e essencial presente nos ossos e plasma, mas é sabido que a quantidade do mesmo diminui ao longo do tempo [31]. Além disso, estudos mostram que o zinco estimula a formação óssea, inibi a formação de células tipo osteoclastos e diminui a reabsorção óssea *in vitro* [32,33]. Quando substituído na hidroxiapatita, o zinco entra nos sítios do cálcio e pode gerar efeitos vantajosos, como mudar o grau de ordem estrutural, a solubilidade, a carga superficial, a taxa de dissolução e melhorar a adsorção de proteínas [34].

A introdução do Zn^{2+} na estrutura da HA produz uma contração da rede cristalina que pode ser explicada pelo fato do raio do íon Zn^{2+} (0,074 nm) ser menor que o do íon Ca^{2+} (0,099 nm) e pelo fato desses íons substituírem preferencialmente o íon CaII, Figura 3.2, [35–37].

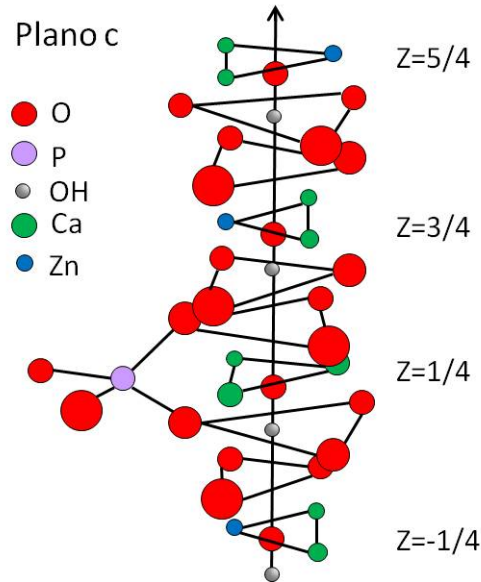


Figura 3.2: Estrutura cristalina da HA dopada com zinco que entra no plano “c”, adaptado de [29].

Essa contração varia de acordo com o percentual de zinco na estrutura da HA.

Para concentrações menores que 10 % molar, tanto “a” quanto “c” diminuem, porém para substituições maiores que 10 % molar, o parâmetro “a” começa a crescer enquanto “c” diminui, [38].

A substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+}

O estrôncio também está presente no sangue humano e apresenta efeitos benéficos, tanto em situações normais quanto em situações osteoporóticas, ao aumentar a resistência e a densidade do osso, aumentar o número de osteoblastos in vitro, diminuir o número e a atividade dos osteoclastos, o que é particularmente importante para o tratamento da osteoporosis [39, 40]. Quando substituído na hidroxiapatita, este novo composto apresenta boa solubilidade, atividade anti-reabsorção, apoptose de osteoclastos, estimulação de osteoblastos e também tem aplicações práticas como sensor de gás, laser e catalisadores [41–43].

Ao contrário do caso do Zn, o raio do íon Sr^{2+} (0,118 nm) é maior do que o raio do íon Ca^{2+} (0,099 nm), o que faz com que os parâmetros de rede da HA aumentem com a substituição do Ca pelo Sr, [44–47].

Refinamentos Rietveld mostram que para substituições menores que 3,5 % atômica, os íons Sr^{2+} substituem os íons CaI e para concentrações maiores há uma preferência pela substituição do íons CaII, mas ocorrendo ambas. A preferência pelo sítio II está associada à geometria do mesmo, uma vez que o mesmo é formado por triângulos de oxigênio empilhados, Figura 3.3, [48, 49].

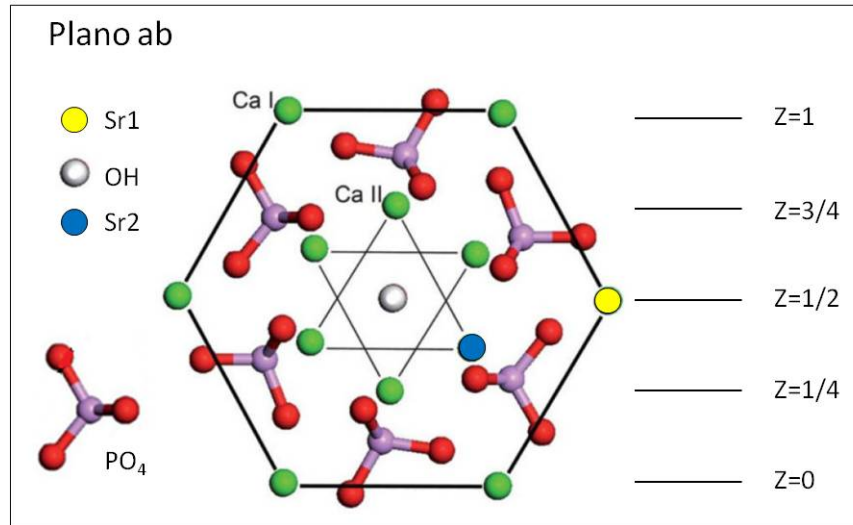


Figura 3.3: Estrutura cristalina da SrHA, com o estrôncio no plano “ab” da HA, adaptado de [29].

3.1.3 Fosfato octacálcico - OCP

O fosfato octacálcico, $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$, (OCP) é juntamente com a HA, o fosfato de cálcio mais importante por ter uma alta compatibilidade com os tecidos ósseos e ser precursor na formação de ossos e dentes, [50]. Acredita-se que o OCP é mais bioativo que a HA, uma vez que o mesmo é um precursor desta e a cerâmica feita de OCP tem propriedade mecânica melhorada, com aumento da densidade e da resistência à compressão, logo é esperado que o mesmo possa ser usado como osso artificial, [51]. Estudos mostram que a implantação de OCP em um defeito ósseo, promove nova formação óssea por osteoblastos e a biodegradação de OCP através da reabsorção direta de células semelhantes a osteoclastos, [52].

Os parâmetros de rede do fosfato octacálcico são: $a = 19,71 \text{ \AA}$, $b = 9,53 \text{ \AA}$ e $c = 6,83 \text{ \AA}$ e $\alpha = 90,14^\circ$, $\beta = 92,52^\circ$ e $\gamma = 108,67^\circ$, tendo uma estrutura triclinica. O OCP tem praticamente a mesma estrutura da hidroxiapatita, alternando entre uma camada de composição $4[Ca_3(PO_4)_2 \cdot 0,5H_2O]$ e camadas hidratadas de composição

$4[CaHPO_4 \cdot 2H_2O]$, Figura 3.4, [53,54].

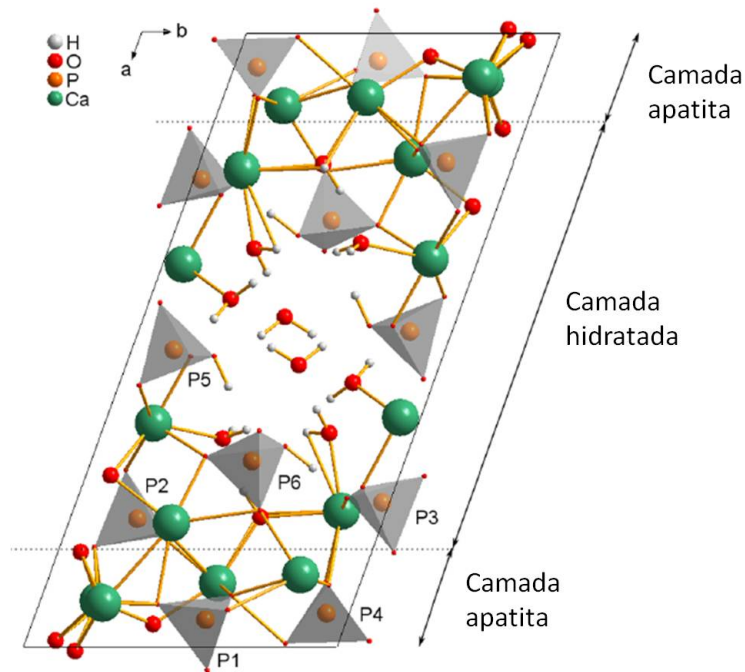


Figura 3.4: Célula unitária da OCP com a camada hidratada intercalada por camadas de apatita, sendo P5 e P6, grupos fosfatos e P1, P2, P3 e P4 grupos ortofosfatos, adaptado de [53].

3.2 Proteínas

Uma proteína é formada por uma cadeia de aminoácidos, conectados por ligações covalentes peptídicas. Em cada tipo de proteína, os aminoácidos estão presentes em uma ordem única.

Os aminoácidos são compostos orgânicos formados por um grupo ácido carboxílico ($C=OOH$) e um grupo amino ($C-NH$), ambos ligados a um mesmo átomo de carbono, denominado carbono α . A diferença entre os aminoácidos deriva das cadeias laterais ligadas ao carbono α . Apesar das cadeias laterais não formarem ligação

peptídica, elas conferem a cada aminoácido suas propriedades únicas. Algumas são apolares e hidrofóbicas, outras são carregadas positiva ou negativamente; outras são quimicamente reativas, etc. A ligação covalente entre dois aminoácidos adjacentes na proteína é chamada de ligação peptídica e sempre ocorre entre um grupo carboxila e um grupo amina, de forma que, os polipetídeos (cadeia de aminoácidos) sempre possuem um grupo amino (NH_2) em uma de suas extremidades (N-terminal) e um grupo carboxila ($COOH$) na outra extremidade (C-terminal), o que dá às proteínas e aos polipeptídeos uma direção definida, Figura 3.5. Normalmente, são encontrados 20 tipos de aminoácidos nas proteínas, Figura 3.6, sendo que eles podem ocorrer repetidas vezes em todas as proteínas.

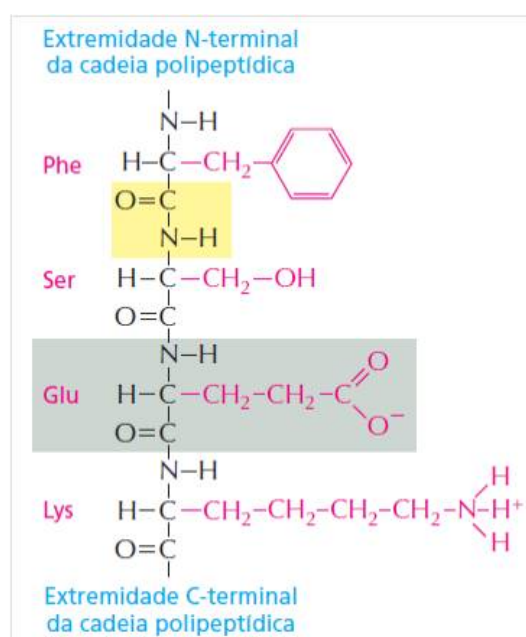


Figura 3.5: Exemplo de um polipeptídeo. Em amarelo temos a ligação peptídica e em cinza, um aminoácido. As cadeias laterais dos aminoácidos são mostradas em rosa. Uma extremidade, o N-terminal, termina com um grupo amino, e a outra, C-terminal, termina com um grupo carboxila. Imagem removida de [55].

AMINOÁCIDO				CADEIA LATERAL			
Aspartato	Asp	D	negativa	Alanina	Ala	A	apolar
Glutamato	Glu	E	negativa	Glicina	Gly	G	apolar
Arginina	Arg	R	positiva	Valina	Val	V	apolar
Lisina	Lys	K	positiva	Leucina	Leu	L	apolar
Histidina	His	H	positiva	Isoleucina	Ile	I	apolar
Asparagina	Asn	N	polar não carregada	Prolina	Pro	P	apolar
Glutamina	Gln	Q	polar não carregada	Fenilalanina	Phe	F	apolar
Serina	Ser	S	polar não carregada	Metionina	Met	M	apolar
Treonina	Thr	T	polar não carregada	Triptofano	Trp	W	apolar
Tirosina	Tyr	Y	polar não carregada	Cisteína	Cys	C	apolar

AMINOÁCIDOS POLARES				AMINOÁCIDOS APOLARES			
(hidrofílicos)				(hidrofóbicos)			

Figura 3.6: Listagem dos diferentes aminoácidos encontrados nas proteínas, separados por suas características químicas. São apresentadas as abreviações de 3 letras e 1 letra. Imagem removida de [55].

A estrutura proteica ou proteína é sintetizada no interior das células de acordo com seu código genético para desempenhar uma determinada função biológica. A sua formação ocorre através do acoplamento de aminoácidos via ligação peptídica que irá originar uma sequência de aminoácidos específica, denominada *estrutura primária*. Esta sequência é sempre lida a partir da extremidade N-terminal. O próximo nível de organização, *estrutura secundária*, que inclui as conformações α -hélices e as folhas β que se formam devido ao enovelamento ou pareamento de alguns segmentos da cadeia polipeptídica. A conformação completa, tridimensional, formada por toda a cadeia polipeptídica é chamada de *estrutura terciária*. Por fim, se uma molécula proteica é formada por um complexo de mais de uma cadeia polipeptídica, então temos a *estrutura quaternária*, Figura 3.7.

A estrutura final, ou conformação, adotada pela proteína é determinada por fatores energéticos, ou seja, uma proteína geralmente se enovela de forma a minimizar sua energia livre. Se as ligações não covalentes que montem a conformação da proteína forem rompidas, então temos uma proteína desenovelada, ou desnaturada.

Cada proteína normalmente se enovela em uma única conformação estável que por sua vez pode variar ao interagir com outras moléculas. Essa maleabilidade na forma é essencial para que a proteína exerça sua função.

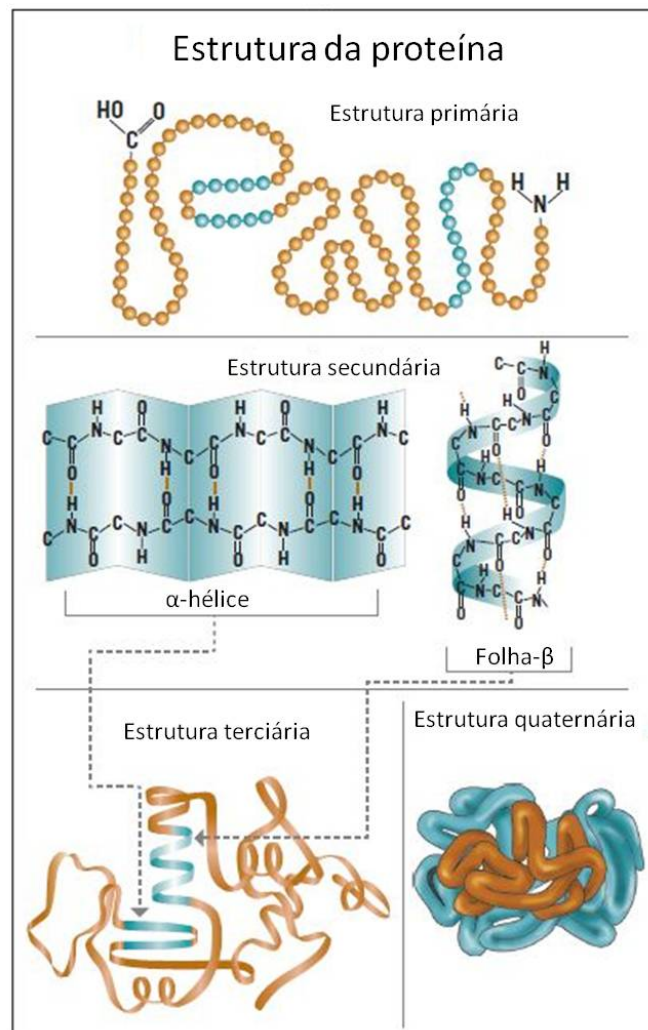


Figura 3.7: Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína. Imagem retirada de [56].

As estruturas secundárias (α -hélices, folhas β e volta β) da proteína resultam da formação de pontes de hidrogênio entre grupamentos $\text{N}-\text{H}$ e $\text{C}=\text{O}$ na cadeia principal de polipeptídeos. Uma α -hélice é formada quando uma única cadeia polipeptídica

gira em torno do seu eixo para formar um cilindro estruturalmente rígido. Uma ponte de hidrogênio se forma a cada quatro aminoácidos, o que origina uma hélice regular com uma volta completa a cada 3,6 aminoácidos, Figura 3.8a. Folhas β são compostas por pontes de hidrogênio entre cadeias polipeptídicas dispostas lado a lado. Quando as cadeias polipeptídicas estão dispostas no mesmo sentido, ela é considerada uma folha β paralela, Figura 3.8b e quando estão em sentidos contrários, a estrutura é uma folha β antiparalela, Figura 3.8d. Por fim, na volta β , a ponte de hidrogênio ocorre entre os aminoácidos 1 e 4 da cadeia peptídica, Figura 3.8c. Esta estrutura permite que a cadeia peptídica mude de direção.

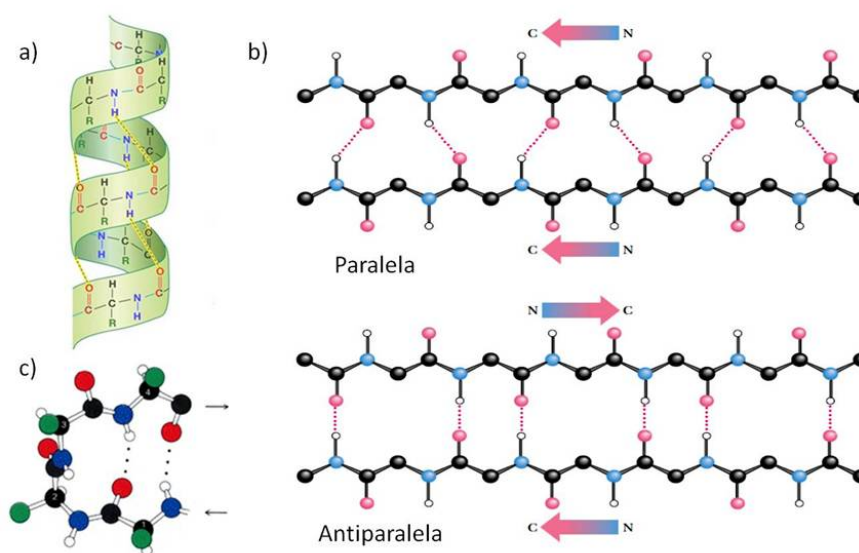


Figura 3.8: Representação da estrutura secundária da proteína. Em a) α -hélice [57], b) folha β paralela e antiparalela [58] e c) volta β [59].

Para ajudar a manter suas estruturas, as cadeias polipeptídicas das proteínas são geralmente estabilizadas por ligações covalentes cruzadas. A ligação covalente cruzada mais comum são as pontes dissulfeto que reforçam a estrutura da proteína na sua conformação mais favorável, apesar de não alterarem a conformação da mesma [55].

Figura 3.9: Sequência primária dos aminoácidos para a osteocalcina em várias espécies, [66].

Mesmo com a grande maioria da estrutura primária da osteocalcina se preservando entre as espécies, o terminal N varia consideravelmente e este terminal é responsável pelas diferenças na afinidade com o cálcio e na indução da helicidade entre as espécies, [60,65]. Na Figura 3.10 temos um esquema da osteocalcina porcina (1Q8H) gerada pelo programa VMD, aproximadamente 85 % idêntica à osteocalcina humana, uma vez que a estrutura da osteocalcina humana não é conhecida.

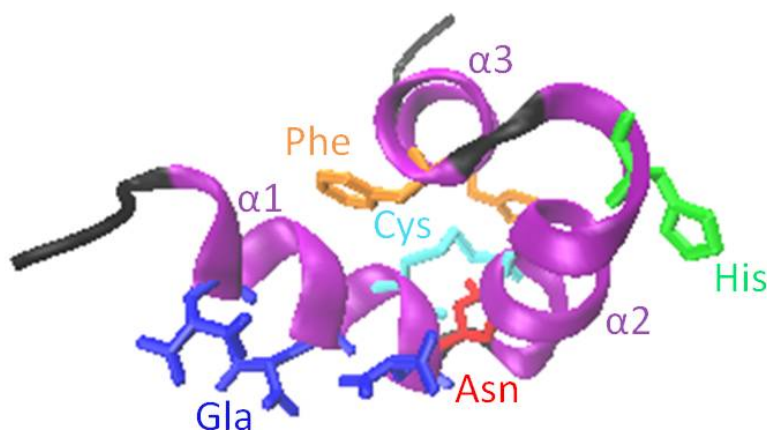


Figura 3.10: Esquema da osteocalcina porcina (RSCB Protein Data Base Structure 1Q8H, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1q8h>) mostrando as três estruturas α -hélices (em roxo), a ponte disulfídica (azul claro), os aminoácidos Gla (azul escuro), Asn (vermelho), His (verde) e Phe (amarelo).

Como é necessário a presença da vitamina-K para a formação do ácido γ -carboxiglutâmico, no nosso corpo existe tanto a osteocalcina com os três Gla, quanto a osteocalcina sem nenhum Gla, chamada aqui de osteocalcina descarboxilada (dOC) em diferentes proporções [64]. Recentemente, trabalhos mostram que a osteocalcina e a osteocalcina descarboxilada estão envolvidas em diferentes processos de regulação endócrina, proliferação de células, testosterona, secreção de insulina, entre outros, [69–76]. Quando usada como recobrimento de materiais compostos de apatita e colágeno, a osteocalcina promove a diferenciação osteoblástica e remodela a atividade óssea, [77].

Devido à estas importantes aplicações há uma motivação no estudo mais aprofundado de OC adsorvida em nano cristais de HA.

3.2.2 Insulina

A insulina é um hormônio peptídeo produzido nos pâncreas e é responsável pela regulação do metabolismo dos carboidratos e gorduras ao fazer com que as células do fígado, dos músculos e tecidos de gordura capturem a glicose do sangue, transformando-a em energia ou armazenando-a na forma de glicogênio no fígado e músculos [78,79]. Além disso, estudos recentes mostram que a insulina, em condições normais, pode estimular a diferenciação osteoblástica produzindo mais osteocalcina, o que pode então estimular mais produção de insulina pelo pâncreas, [80].

A insulina é produzida no pâncreas sob a forma de uma longa cadeia polipeptídica de 110 aminoácidos incluindo um peptídeo sinal, as cadeias A e B da insulina e um peptídeo conector, ou C-peptídeo. Ao entrar no retículo endoplasmático o peptídeo sinal é cortado e as pontes de dissulfeto entre as cadeias A e B são formadas. Nesta etapa o C-peptídeo é de suma importância para orientar as duas cadeias para a formação das pontes de dissulfeto. A pró-insulina, como é chamada nessa etapa, é transportada para o aparelho de Golgi onde tem o C-peptídeo cortado e sua conformação final é formada. Ela então é estocada em forma de grânulos, que posteriormente serão secretados para o meio extracelular [81].

Sua cadeia primária, portanto, consiste de duas cadeias de aminoácidos, sendo a cadeia A (ácida) com 21 aminoácidos e a cadeia B (básica) com 30. Três pontes de dissulfeto estão presentes na estrutura da insulina, sendo duas ligando as cadeias A e B (posições 7A com 7B e 20A com 19B) e a terceira é uma ponte interna na cadeia A (posições 6 e 11). A integridade das três pontes de dissulfeto da insulina é crítica para sua atividade biológica e sua ruptura ou rearranjo invariavelmente conduz a uma bioatividade extremamente baixa. A insulina bovina difere da humana em 2

aminoácidos da cadeia A e no último aminoácido da cadeia B, Figura 3.11.

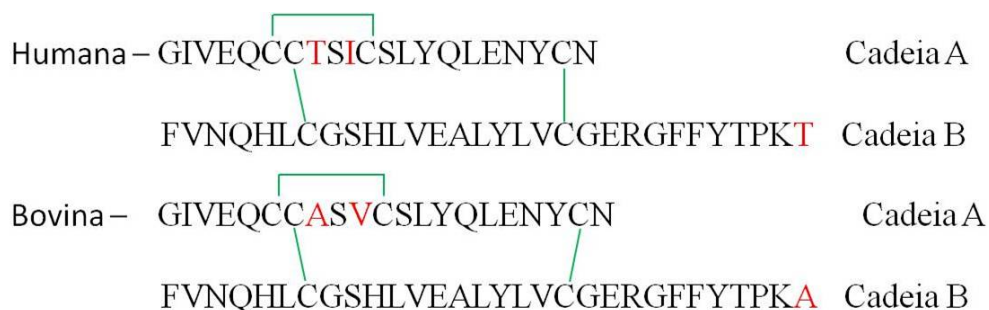


Figura 3.11: Sequência primária dos aminoácidos na insulina humana e bovina, mostrando as duas cadeias e as pontes de dissulfeto.

Devido à similaridade entre ambas as insulinas, as massas moleculares também são parecidas, sendo 5807,57 Da para a humana e 5733,49 Da para a bovina. Como os resíduos invariáveis entre as diferentes origens da insulina são responsáveis pela estrutura molecular da mesma, o enrolamento e empacotamento das cadeias A e B são essencialmente, numa conformação tridimensional, iguais. Portanto, a estrutura secundária de ambas as insulinas é formada, na cadeia A, somente por duas estruturas α -hélices antiparalelas (A1-A8 e A12-A18) e, na cadeia B, por uma estrutura α -hélice (B9-B19). Na sua conformação final, a insulina apresenta aminoácidos hidrofílicos à superfície e hidrofóbicos no interior, sendo que a cadeia A é a mais exposta ao exterior.

A insulina pode existir na forma de monômero, dímero ou hexâmero. Em soluções ácidas e neutras, em concentrações usadas para uso farmacêutico, os monômeros (~2,6 nm) se juntam para formar um dímero, e em soluções neutras com presença de íon zinco, esses dímeros aglomeram-se formando hexâmero (~5,6 nm), Figura 3.12. Esta figura foi gerada usando o programa VMD, versão 1.9.1, [82]. A insulina é armazenada no corpo na forma de hexâmero e por não ser susceptível à fibrilação, é usada nesta estrutura para o uso farmacêutico, no entanto a forma ativa da mesma

é o monômero, uma vez que é nesta forma que a proteína se liga aos receptores de insulina, [83–86].

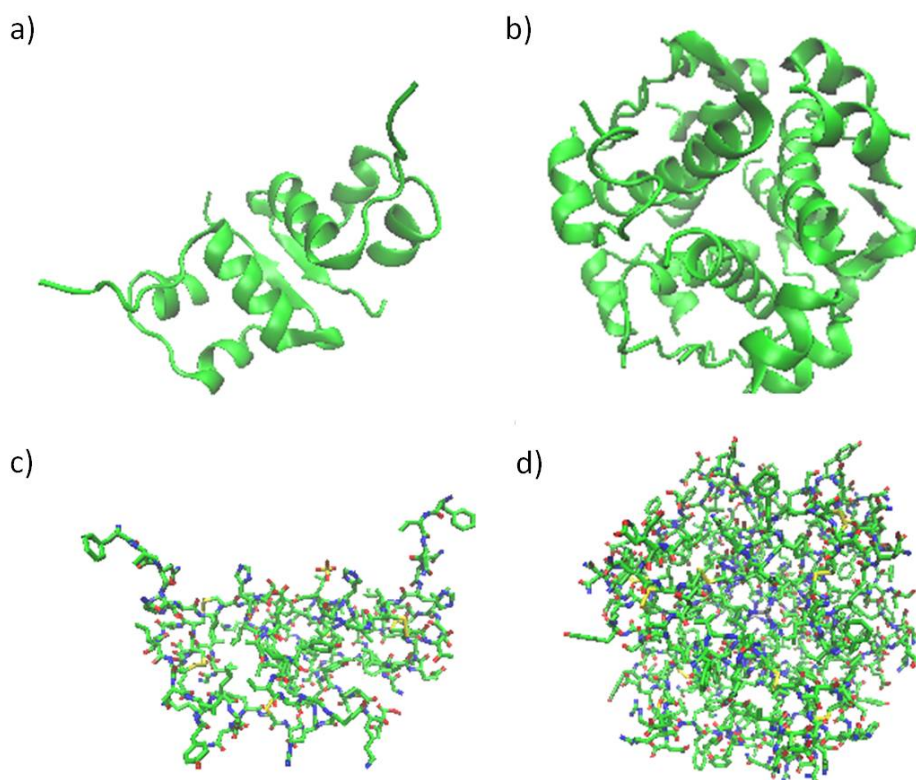


Figura 3.12: Esquema da insulina humana na forma de dímero (RSCB Protein Data Base Structure 1GUJ, [http : //www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId = 1guj](http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1guj)) (a e c) e de hexâmero (RSCB Protein Data Base Structure 2WS6, [http : //www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId = 2ws6](http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2ws6)) (b e d). Na parte de cima temos a forma esquemática das α -hélices e na parte de baixo os átomos ligados, sendo que a cor verde é o carbono, a cor azul é o nitrogênio, vermelho é o oxigênio e amarelo o enxofre.

3.2.3 Isotermas de adsorção

Em um processo de adsorção, o material a ser adsorvido (adsorbato, no caso deste trabalho, proteína) é atraído para a superfície do material (adsorvente, neste caso, fosfato de cálcio) ficando ligado ao mesmo via ligações físicas ou químicas. No caso de adsorção física, as interações entre adsorbato e adsorvente são fracas, envolvendo menores valores de energia de ligação. Já a adsorção química envolve interações com valores de energia superiores. Quando o equilíbrio (taxa de adsorção é igual à taxa de desorção) é atingido, relações de equilíbrio (conhecidas como isoterma de adsorção) podem ser estabelecidas, o que nos fornece uma descrição da interação entre os materiais, as vias do mecanismo de adsorção, propriedades da superfície, entre outras características do sistema, [87]. As isotermas de adsorção podem então ser usadas para comparar a capacidade de adsorção de diferentes adsorbatos em diferentes adsorventes. Dentre os modelos que descrevem as cinéticas de adsorção pode-se citar o de Langmuir, de Freundlich e Langmuir-Freundlich [88–90].

Isotermas de Langmuir

O modelo de Langmuir assume que a adsorção ocorre pela formação de uma monocamada molecular, através de ligações químicas com a superfície do material, sem que as moléculas interajam entre si. A isoterma é descrita pela equação:

$$Q = Q_{max} \frac{KC_{eq}}{1 + KC_{eq}} \quad (3.1)$$

em que: Q é a concentração de proteína na superfície da HA [mg/mL], C_{eq} é a concentração da proteína em solução [mg/mL], K é a constante de equilíbrio que representa a afinidade entre a superfície e a proteína, com unidade sendo a inversa da concentração, ou seja, [mL/mg] e Q_{max} é a quantidade máxima de proteína adsorvida [mg/mL].

Isotermas de Freundlich

Neste modelo, formam-se multicamadas de adsorbato na superfície do adsorvente, com interação física entre as moléculas. Este modelo é aplicado para sistemas heterogêneos, especialmente para compostos orgânicos. A equação que descreve essa isoterma é:

$$Q = kC_{eq}^{1/p} \quad (3.2)$$

em que: Q é a concentração de proteína na superfície da HA [mg/mL], C_{eq} é a concentração da proteína em solução [mg/mL], k é a constante de equilíbrio entre a superfície da HA e a proteína e, neste caso, relaciona a capacidade de adsorção e p é a constante de potência que descreve a intensidade da adsorção e o grau de não linearidade entre a concentração da solução e a adsorção, com $n = 1$ implicando em uma adsorção linear, $n < 1$, um processo químico e $n > 1$ um processo físico. Quando n está entre 1 e 10, significa que temos um bom processo de adsorção.

Isotermas de Langmuir-Freundlich

A isoterma de Langmuir-Freundlich é uma associação dos dois regimes, a saturação e não saturação da adsorção. Para pequenas concentrações de adsorbato, temos a isoterma de Freundlich e para grandes concentrações, a isoterma de Langmuir. A equação é dada por:

$$Q = Q_{max} \frac{KC_{eq}^r}{1 + KC_{eq}^r} \quad (3.3)$$

em que: os parâmetro Q , Q_{max} , K e C_{eq} são idênticos aos da isoterma de Langmuir e r é o índice de heterogeneidade e representa a cooperatividade presente na interação das moléculas na superfície com a proteína. Para $r = 1$ não há cooperatividade, $r > 1$, a cooperação é positiva e $0 < r < 1$ a cooperação é negativa.

3.3 Interação de proteínas com superfícies

Assim que um material entra em contato com o fluido corpóreo, proteínas são adsorvidas na superfície do mesmo, provocando mudanças importante na distribuição de carga superficial do material, na capacidade de formação de ligação de hidrogênio, eletrostáticas ou de Van der Waals [91]. Além disso, a adsorção de proteínas constitui o primeiro evento necessário para que células sejam aderidas à superfície do material e deem partida ao processo de proliferação, diferenciação e formação de tecido novo, [5]. Assim, as interações entre proteínas e a superfície do material é um processo essencial para o sucesso do implante. Ademais, a adsorção de proteína também desempenha um papel vital nas áreas de *design* de biossensores e sistemas de liberação de drogas, [92,93].

Algumas características dos materiais, tais como topografia, composição química de superfície, hidroflicidade e hidrofobicidade, carga e potencial de superfície e estabilidade estrutural são fatores importantes que interferem no processo de adsorção das proteínas. Além disso, as propriedades do meio reacional ou biológico tais como o pH, temperatura, composição iônica, afetam a cinética do processo, tornando-o complexo. Em geral, a interação é de curto alcance (Å), através de ligações de pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e forças dispersivas, sendo, portanto, fracas. Estas interações ocorrem entre os átomos de Ca^+ da hidroxiapatita e o terminal COO^- das proteínas, ou entre os terminais PO^-/OH^- da HA e H_3N^+ das proteínas, [16,94–96].

As ligações da proteína com a superfície do material podem induzir mudanças conformacionais e estruturais na proteína. Estas mudanças dependem da energia interna da proteína sendo que as proteínas mais flexíveis têm mais facilidade de serem adsorvidas na superfície do que proteínas “rígidas”. O conceito de proteína flexível vem do fato de que grande parte das proteínas têm grandes domínios desestruturados

que podem se estruturar ao interagir com o material. Portanto, os terminais COO^- e H_3N^+ das regiões desestruturadas são os principais candidatos para interagir com a superfície do implante, [95].

Ao longo das últimas décadas, inúmeros trabalhos têm se dedicado ao estudo da interação de biomateriais cerâmicos (fosfatos de cálcio, titânio, alumina, zircônia, biovidro) com proteínas com importância biológica. Estes trabalhos procuram estabelecer relação entre a adsorção e característica do material tais como o tamanho de partícula, tamanho de poro [92, 97–99], área superficial específica, a natureza química da superfície e a carga superficial [18, 93, 100–102] e o pH e a força iônica do meio reacional [103]. Apesar da grande quantidade de trabalhos, pouco se conhece sobre estes mecanismos, por isso, procura-se entender os mecanismos de interação entre proteínas e a superfície dos materiais. Um exemplo disto é a interação da insulina com fosfatos de cálcio [92, 104–106].

Lee *et al* funcionalizaram a superfície da hidroxiapatita com os aminoácidos arginina (Arg) e com o ácido glutâmico (Glu). Eles mostraram que a forte atração eletrostática entre aminoácidos na superfície da HA e proteínas do meio biológico promove significativamente a adesão dos osteoblastos e aumenta a atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblasto. No entanto a presença dos aminoácidos não altera a proliferação celular [107].

Zhao *et al* estudaram a adsorção da albumina, BSA, em fosfatos de cálcio e mostraram que a composição dos fosfatos influencia a taxa de liberação da proteína na seguinte ordem: TCP-BSA > BCP-1-BSA > BCP-2-BSA > HA-BSA [108].

Ao comparar a superfície do substrato de titânio (Ti), sem e com o revestimento de um filme de HA, Sai Wu *et Al*, demonstraram que o revestimento diminui o ângulo de contato da água com a superfície que tem maior rugosidade. Estas mudanças diminuem a adsorção da fibronectina (Fn) e da BSA na superfície do Ti recoberto, mas aumenta a adsorção da proteína morfogenética, BMP-2. Além disso, o filme de

HA estimula a adesão de osteoblastos e as células-tronco mesenquimais da medula óssea (MSCs) e a diferenciação osteogênica de MSCs, [109].

No caso do estudo apenas da adsorção da Fn, ao comparar duas hidroxiapatitas diferentes, sendo a HAp1 com menor tamanho, cristalinidade e potencial zeta que a HAp2, Wu, F. *et Al*, revelaram que a adsorção é maior para moléculas mais compactas de Fn para a HAp1 e, além disso, à medida que a concentração da HA aumenta, ocorre uma aglomeração de nano partículas de HA que provoca um aumento da adsorção de Fn. Sendo assim eles propuseram que tanto a química da superfície de um única nano partícula, quanto o tamanho e a morfologia dos aglomerados de HA são importantes para a interação da fibronectina com a hidroxiapatita [110].

Matsui, N. estudou a influência da concentração da fibronectina no processo de adsorção na hidroxiapatita e concluiu que para baixas concentrações a Fn assume uma estrutura esferoide oblato ficando com a lateral em contato com o ar (*side-on*), enquanto para altas concentrações, sua estrutura é fibrilar e adsorve com a parte final para fora (*end-on*). Além disso, ele mostrou que há maior aderência de osteoblastos na superfície com baixa concentração de Fn adsorvida, o que sugere que o gradiente da concentração da Fn é importante para regular a interação biomaterial-célula na medicina regenerativa [111].

A discrepância entre o ligeiro aumentos dos níveis de sBGP (serum bone Gla protein) em paciente com doença de Paget e o grande aumento da renovação óssea em todos esses pacientes é conhecida na literatura e uma possível explicação para esta discrepância pode ser uma reforçada ligação da sBGP com a fase mineral do osso nesta patologia. Um aprisionamento anormalmente alto de BGP na matriz óssea levaria a uma menor liberação desta proteína no osso. Com isso, Rosa Torres *et al*, estudaram essa hipótese usando um modelo experimental da fase mineral do osso (HPLC hydroxypatite column) e para isso eles avaliaram 14 pessoas com ($sBGP = 7,8 \pm 3,5$ ng/mL) e 14 pessoas sem ($sBGP = 3,3 \pm 0,9$ ng/ml) a doença.

O sBGP foi liofilizado e ressuspenso em 1 mM de KH_2PO_4 , 1 mM $CaCl_2$, 0,02 % NaN_3 , pH 8,4 e injetado em um sistema de gradiente de HPLC. Eles então concluíram que a sBGP se liga à HA de forma similar em ambos os grupos sugerindo então que a alteração nas moléculas de sBGP não é responsável pela ligação anormal desta com o osso [112].

T.L. Dowd *et al* investigaram o efeito do Pb^{2+} na estrutura e nas propriedades de ligações minerais da osteocalcina. Como a relação entre Ca^{2+} e a osteocalcina já é conhecida, eles compararam o efeito do Pb^{2+} com o do Ca^{2+} . Análises de dicroísmo circular (CD) indicam que o Pb^{2+} induz uma estrutura similar na osteocalcina com o Ca^{2+} , porém com concentrações com duas ordens de magnitude menores. Esses resultados foram explicados pelas ligações do Pb^{2+} com a osteocalcina serem mais de 4 ordens de magnitude mais fortes ($K_d = 0,085 \mu M$) se comparado com o Ca^{2+} ($K_d = 1,25 mM$). Os ensaios com ligações da OC com hidroxiapatita mostraram que o chumbo causa um aumento da adsorção de HA similar ao aumento com a presença do cálcio, mas com concentrações na ordem de 2-3 vezes menores. Além disso, baixo nível de Pb^{2+} (1 μM) junto com níveis de Ca^{2+} fisiológicos (1 mM) provocaram um significativo aumento (40 %) da quantidade de mineral ligado à osteocalcina se comparado com a quantidade de mineral na presença de apenas 1 mM de Ca^{2+} . Estes resultados sugerem um mecanismo molecular de toxicidade de Pb^{2+} , onde baixo nível de Pb^{2+} pode perturbar inapropriadamente o processo regulamentado pelo Ca^{2+} . *In-vivo*, o aumento de osteocalcina ligada ao mineral pode ser responsável pela baixa taxa de formação óssea e por diminuir a densidade óssea que é observada em animais contaminados com Pb^{2+} [113].

Com o intuito de analisar a influência das características topográficas da hidroxiapatita na adsorção de fibronectina (Fn) e osteocalcina (OC) e a adesão e morfologia do osteoblasto MC3T3-E1, N. Ribeiro *et al*, sintetizaram dois substratos de HA à 725 °C (HA725) e 1000 °C (HA1000). As HA1000 apresentaram tamanho de grão ligei-

ramente maior, maior raiz quadrada média de rugosidade (R_q), área de superfície e porosidade menores em relação à HA725, adsorvendo assim maiores quantidades de ambas as proteínas. Estes substratos também obtiveram maior número de domínios expostos de célula-Fn, assim como maior afinidade à osteocalcina. Maior viabilidade e número de célula foram encontrados nas superfícies de HA1000 em comparação às HA725, independentemente da presença ou tipo de proteína adsorvida na superfície dos substratos. Portanto, a adesão de osteoblastos e a atividade metabólica parecem ser mais sensíveis à morfologia e rugosidade da superfície do que ao tipo de proteína adsorvida, [114].

No estudo da adsorção de citocromo c e insulina na superfície de hidroxiapatita, Chie Kojima *et al* viram que houve maior adsorção da insulina, o que foi atribuído ao fato desta ser menor que o citocromo c. Também propuseram que a insulina adsorve formando multicamadas [88].

Com o objetivo de estudar o efeito da injeção intramuscular de hidroxiapatita funcionalizada com insulina em ratos com diabetes mellitus, Yen-Jye Shyong *et al*, concluíram que o nível de glicose no sangue permaneceu normal por 4 dias depois de uma única injeção de partículas de insHAP, o que prova que a insHAP pode proporcionar um avanço na administração de insulina para o tratamento da diabetes mellitus, e podem também ser usadas para administrar proteínas fluorescentes, anticorpos e fármacos anticancerígenos [115].

Todos esses artigos descrevem resultados da interação de proteínas com a hidroxiapatita, mas nenhum estuda como é esta interação, qual o efeito da adsorção no material e na própria proteína. A seguir segue alguns experimentos que descreveram de alguma forma, mas não detalhadamente, o efeito do processo de interação.

Ao estudar a adsorção de insulina em hidroxiapatita não dopada e dopada com silício, M. Lasgorceix *et al* mostraram que a insulina adsorveu em ambas superfícies e a mesma mudou a sua estrutura secundária de majoritariamente α -hélice para a

forma folha- β . Ao estudar a biocompatibilidade nos materiais com e sem insulina, uma boa viabilidade das células foi encontrada e não foi observado proliferação, independentemente da composição do material e da presença ou ausência de insulina. Nos estudos *in vivo*, depois de 9 semanas de implantação de grânulos dos materiais, uma maior resposta inflamatória foi obtida para a silicato hidroxiapatita em comparação com a hidroxiapatita pura, mas não houve diferença no caso da presença de insulina [104].

Susanne *et al* estudaram a interação de insulina humana, Asp^{B28} -Insulina e Trp^{B30} -Insulina adsorvida em teflon. A medida para a curva de isoterma (concentração da proteína adsorvida em função da concentração da proteína em solução) foi realizada ao medir a concentração do sobrenadante com UV-Vis e subtrair da solução inicial. Esta curva mostra que a adsorção atinge uma saturação, mas eles não ajustaram a curva com nenhuma isoterma conhecida. Além da curva eles mostraram através de dicroísmo circular que a Asp^{B28} -Insulina tem o sinal em 222 nm diminuído e a insulina adsorvida em teflon perde essa banda, mostrando que no processo de adsorção a uma superfície ou a um aminoácido a insulina tem sua estrutura secundária perturbada [116].

Michael *et al* demonstraram a adsorção de insulina em várias superfícies diferentes e compararam em qual amostra há maior adsorção, o que indica uma maior afinidade da insulina com a superfície. No entanto, nenhum estudo mais profundo indicando a dinâmica do processo é feito [117].

Zhu *et al* fizeram o estudo da adsorção de fibronectina, insulina e colágeno tipo I em substratos de HA e BCP com diferentes tamanhos. Eles levantaram a isoterma de adsorção ao medir a concentração de proteína no sobrenadante usando um ensaio BCA. Apesar do grande erro nas medidas e dos poucos pontos na curva, Figura 3.13, ele concluiu que o processo de adsorção segue a isoterma de Langmuir e com a BCP formando uma maior capacidade de adsorção, porém uma menor constante de

equilíbrio se comparado com a HA. Além disso, a fibronectina e a insulina mostraram adsorver mais nas partículas de HA I e BCP I (maior distribuição de tamanhos e formas irregulares) do que nas amostras de HA II e BCP II (formato de bola e uma fina distribuição de tamanho em $50\ \mu\text{m}$) e para o Col-I não houve diferença significativa entre as amostras [92].

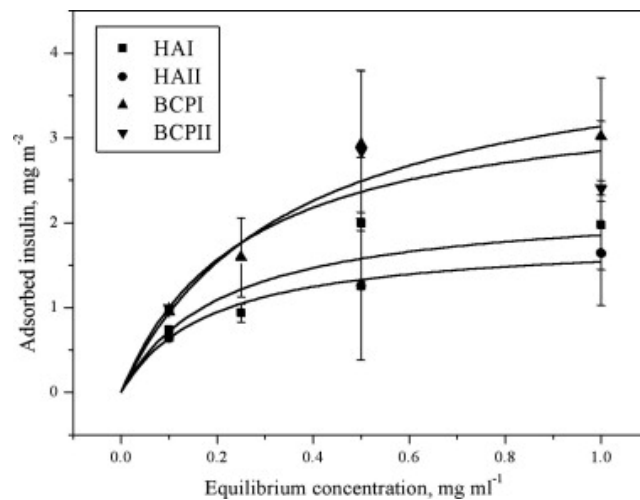


Figura 3.13: Isoterma de adsorção de insulina nas amostras estudadas por Zhu *et al* [92].

Até onde foi possível investigar, apenas um trabalho usou a técnica de XPS para levantar a curva de isoterma da quantidade de proteína adsorvida na superfície do material. Neste caso, Baio J *et al*, adsorveram albumina bovina (BSA) em três tipos de fosfatos de cálcio: hidroxiapatita, DCPD e β -TCP. Eles encontraram que houve formação de monocamada de BSA, com saturação nas três superfícies, mas com ligeiramente menos proteína na superfície de β -TCP. Logo, a densidade de empacotamento da BSA é ligeiramente mais elevada nas superfícies de HA e DCPD em comparação com a superfície de β -TCP [118].

3.4 Técnicas Analíticas

3.4.1 Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons por raios X, XPS, é uma das técnicas mais importantes para o estudo da composição química da superfície de materiais. A técnica baseia-se na irradiação da superfície da amostra com raios X macios, tais como $\text{MgK}\alpha$ (1253,6 eV) e $\text{AlK}\alpha$ (1486,6 eV). Através do efeito fotoelétrico, Figura 3.14, elétrons são emitidos com energia E_c :

$$E_c = h\nu - E_b - \phi \quad (3.4)$$

em que: h é a constante de Planck e vale $6,62 \times 10^{-34}$ Js, ν é a frequência do fóton em Hz, E_b é a energia de ligação do elétron na amostra e ϕ é a função trabalho. Esses elétrons emitidos são chamados de fotoelétrons. Os raios X utilizados têm poder limitado de penetração em um sólido, restringindo a análise à superfície do material (de 1 nm a 10 nm). Eles interagem com os átomos do material que emitem fotoelétrons com livre caminho médio inelástico da ordem de nanômetros. No caso de fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita, o livre caminho médio dos elétrons com espalhamento inelástico que conseguem sair do material com energia variando de 50 eV a 1500 eV é de 0,5 nm a 2,6 nm, [119]. O equipamento de medida operando em ultra alto vácuo (5×10^{-10} mbar), detecta e quantifica a energia dos elétrons emitidos e, através da Equação 3.4 determina-se a energia de ligação do elétron com o elemento, permitindo então uma análise química da superfície da amostra.

No processo de interação da radiação com a superfície, dois processos podem ocorrer: emissão de fotoelétrons ou de elétrons Auger. No processo Auger, um elétron de uma camada exterior decai para a vacância gerada na emissão do fotoelétron emitindo um segundo elétron que carrega o excesso de energia envolvida

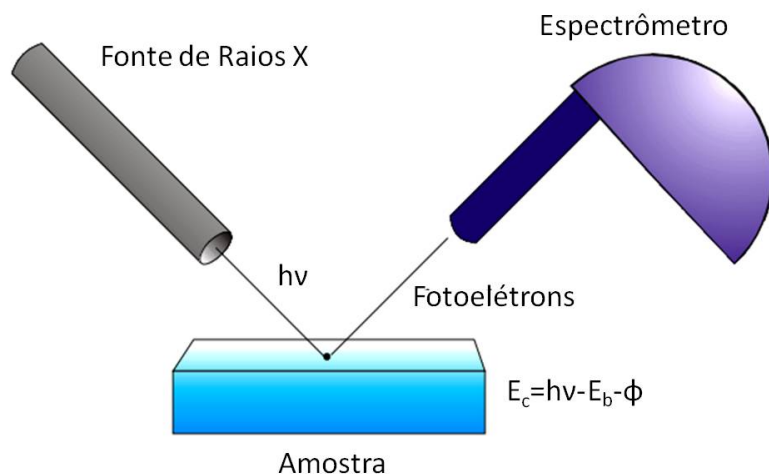


Figura 3.14: Princípio básico de funcionamento da técnica de XPS baseada no efeito fotoelétrico, [120].

em todo o processo. Essa energia, E_{KLL} é dada pela seguinte equação:

$$E_{KLL} = E_K - E_{L1} - E_{L23} \quad (3.5)$$

em que: E_K , E_{L1} e E_{L23} são as energias cinéticas dos elétrons da camada K, do elétron da camada L que decaiu para a camada K e do elétron Auger que saiu da camada L, respectivamente. A energia dos dois elétrons, Auger e fotoelétrons, juntos não pode exceder a energia dos fótons ionizantes. Como os dois processos ocorrem simultaneamente, o espectro de XPS apresenta picos de ambos processos.

Uma vez emitidos da amostra, os elétrons são detectados no espectrômetro de acordo com sua energia cinética. O analisador mais usado é o analisador hemisférico concêntrico (*Concentric Hemispherical Analyser* - CHA). Ele consiste de duas semi-esferas concêntricas, de raios R_2 (a externa) e R_1 (interna) com uma diferença de potencial aplicada entre elas, sendo a semi-esfera externa negativa e a interna positiva. Devido ao campo elétrico criado entre as duas semi-esferas, se um elétron entra com uma alta energia cinética ele irá colidir com a parede externa e se sua velocidade for baixa, colidirá com a parede interna. Portanto, apenas elétrons com uma faixa

de energia cinética (*pass energy* ou energia de passagem) conseguirá percorrer todo o analisador e chegará no detector.

O espectro de XPS corresponde às intensidades dos elétrons emitidos versus as energias de ligação ou a energia cinética dos elétrons que chegam ao detector, resulta em uma curva com picos sobrepostos a um background, ou ruído de fundo. Estes picos correspondem aos fotoelétrons e elétrons Auger que não perderam energia cinética ao saírem da amostra e o ruído de fundo é referente aos outros elétrons que sofreram colisões elásticas perdendo energia cinética ao saírem da amostra e, portanto, não serve para a identificação dos elementos químicos, Figura 3.15. Desta forma, podem-se identificar elementos presentes na amostra e a sua concentração relativa.

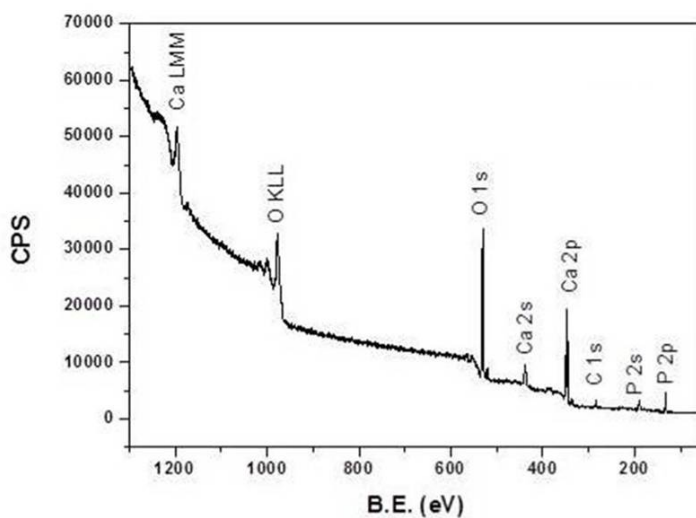


Figura 3.15: Exemplo de um espectro de XPS com picos fotoelétricos e picos Auger.

No espectro de XPS, os picos podem apresentar deslocamentos devido à um carregamento que ocorre na superfície de amostras não condutoras durante a medida. Portanto, antes de começar a análise de XPS é necessário fazer uma calibração do espectro. Para isso, utiliza-se o pico do carbono orgânico (energia de 284,6 eV, [121]), uma vez que este sempre aparece em amostras que tiveram contato com o

ar. Além deste deslocamento, ocorre também o chamado deslocamento químico, que ocorre quando um átomo combina com outro átomo, mudando seu estado químico. Quando isto acontece, uma interação ocorre na densidade de elétrons de valência causando uma alteração no potencial eletrostático afetando os elétrons internos, o que resulta na mudança da energia de ligação desses elétrons internos. Ou seja, o mesmo átomo ligado a diferentes átomos, leva a diferentes energias de ligação, deslocando o pico de 0,1 eV a 10 eV. Após a correção do possível carregamento, qualquer outro deslocamento é referente à ligação química do elemento.

Enquanto a energia de ligação do pico está relacionada com a identificação do elemento químico, a área do pico refere-se à quantidade do elemento presente na amostra. Várias técnicas utilizando fator de sensibilidade para a área foram desenvolvidas e são as mais usadas para esta quantificação. Seguindo esta linha de raciocínio, para uma amostra homogênea, o número de fotoelétrons por segundo em um pico (I) é dado por:

$$I = n f \sigma \theta y \lambda A T \quad (3.6)$$

em que: n é o número de átomos do elemento por cm^3 da amostra, f é o fluxo de raios x [fótons/(cm^2s)], σ é a seção de choque fotoelétrica da órbita atômica de interesse [cm^2], θ refere-se à eficiência do espectrômetro e é baseado no ângulo entre o caminho do fóton e o detector, y é a eficiência do processo fotoelétrico, λ é o livre caminho médio do fóton na amostra, A é a área da amostra onde ocorreu emissão de fotoelétrons e T é a eficiência de detecção dos elétrons emitidos [122]. De acordo com a equação 3.6, temos:

$$n = \frac{I}{f \sigma \theta y \lambda A T} \quad (3.7)$$

em que: o denominador é chamado de fator de sensibilidade atômico, S . Como a razão entre os fatores que envolvem o espectrômetro e a fonte é independente da

amostra, a razão entre as concentrações pode ser calculada pela seguinte equação:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{I_1/S_1}{I_2/S_2} \quad (3.8)$$

Por sua vez, a fração atômica de um constituinte na amostra é dada por:

$$C_x = \frac{n_x}{\sum_i n_i} = \frac{I_x/S_x}{\sum_i I_i/S_i} \quad (3.9)$$

Com isso, podemos caracterizar a amostra quanto à composição e quanto à ligação química dos elementos.

Além disso, a técnica de XPS também pode ser usada para a identificação de contaminações e/ou impurezas desejadas na superfície da amostras, como também fazer um perfil ao longo de toda a amostra, utilizando para isso a técnica de *sputtering*, na qual íons que incidem na amostra arrancam material da mesma, expondo camadas mais profundas.

3.4.2 Espectroscopia de Massa de Íons Secundários por Tempo de Voo (ToF-SIMS)

A espectroscopia de massa de íons secundários por tempo de voo usa um feixe de íons, da ordem de keV, que incide na amostra e por *sputtering* desloca os íons da superfície. Como os íons que incidem na amostra tem energia da ordem de alguns keV, eles têm energia suficiente para quebrar as ligações atômicas, portanto, quanto mais próximo do ponto de incidência dos feixes, mais íons dissociados são liberados e à medida que vai afastando do ponto de incidência, os íons primários perdem energia devido à colisões com moléculas e átomos do material, não conseguindo quebrar as ligações, o que faz com que partículas maiores, como *clusters* e moléculas sejam liberadas, Figura 3.16. Neste processo, somente partículas produzidas nas 2-3 monocamadas externas da amostra têm energia suficiente para superar a energia de ligação superficial e deixar a amostra. A maioria das partículas liberadas é neutra e,

portanto não serve para análise, pois é necessário um campo elétrico para acelerar essas partículas até o detector. Somente uma pequena fração dos íons liberados são carregados positivamente ou negativamente dependendo da sua configuração eletrônica [123], podendo ser então analisados em respeito à sua razão m/z .

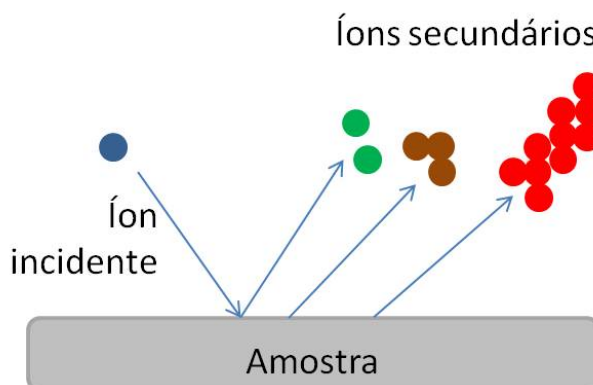


Figura 3.16: Esquema do funcionamento da técnica ToF-SIMS mostrando a formação de íons secundários que podem ser íons dissociados ou moléculas, dependendo da distância de incidência do feixe primário.

Para manter a sensibilidade às monocamadas mais externas, minimizar o dano da amostra e promover a dessorção de grandes fragmentos orgânicos, a dose de íons primários na área de análise deve ser suficientemente baixa para garantir que um íon primário não atinja a mesma região mais de uma vez. Para materiais poliméricos analisados sob estas condições e com menos de 10% da monocamada superior podendo ser consumida, a dose de íons primários totais não deve exceder 10^{13} íons/cm² [123].

Estes íons liberados da amostra são chamados de íons secundários e são acelerados até o detector. Este detector é um espectrômetro de massa que determina a massa da partícula (m) pelo tempo (t) que a mesma levou (tempo de voo) para sair da amostra e chegar no detector. A energia (E) do íons pode ser descrita como:

$$E = \frac{mv^2}{2} = \frac{mL^2}{2zt^2} \quad (3.10)$$

em que: v é a velocidade dos íons, L é a distância percorrida da amostra até o detector e z é a carga do íon [123].

Se a energia e a distância são conhecidas, medindo o tempo que o íon levou para percorrer toda a distância, a razão m/z pode ser diretamente calculada. Com essa análise consegue-se ter informação sobre as espécies molecular e elementar presentes na superfície. Uma vantagem desta técnica é que todos os elementos da tabela periódica, incluindo H e He, são detectados.

A análise dos fragmentos gerados pelo bombardeamento de proteínas por íons no experimento de ToF-SIMS dá informações sobre as regiões da molécula expostas ao feixe. Quando a proteína está adsorvida numa superfície os fragmentos detectados por ToF-SIMS são prioritariamente provindos de regiões das moléculas expostas ao ambiente e não de regiões diretamente ligadas à superfície. Assim, pela razão das intensidades dos fragmentos analisadas, é possível termos informações originais sobre a orientação da proteína na superfície após processos de adsorção, [124–128].

Apesar de ser uma técnica sensível à todos os elementos e portanto servir para determinar a composição química e molecular, se há contaminantes, a orientação de proteínas ligadas à superfície, entre outras e ser ultrasensível à superfície (10-20 Å), ela é uma técnica semiquantitativa, pois a quantidade de material por certa área da amostra não pode ser determinado, já que existe o efeito de matriz, que consiste em uma probabilidade de ionização para cada íon que depende da vizinhança (matriz) [129]. Ou seja, o mesmo composto em duas matrizes diferentes, mantendo todos os outros parâmetros iguais, pode gerar diferentes quantidades de íons secundários. Logo, essa técnica se torna útil ao comparar duas amostras diferentes, com mesma matriz, como por exemplo, proteínas diferentes adsorvidas em um mesmo material.

Tipicamente, um espectro de ToF-SIMS tem centenas de picos que são associados a fragmentos emitidos da amostra pelo bombardeamento do íons. O grande número de picos torna a análise complexa e por isso várias rotas podem ser utilizadas na

análise. Uma delas é comparar o espectro da sua amostra com espectros padrões já estudados anteriormente e facilmente encontrados na literatura. Outra alternativa é a dedução lógica, uma vez que a estrutura molecular pode ser identificada pelo padrão de fragmentação. Técnicas de análise multivariadas são usualmente utilizadas para analisar os dados obtidos por ToF-SIMS. Neste trabalho foi usada a técnica de Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis* - PCA) que será detalhado a seguir [130–132].

Na estatística, "amostra" refere-se a qualquer medida individual feita em um sistema e "variável" significa os canais sobre os quais as medições são feitas. Por exemplo, na espectrometria de massas de íons secundários (SIMS) as variáveis referem-se à massa ou tempo de voo dos íons secundários e, na espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), as variáveis referem-se às energias de ligação dos fotoelétrons detectados. Matematicamente, os dados são colocados em uma matriz, em que cada linha da matriz representa uma amostra individual (um espectro) e cada coluna uma variável dessa amostra, no caso de SIMS, em cada coluna temos um pico do espectro [133].

Basicamente, o PCA encontra um sistema de coordenadas que pode ser expresso como uma combinação linear dos dados experimentais originais, a fim de procurar um padrão de variação e obter a direção de maior variação. De fato, PCA é uma rotação de matriz que cria um novo sistema de eixos (*Principal Componentes*, PCs) que explica como as amostras e variáveis estão relacionadas uma às outras, reduzindo assim as centenas de variáveis originais em poucas variáveis que podem ser facilmente interpretadas usando simples gráficos, ver Figura 3.17.

As amostras que são amplamente separadas ao longo destes novos eixos não são tão semelhantes quanto as amostras que são agrupadas próximas. Figura 3.18 mostra esquematicamente os resultados de uma análise simulada de PCA. Conforme observado na figura, amostras com letras iguais agrupam-se, significando que elas

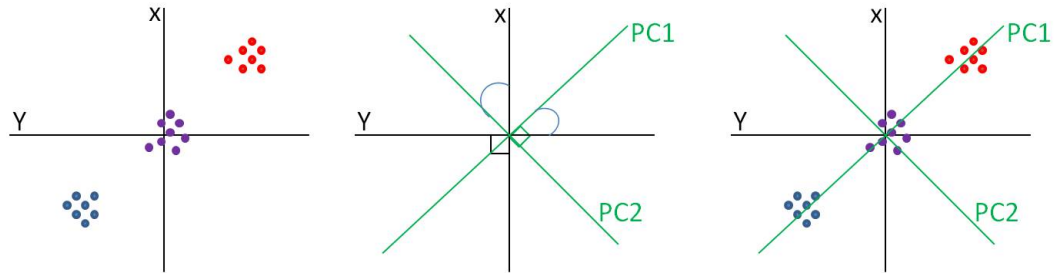


Figura 3.17: Esquema mostrando como funciona o *Principal Components Analysis*, adaptado de [134].

são semelhantes entre si no espaço multivariacional. Por exemplo, pode ser visto na Figura 3.18 que as variáveis 1 e 7 estão positivamente correlacionadas com as amostras b. Isto é visto pela sua localização relativa no gráfico *loading* em relação à localização das amostras b no gráfico *score*. Isto significa que as variáveis 1 e 7 explicariam as principais diferenças entre as amostras b e as outras amostras [123].

Como visto anteriormente, o resultado da análise usando PCA se resume em dois gráficos: *Scores* e *Loadings*, em que o *score* fornece a relação entre as amostras no novo sistema de coordenadas e é a projeção das amostras nos eixos PCs e o *loadings* é definido como a direção do cosseno entre a variável original e os novos PCs, descrevendo qual variável é responsável pela diferença vista entre as amostras.

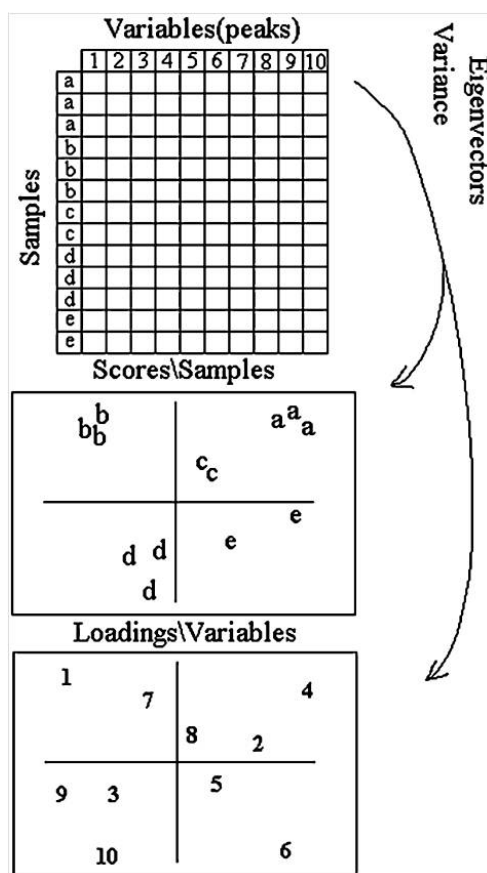


Figura 3.18: Ilustração esquemática da análise de PCA de uma matriz de dados com os score e loading representando as amostras e variáveis, respectivamente, do sistema no espaço recém-definido [123].

Como ToF-SIMS é uma técnica muito sensível à superfície, é essencial evitar o máximo possível qualquer tipo de contaminação da amostra e além disso, minimizar o efeito de possíveis variações no instrumento. No intuito de maximizar as diferenças entre as amostras e minimizar o efeito do instrumento e da contaminação, é necessário tratar os dados antes de analisá-los usando PCA. Apesar de não existir uma forma padrão de pré-tratamento, os passos são os mesmos: o primeiro passo, essencial, é calibrar cada espectro, depois selecionar os picos de interesse, definir o limite de integração do pico, de forma que o mesmo pico de todas as amostras esteja

dentro desse limite, normalizar e centrar os picos. O processo de normalização é necessário para remover as diferenças devido a efeito de carregamento da amostra e variação do instrumento e pode ser feito de várias formas. As normalizações mais comuns são pela intensidade total (normalmente escolhido quando todos os picos da amostra são selecionados), pela soma dos picos selecionados (quando são selecionados picos específicos de interesse) e pelo maior pico do espectro. Já o processo de centralização é feito para remover o *offset* comum aos espectros e a diferença entre os centros dos picos entre as diferentes amostras, de forma que a mesma variável, nas diferentes amostras, varie em um zero comum. Os picos utilizados neste trabalho são os apresentados na Tabela 3.2, de acordo com [135].

Além dos gráficos de *score* e *loading*, a técnica de PCA também pode nos fornecer a razão entre a área de dois picos. Dessa forma podemos selecionar picos de interesse, como por exemplo, os picos hidrofóbicos e os hidrofílicos, e calcular a razão entre eles para determinar qual está voltado para a superfície da amostra e qual está voltado para a atmosfera. Vale aqui lembrar que o ToF-SIMS é uma técnica muito sensível a moléculas ligadas à superfície. Os picos de ToF-SIMS terão maior intensidade para os aminoácido mais expostos à atmosfera e mais longe da superfície da amostra [124–128].

Tabela 3.2: Picos dos íons positivos usados no PCA para as proteínas adsorvidas em pó.

Aminoácido	Fragmento
Alanina (A, Ala)	44: $C_2H_6N^+$
Arginina (R, Arg)	43: $CH_3N_2^+$, 73: $C_2H_7N_3^+$, 100: $C_4H_{10}N_3^+$, 101: $C_4H_{11}N_3^+$,
Asparagina (N, Asn)	70: $C_3H_4NO^+$, 87: $C_3H_7N_2O^+$, 88: $C_3H_6NO_2^+$, 98: $C_4H_4NO_2^+$
Ácido aspártico (D, Asp)	88: $C_3H_6NO_2^+$
Cisteína (C, Cys)	45: CHS, 59: C_2H_3S ,
Glutamina (Q, Gln)	84: $C_4H_6NO^+$
Ácido glutâmico (E, Glu)	84: $C_4H_6NO^+$, 102: $C_4H_8NO_2^+$
Glicina (G, Gly)	30: CH_4N^+
Histidina (H, His)	81: $C_4H_5N_2^+$, 82: $C_4H_6N_2^+$, 110: $C_5H_8N_3^+$
Isoleucina (I, Iso)	86: $C_5H_{12}N^+$
Leucina (L, Leu)	86: $C_5H_{12}N^+$
Fenilalanina (F, Phe)	120: $C_8H_{10}N^+$, 131: $C_9H_7O^+$
Prolina (P, Pro)	68: $C_4H_6N^+$, 70: $C_4H_8N^+$
Triptofano (W, Trp)	130: $C_9H_8N^+$,
Tirosina (Y, Tyr)	107: $C_7H_7O^+$, 136: $C_8H_{10}NO^+$
Valina (V, Val)	72: $C_4H_{10}N^+$, 83: $C_5H_7O^+$

3.4.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Movimento vibracional ou rotacional ocorre em uma molécula que possui uma distribuição de elétrons não simétrica, isto é, possui átomos de elementos químicos distintos, variando seu momento de dipolo. Essa pequena variação de energia do momento de dipolo coincide com a faixa de infravermelho. Vibrações, rotações ou uma combinação de modos vibracionais da molécula absorvem na região do infravermelho provocando alterações de amplitude em alguns modos vibracionais.

Vibrações podem envolver tanto uma mudança no comprimento da ligação (deformação axial ou estiramento - *stretching*) ou no ângulo de ligação (deformação angular - *bending*), sendo que algumas ligações podem se esticar em fase (simétrico) ou fora de fase (assimétrico), Figura 3.19.

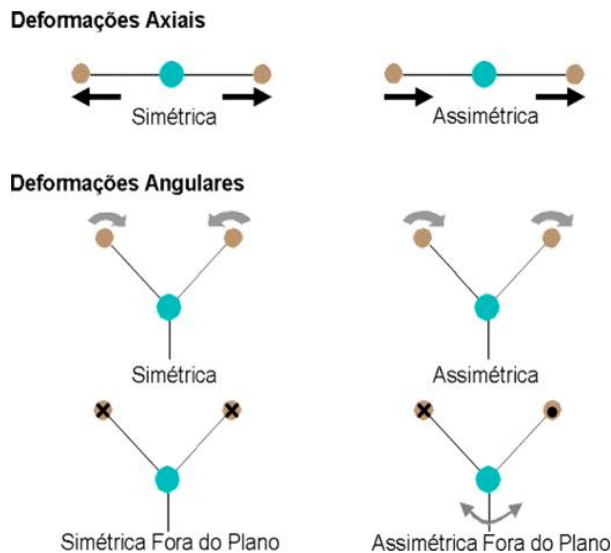


Figura 3.19: Modos vibracionais ativos na região do Infravermelho [136].

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica que usa a luz com frequência na faixa do infravermelho. Ao excitar modos vibracionais e rotacionais de grupos iônicos do material, é possível com esta técnica

identificar grupos iônicos, existentes em um material no estado sólido, líquido ou gasoso.

Parte da radiação incidente é absorvida pela amostra e parte é transmitida. Sendo assim, o espectro resultante cria uma impressão digital molecular da amostra com picos de absorção que correspondem às frequências de vibrações entre as ligações dos átomos que compõem o material. Como cada material tem uma combinação única de átomos, dois compostos não produzem exatamente o mesmo espectro infravermelho. Portanto, a espectroscopia de infravermelho pode resultar em uma identificação positiva (análise qualitativa) de cada tipo de material. Além disso, a intensidade dos picos no espectro é uma indicação direta da quantidade de material presente [137].

Portanto, com a técnica de FTIR podemos identificar uma amostra desconhecida, determinar a qualidade e a consistência da amostra e a quantidade de cada componente na amostra.

No caso de proteínas que possuem muitas ligações peptídicas, nove regiões ativas aparecem no espectro do infravermelho, como mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Bandas de FTIR características das ligações peptídicas. Adaptado de [138].

Banda	Número de onda (cm^{-1})	Descrição
Amida A	3300	Estiramento NH
Amida B	3100	Estiramento NH
Amida I	1600-1690	Estiramento C=O
Amida II	1480-1575	Estiramento NH e deformação angular NH
Amida III	1229-1303	Estiramento NH e deformação angular NH
Amida IV	625-767	Deformação angular OCN
Amida V	640-800	Deformação angular fora do plano NH
Amida VI	537-606	Deformação angular fora do plano C=O

Para os recobrimentos nanométricos, a técnica de Refletância Total Atenuada (ATR) é recomendada. Nela, a amostra está em contato físico com o cristal que deve ter um alto índice de refração (2 a 4) na banda do IR. Geralmente os cristais usados são: ZnSe, ZnS, KRS-5, Si, Ge ou safira. O feixe IR é incidido sobre o cristal em ângulos maiores que o ângulo crítico (ângulo que induz a reflexão total) quando o cristal se mantém em contato com a amostra. O feixe então atinge a superfície do cristal, ocorrendo o fenômeno de reflexão total com a onda se propagando ao longo de todo o cristal. Quando isso ocorre, o feixe penetra uma pequena profundidade da amostra (onda evanescente), podendo excitar as moléculas da superfície da amostra, Figura 3.20. A luz absorvida pela amostra é então detectada, registrando-se os espectros de IR produzidos pelo recobrimento.

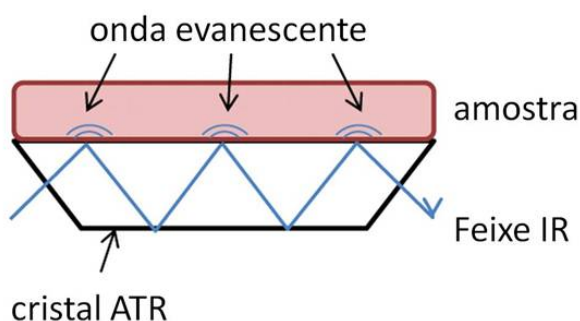


Figura 3.20: Esquema de configuração da técnica refletância total atenuada (ATR), modificada de [139].

3.4.4 Difração de Raios X (DRX)

O fenômeno de difração ocorre quando a distância entre duas ou mais fendas é da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda irradiado. Imaginando a rede cristalina como um conjunto de fendas criada pela distância entre os átomos, é possível realizar experimentos de difração, desde que a onda utilizada possua o comprimento de onda da mesma ordem de grandeza que os espaçamentos, da ordem

de 0,15-0,40 nm. A onda que corresponde a este comprimento de onda é a dos raios X.

No difratômetro, incide-se raios X sobre o material a ser estudado e detecta-se o feixe difratado por átomos situado em diferentes orientações ou planos cristalinos do material, Figura 3.21. Como proposto por Bragg, o aparecimento dos picos de difração ocorre quando a interferência entre duas ondas que sofreram reflexão em diferentes planos cristalinos é construtiva, ou seja, a diferença de caminho entre as duas ondas deve ser múltiplo inteiro do comprimento de onda:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (3.11)$$

em que: λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância entre dois planos cristalográficos, n é um número inteiro que indica a ordem de difração, normalmente usa-se $n = 1$ e θ é ângulo de incidência do feixe em relação aos planos difratantes.

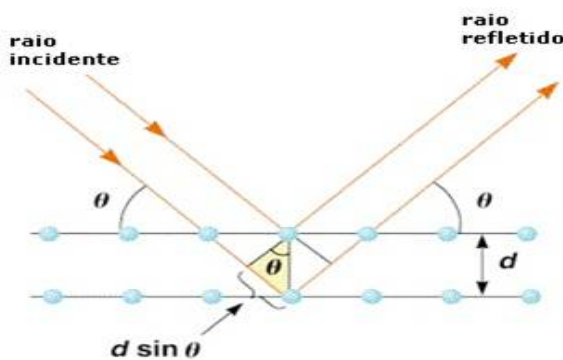


Figura 3.21: Esquema ilustrando o princípio básico da difração de raios X em um plano cristalino, retirado de [140].

Esta equação é conhecida como a Lei de Bragg e é a base para as análises de cristalografia dos materiais, sendo usada para a identificação das posições angulares dos picos de difração, catalogados em fichas padronizadas, determinando assim as possíveis fases presentes. A partir dela também é possível determinar parâmetros

microestruturais do material, tais como o tamanho médio do cristalito (maior região com mesma orientação cristalográfica) a partir da largura dos picos, a orientação preferencial dos cristais de acordo com a intensidade relativa. Além disso, a difração de raios X é uma importante técnica que permite identificar as tensões da rede cristalina, textura do material, densidade, espessura, rugosidade.

Normalmente é muito difícil analisar a estrutura de filmes finos depositados sobre substratos cristalinos devido ao seu pequeno volume de difração, o que resulta em uma difração de baixa intensidade se comparada com as intensidades geradas pelos substrato, dificultando a identificação das fases presentes na amostra. A fim de maximizar o sinal do filme, usa-se a técnica de incidência rasante combinada com a geometria de feixes paralelos. Nesta técnica o feixe de raios X incidente faz um pequeno ângulo com a superfície da amostra (tipicamente $0,5^\circ$ a $4,0^\circ$), o que aumenta o comprimento de percurso dos raios X no filme (região em azul na Figura 3.22). Durante a medida, somente o detector gira ao longo do intervalo angular, mantendo o ângulo de incidência, o comprimento de interação e a área irradiada constantes. Como a intensidade do sinal gerado pelas fontes tradicionais é baixa, é comum utilizar um tempo de coleta maior, espelhos para tornar o feixe paralelo ou uma radiação síncrotron, que é naturalmente de maior intensidade e monocromática.

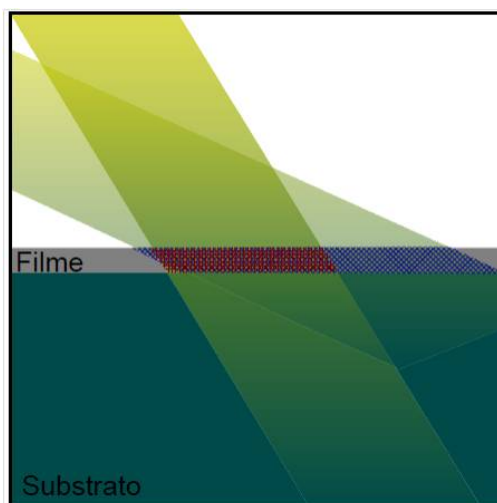


Figura 3.22: Esquema da incidência em uma difração convencional e incidência rasante, mostrando como o ângulo de incidência influencia na interação do feixe com o filme.

3.4.5 Análise Química - Espectrofotometria

A espectrofotometria é um dos métodos mais utilizados para análise quantitativa em vários campos, como química, física, bioquímica, engenharia química e aplicações clínicas. Espectrofotometria é um método para medir o quanto uma substância química absorve a luz, medindo a intensidade da luz que passa através da amostra.

Quando um átomo em seu estado normal absorve luz com um comprimento de onda específico, o mesmo passa para um estado excitado. Ao retornar para seu estado relaxado, o elétron emite um fóton com energia equivalente à diferença de energia entre os níveis excitado e relaxado. O comprimento de onda que será absorvido é específico para cada transição eletrônica em um elemento particular, ou seja, cada comprimento de onda corresponde a somente um elemento. Sendo assim, os átomos de um elemento emitem uma linha espectral única.

São três os principais tipos de processo pelos quais a radiação interage com a amostra e é analisada:

i) Espectroscopia de absorção - Correlaciona a quantidade da energia absorvida em função do comprimento de onda da radiação incidente.

ii) Espectroscopia de emissão - Consiste fundamentalmente na reemissão de energia previamente absorvida pela amostra

iii) Espectroscopia de espalhamento (ou de dispersão)- Determina a quantidade da energia espalhada (dispersa) em função de parâmetros tais como o comprimento de onda, ângulo de incidência e o ângulo de polarização da radiação incidente.

Com isso, através do espectro gerado pelo sinal da luz ao atravessar a amostra, é possível determinar o elemento presente na amostra. Além disso, a quantidade de luz absorvida em um determinado comprimento de onda aumenta com o aumento do número de átomos presentes na amostra que absorvem essa energia. A relação entre a quantidade de luz absorvida (medida através da quantidade de luz que atravessou a amostra) e a concentração do elemento é dada pela lei de Beer-Lambert:

$$A = \log(1/T) = \epsilon cl \quad (3.12)$$

em que: A é a absorbância, T é a transmitância dada por I/I_0 , I é a intensidade da luz depois de atravessar a amostra, I_0 é a intensidade inicial da luz, ϵ é a absorptividade molar, c a concentração do elemento na amostra e l é a distância percorrida pela luz através da amostra. Logo a absorbância é diretamente proporcional ao número de átomos na amostra.

A Espectrometria de Absorção Atômica é uma técnica para medir quantidades de elementos químicos presentes em amostras ao medir a radiação absorvida pelo elemento químico de interesse. Os átomos absorvem luz ultravioleta ou visível e fazem transições para níveis de energia mais elevados. Dentre as técnicas de espectrofotometria por absorção, podemos destacar duas:

Espectrofotometria de adsorção atômica em chama

Neste caso a amostra a ser analisada é diluída em solução e depois aquecida até sua vaporização. Quando na forma de vapor, os átomos da amostra são reduzidos ao seu estado atômico. Um feixe de luz com comprimento de onda específico do elemento a ser estudado, ao atravessar esse vapor é absorvido pelo elemento. O detector então determina a quantidade de energia na forma de fótons de luz que foi absorvida pela amostra, Figura 3.23. Um monocromador é usado para eliminar sinal de fundo e ruído.

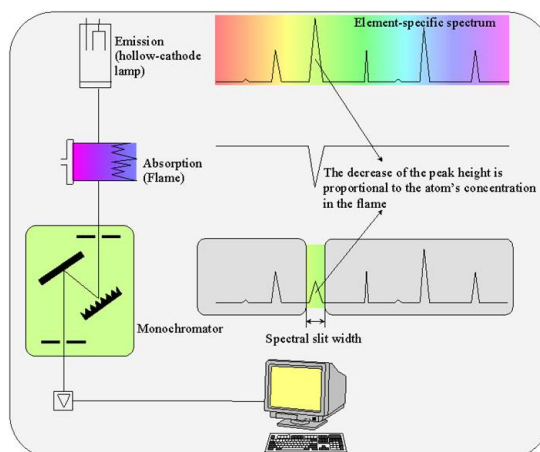


Figura 3.23: Esquema do experimento de absorção atômica por chama em que a luz passa pela chama e um monocromador até chegar ao detector. Figura retirada de [141].

Espectrofotometria de UV-Vis

Neste caso, luz com energia na faixa do visível, do ultravioleta (UV) próximo, cujos comprimentos variam entre 200 a 780 nm, incide diretamente na amostra. Nesta faixa de energia, as moléculas presentes na amostra absorvem energia realizando transições eletrônicas moleculares e o espectrofotômetro mede o quanto de luz foi absorvida pela amostra. O gráfico gerado pode ser apresentado na forma de

absorbância versus um comprimento de onda específico ou absorbância versus uma faixa de comprimento de onda.

O espectrofotômetro pode ser constituído de um feixe único ou duplo. No caso do feixe único primeiro se faz uma medida sem a amostra pra determinar I_o e depois a medida com a amostra. No feixe duplo a luz é separada de forma a passar pela amostra de referência (normalmente uma cubeta vazia) e a amostra a ser analisada, Figura 3.24.

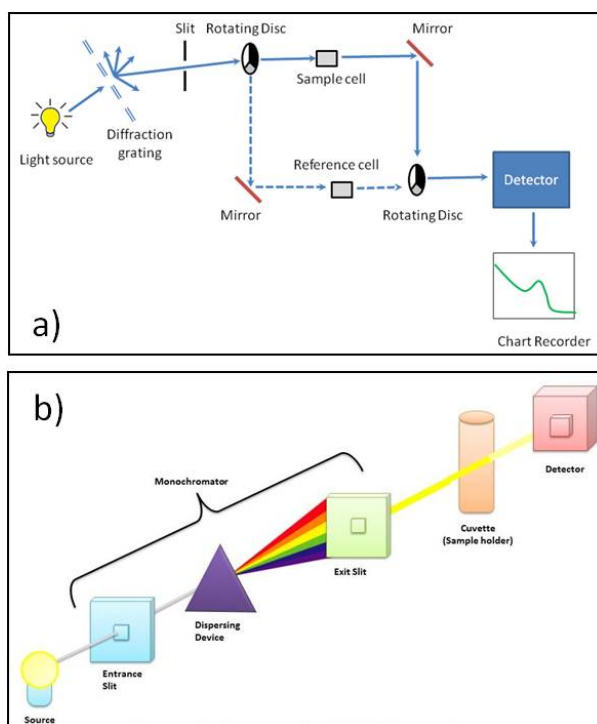


Figura 3.24: Esquema da espectrofotometria por UV-Vis com a) feixe duplo e b) feixe simples. Em ambos a luz passa por um monocromador e incide na amostra antes de chegar ao detector. Figuras retiradas de [142].

3.4.6 Tamanho de partícula

A determinação da distribuição de tamanho de partícula, ou seja, que tamanhos de partícula estão presentes em que proporções, é importante uma vez que o tamanho das partículas tem grande impacto na reatividade, na taxa da dissolução, na fluidez etc. Partículas maiores e mais esféricas fluirão mais facilmente do que partículas menores. As partículas menores, por sua vez, se dissolvem mais rapidamente e levam a altas viscosidades de suspensão, se comparada com as maiores. Tamanhos de gotas menores e carga superficial mais elevada (potencial zeta) melhora a estabilidade da suspensão e da emulsão. Pó ou gotas no intervalo de 2-5 μm se tornam aerossol mais facilmente e penetra mais profundamente em pulmões do que tamanhos maiores.

A técnica utilizada para medir a distribuição dos tamanhos de partículas presentes na amostra foi a difração a laser que consiste em incidir um feixe de laser colimado sobre a amostra que está dispersa em ar ou líquido. Ao colidir com as partículas o laser difrata em ângulos diferentes para diferentes tamanhos de partículas. Basicamente, quando maior a partícula, menor o ângulo de difração e vice-versa, Figura 3.25a. Esses diferentes padrões de difração são então projetados no detector e métodos computacionais medem a intensidade de cada anel de difração e a distância entre eles, Figura 3.25b. O laser utilizado consiste de duas fontes de luz com diferentes comprimentos de onda, no azul e no vermelho. O laser azul é usado para medida de pequenas partículas enquanto que o laser vermelho detecta partículas maiores. Com essa técnica é possível medir partículas com tamanhos entre 0,02 μm e 2000 μm .

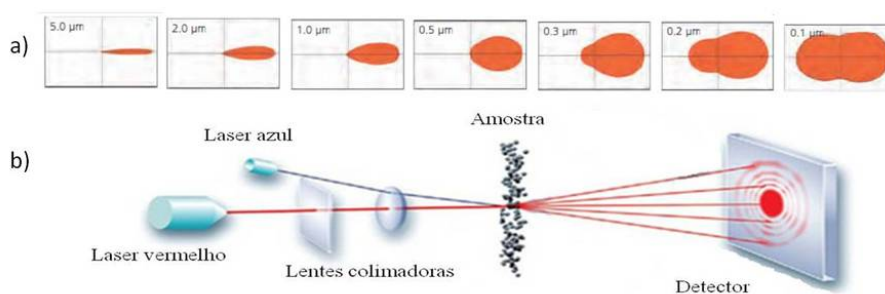


Figura 3.25: Em a) esquema de difração da luz para vários tamanhos de partícula, modificada de [143] e em b) esquema da técnica de difração a laser para medida de tamanho de partícula, modificada de [144].

A medida da distribuição do tamanho de partícula não é realizada em partículas individuais, mas sim em aglomerados de partículas. O aglomerado contém partículas de diferentes tamanhos e o padrão de distribuição de intensidade luminosa emitido é composto pela luz emitida por todas as partículas individuais. A distribuição de tamanho de partícula pode ser obtida detectando e analisando este padrão de distribuição de intensidade de luz. Esses padrões são transformados em distribuição de tamanho de partículas com base na teoria de difusão da luz de Mie ou na teoria de Fraunhofer. A teoria de Mie é usada para análise das partículas pequenas em que o espalhamento ocorre com partículas muito menores que o comprimento de onda da luz ($d < 0.05 \cdot \lambda$). A teoria considera que as partículas são isotrópicas e esféricas com uma superfície lisa, sendo necessário o conhecimento do índice de refração tanto da amostra a ser medida quanto do dispersante. Já a teoria de Fraunhofer é uma simplificação da teoria de Mie que considera partículas muito maiores que o comprimento de onda do laser. Na prática, o comprimento de onda do laser utilizado varia de 633 nm a 900 nm, portanto a aproximação de Fraunhofer só vale para partículas maiores que 4,5 μm. As partículas menores que isso devem ser analisadas pela teoria de Mie. Em ambas as teorias, o tamanho de partícula é dado como o diâmetro de uma esfera, [145].

3.4.7 Brunauer-Emmett-Teller - BET

O método BET é o procedimento mais utilizado para a determinação da área superficial específica de uma amostra, incluindo a distribuição do tamanho dos poros. Esta informação é utilizada para prever a taxa de dissolução, uma vez que esta taxa é proporcional à área de superfície específica.

A determinação da área de superfície específica por meio da teoria BET baseia-se no fenômeno de adsorção física de gases na superfície de um material poroso. Esse material que está rodeado e em equilíbrio com um determinado gás que tem uma certa temperatura T e uma pressão de vapor relativa, P/P_o , adsorve fisicamente uma certa quantidade de gás. A quantidade de gás adsorvido dependerá da superfície exposta mas também da temperatura, da pressão do gás e da resistência da interação entre o gás e o sólido. A relação entre a pressão de vapor relativa e a quantidade de gás adsorvido a uma temperatura constante é chamada de isoterma de adsorção.

Neste método, antes da análise ser feita, a amostra deve ser rigorosamente degaseificadas para remover completamente água e outros contaminantes adsorvidos na amostra, a fim de se garantir que as medidas de área superficial obtidas durante a análise possam ser adquiridas com precisão. Isso é feito em altas temperaturas e sob vácuo ou com fluxo contínuo de gás. A temperatura escolhida é usualmente a maior possível, desde que não ocorra o comprometimento da estrutura física da amostra. Após a limpeza da amostra, a mesma é colocada em nitrogênio líquido (77 K) e um gás (nitrogênio ou argônio, dependendo do tipo de amostra) é injetado ao recipiente da amostra em etapas de forma que a pressão (P_o) em cada etapa é conhecida e diferentes pressões de vapor (P) são formadas no equilíbrio. Esse gás vai adsorvendo na superfície da amostra até atingir a saturação. Neste ponto não ocorre mais adsorção, independentemente de qualquer aumento adicional na pressão. Após atingir a saturação, a amostra é removida e aquecida para fazer com que o gás adsorvido seja libertado do material e quantificado, Figura 3.26. Os dados recolhidos

são apresentados na forma de uma isoterma BET, que representa a quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa, [146].

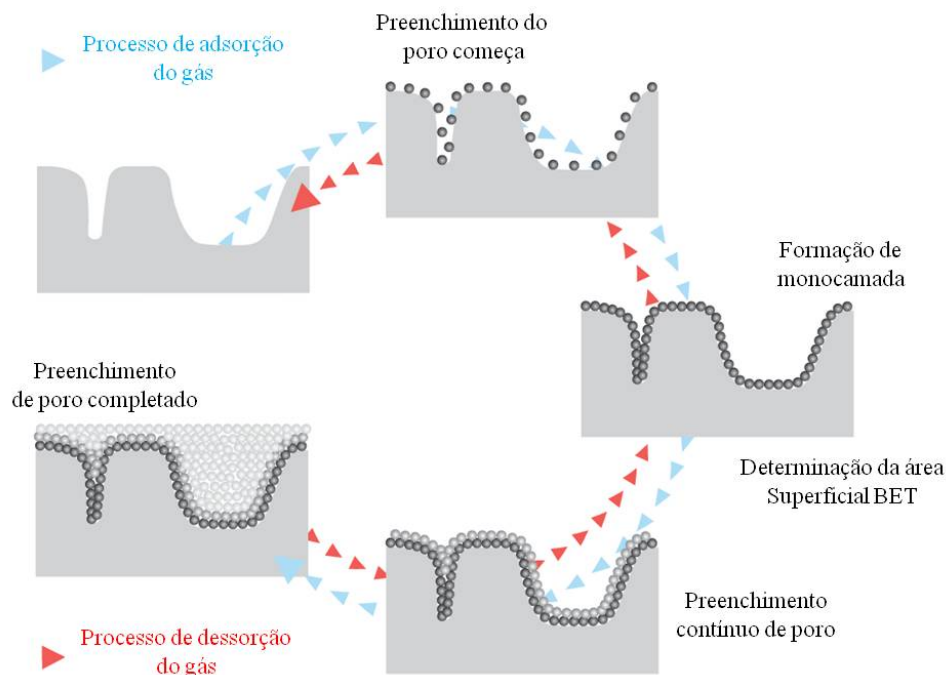


Figura 3.26: Esquema do processo de adsorção e dessorção do gás na superfície da amostra pelo processo de BET, adaptado de [147].

A teoria de BET é uma extensão da teoria de Langmuir, que relaciona a fisisorção de uma camada única de moléculas de gás, também chamadas de adsorbatos, sobre superfície sólida, introduzindo o conceito de multicamadas segundo três hipóteses, Figura 3.27:

- As moléculas de gás irão adsorver fisicamente e infinitamente na superfície sólida em camadas;
- As diferentes camadas de adsorção não interagem entre si;
- A teoria de Langmuir se aplica a cada camada de adsorção.

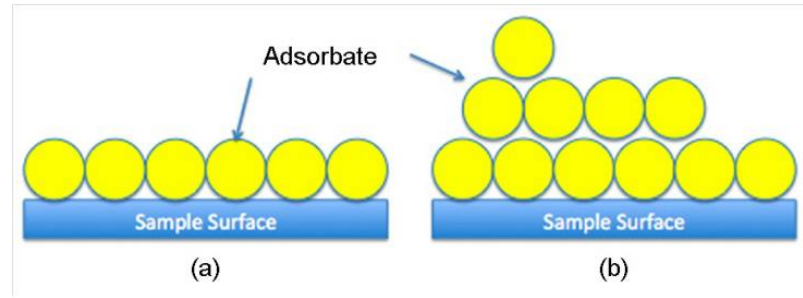


Figura 3.27: Esquema da adsorção de moléculas de gás na superfície de uma amostra mostrando (a) o modelo de adsorção monocamada assumido pela teoria de Langmuir e (b) o modelo de adsorção multicamada assumido pela teoria BET, [146].

De acordo com a teoria de BET, a isoterma de BET relaciona o volume de gás adsorvido V em função da pressão relativa P/P_o [148]

$$\frac{P}{V(P_o - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C - 1}{V_m C} \left(\frac{P}{P_o} \right) \quad (3.13)$$

em que: V_m é a quantidade de gás adsorvida em uma monocamada e C é a constante BET. De acordo com a equação 5.5, a curva de $P/V(P_o - P)$ em função de P/P_o resulta em uma reta, Figura 3.28, cuja inclinação é dada por:

$$s = \frac{C - 1}{V_m C} \quad (3.14)$$

e a intersecção por:

$$i = \frac{1}{V_m C} \quad (3.15)$$

Dessa forma o volume da monocamada de gás adsorvido V_m e a constante C de BET são calculados no intervalo de pressão relativa de 0,05 a 0,35. A área superficial específica, $S[m^2g^{-1}]$, da amostra, é calculada por

$$S = \frac{V_m \sigma N_A}{m V_o} \quad (3.16)$$

sendo σ a área efetiva ocupada por uma molécula de adsorbato ($1,6 \times 10^{-20} m^2$ para o nitrogênio), N_A é o número de Avogadro (mol^{-1}), m a massa de adsorbato (g) e V_o

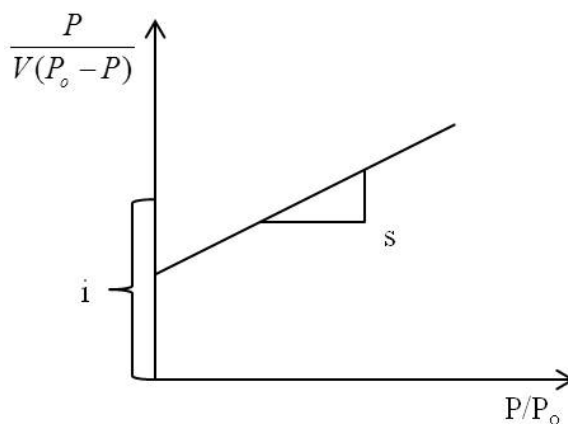


Figura 3.28: Gráfico gerado pela equação de BET, [148].

é o volume molar do gás ($cm^3.mol^{-1}$). Já o tamanho dos poros (D) é simplesmente um cálculo entre a razão do volume (V) com a área S : $D = 4V/S$.

3.4.8 Potencial Zeta

Muitas das propriedades importantes dos sistemas coloidais são determinadas direta ou indiretamente pela carga elétrica (ou potencial) das partículas. O potencial em si determina a energia de interação entre as partículas, o que é em muitos casos responsável pela estabilidade das partículas em relação à coagulação e por muitos aspectos do comportamento do fluxo da suspensão coloidal [149].

No contato com um meio polar a maioria das partículas minerais apresentam uma carga superficial definida como consequência da ionização, adsorção e dissolução iônica. Esta carga superficial influencia a disposição de íons vizinhos do meio, ou seja, íons de sinal oposto serão atraídos para a superfície da partícula e os íons de sinal igual serão repelidos da superfície.

O termo científico para a medida do potencial eletrostático da superfície de uma partícula em um meio líquido é Potencial Zeta (PZ). Seu valor vai depender das propriedades do líquido, assim como da superfície da partícula. Quanto maior o valor

do potencial zeta (tanto positiva, quanto negativamente), maior será a repulsão entre as partículas de forma que não haja uma tendência das partículas se aglomerarem, tornando a solução estável, desta forma, a medida do potencial zeta é um indicativo da estabilidade do sistema. A Tabela 3.4 indica os valores de potencial zeta para cada regime de estabilidade.

Tabela 3.4: Estabilidade da solução coloidal para cada faixa de potencial zeta. Adaptado de [150].

Potencial Zeta [mV]	Estabilidade do coloide
De 0 a ± 5	Coagulação rápida ou floculação
De ± 10 a ± 30	Instabilidade incipiente
De ± 30 a ± 40	Estabilidade moderada
De ± 40 a ± 60	Boa estabilidade

No entanto, o potencial zeta não está associado à medida da carga da superfície de um material, pois uma vez em contato com o líquido, uma dupla camada de cargas é formada na superfície da mesma. Se a amostra tem carga superficial negativa, íons positivos da solução irão se ligar fortemente na superfície da mesma, neutralizando sua carga. Essa primeira camada de carga formada é chamada de camada Stern. Já a região externa à esta camada, tem cargas que se ligam fracamente à superfície e sua concentração vai diminuindo com a distância até se igualar à carga da solução. Esta região de variação de potencial é denominada camada difusa e em seu interior existe um limite de distância em que as cargas são consideradas independentes uma das outras. Essa distância, da superfície da amostra até onde as cargas são independentes uma das outras, é chamada de plano de deslizamento e seu potencial é denominado Potencial Zeta, Figura 3.29.

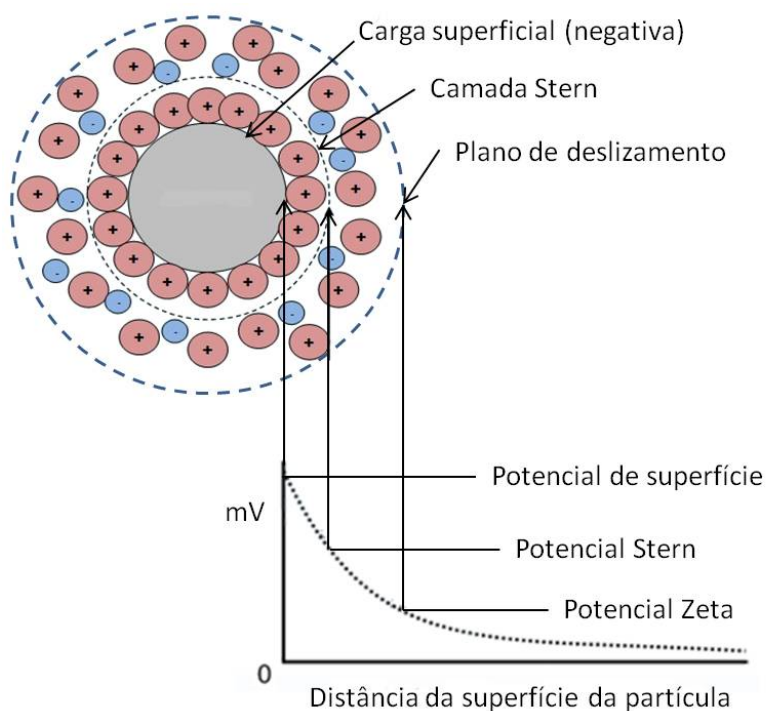


Figura 3.29: Desenho esquemático das cargas ligadas à superfície da amostra e o potencial em cada camada, adaptado de [151].

O potencial zeta é normalmente medido através da técnica de eletroforese, que nada mais é que aplicar um campo elétrico na solução com a amostra e medir a velocidade com que as partículas se movem nesse campo elétrico. Quanto maior a carga, mais rápido a partícula se move e, portanto, maior será seu potencial zeta.

3.4.9 Análise Térmica

Análise Térmica compreende um grupo de técnicas em que uma propriedade física da amostra é medida em função da temperatura quando a amostra é aquecida ou resfriada de uma maneira controlada. Na prática a análise térmica fornece informações sobre entalpia, capacidade térmica, mudança de massa e o coeficiente de expansão térmica. A análise térmica inclui vários métodos diferentes que são

distinguidos um do outro pela propriedade que é medida.

A análise termogravimétrica (TGA) é a técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra em função da temperatura, Figura 3.30. Neste caso estudam-se as mudanças de massa devido à interação com a atmosfera, vaporização e decomposição. A curva de perda de peso em função da temperatura fornece informações sobre as alterações na composição da amostra, a estabilidade térmica e os parâmetros cinéticos das reações químicas na amostra. Normalmente a perda de peso é dada em percentual em relação à massa inicial e não em valores reais de massa.

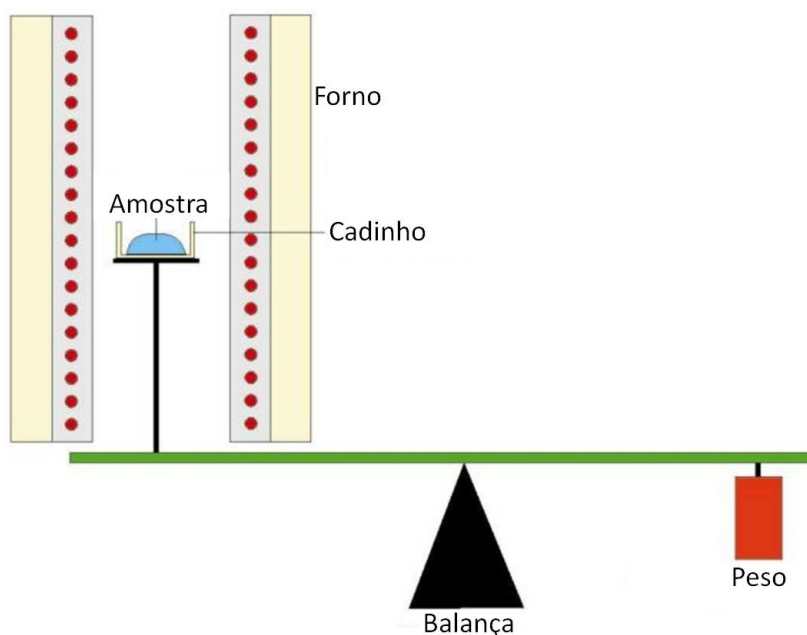


Figura 3.30: Esquema da técnica de termogravimetria em que a amostra é aquecida enquanto sua massa é medida, modificada de [152].

Já a análise térmica diferencial (DTA) é a técnica que determina continuamente a diferença entre as temperaturas da amostra e de um material de referência termicamente inerte, à medida que ambos vão sendo aquecidos em um forno, Figura 3.31. Estas medidas registram a diferença de temperatura entre as duas amos-

tras, e por isso o uso do termo diferencial. Com essa técnica temos informação dos processos físico e químico envolvendo variação de energia. Nos processos físicos temos a adsorção (exotérmico), desorção (endotérmico), mudança na estrutura cristalina (endo ou exotérmico), vaporização (endotérmico), sublimação (endotérmico) e derretimento (endotérmico). No caso dos processos químicos temos a oxidação (exotérmico), a redução (endotérmico), quimisorção (exotérmico) e reações de estado sólido (endo ou exotérmico). A diferença de temperatura pode ter a unidade de temperatura, como K ou °C, mas também de μV dependendo do processo utilizado para medir a variação de temperatura. Uma conversão entre essas duas unidades pode ser fornecida pelo fabricante do equipamento.

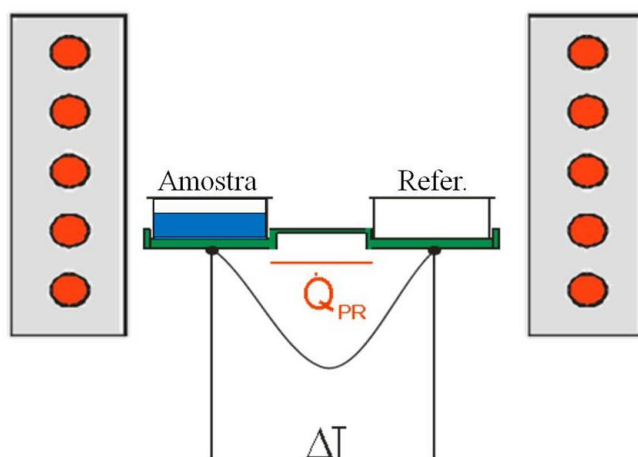


Figura 3.31: Esquema da técnica de análise térmica diferencial em que a temperatura da amostra comparada com uma referência enquanto ambas são aquecidas, modificada de [152].

3.4.10 Dicroísmo circular

Dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica utilizada para medir a estrutura secundária de proteína, peptídeos entre outros. A luz circularmente pola-

rizada, com componentes girando no sentido horário (R, *right handed*) e no sentido anti-horário (L, *left handed*), ao atravessar o meio, pode não ser absorvida, pode ser absorvida de forma igual ou diferentemente por cada componente, tornando-se então elíptica neste último caso.

O equipamento de CD mede a diferença na absorção dos dois componentes ($\Delta A = A_L - A_R$) que será diferente de zero para amostras quirais, como as proteínas. Em geral, as medidas são reportadas em elipticidade (θ), em graus, pelo comprimento de onda da luz incidente. Deve-se notar que $\theta = \tan^{-1}(b/a)$ em que b e a são os eixos menor e maior da elipse resultante. Existe uma relação numérica simples entre ΔA e elipticidade em que $\theta = 32,98\Delta A$. Vale lembrar que na maioria dos casos, o sinal de CD para estudos biológicos é muito pequeno, da ordem de 10 mdeg, que corresponde a uma diferença de absorção de 3×10^{-4} [153].

A elipticidade é medida de acordo com a equação de Beer-Lambert:

$$\Delta A = A_L - A_R = \frac{A_L - A_R}{c * l} \quad (3.17)$$

em que: c é a concentração em mol/L e l é o percurso óptico em cm. Para normalizar os efeitos da concentração e do caminho óptico, usa-se a elipticidade molar $[\theta]$, definida por:

$$[\theta] = \frac{\theta * 100}{c * l} = 3298\Delta A \quad (3.18)$$

e para uma determinada proteína, a elipticidade do resíduo médio $[\theta]_{ERM}$ é calculada por:

$$[\theta]_{ERM} = \frac{\theta * 100}{c * l * n_A} \quad (3.19)$$

em que: n_A é o número de aminoácidos. A unidade de $[\theta]_{ERM}$ é $\text{deg} * \text{cm}^2 * \text{dmol}^{-1}$.

Os espectros de CD das proteínas têm quatro regiões de interesse. São elas: (1) abaixo de 240 nm, devido à contribuições de peptídeos, (2) entre 260-320 nm, devido aos anéis aromáticos, (3) devido à pontes de dissulfeto com bandas fracas e largas

centradas em 260 nm e (4) entre 300-700 nm, devido à presença de cromóforos extrínsecos. A primeira faixa é geralmente a mais empregada nos estudos de alterações conformacionais das proteínas. Os diferentes tipos de estrutura secundária podem ser vistos na Figura 3.32, em que a estrutura α -hélice tem mínimos em 208 nm e 222 nm e a estrutura folha- β com mínimo em 216 nm, [154].

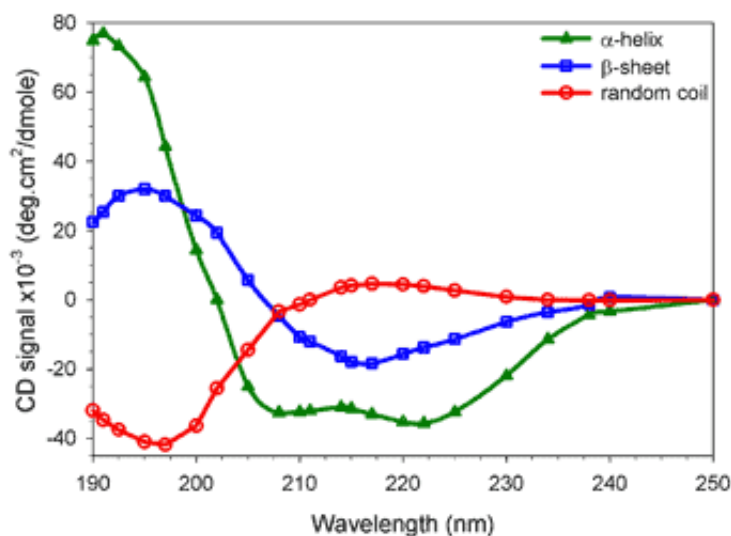


Figura 3.32: Espectro de CD para uma proteína contendo estrutura de α -hélice (verde), folha- β (azul) e aleatória (vermelho) [155].

Existe um grande número de algoritmos que utilizam os dados de espectros de CD para estimar a composição da estrutura secundária das proteínas. Todos os métodos de análise de espectros de CD, no entanto, assumem que o espectro de uma proteína pode ser representado por uma combinação linear dos espectros dos seus elementos estruturais secundários, mais um termo de ruído. Existem dois métodos para avaliar a conformação da proteína. O primeiro utiliza padrões de polipeptídios, com composições definidas em conformações conhecidas que foram determinadas por espalhamento de raios X ou por IR. A segunda utiliza os espectros de proteínas que foram caracterizadas por cristalografia de raios X como padrões para comparação com os espectros de proteínas desconhecidas usando a análise dos

mínimos quadrados, decomposição do valor singular, decomposição de um único valor com seleção variável, método autoconsistente ou análise de rede neural [156].

O dicroísmo circular também pode ser usado para o estudo do efeito de um metal associado à proteína na conformação da mesma. Neste caso faz-se a medida da proteína pura e depois medidas com concentrações variadas do metal. A curva formada no gráfico da diferença entre a elipticidade molar, $\Delta\theta$, em 222 nm entre a proteína com o metal e a proteína pura versus a concentração de metal $[M]$ pode ser ajustada pela seguinte equação:

$$\Delta\theta = \Delta Q_{max} \frac{[M]}{K_d + [M]} \quad (3.20)$$

em que: ΔQ_{max} é a máxima diferença na elipticidade molar e K_d é a constante de dissociação para o complexo proteína-metal que nos fornece a afinidade entre ambos. Quanto menos o valor da constante, maior será a afinidade entre metal-proteína [113].

3.4.11 Imunomarcação

Esta técnica foi baseada nos trabalhos pioneiros de Coons e Kaplan [157, 158] e posteriormente de Mary Osborne [159] e consiste basicamente em associar um anticorpo ao antígeno e incidir luz no sistema. Essa luz irá excitar os elétrons de marcadores fluorescentes que estão associados ao anticorpo, fazendo com que o marcador emita luz ao retornar para o estado fundamental. A fluorescência pode ser quantificada utilizando um citômetro de fluxo ou um instrumento de imagem automatizado e pode ser visualizada por fluorescência ou microscopia confocal. Os marcadores possuem grupos químicos capazes de formar ligações covalentes com moléculas proteicas presentes no antígeno, emitindo fluorescência no espectro visível com coloração distinta da emitida pelo substrato, [160]. Esta técnica, por detectar micro-organismos em amostra e anticorpo específico em células e tecidos, é muito

utilizada em pesquisa e diagnósticos clínicos. Aplicações da mesma inclui a avaliação de células em suspensão, em cultura de células, em tecidos e em grânulos para a detecção de proteínas específicas.

Existem duas formas de marcar os antígenos, direta e indiretamente, que serão explicadas a seguir, [161].

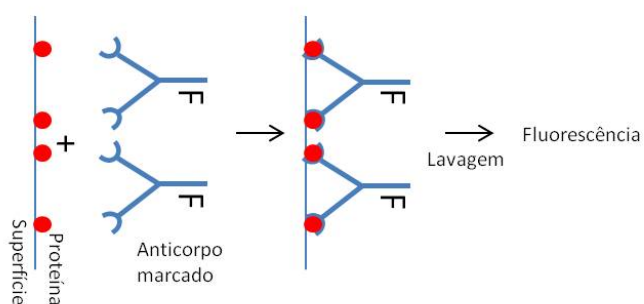
Direta

Anticorpos específicos para o antígeno estudado (seja ele uma proteína, uma célula, entre outros) associados à partículas fluorescentes são adicionados à amostra deixando um tempo de incubação. Após a incubação, a amostra é lavada para a remoção dos anticorpos que não se ligaram em nenhum antígeno. Apesar de esta técnica utilizar somente um tipo de anticorpo e ter um pequeno tempo para a marcação, ela não é muito usada nos laboratórios, pois requer uma quantidade relativamente grande de anticorpos puros e possui um sinal pouco intenso, Figura 3.33a.

Indireta

Neste caso, primeiro o anticorpo específico do antígeno estudado é acoplado ao sistema. Após a incubação, o sistema é lavado, retirando os anticorpos não ligados e só então é colocado um segundo anticorpo que desta vez está acoplado a um marcador fluorescente. Este marcador irá se ligar somente aos primeiros anticorpos, que por sua vez estão associados ao antígeno. Novamente o sistema é deixado reagindo por um tempo para depois fazer a remoção dos anticorpos não ligados. Este método é mais usado pois possui uma amplificação maior do sinal, uma vez que ocorre várias reações secundárias de anticorpo com diferentes antígenos no primeiro anticorpo. Além disso, os anticorpos secundários não são caros, existem em várias cores e podem ser associados a vários anticorpos primários, Figura 3.33b.

Método direto



Método indireto

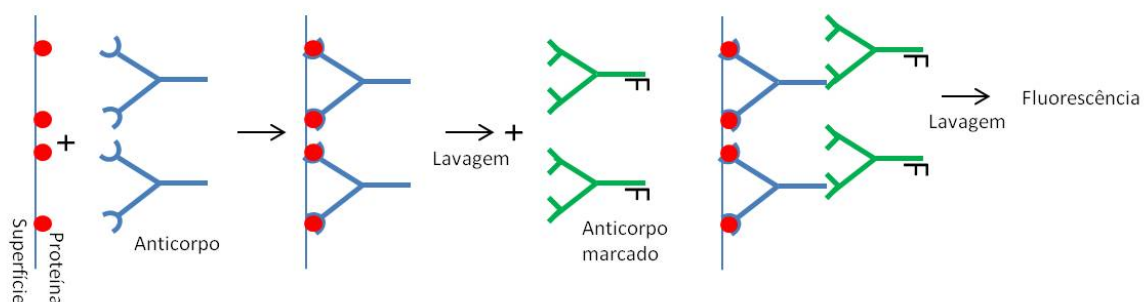


Figura 3.33: Esquema da técnica de imunofluorescência direta e indireta, adaptado de [162].

Capítulo 4

Materiais e Métodos Experimentais

4.1 Síntese da Hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi sintetizada seguindo dois procedimentos. No primeiro, uma solução aquosa de 0,24 M de H_3PO_4 foi adicionada lentamente à solução 0,02 M de $Ca(OH)_2$, a uma taxa de 150 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. Uma vez atingido o pH de 10, a solução foi mantida em agitação durante 36 h à 50 °C. Depois de filtrada e lavada, o pó foi mantido em uma solução com concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em um pH 7,4 que foi mantido usando-se H_3PO_4 . No segundo procedimento, a síntese foi realizada por adição de uma solução aquosa de $(NH_4)_2HPO_4$ em uma solução de $Ca(NO_3)_2$ em pH=12 e temperaturas de 90 °C e 5 °C, a fim de termos HA cristalina e amorfa, respectivamente. Após a adição o meio reacional foi mantido em agitação por 3 horas. Depois de filtrado e lavado, o pó foi mantido em pH 7,4 usando-se NaOH. Em seguida, o pó foi seco por liofilização.

4.2 Síntese da Hidroxiapatita dopada com zinco e estrôncio

As soluções de nitrato de cálcio [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$] e nitrato de estrôncio [$Sr(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$] (nitrato de zinco [$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$]) com concentração total de cátions de 0,2 M foram gotejadas com auxílio de uma bomba peristáltica, fluxo de 4,5 mL/min, em uma solução de fosfato dibásico de amônio [$(NH_4)_2HPO_4$] com concentração de 0,20 M. Neste processo o pH foi mantido em 9,0 ao utilizar hidróxido de amônio concentrado [NH_4OH], a temperatura mantida em 90 °C (para obter pós cristalinos) e agitação mecânica de 240 rpm. Findo o gotejamento, mas mantendo as condições de pH e temperatura, a mistura permaneceu em digestão por 3 horas, sendo então filtrada em funil de Buckner e ressuspensa em água Milli-Q a 90 °C por três vezes até obter pH 7,0 na água de lavagem. O sólido obtido foi liofilizado por 24 horas.

4.3 Síntese do Fosfato Octacálcico

O fosfato octacálcico, $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$, foi produzido pela rota determinada por LeGeros [163] em que 250 mL de solução de fosfato, com concentração de 0,04 M, é gotejada em 250 mL de solução de cálcio, de concentração 0,04 M. O pH da solução é deixada em 6 à 60 °C. A mistura foi mantida em digestão por 4 h e depois filtrada em funil de Buckner. Desta forma temos o OCP cristalino (OCP).

4.4 Produção de filmes de hidroxiapatita em substrato de titânio

Substratos de titânio de 12,7 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura foram lixados, polidos e lavados com água deionizada e acetona em ultrassom durante

15 min antes do crescimento do filme. A produção de filmes de hidroxiapatita foi realizada utilizando-se a técnica de Magnetron Sputtering de Alvos Opostos, RAMS (*Right Angle Magnetron Sputtering*), desenvolvida no CBPF [164]. Neste sistema o substrato fica posicionado em um ângulo reto em relação ao eixo dos dois magnetrons e os alvos são colocados face a face. Esta geometria induz o confinamento do campo magnético no plasma, e aumenta a taxa de deposição, além de evitar o *backsputtering* presente nas técnicas tradicionais de RAMS [165–167].

Os filmes foram produzidos à potência de 120 W, a altura do porta-amostra com respeito aos magnetrons foi de 29 mm, pressão de gás argônio de 5 mTorr e de gás oxigênio de 1 mTorr e o tempo de deposição foi controlado para ter uma espessura de 540 nm. Duas séries de filmes, HAF1 e HAF2, foram produzidas com taxa de deposição de 6 nm/min e de 3 nm/min. Essa diferença na taxa de deposição ocorreu, pois entre uma série e outra foi necessário trocar o alvo e cada vez que abre o sistema, a taxa de deposição varia. A primeira série (HAF1) foi utilizada para os experimentos de adsorção com a insulina bovina e a segunda série (HAF2) para os experimentos com a insulina humana. Como os filmes produzidos eram parcialmente amorfos, foi feito um tratamento térmico à 400 °C durante 2 h com rampa de aquecimento de 3 °C por minuto. Este procedimento transformou as fases amorfas em hidroxiapatita com alto grau de cristalinidade.

4.5 Preparação da Osteocalcina e Insulina

A osteocalcina foi sintetizada nos laboratórios da NESAC/BIOdo departamento de Bioengenharia da Universidade de Washington, EUA, a partir da síntese dos peptídeos em fase sólida, usando o procedimento Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo). A autenticidade da proteína foi estabelecida por espectrometria de massa de *electrospray* e caracterizada por dicroísmo circular. Foram produzidas duas diferentes amostras de osteocalcina: com os três Gla (forma nativa) e sem nenhum Gla, cha-

mada aqui de osteocalcina descarboxilada (dOC).

Por sua vez, tanto a insulina humana (recombinante - I9278) quanto a bovina (proveniente do pâncreas - I0516) foram adquiridas diretamente pela Sigma Aldrich [168], na forma de solução, na concentração de 10 mg/mL. As fichas de especificação de cada insulina encontra-se em anexo no final da tese.

4.6 Adsorção da Osteocalcina na Hidroxiapatita

Como a osteocalcina depende da presença do cálcio para apresentar sua estrutura secundária, comparamos como é a adsorção da osteocalcina nativa (hOC) e a descarboxilada (hdOC) na ausência (Si) e na presença de cálcio (HAp).

A adsorção das amostras de osteocalcinas (nativa e descarboxilada) humanas em pó de hidroxiapatita, foi feita a partir de soluções das proteínas com concentração igual a 0,3 mg/mL, pH 7,4 usando tampão Tris 20 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl. 0,2 mg de pó de fosfato de cálcio (HAp, HAp90, HAp5 e OCP) foi adicionado à 200 μ L da solução de proteína agitando por 3 h em temperatura ambiente. Após a adsorção, o pó de hidroxiapatita foi lavado com tampão Tris (2 vezes) e água Milli-Q (3 vezes). Uma suspensão do pó (50 μ L) foi gotejada sobre um substrato de silício e exposta a fluxo de ar por 12 horas. Depois de seco, o pó depositado no substrato de silício foi guardado em atmosfera de nitrogênio para posterior caracterização por XPS e ToF-SIMS.

A osteocalcina foi também adsorvida em substrato de silício. Neste procedimento, 500 μ L da solução de proteína foi colocada diretamente sobre o substrato na temperatura ambiente, por 3 h. Após a adsorção, o substrato foi lavado duas vezes com solução tampão e três vezes com água Milli-Q e seco com gás de nitrogênio.

4.7 Adsorção da Insulina na Hidroxiapatita

Amostras de insulina bovina e humana foram adsorvidas em pós de HA, ZnHA e SrHA e filmes finos de HA depositados em substrato de Ti. Os experimentos foram realizados utilizando-se solução tampão Tris 0,01 M, pH 6,4, sem insulina e com insulina em concentrações de (0,01, 0,05, 0,10, 0,30, 0,50, 0,80 1,00 e 1,20) mg/mL.

Previamente à adsorção, o pó das diferentes HAs foi colocado em solução de tampão Tris por 30 min para hidratação. Após a hidratação, 0,2 mg de hidroxiapatita foi adicionado em 200 μ L da solução contendo diferentes concentrações de insulina humana. Este sistema foi deixado sob agitação a temperatura ambiente, por 3 h. O processo de lavagem e secagem foi similar ao descrito para a osteocalcina. Os experimentos de adsorção foram feitos em triplicata.

A adsorção da insulina bovina e humana nas duas séries de filmes finos de hidroxiapatita, HAF1 e HAF2, depositados em substratos de titânio foi realizada em triplicata em porta-amostras de cultura celular de 24 poços contendo 400 μ L de solução Tris com a concentração desejada da proteína. Os filmes permaneceram em contato com a solução por 3 horas. Após a adsorção, os filmes foram lavados duas vezes com tampão Tris 0,01 M, pH 6,4, e três vezes com água Milli-Q por 1 minuto com auxílio de um agitador. Após a lavagem, o substrato foi submetido a um fluxo de ar comprimido para sua secagem.

4.8 Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X (XPS)

Dois equipamentos de XPS foram utilizados neste trabalho para a análise das amostras em contato com solução tampão Tris e adsorvidas com proteínas: i) um *S-Probe* da *Fisons Instruments* do laboratório NESAC/BIO no departamento de

Bioengenharia da Universidade de Washington, EUA, e ii) um SPECS do laboratório de Superfícies e Nanoestruturas do CBPF.

O XPS *S-Probe* da *Fisons Instruments*, do laboratório NESAC/BIO em Seattle-EUA, é equipado com uma fonte de raios x monocromático Al K α e um analisador semiesférico com um *take-off* de 55°. O pico do carbono (C 1s) em 284,6 eV foi usado como referência para a calibração do espectro. Para todas as amostras, a energia da fonte de raios X foi de 10 kV e a potência de 200 W. O espectro contendo todos os elementos (*survey*) foi feito com 150 eV de Epass (energia usada para acelerar os elétrons ao chegarem no analisador) e 1,0 eV como passo de energia. Para os elementos de interesse foram realizadas dois tipos de varredura: uma com o passo de 0,4 eV e Epass de 150 eV e outra com alta resolução com Epass de 50 eV e passo de 0,065 eV. O espectro do elemento carbono foi obtido em alta resolução uma vez que ele é usado para a calibração dos espectros dos demais elementos.

O equipamento SPECS do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas usa uma fonte de raios X não monocromático de Al K α e um analisador semiesférico com um *take-off* de 30°. O pico do carbono (C 1s) em 284,6 eV foi usado como referência para a calibração do espectro. O espectro geral *survey* e os de alta resolução foram feitos com Epass de 15,5 eV e um passo de energia de 0,5 eV e 0,02 eV, respectivamente. No caso das amostras HAp90, ZnHA e SrHA, este equipamento também foi utilizado para analisar as amostras antes do tratamento com solução tampão Tris 0,01 M, pH 6,4.

4.9 Espectroscopia de Massas de Íons Secundários por Tempo de Voo (ToF-SIMS)

As medidas de ToF-SIMS foram feitas usando um *ION-TOF 5-100*, do laboratório NESAC/BIO em Seattle-EUA, com o pulso da fonte de íon Bi³⁺ primária de

25 keV. A dose dos íons usada para adquirir a medida foi $< 9 \times 10^{11}$ íons/cm². A área analisada em cada espectro foi de (100 x 100) μm² e o espectro foi adquirido usando 5 pontos em cada amostra. Foram coletados somente os íons positivos porque os íons negativos não fornecem informações relevantes para o estudo de proteínas. O espectro foi calibrado usando o seguinte conjunto de fragmentos CH^3+ , C_2H^3+ , C_3H^5+ , $C_2H_6N^+$ e $C_3H_3O^+$. Todos os procedimentos usando PCA foram realizados usando o software livre SPECTRAGUI desenvolvido no laboratório NESAC/BIO [169].

4.10 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de hidroxiapatita em pó sem contato com solução tampão, após 3 h em solução tampão Tris 0,01 M, pH 6,4, e após a adsorção de insulina (concentração de 0,5 mg/mL e 1,2 mg/mL), foram analisadas na forma de pastilha misturada com KBr na proporção de KBr/HA=5 para maximizar o sinal da proteína. Os espectros de FTIR foram obtidos com um espectrofotômetro Shimadzu IR-Prestige-21/AIM-880, no intervalo de (4000-400) cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 500 varreduras por amostra.

Os espectros antes e após o tratamento com solução tampão Tris foram deconvolucionados, usando a curva Lorentz para o ajuste e o programa OriginPro8, na região de 750-450 cm⁻¹ a fim de analisar se outras fases de fosfato de cálcio são encontradas na estrutura das apatitas. Essa deconvolução foi sugerida por Iafisco *et al*, [170].

Os filmes finos foram analisados pela técnica de Refletância Total Atenuada (ATR) utilizando um microscópio (modelo AIM8800) acoplado ao sistema. Os espectros foram obtidos entre 4000 cm⁻¹ e 750 cm⁻¹ com 300 varreduras por amostra. Todos os espectros foram tratados com correção de ar atmosférico, linha base e

smooth pelo programa IR Solution do próprio equipamento.

4.11 Difração de Raios X (DRX)

Utilizou-se para o experimento de difração de raios X um equipamento X-Pert Pro da Panalytical do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas. As medidas de raios X foram executadas em incidência rasante com ângulo θ de incidência fixado em 3 graus, e 2θ variando de $7^\circ < 2\theta < 60^\circ$, com passo de 0,02 graus e tempo de detecção de 50 s por grau a fim de diminuir o sinal do substrato, uma vez que as amostras de pó analisadas formavam um fino filme sobre um substrato de silício.

O tamanho médio de cristalito (D_v , em nm) ao longo de (002) foi determinado através da medida da largura a meia altura e posição do pico de difração utilizando a equação de Scherrer [171]:

$$D_v = \frac{k\lambda}{\beta_{hkl} \cos \theta_{hkl}} \quad (4.1)$$

em que: k é o fator de forma e vale 0,89, λ é o comprimento de onda dos raios X, que para a radiação Cu K α tem o valor de 0,154056 nm, β_{hkl} é a largura de linha a meia altura (em nm) e θ_{hkl} é o ângulo de Bragg ($^\circ$) do pico de difração do plano hkl desejado.

O parâmetro de rede das amostras de HAp5, HAp90, ZnHA e SrHA que tem uma rede hexagonal foi calculado através da equação da distância interplanar (d_{hkl}) de uma rede hexagonal [172]

$$\frac{1}{D_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (4.2)$$

e da equação de Bragg (Equação 3.11). O que nos fornece a seguinte equação:

$$\sin^2 \theta_{hkl} = \frac{\lambda^2}{4} \left[\frac{4}{3} \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \right] \quad (4.3)$$

Com esta equação e usando o programa OriginPro8 foi possível determinar os valores de $a = b$ e c . No caso da OCP, por ter uma rede triclinica, com distância interplanar

dada por:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{1}{V^2} \left[\begin{array}{c} h^2 \cdot b^2 \cdot c^2 \cdot \sin^2 \alpha + k^2 \cdot a^2 \cdot c^2 \cdot \sin^2 \beta \\ + l^2 \cdot a^2 \cdot b^2 \cdot \sin^2 \gamma + 2 \cdot h \cdot k \cdot a \cdot b \cdot c^2 \cdot (\cos \alpha \cdot \cos \beta - \cos \gamma) \\ + 2 \cdot k \cdot l \cdot a^2 \cdot b \cdot c \cdot (\cos \beta \cdot \cos \gamma - \cos \alpha) \\ + 2 \cdot h \cdot l \cdot a \cdot b^2 \cdot c \cdot (\cos \alpha \cdot \cos \gamma - \cos \beta) \end{array} \right] \quad (4.4)$$

em que o volume é dado por:

$$V = a \cdot b \cdot c \left(\frac{1 - \cos^2 \alpha - \cos^2 \beta - \cos^2 \gamma + 2 \cdot \cos \alpha \cdot \cos \beta \cdot \cos \gamma}{2} \right)^{1/2} \quad (4.5)$$

foi impossível determinar de forma simples os valores de a , b , c , α , β e γ , sendo necessário um programa mais sofisticado para tal cálculo.

4.12 Análise Química

Para as medidas de Ca, Zn e Sr, foi usada a técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica em Chama de Air- C_2H_2 . Neste caso 0,1 g da amostra foi solubilizada em 100 mL de HNO_3 5 % e as medidas foram feitas nos comprimentos de onda específicos de cada material (Ca=422,7 nm, Sr=460,7 nm e Zn=213,9 nm). O equipamento utilizado foi o AAS-6800 da Shimadzu.

O fósforo foi analisado tratando uma alíquota da amostra em solução vanadomolibdica, medindo a absorbância do complexo formado em 420 nm, pelo método de Espectrofotometria de UV-Vis. Neste caso o equipamento é um UV-Vis Spectrophotometer-2450 também da Shimadzu. A curva de calibração é feita com padrões Merck 99,99 % puro.

4.13 Tamanho de Partícula e Propriedades Texturais

4.13.1 Tamanho de partícula

O equipamento utilizado para a medida de tamanho de partícula foi o SALD-2201 da Shimadzu, cuja faixa de medição varia de 0,03 μm a 1000 μm . As amostras foram dispersas em água sem nenhum tipo de processamento das mesmas. A concentração de amostra utilizada foi tal que a absorbância estivesse entre 0,1 e 0,2.

4.13.2 BET

As análises de área superficial, tamanho e volume de poro foram realizadas utilizando-se o equipamento ASAP 2020 (Surface Area and Porosity Analyzer) da Micromeritics. Antes das amostras serem analisadas, elas foram submetidas à temperatura de 350 °C com o intuito de remover moléculas de água e outras contaminações que pudessem estar adsorvidas sobre as suas superfícies. O método empregado nas análises foi o de adsorção de nitrogênio gasoso (alta pureza), utilizando-se banho de nitrogênio líquido em condições criogênicas ($T = -196\text{ °C}$). A pressão relativa variou de 0,01 a 0,30.

4.14 Potencial Zeta

O experimento de potencial zeta foi realizado em um equipamento Zetasizer Nano ZS90, pertencente ao laboratório LNBio em Campinas-SP, equipado com a técnica M3-PALS à 25 °C. Todas os pós, com e sem proteína foram lavados, diluídos e suspensos em solução de KCl 0.001 M, pH 6,0. A solução com o pó foi colocado até encher completamente a cubeta Folded Capillary Zeta Cell DTS1060/61. Todas

as medidas foram feitas usando o procedimento padrão de operação do equipamento.

4.15 Análise Térmica

As análises térmicas foram realizadas em um equipamento de Analisador Térmico modelo DTG-60 da Shimadzu. As amostras foram aquecidas até 800 °C em uma taxa de aquecimento de 7 °C/min. Para a análise de DTA, a amostra de referência foi o próprio forno.

4.16 Dicroísmo Circular

Espectros de dicroísmo circular foram gerados com um espectropolarímetro Jasco J-810 operando de 190 a 260 nm, no laboratório NUMPEX-Bio na UFRJ. Uma cubeta de quartzo de 1 mm de espessura foi usada para os experimentos realizados à 25 °C. Um total de 10 acumulações foi usado para a medida de cada material. Para diminuir o ruído da medida e deixar a solução o mais transparente possível, depois de lavar os 10 mg dos pós usado na adsorção (feita nas mesmas condições explicadas anteriormente), os mesmos foram resuspendidos em 4 mL de água Milli-Q. O espectro foi analisado por um software aberto, DICHROWEB, usando o método CDSSTR a fim de quantificar a estrutura secundária da proteína antes e depois da adsorção de insulina, [173–175].

Já no caso da osteocalcina, espectros de CD foram gerados com um espectropolarímetro Jasco J-720 usando uma cubeta de quartzo de 1 mm de espessura a 22 °C. Um total de 8 acumulações foi usado para gerar o espectro. Todas as amostras foram preparadas em tampão Tris 20 mM contendo 150 mM NaCl em pH 7,4. Osteocalcina na concentração de 20 μ M foi encubada a 25 °C com várias concentrações de Ca^{2+} variando de 0,1 mM a 5 mM. Os espectros foram obtidos para hOC e hdOC pura e depois da adição de solução de Ca^{2+} . Para cada adição de Ca^{2+} , a solução foi

incubada por 5 min antes das medidas. Todos os espectros foram coletados usando uma largura de banda de 2 nm e depois da correção do solvente.

Para poder comparar todas as amostras, com concentrações diferentes, os gráficos foram apresentados na forma de elipticidade residual média $[\theta]$ e para isso os dados gerados que estavam em miligraus foram convertidos para a elipticidade residual média usando a seguinte equação:

$$[\theta] = \theta / (C * n * l) \quad (4.6)$$

em que: $[\theta]$ é a elipticidade residual média em $\text{deg} * \text{cm}^2 * \text{dmol}^{-1}$, θ é o dado gerado em miligraus, C é a concentração da proteína em M, n é o número de aminoácidos e l é a espessura da cubeta em mm.

4.17 Imunomarcção

Após a adsorção das insulinas bovina e humana nos filmes HAF1 e HAF2, respectivamente, as moléculas foram marcadas com o anticorpo primário anti-insulina em concentração de [1:300]. Após um período de incubação de 4 h as amostras foram lavadas cinco vezes por 5 min com solução tampão PBS (pH 7,4). Uma vez removido os anticorpos não ligados à insulina, foi feita uma segunda incubação, por 1 h, com o anticorpo secundário Alexa 488, em concentração de [1:500]. O mesmo processo de lavagem foi feito para a remoção dos anticorpos não ligados. As pastilhas foram então montadas em Antifade (DABCO). As amostras foram analisadas usando o microscópio de imunofluorescência (microscópio invertido da ZEISS AxioObserver A1) com filtro *band pass* de 590 nm. As imagens capturadas foram processadas utilizando o programa ZEN Lite 2012 (blue edition).

Capítulo 5

Resultados

5.1 Caracterização Físico-Química dos Fosfatos de Cálcio

Caracterização do material, tanto interior quanto exterior (superfície) foi feita com o intuito de conhecer o material como um todo e entender como a superfície pode ser diferente do interior. Para isso medidas de espectrofotometria, análise térmica, XRD, FTIR, BET, tamanho de partícula e XPS foram realizadas.

5.1.1 Composição Química

A composição química das amostras HAp90, HAp5, OCP, ZnHA e SrHA é mostrada na Tabela 5.1. Vale aqui ressaltar que todos os experimentos foram realizados com substratos produzidos no mesmo lote, para evitar possíveis alterações morfológicas entre uma síntese e outra. A hidroxiapatita HAp90 sintetizada a 90 °C apresenta uma razão Ca/P próxima à da HA estequiométrica (1,67) enquanto a amostra sintetizada a 5 °C é fortemente deficiente em Ca (Ca/P=1,56). Este último resultado sugere que a HAp5 pode apresentar outra fase cristalina, com diferente

estequiometria e por isso razão Ca/P bem abaixo de 1,67. A amostra de octacálcio fosfato apresenta uma razão Ca/P superior à esperada para uma amostra de OCP em estequiometria ideal (Ca/P=1,33). Apesar das amostras ZnHA e SrHA terem sido sintetizadas nas mesmas condições de temperatura, pH, velocidade de agitação e a partir de soluções contendo 5 % molar dos metais verifica-se que os conteúdos de Zn, $\text{Zn}/(\text{Ca}+\text{Zn})=0,049$, e Sr, $\text{Sr}/(\text{Ca}+\text{Sr})=0,021$, na estrutura da HA são diferentes sugerindo uma maior afinidade da HA pelo Zn. O valor de $(\text{Ca}+\text{Sr})/\text{P}=1,697$ próximo ao valor estequiométrico, para a amostra de SrHA sugere que o estrôncio substituiu o cálcio na estrutura da hidroxiapatita, enquanto que para ZnHA, $(\text{Ca}+\text{Zn})/\text{P}=1,725$ bem maior que o estequiométrico, há uma ocupação de outros sítios, além do sítio do Ca.

Tabela 5.1: Resultados da análise química para os materiais estudados.

	Mol Ca	Mol P	Mol Metal	Ca/P	(Ca+M)/P	M/Ca
HAp90	0,99	0,59		1,678		
HAp5	0,95	0,61		1,557		
OCP	0,80	0,54		1,481		
ZnHA	0,96	0,58	0,05	1,655	1,741	0,049
SrHA	0,92	0,56	0,02	1,643	1,679	0,021

Para a análise térmica temos que no intervalo de temperatura ambiente até 200 °C, existe água fisicamente adsorvida na superfície da amostra por meio de interações de Van der Waals, que é uma ligação de longo alcance, mas fraca. Já entre 200-600 °C há água quimicamente adsorvida, formando ligações químicas com a estrutura, normalmente do tipo covalente. Entre 600-800 °C é identificada a presença de impurezas estruturais, como a formação de CO_3^{2+} . As análises térmicas mostraram que a HAp5 contém mais água fisicamente adsorvida, da temperatura ambiente até 200 °C, (6,48 %) do que os demais materiais, sendo que a HAp90 foi a amostra com

menos quantidade de água fisicamente adsorvida (2,75 %). Como todas as amostras são cristalinas, com exceção da HAp5 que tem seu grau de cristalinidade reduzido, esse resultado já era esperado. Neste processo todas as amostras apresentaram uma reação endotérmica, sendo que a SrHA, ZnHA e HAp5 apresentaram picos em $\sim 45^\circ\text{C}$ e $\sim 77^\circ\text{C}$, com todas as amostras apresentando picos próximos dessa última temperatura. Entre (200-600) $^\circ\text{C}$ toda a água quimicamente adsorvida é evaporada através da reação $\text{OH}^- + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{H}_2\text{O}$. Neste caso as amostras de ZnHA (3,92 %) e a OCP (3,93 %) apresentaram a mesma perda de água, apesar dos processos serem diferentes, uma vez que para a ZnHA houve um pico grande exotérmico em $\sim 338^\circ\text{C}$ com perda abrupta de massa e um pequeno em 455°C com pequeno ganho de massa, devido provavelmente à oxidação, e para a OCP houve apenas uma banda endotérmica larga com centro em $\sim 430^\circ\text{C}$. Como na estrutura cristalina da OCP, há presença de camadas hidratadas intercaladas com as camadas de apatita, é esperado que a mesma tenha uma maior quantidade de água quimicamente adsorvida sendo liberada. Novamente a HAp90 (2,38 %) foi a que menos tinha água quimicamente adsorvida em sua estrutura. A introdução do zinco acarretou na presença de mais água tanto fisicamente (5,45 %) quanto quimicamente (3,92 %) adsorvida se comparada com a substituição por estrôncio (3,95 e 2,82 %, respectivamente). Este resultado pode ser explicado pelo fato da ZnHA apresentar maior quantidade de Zn substituído do que a SrHA, mostrando que a quantidade de metal presente na estrutura é importante para a adsorção da água. Para a SrHA houve uma variação de perda e ganho de massa nessa região, sendo todo o processo endotérmico. No total, considerando toda a água adsorvida, a HAp5 foi a que mais perdeu água (9,83 %) e novamente a HAp90 foi a que menos perdeu (5,13 %). De 600°C a 800°C , o que ocorre é a perda de CO_3^{2-} ou mudança na estrutura/composição das amostras. Neste caso, a SrHA (0,05 %) foi a que menos perdeu massa, apesar de um processo exotérmico em $\sim 731^\circ\text{C}$ com pequeno ganho de massa e a OCP (0,67 %) a que mais

perdeu, Figura 5.1a-e, Tabela 5.2, [176–178].

Tabela 5.2: Porcentual de massa perdida por cada amostra para faixas de temperatura. RT significa temperatura ambiente.

Amostra	RT-200 °C	200-600 °C	600-800 °C	RT-800 °C
HAp90	2,75 %	2,38 %	0,40 %	5,53 %
HAp5	6,48 %	3,35 %	0,66 %	10,49 %
OCP	4,86 %	3,93 %	0,67 %	9,46 %
ZnHA	5,45 %	3,92 %	0,49 %	9,86%
SrHA	3,95 %	2,82 %	0,05 %	6,82 %

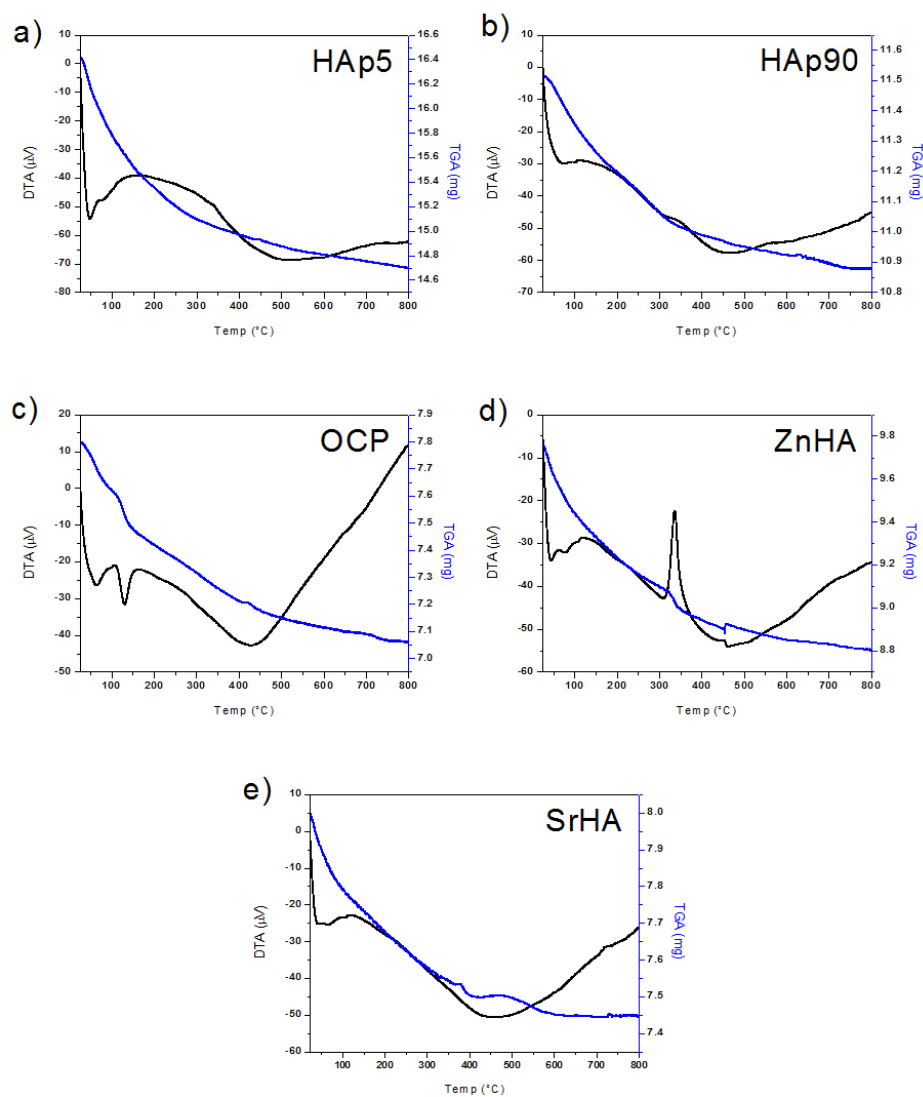


Figura 5.1: Gráfico de TGA e DTA em função da temperatura para as amostras de a) HAp5, b) HAp90, c) OCP, d) ZnHA e e) SrHA.

5.1.2 Estrutura e fases cristalinas

Os padrões de XRD das amostras HAp90, HAp5, ZnHA e SrHA, Figura 5.2, são constituídas por picos característicos da estrutura da hidroxiapatita (ICCD: 01-084-1998). Fases cristalinas de outros fosfatos de cálcio não foram detectadas. Isso mostra que a baixa razão $\text{Ca/P}=1,56$ para a amostra HAp5 indica apenas uma deficiência em Ca na estrutura da amostra.

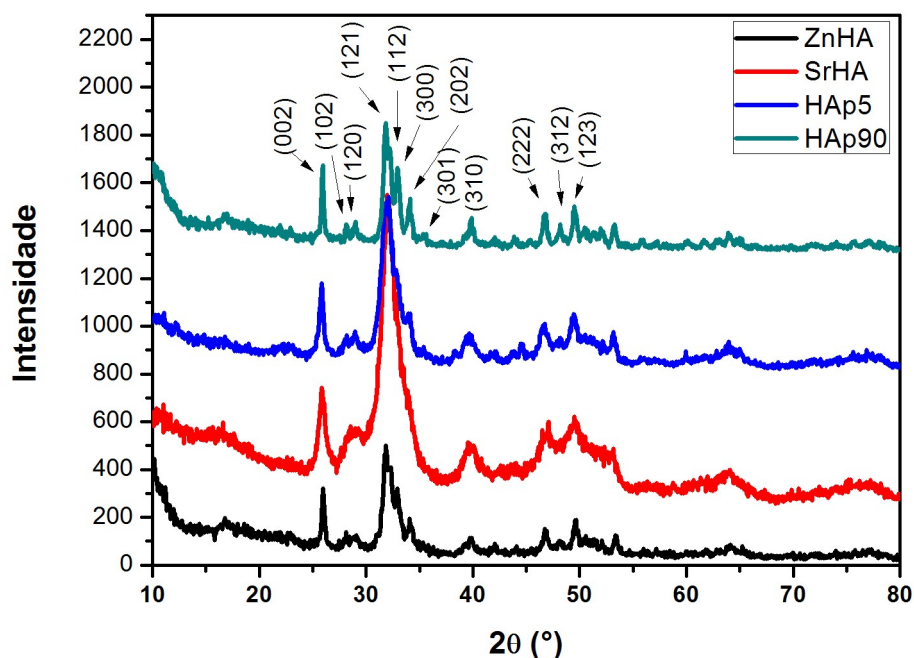


Figura 5.2: Padrão de difração da ZnHA, SrHA, HAp5 e HAp90 mostrando as fases da hidroxiapatita.

A HAp90 apresenta maior ordem cristalina de longo alcance (42 nm) que a amostra HAp5 (31 nm) ao longo do eixo “c”, direção principal de simetria da HA, Tabela 5.3. Esta tabela indica que a diminuição da temperatura de síntese diminui a cristalinidade do material e/ou o tamanho de cristalito. Estas mudanças não se refletem em diferenças nos parâmetros de célula unitária $a = b$ e c , como mostra a Tabela 5.4. Dentro do erro experimental as amostras HAp90 e HAp5 possuem

parâmetros de célula unitária similares, típicas de uma hidroxiapatita.

Tabela 5.3: Posição (θ), largura de linha a meia altura (β) do pico referente ao plano (002) e tamanho de cristalito (D_v) de cada amostra.

Amostras	θ_{002}	β_{002}	D_v
HAp5	25,82	0,527	32
HAp90	25,83	0,396	42
ZnHA	25,92	0,471	36
SrHA	25,81	0,409	41
OCP	25,99	0,335	52
HAF1	25,74	0,400	41
HAF2	25,81	0,385	43

Tabela 5.4: Parâmetros de rede dos pós e dos filmes estudados.

Amostras	c (nm)	a=b (nm)
HAp5	0,689	0,942
HAp90	0,689	0,942
ZnHA	0,686	0,941
SrHA	0,689	0,944
HAF1	0,691	0,942
HAF2	0,690	0,941

Para a amostra HAp, o padrão adquirido foi comparado com a fase da HA (ICDD: 00-009-0432), traços pretos, do hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$ - ICDD: 00-004-0733), traços vermelhos, e do ácido fosfórico (H_3PO_4 - ICDD: 00-025-0378), traços azuis, e como podemos ver na Figura 5.3 o padrão tem os mesmos picos da HA, mostrando portanto ser realmente uma hidroxiapatita cristalina pura.

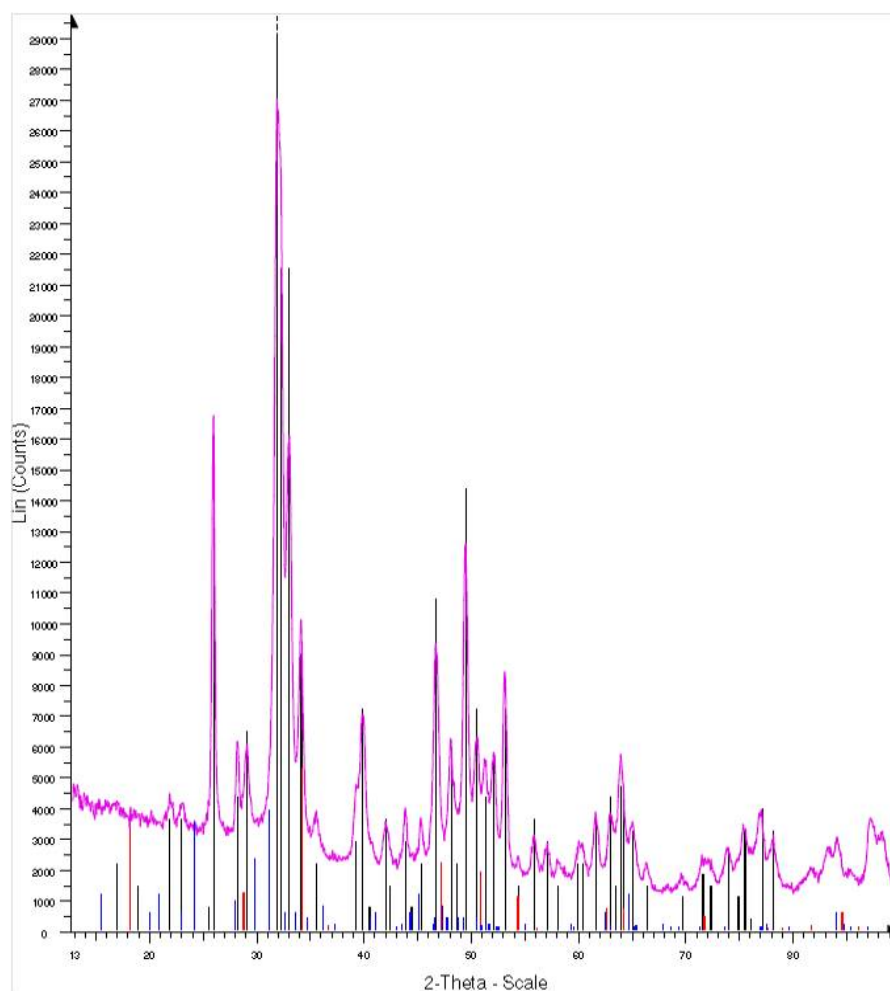


Figura 5.3: Padrão de difração da HAp com os traços gerados pelos padrões conhecidos da HA (em preto), do hidróxido de cálcio (em vermelho) e do ácido fosfórico (em azul).

A substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} não afetou a cristalinidade da amostra, Tabela 5.3, com valor médio de tamanho de cristalito de 42 nm e 41 nm para HAp90 e SrHA, respectivamente. Por outro lado, a amostra de ZnHA apresenta picos mais largos, o que implica em menor cristalinidade, cristalitos com 36 nm de diâmetro. Isso sugere que o Sr não influencia a cristalização da apatita, enquanto o Zn inibe o crescimento do cristal, [179] ou que a substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} foi pe-

quena, $\text{Ca}/(\text{Ca}+\text{Sr}) \cdot 100\% = 2\%$, não sendo suficiente para alterar a cristalinidade do material. Por outro lado, como a substituição por Zn^{2+} foi 2,5 vezes maior, $\text{Ca}/(\text{Ca}+\text{Zn}) \cdot 100\% = 5\%$, essa maior quantidade de Zn é suficiente para afetar negativamente a cristalinidade do filme. Verifica-se também que a amostra ZnHA e SrHA possui parâmetro “c” menor e “a” maior, respectivamente, do que o da HAp90 e HAp5 reforçando a hipótese da substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} e pelo Sr^{2+} , pois o zinco possui raio iônico menor que o do cálcio e o estrôncio raio iônico maior, Tabela 5.4. Tendências iguais, em que os parâmetros de rede aumentam com a substituição do Ca^{2+} por Sr^{2+} e diminuem quando a substituição é pelo Zn^{2+} são encontradas na literatura: Stanic V *et al*, encontraram que quando a substituição de Zn é da ordem de 4 %, os parâmetro de rede não se alteraram, mas quando essa substituição aumentou para 40 %, “c” diminuiu, [179]. Já Querido W. *et al*, acharam que com uma substituição de 9 % de Ca^{2+} por Sr^{2+} , os parâmetros “a” e “c” aumentaram, mas quando a substituição é de apenas 2 % não há diferença significativa nos parâmetros de rede [46].

A amostra de octacálcio fosfato, Figura 5.4, apresenta somente picos da fase OCP (ICDD: 01-074-1301) com tamanho de cristalito maior que o da HAp90, ou seja, a OCP apresenta maior cristalinidade, 52 nm.

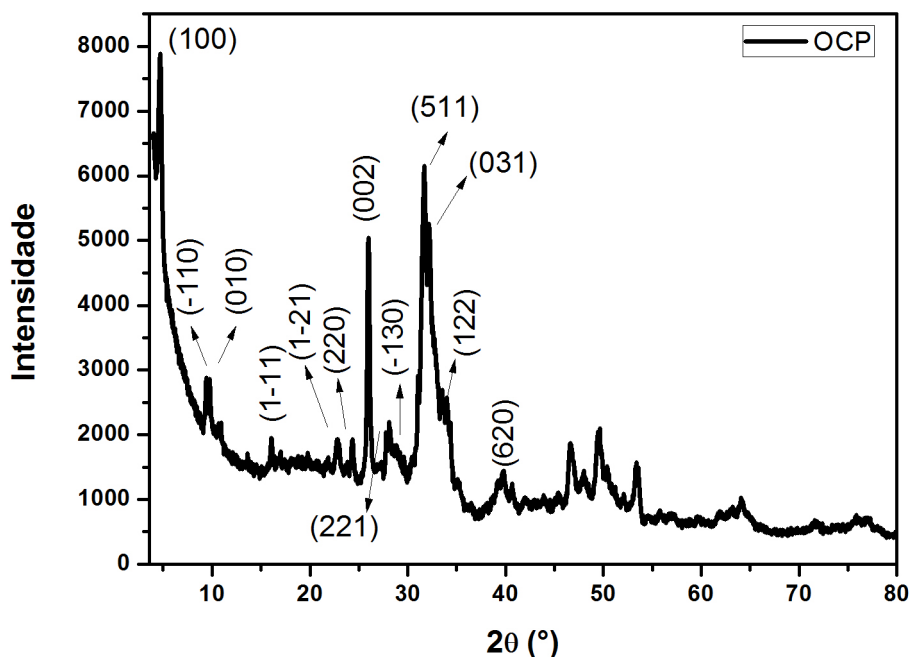


Figura 5.4: Padrão de difração da OCP mostrando somente planos da OCP.

Os filmes de HA depositados em substrato de titânio conforme procedimento descrito no Item 4.4 apresentam padrões de difração similares e típicos de uma HA, Figura 5.5. Ambos os filmes são cristalinos após o tratamento em tampão Tris apresentando ordem de longo alcance de 41 nm para a HAF1 e 43 nm para a HAF2, ao longo do eixo “c” da HA, Tabela 5.3. Estes valores são similares ao encontrado na amostra de HAp90. Apesar da mesma ordem de cristalinidade da HAp90, o filme HAF1 apresenta uma orientação preferencial no plano (002), o que não ocorre para os pós e para o filme HAF2, mostrando que a taxa de deposição pode afetar o crescimento do filme.

O ajuste para o caso dos filmes mostrou que o parâmetro “a” diminuiu nas duas sequências de filmes, o que pode ser uma consequência de tensões existentes quando o material está na forma de filme, Tabela 5.4.

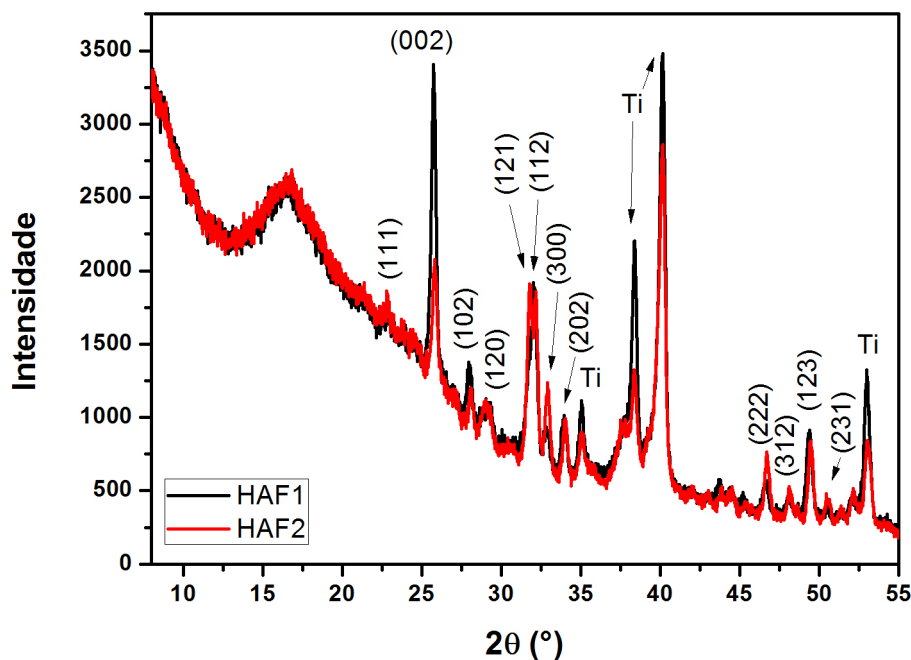


Figura 5.5: Padrão de difração dos filmes de HA depositados sobre titânio, aquecido a 400 °C e posteriormente tratadas com tampão Tris. Em cores preta e vermelha filmes utilizados nos experimentos de adsorção da insulina bovina (HAF1) e humana (HAF2), respectivamente.

As medidas de FTIR foram feitas em duas etapas: i) o pó como preparado, sem nenhum tratamento específico e neste caso medimos a hidroxiapatita estequiométrica (HAp90) e substituída com Zn (ZnHA) e Sr (SrHA) e ii) os pós após o tratamento de 3 h com a solução tampão sem proteína. Isto foi feito para entendermos qual a influência do tampão na estrutura do pó.

Como podemos ver na Figura 5.6a, o espectro de todas as amostras apresentam bandas largas em 1641 cm^{-1} e 3440 cm^{-1} que são associadas a moléculas de água estrutural e adsorvida nas apatitas, respectivamente. Modos vibracionais dos grupos hidroxilas (OH^-) foram encontrado em 3567 cm^{-1} (estiramento) e em 631

cm^{-1} (vibração). Estes grupos se encontram ao longo do eixo “c” da estrutura da HA. Todas as amostras também apresentaram os modos vibracionais ν_1 , ν_3 e ν_4 dos grupos PO_4^{3-} em $963\text{ }cm^{-1}$, $1095/1034\text{ }cm^{-1}$ e $603/563/574\text{ }cm^{-1}$, respectivamente. O espectro de todas as três amostras também mostrou um ombro em $1220\text{ }cm^{-1}$ e em $876\text{ }cm^{-1}$ atribuído ao modo vibracional do grupo PO-H e HO_4P^{-2} , respectivamente [180,181]. Por último, uma pequena banda na região de $1400\text{-}1500\text{ }cm^{-1}$ foi encontrada e associada ao grupo carbonato na estrutura da hidroxiapatita. Este resultado sugere então a formação de fases não apatíticas na estrutura da HA.

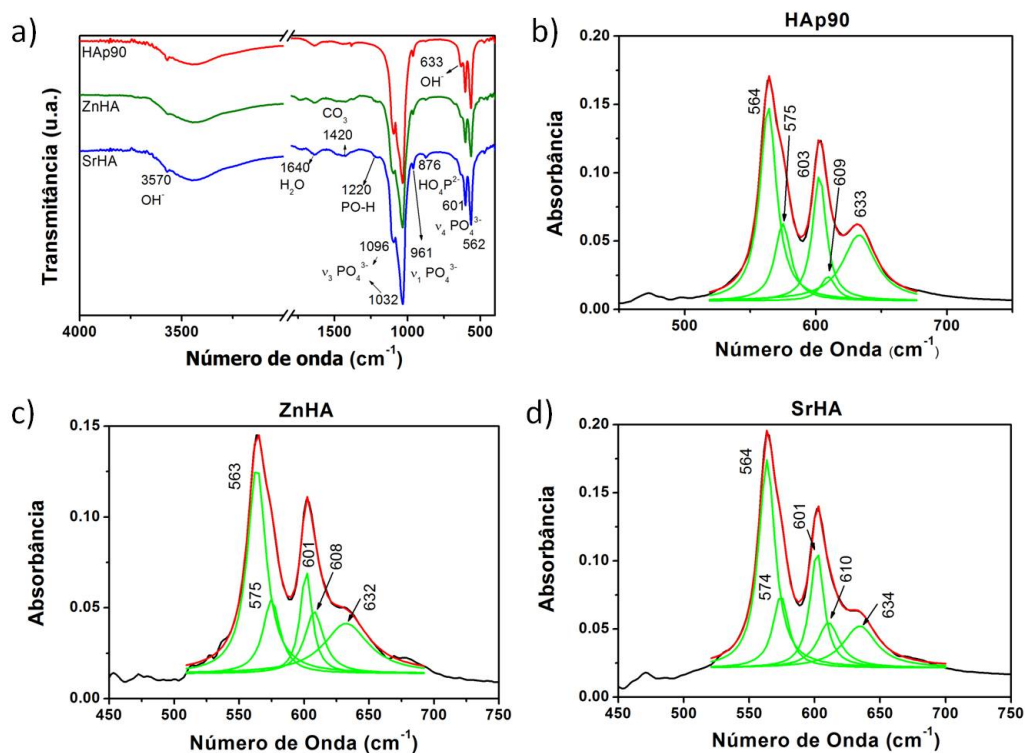


Figura 5.6: FTIR das amostras como preparada, sem o tratamento com solução tampão. a) Espectro de FTIR das amostras HAp90, ZnHA e SrHA na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} mostrando picos característicos de uma hidroxiapatita. Deconvolução na região de $450\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ das amostras b) HAp90, c) ZnHA e d) SrHA.

A deconvolução da região da banda $\nu_4 PO_4$ das amostras de HAp90, ZnHA e

SrHA, Figura 5.6b-d, revelou a existência de uma banda adicional em 608-610 cm^{-1} que foi atribuída ao modo vibracional do fosfato que não está na estrutura da apatita [170]. Este resultado reforça a hipótese de que a substituição do Ca por Zn e Sr promove a formação de fases não apatitas.

No caso das amostras tratadas por 3 h com solução tampão Tris, os espectros de FTIR, Figura 5.7a,b, das amostras HAp90 e HAp5 apresentam bandas vibracional em 1641 cm^{-1} e 3440 cm^{-1} atribuídas a moléculas de água estrutural (quimicamente adsorvida na estrutura) e fisicamente adsorvidas na superfície das nano partículas de HA, respectivamente. Bandas associadas a grupos hidroxila (OH^-) localizados ao longo do eixo “c” da estrutura da HA são observadas em 3567 cm^{-1} e 631 cm^{-1} . Modos vibracionais ν_1 , ν_3 e ν_4 dos grupos PO_4^{3-} ocorrem em 963 cm^{-1} , (1095, 1064, 1034) cm^{-1} e (603, 564) cm^{-1} , respectivamente. A amostra de OCP apresenta a banda em 1641 cm^{-1} com forte intensidade devido às camadas hidratadas situadas entre planos de cálcio e fosfato na estrutura da HA, [180].

As amostras de ZnHA e SrHA apresentam espectro de FTIR com a mesma estrutura de bandas vibracionais que HAp90 e HAp5. Bandas vibracionais mais largas sugerem uma estrutura local mais desordenada em torno dos OH^- e PO_4^{3-} . Estes resultados concordam com os resultados obtidos por XRD.

Bandas de impurezas de íons carbonato, em 1450 cm^{-1} e 1428 cm^{-1} são observadas na amostra HAp5 com relativa intensidade. Estas impurezas entram com facilidade na estrutura da HA durante a nucleação das nano partículas em sínteses aquosas conduzidas em baixas temperaturas. A HAp90 apresenta uma contaminação por NH_4^+ com banda em 1383 cm^{-1} [180]. Com o experimento de FTIR, espectro completo (Figura 5.7a,b) e deconvolucionado (Figura 5.8a-c), não foi possível detectar nenhuma diferença na estrutura das amostras de HAp90, ZnHA e SrHA após o tratamento de 3 h com a solução tampão. Como o FTIR nos fornece informação de um todo, bulk e superfície, este resultado sugere que o Tris não afeta a estrutura

das amostras.

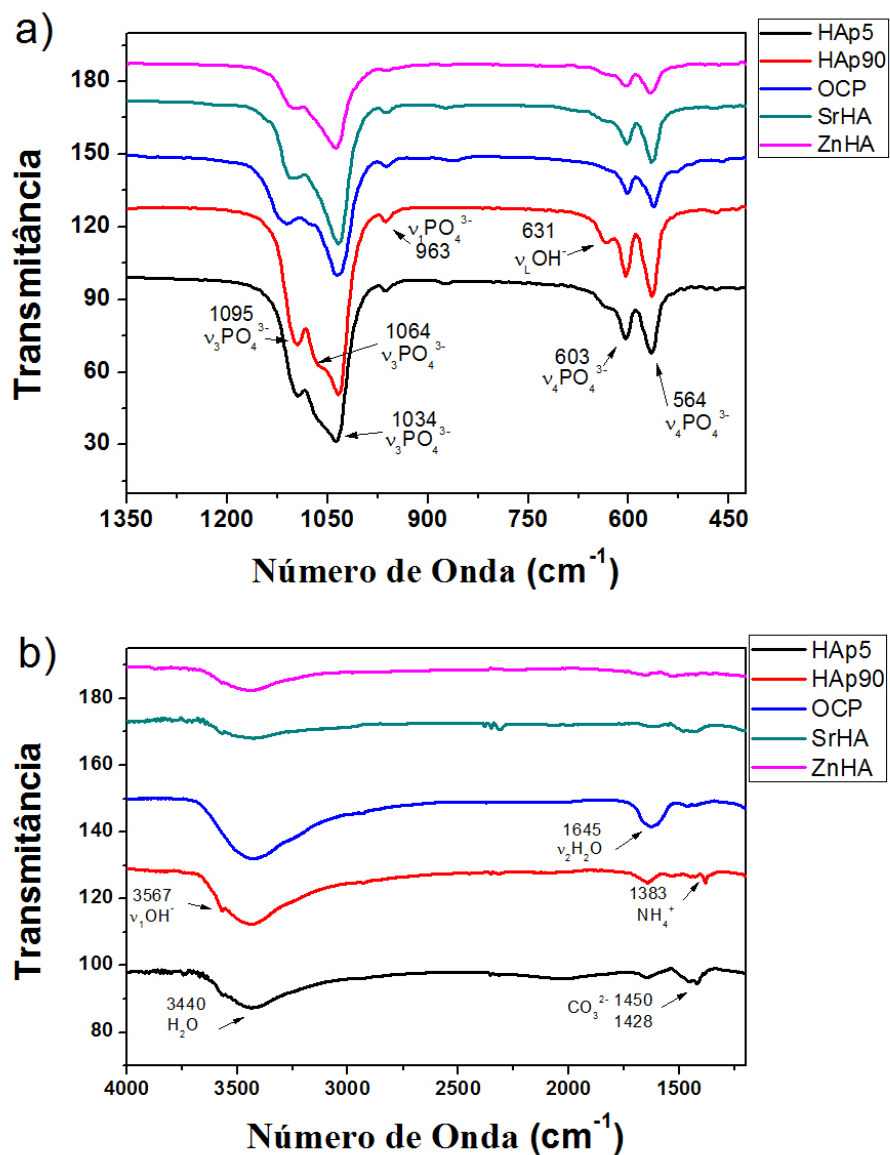


Figura 5.7: Espectro de FTIR das amostras HAp5, HAp90, OCP, SrHA e ZnHA: a) região de 4000 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} , b) região de 1350 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

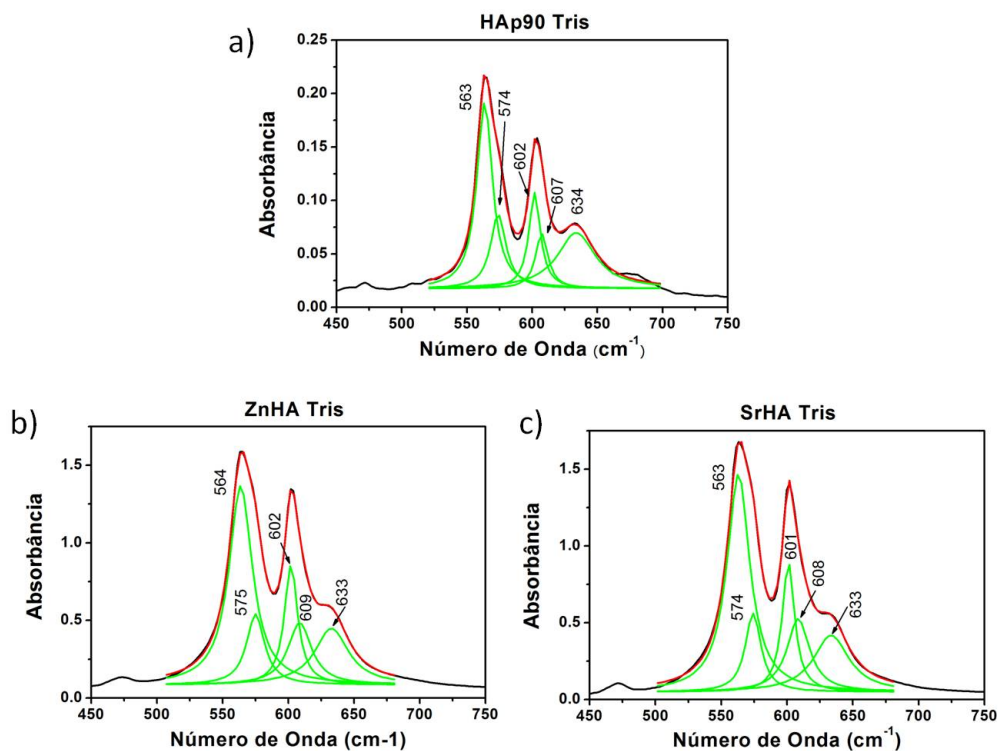


Figura 5.8: Deconvolução na região de 450-750 cm^{-1} das amostras a) HAp90, b) ZnHA e c) SrHA após o tratamento de 3 h com a solução tampão Tris.

O espectro de FTIR do filme de HA depositado em superfície de Ti apresenta as bandas OH^- e PO_4^{3-} da hidroxiapatita, Figura 5.9. Bandas de água adsorvida e estrutural ocorrem com baixa intensidade, mesmo após o tratamento do filme. Mesmo após o contato com solução tampão, os filmes não apresentaram grande intensidade de banda OH^- , indicando que o filme possui boa cristalinidade e estabilidade em meios aquosos.

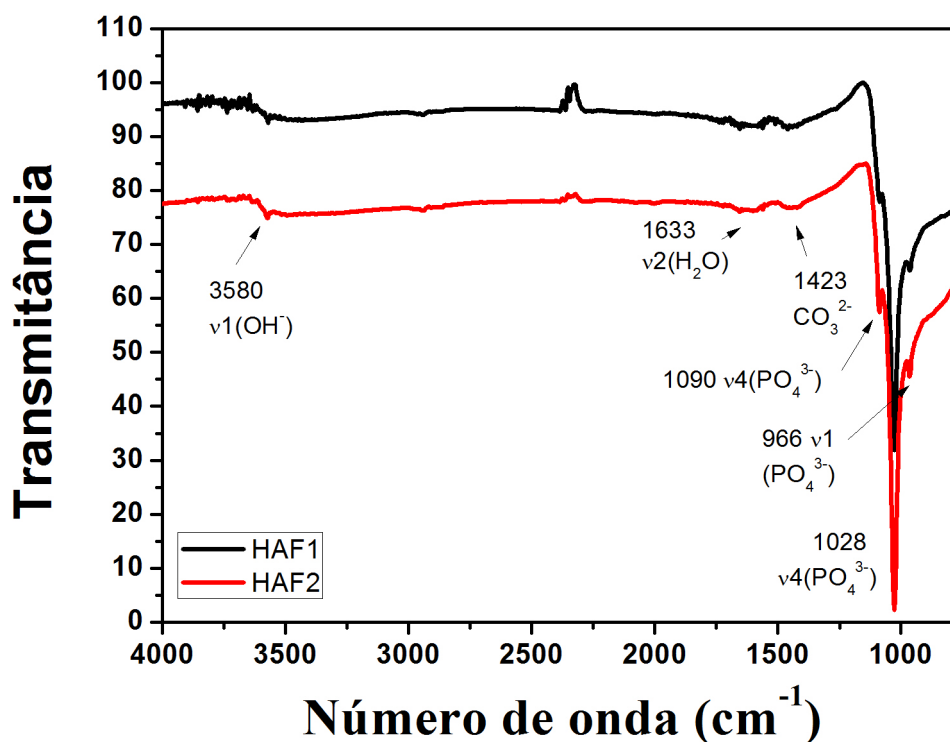


Figura 5.9: Espectros de FTIR de filme de HA depositados sobre Ti na região de 4000 cm^{-1} a 750 cm^{-1} com as bandas características de fosfato e OH, mostrando que temos hidroxiapatita.

5.1.3 Características Morfológicas e Texturais

A Tabela 5.5 apresenta os valores de área específica, tamanho e volume de poros para as amostras HAp, HAp90, HAp5, OCP, ZnHA e SrHA. Estes parâmetros são de grande importância no estudo dos processos de adsorção de moléculas em sistemas nano estruturados. Em princípio, a adsorção é controlada pela área específica disponível para a interação com as moléculas e pela porosidade do material na nano escala que irá modular os processos difusionais das moléculas para o interior dos agregados de nanopartículas.

As áreas específicas das amostras de hidroxiapatita apresentam grandes variações

em função da temperatura de síntese. A nucleação em baixas temperaturas induz a formação de pequenas partículas com baixa cristalinidade e razão Ca/P abaixo do valor estequiométrico (Ca/P=1,67). Este é o caso da amostra HAp5 que foi sintetizada a 5 °C. Esta amostra possui uma área específica quase 6 vezes maior (220 m²/g) que amostras sintetizadas em temperaturas de (50-90) °C (áreas específicas entre (30-60) m²/g). O tamanho médio de poros da HAp5 é bem menor que o das amostras HAp90 e HAp, enquanto o volume de poros da HAp5 é bem maior que destas últimas amostras. Estes parâmetros, alta área e volume de poros e baixo tamanho de poros, constituem indicadores que a amostra é formada por nanopartículas primárias bem menores que aquelas das amostras HAp90 e HAp.

A substituição do cálcio pelo estrôncio e zinco também induz o aumento da área específica, a diminuição do tamanho de poros e o aumento do volume de poros, conforme mostra a Tabela 5.5. Novamente a amostra ZnHA teve maior alteração se comparada com a amostra SrHA, o que pode ser explicado pela maior quantidade de Zn na estrutura da HA. A amostra de OCP possui volume de poros próximo ao da HAp90 mas um tamanho de poro bem menor. Isto explica a maior área específica do OCP em relação a HAp90.

Tabela 5.5: Tabela com as características físico-químicas do material *bulk*.

Amostras	Área superficial [m ² /g]	Tamanho de poro [Å]	Volume de poro [cm ³ /g]
OCP	50	199	0,25
HAp5	220	194	1,07
HAp90	37	319	0,29
ZnHA	92	185	0,43
SrHA	61	233	0,36
HAp	46	323	0,37

Apesar da presença do metal alterar a área superficial e o volume e tamanho de

poro da hidroxiapatita, essa alteração não é relevante para o processo de adsorção de proteínas pequenas, como osteocalcina e insulina. Essas proteínas têm tamanhos da ordem de 5 nm, ou seja, os poros menores do que isso não são acessíveis para as proteínas. De acordo com a Figura 5.10, as maiores áreas superficiais, na presença de metal, ocorrem para poros menores do que 5 nm, não sendo portanto acessíveis. Para poros maiores do que 5 nm, a distribuição de área é a mesma na ausência ou presença de metal.

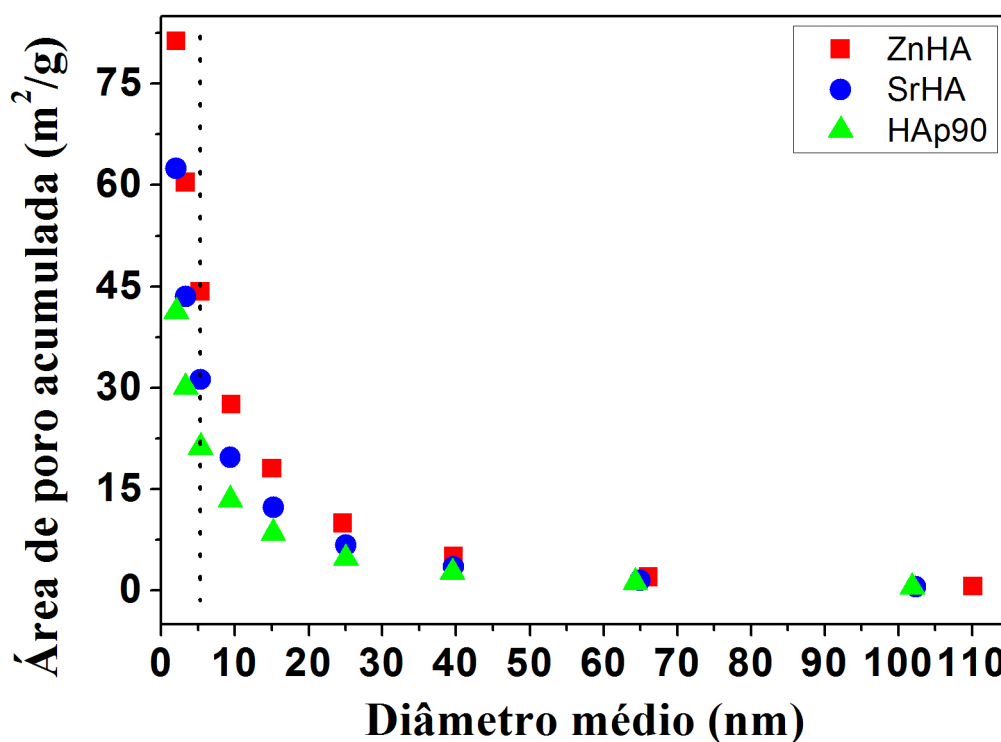


Figura 5.10: Área de poro acumulada em função do diâmetro médio das amostras ZnHA, SrHA e HAp90.

A dimensão manométrica das partículas primárias de fosfato de cálcio e a sua alta reatividade superficial são fatores importantes para estimular a aglomeração das NPs em ambientes aquosos e biológicos. Interações eletrostáticas entre as NPs induzem a aglomeração e a formação de agregados de partículas. Nos fosfatos de

cálcio, este efeito é muito pronunciado devido à alta concentração (3-6 wt %) de moléculas de água (dipolos elétricos) na estrutura da hidroxiapatita e na superfície das nanopartículas. Nas amostras pouco cristalinas, fases amorfas e hidratadas podem se concentrar na superfície das NPs criando uma estrutura *core* (interior da NP) e *shell* (superfície da NP) que contribui fortemente para a formação de agregados de NPs [182]. Quanto menor a dimensão e a cristalinidade da NP maior será o efeito de aglomeração. A formação de agregados tem grande influência na adsorção de moléculas nos fosfatos de cálcio, pois diminui a área específica e a porosidade do material.

Todas as amostras utilizadas neste trabalho formaram agregados em condições ambientais normais, como mostra a Figura 5.11. As amostras HAp90 e OCP possuem uma distribuição bimodal de agregados de NPs com tamanhos variando de 80 nm a 10 μm com tamanho mais prováveis centrados em 300 nm e 2 μm para a HAp90 e 400 nm para a OCP.

A amostra HAp5 que possui baixa cristalinidade e é constituída por partículas primárias menores que as da HAp90, possui um perfil de distribuição de tamanho de NPs mais complexo. O perfil da distribuição é trimodal com modas entre: i) 1,7 μm e 10 μm e um máximo em 3 μm , ii) 28 μm e 45 μm com pequena intensidade e iii) 60 μm e 200 μm , com máximo em 100 μm . Comparando estes resultados com os obtidos pela técnica de BET, verifica-se que os agregados da HAp5 possuem dimensões micrométricas, mas os poros são nanométricos (19 nm) o que explica a grande área específica do material (220 m^2/g). Moléculas tais como a albumina e insulina com dimensões variando de 0,5 nm a 1,5 nm não terão dificuldade de ter acesso ao interior dos agregados e interagir com grande parte da área superficial das NPs.

A substituição do cálcio por Sr e Zn produz NPs com menor capacidade de agregação. A distribuição de tamanho da SrHA é unimodal com aglomerados de

tamanhos entre 100 nm e 600 nm, e máximo da moda centrado em 300 nm. No caso da ZnHA a distribuição é bimodal com moda entre 80 nm e 1 μm e máximo em 300 nm e moda de pequena intensidade entre 1 μm e 9 μm . Apesar do metal induzir maior quantidade de água adsorvida e com isso aumentar a probabilidade de formar agregados, o que vemos aqui é o contrário, ou seja, a presença do metal está reduzindo o tamanho de agregados, o que pode levar a uma maior adsorção de proteína, uma vez que a área específica diminui quando as partículas estão aglomeradas.

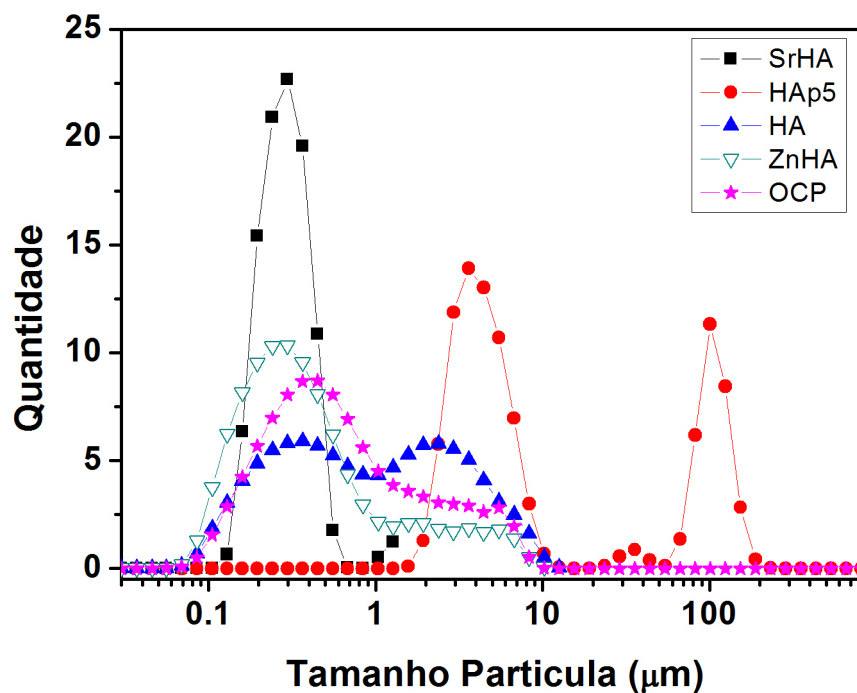


Figura 5.11: Distribuição do tamanho de partícula para as amostras de SrHA, HAp5, HAp90, ZnHA e OCP.

5.1.4 Estequiometria da superfície

Fosfatos de Cálcio na forma de pó

As informações sobre a composição da superfície das NPs de fosfatos de cálcio foram obtidas pela técnica de XPS. É importante ressaltar que não são muitos os trabalhos detalhados sobre a composição da superfície da hidroxiapatita sintetizada em diferentes condições [183–185].

Aqui, novamente, as amostras HAp90, ZnHA e SrHA foram analisadas sem nenhum tratamento com a solução tampão, afim de entendermos o impacto de uma solução na superfície dos pós de hidroxiapatita.

Como visto na Figura 5.12, o espectro completo (*survey*) das amostras HAp90, SrHA e ZnHA mostram os picos dos elementos constituintes de uma hidroxiapatita (O, Ca e P). Na amostra ZnHA, é possível detectar a presença do elemento dopante, Zn. No entanto, para a amostra de SrHA o pico do Sr não foi detectado. Isso pode ocorrer se a quantidade da dopagem não é grande o suficiente, neste caso o pico fica na mesma intensidade do ruído e por isso não é possível detectar em um espectro de baixa resolução. Para realmente confirmar a presença do elemento, é necessário uma medida de alta resolução. Além disso, é possível vermos um grande pico referente ao carbono. Como o pico do Sr é próximo ao pico do carbono, o mesmo pode estar escondido pelo carbono. Este carbono aparece devido ao contato com o ar, ele é de origem orgânica e usado para calibração do espectro.

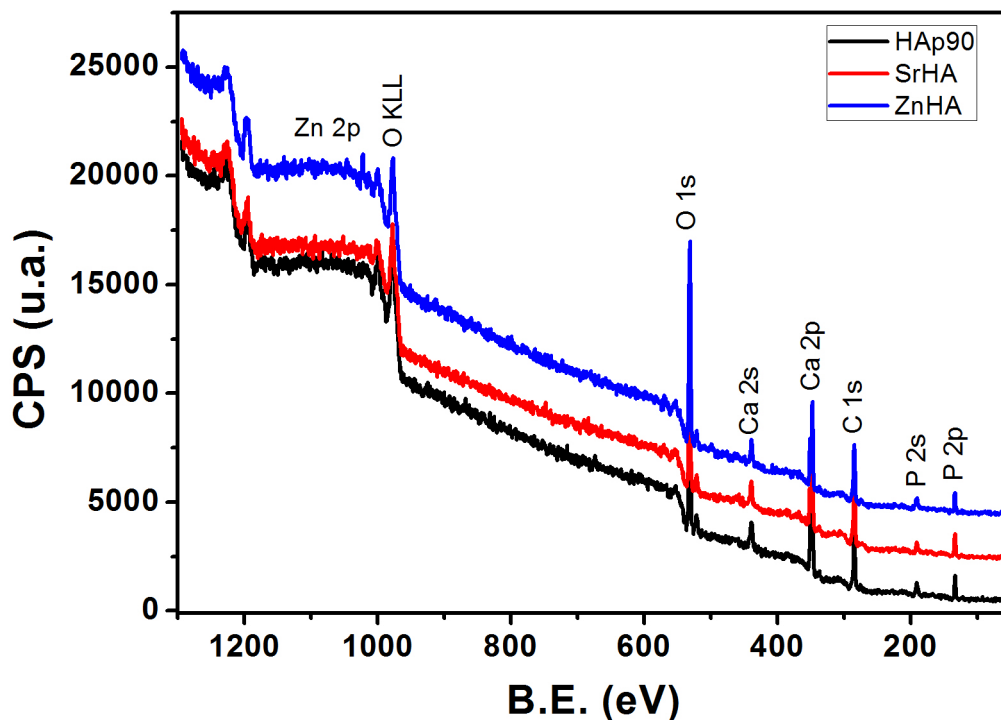


Figura 5.12: Espectro de XPS das amostras HAp90, SrHA e ZnHA com a identificação dos elementos presentes na superfície.

A composição elemental da superfície foi realizada dividindo a área do espectro de alta resolução pelo fator de sensibilidade de cada elemento e pode ser encontrada na Tabela 5.6. Podemos ver que a razão $(Ca+M)/P$, em que $M=Zn, Sr$ quando presente, é abaixo da estequiométrica para todas as amostras. Isto sugere que a superfície das NPs está mais próxima de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio. A diminuição da razão Ca/P não pode ser explicada pela presença de carbonato na superfície em sítios de fosfato, pois a substituição do PO_4^{3-} por CO_3^{2-} seria responsável por um aumento da razão Ca/P e não pela sua diminuição. Uma hipótese provável seria a formação de uma estrutura na superfície do tipo $Ca_{10-x}M_x(V^{CaII})_x(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(H_2O)_x(OH)_{2-x}$, em que: M é a impureza metálica (Zn ou Sr) no caso das amostras dopadas [186,187]. A presença

de água em sítios de OH^- ao longo do eixo “c” da HA seria um fator importante na estabilização de uma estrutura deficiente em cálcio. Entretanto, a variação da razão $(Ca+M)/P$ nas amostras substituídas é dependente da natureza do metal: ela praticamente não varia na ZnHA, se comparada com a HAp90 e diminui ainda mais na SrHA. Este efeito deve ser estudado com maior detalhe em futuros trabalhos. A concentração de metal na superfície é dada pela razão $M/(Ca+M)$. A substituição de Zn na superfície (11 %) é bem maior que a determinada pela análise química elementar (5 %) indicando que o metal se concentra na superfície da ZnHA. Entretanto este valor é bem acima do teórico adicionado (5 %), o que sugere que a quantidade de Ca na superfície é realmente bem abaixo do valor estimado teoricamente, ou que a quantidade de carbono presente nas amostras acaba encobrindo os picos dos elementos base da HA. No caso da SrHA, a concentração de Sr é igual ao determinado pela análise química (2 %). Este resultado sugere que o Sr distribuí-se igualmente na estrutura da hidroxiapatita.

Tabela 5.6: Razões $(Ca+M)/P$, $M/(Ca+M)$, Ca/P e O/P determinadas pela análise química por XRF (interior e superfície) e pelo XPS (superfície) das amostras sem tratamento com solução tampão Tris. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	$(Ca+M)/P$	$(Ca+M)/P$	$M/(Ca+M)$	$M/(Ca+M)$	Ca/P	O/P
	XRF	XPS	XRF	XPS	XPS	XPS
HAp90	1,687±0,002	1,50±0,01			1,50±0,01	4,73±0,07
ZnHA	1,725±0,004	1,54±0,02	0,049±0,002	0,115±0,003	1,36±0,02	4,37±0,07
SrHA	1,697±0,007	1,03±0,02	0,021±0,004	0,016±0,001	1,02±0,02	3,62±0,09

Os valores encontrados de O/P para as amostras HAp90, ZnHA e SrHA variam muito sendo a ZnHA a única que apresentou o valor estequiométrico. A HAp90 foi ligeiramente maior enquanto a SrHA apresentou valor abaixo do estequiométrico.

Este resultado sugere a complexidade da superfície das apatitas.

Os espectros de alta resolução das amostras HAp90, SrHA e ZnHA são apresentados nas Figuras 5.13-5.15. A deconvolução do pico do oxigênio O 1s pode ser decomposto em picos associados a três energias de ligação: em 529,0 eV referente à formação de óxidos na superfície, uma segunda em 531,2 eV, pertencente à ligação simples do O-P formando o fosfato e uma terceira em 533,0 eV referente à hidroxila ou água na amostra, [113, 188, 189]. Para o elemento fósforo temos apenas o pico referente à ligação com o oxigênio (P-O) em 133,2 eV, [113, 189]. A deconvolução do pico do cálcio mostra somente o pico associado ao cálcio ligado ao oxigênio em 347,3 eV [122, 190]. O espectro do carbono foi decomposto em duas diferentes ligações. A de maior intensidade pode ser atribuída ao carbono de origem orgânica (C-C/C-H) devido ao contato com a atmosfera. Este pico com energia de 284,6 eV é utilizado para a calibração. A energia em 288,0 eV pode ser atribuída à ligação COOH, [113, 121, 190], Tabela 5.7.

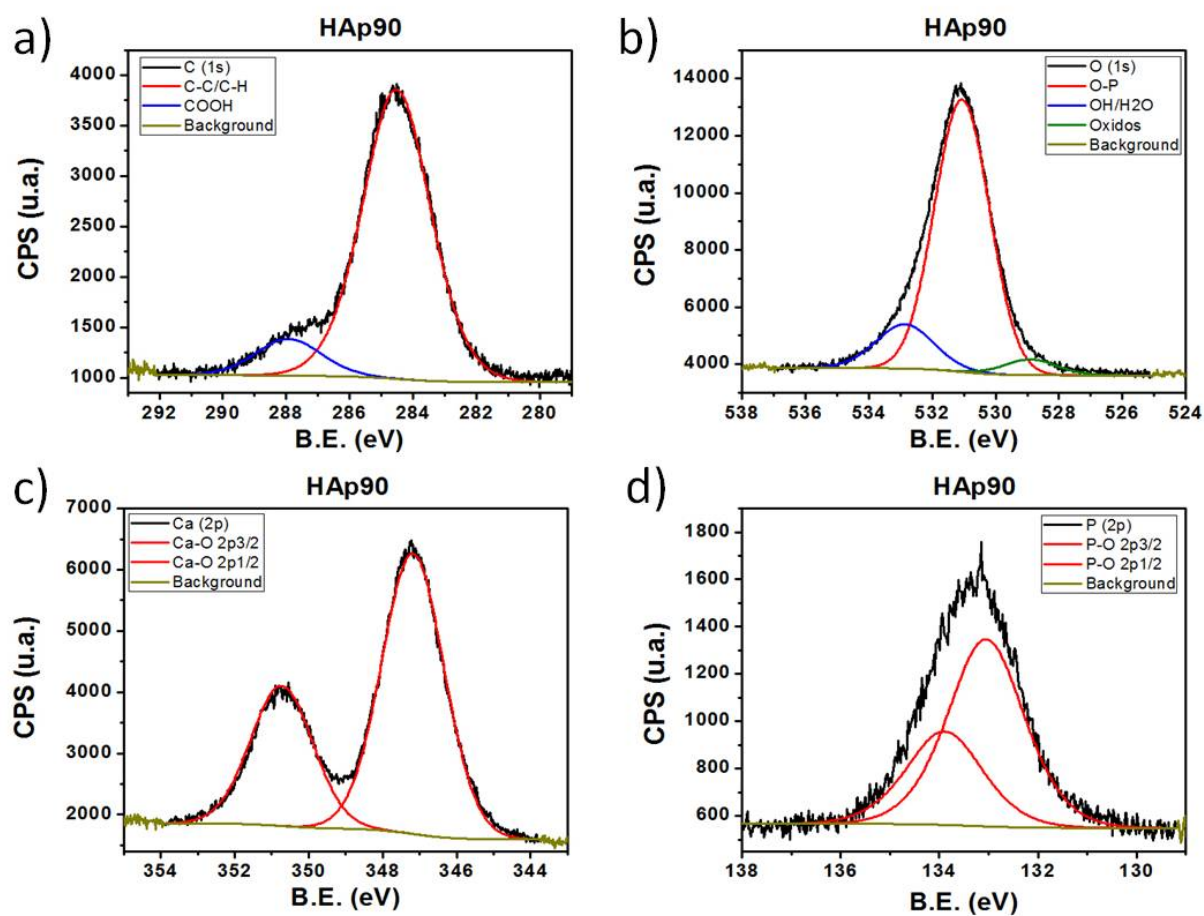


Figura 5.13: Espectro XPS de alta resolução da amostra HAp90 como produzida:

a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo.

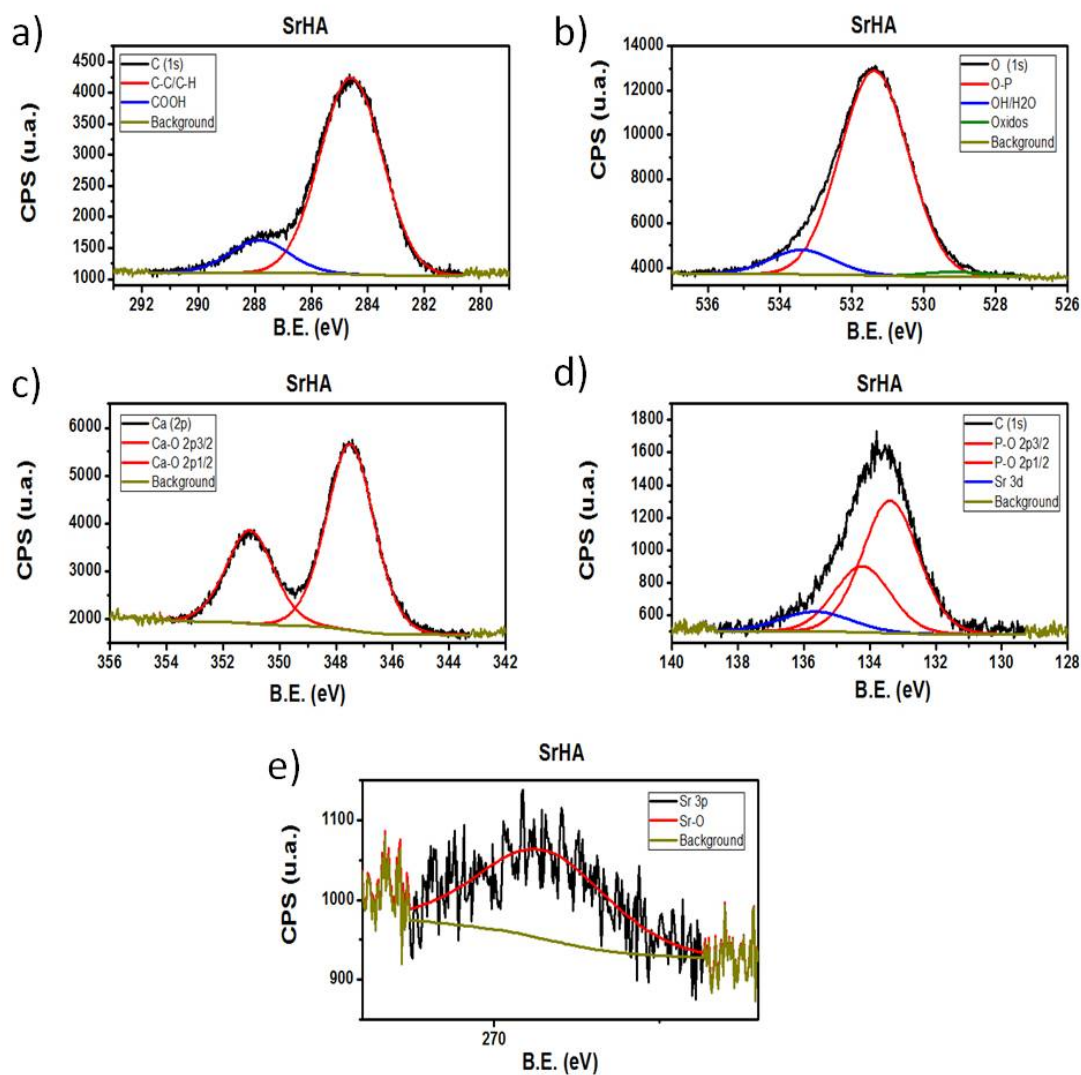


Figura 5.14: Espectro XPS de alta resolução da amostra SrHA como produzida: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) estrôncio.

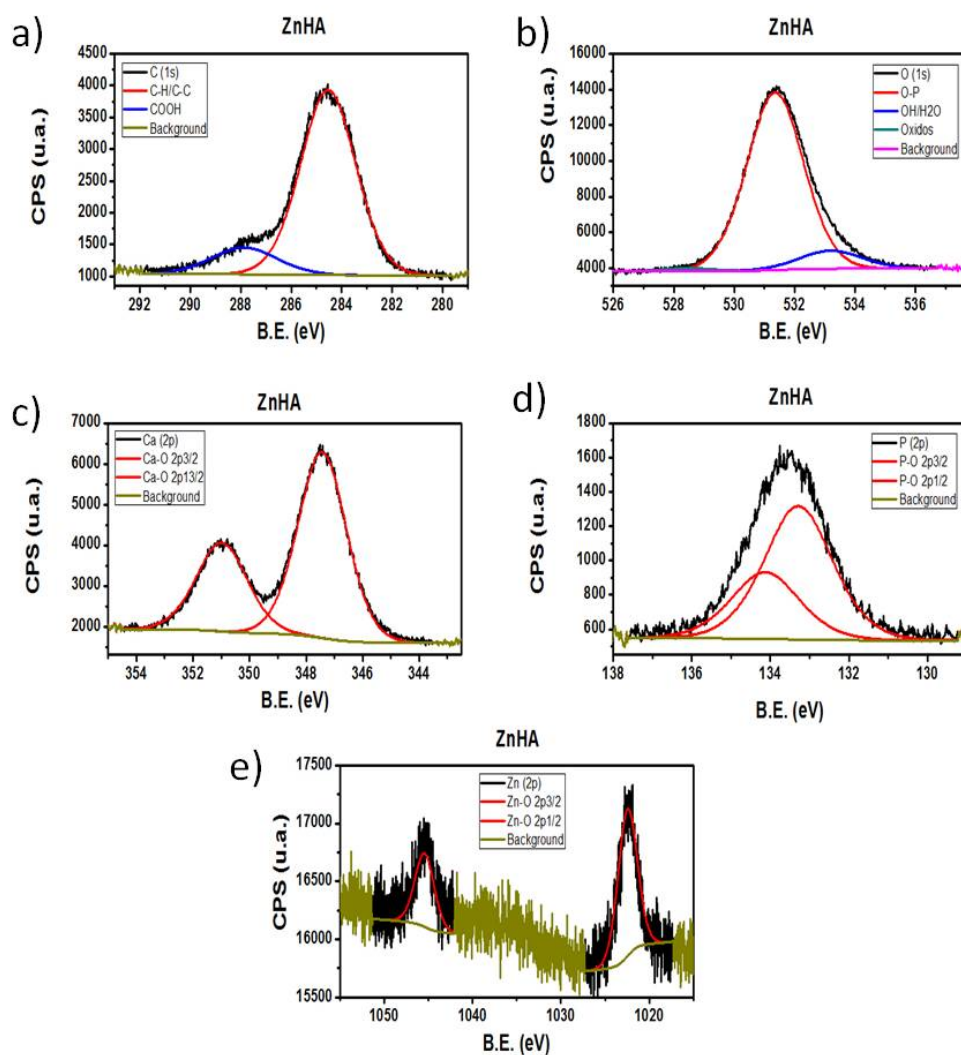


Figura 5.15: Espectro XPS de alta resolução da amostra ZnHA como produzida: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) zinco.

Tabela 5.7: Energia de ligação da deconvolução de cada pico presentes nas amostras de HAp90, ZnHA e SrHA. Dentro do erro experimental, todos os elementos apresentam a mesma deconvolução. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostra	O 1s [eV]			Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]		Zn 2p [eV]	Sr 3p [eV]
	Óxidos	O-P	O-H / H_2O	Ca-O	P-O	C-C /C-H	COOH	Zn-O	Sr-O
HAp90	529,0	531,2	533,0	347,3	133,2	284,6	288,0		
	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1		
ZnHA	528,6	531,5	533,3	347,5	133,4	284,6	288,0	1022,6	
	±0,1	±0,1	±0,0	±0,0	±0,0	±0,1	±0,2	±0,1	
SrHA	529,2	531,4	533,4	347,5	133,4	284,6	287,8		269,3
	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2		±0,2

Comparando agora os resultados das amostras em pó após o tratamento de 3 h com a solução tampão. Como para a adsorção das proteínas, as amostras ficam em meio aquoso, a nossa amostra referência deve ser a superfície da amostra no meio aquoso, uma vez que o meio pode modificar as características da amostra.

Na Figura 5.16 temos o espectro de XPS completo, *survey*, das amostras HAp90, HAp5, SrHA, ZnHA e OCP. Os espectros são constituídos por picos dos elementos básicos que compõe a matriz destes materiais tais como o O, Ca e P. Nas amostras dopadas são detectados picos de Zn (ZnHA) e Sr (SrHA). Já podemos ver por aqui que o tratamento em meio aquoso modificou o sinal detectado pelo XPS, uma vez que anteriormente não era possível detectar o pico do Sr. O carbono é um elemento presente em todas as amostras devido à contaminação da superfície por carbono de origem orgânica presente no ar. Observam-se também picos de carbono de origem mineral, ligado à estrutura da hidroxiapatita provavelmente substituindo grupos fosfatos. A substituição fosfato x carbonato ocorre provavelmente durante

o processo de síntese e estocagem do material. Aqui também percebemos outra alteração no espectro. Após o tratamento com tampão, a quantidade de carbono na superfície diminui e muito provavelmente por isso, foi possível a detecção do pico do Sr. De certa forma a solução tampão limpa a superfície das amostras do carbono contaminante proveniente do ar.

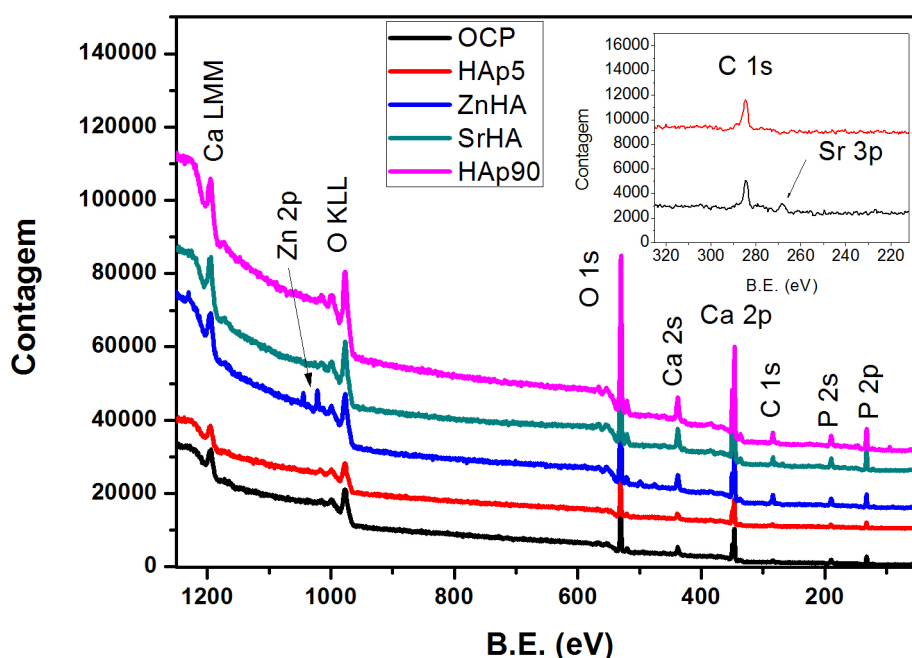


Figura 5.16: Espectro XPS das amostras OCP, HAp5, ZnHA, SrHA e HAp90 com a identificação dos elementos presentes na superfície.

A análise das razões $(Ca+M)/P$, $M/(Ca+P)$ e O/P em que $M=Sr$ ou Zn , será feita em duas etapas, sendo a primeira comparando a análise por XPS antes e após o tratamento de 3 h com solução tampão e em seguida a comparação entre análise química (XRF) e de superfície (XPS) após o tratamento com tampão, que é a nossa amostra referência.

Como pode-se ver na Tabela 5.8, após o tratamento com solução tampão, a razão

(Ca+M)/P da HAp90 e ZnHA diminuiu, deixando as amostras ainda mais deficientes em cálcio. No entanto, elas continuam tendo razões próximas uma das outras. Comportamento contrário foi encontrado para a SrHA, em que a razão aumentou, mas não o suficiente para se igualar às outras amostras. Ela continua sendo a mais deficiente em cálcio. Com a remoção de grande parte do carbono orgânico, foi possível calcular a nova percentagem de metal substituído, sem ser mascarado pelo carbono. Neste caso temos uma diminuição da quantidade de Zn, indo para valor igual ao desejado teoricamente (5 %). No caso do Sr, o valor encontrado na superfície após o tratamento em solução foi maior (4 %) que sem o tratamento (2 %) e próximo do valor desejado. Um resultado interessante é que após o tratamento com tampão Tris, ambas as amostras apresentaram praticamente a mesma quantidade de metal na superfície, portanto a quantidade de metal que a proteína enxergará será igual. Outro resultado encontrado é que a razão O/P assume valores bem menores do que o esperado para uma HA estequiométrica (4,3) para todas as amostras. Este efeito é mais um indicador da natureza complexa da estequiometria da superfície dos fosfatos de cálcio. Efeitos do feixe de raios X na estequiometria da superfície da HA não podem ser excluídos. Tal hipótese foi levantada por Hongbo *et al* em trabalho sobre a caracterização da superfície da HA por XPS [191, 192].

Tabela 5.8: Razões (Ca+M)/P, M/(Ca+M) e O/P determinadas pela análise de XPS (superfície) antes e após o tratamento com solução tampão Tris. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostra	(Ca+M)/P	(Ca+M)/P	M/(Ca+M)		O/P	O/P
	antes	após	antes	após	antes	após
HAp90	1,50±0,01	1,30±0,01			4,73±0,07	2,66±0,07
ZnHA	1,54±0,02	1,33±0,02	0,115±0,002	0,047±0,003	4,37±0,07	3,00±0,07
SrHA	1,03±0,02	1,13±0,02	0,016±0,004	0,036±0,001	3,62±0,07	2,85±0,09

A comparação entre a análise química (XRF) e a análise por XPS são apresentadas na Tabela 5.9. Verifica-se que a razão Ca/P na superfície das amostras não dopadas com metal (HAp90 e HAp5) é menor que a razão Ca/P do conjunto da amostra (interior mais superfície) que foi determinada pela análise química. Isto sugere que a superfície das NPs possui uma estrutura e estequiometria diferentes das do interior da NP e, novamente, mais próxima de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio. Além disso, podemos ver que a razão entre as duas amostras é próxima, o que sugere que após o tratamento com tampão, a amostra menos cristalina, tem superfície igual à cristalina. A razão Ca/P da superfície do OCP (1,15) é também inferior à do interior da estrutura (Ca/P=1,47) e da razão estequiométrica (1,33).

Tabela 5.9: Razões (Ca+M)/P, M/(Ca+M) e O/P determinadas pela análise química por XRF (interior e superfície) e pelo XPS (superfície). Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	(Ca+M)/P	(Ca+M)/P	M/(Ca+M)		O/P
	XRF	XPS	XRF	XPS	XPS
HAp90	1,687±0,002	1,30±0,01			2,66±0,07
HAp5	1,566±0,002	1,27±0,06			2,41±0,12
OCP	1,466±0,001	1,15±0,01			2,32±0,03
ZnHA	1,725±0,004	1,33±0,02	0,049±0,002	0,047±0,003	3,00±0,07
SrHA	1,697±0,007	1,13±0,02	0,021±0,004	0,036±0,001	2,85±0,09
HAp		1,64±0,01			4,67±0,07

O efeito de diminuição da razão (Ca+M)/P na superfície, quando comparada com o valor estequiométrico, é também verificado nas amostras substituídas. Entretanto, a variação é dependente da natureza do metal: ela praticamente não varia na ZnHA, se comparada com a HAp90 e diminui ainda mais na SrHA. Este efeito deve ser estudado com maior detalhe em futuros trabalhos. A concentração de Zn

na superfície (5 %) é similar à determinada pela análise química elementar (5 %) indicando que o metal se distribui homogeneamente do interior à superfície da ZnHA. Este perfil não é verificado na SrHA onde a concentração de Sr é muito maior na superfície (4 %). Este resultado sugere a formação de complexos de Sr na superfície da hidroxiapatita. Apesar da quantidade de Sr e Zn ser diferente no interior da amostra, a mesma é similar na superfície, o que é importante para o nosso experimento no efeito de comparação entre amostras, já que o processo de adsorção ocorre na superfície. Como as concentrações de metal na superfície são próximas, a menor razão $(Ca+M)/P$ para a amostra SrHA indica que sua superfície é mais deficiente em Ca se comparada com as demais amostras.

Espectro de alta resolução de XPS da amostra HAp90 em torno das energias de ligação dos elementos Ca, P, O e C para todas as amostras estudadas são mostrados na Figura 5.17. O espectro na região da energia de ligação do oxigênio O 1s pode ser decomposto em picos associados a três energias de ligação: em 528,5 eV referente à formação de óxidos na superfície, uma segunda em 530,6 eV, pertencente à ligação simples do O-P formando o fosfato e uma terceira em 532,4 eV referente à hidroxila ou água na amostra, [113, 188, 189]. Para o elemento fósforo temos apenas o pico referente à ligação com o oxigênio (P-O) em 132,7 eV, [113, 189]. A deconvolução nestes dois casos é igual à deconvolução das amostras antes do tratamento com tampão. A deconvolução do pico do cálcio mostra o pico associado ao cálcio metálico em 344,7 eV e do cálcio ligado ao oxigênio em 346,8, [122, 190]. O espectro do carbono foi decomposto em três diferentes ligações. A de maior intensidade pode ser atribuída ao carbono de origem orgânica (C-C/C-H) devido ao contato com a atmosfera. Este pico com energia de 284,6 eV é utilizado para a calibração. As energias em 286,1 e 288,7 eV podem ser atribuídas à ligação simples (C-O) e a ligação COOH, respectivamente, [113, 121, 190], Tabela 5.10. Nestes dois casos é possível ver uma alteração na deconvolução. O tratamento com solução tampão fez o cálcio

perder algumas ligações com o oxigênio ou foi possível ver ligações do tipo Ca-Ca. Já no caso do carbono, é possível ver uma outra ligação, antes inexistente ou encoberta pelas ligações C-C/C-H. Além disso a ligação COOH que antes tinha energia de 288,0 eV teve sua energia aumentada em 0,7 eV.

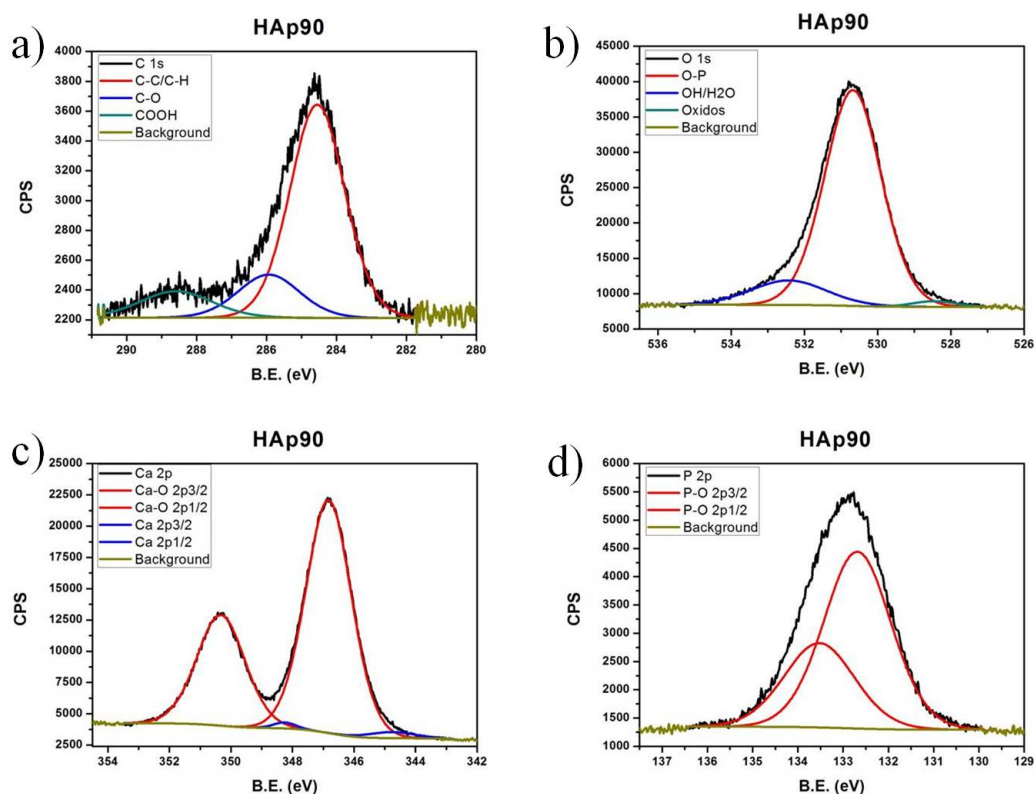


Figura 5.17: Espectro XPS de alta resolução da amostra HAp90: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.

Tabela 5.10: Energia de ligação da deconvolução de cada pico presentes nas amostras de HAp90, ZnHA, SrHA, HAp5 e OCP. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

	O 1s [eV]		Ca 2p [eV]		P 2p [eV]	C 1s[eV]		Zn 2p [eV]	Sr 3p [eV]	
Amostras	Óxidos	O-P	O-H/ <i>H₂O</i>	Ca	Ca-O	P-O	C-C/ C-H	COOH	Zn-O	Sr-O
HAp90	528,5	530,6	532,4	344,7	346,8	132,7	284,6	286,1	288,7	
	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,3	±0,1	
ZnHA	528,3	530,8	532,4	344,7	346,9	132,8	284,6	286,1	288,4	1022,0
	±0,1	±0,1	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,1	±0,2	±0,2	±0,1
SrHA	528,6	530,9	532,5	344,8	347,1	132,9	284,6	285,7	288,8	268,7
	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,2
HAp5	528,2	530,6	532,1	344,5	346,8	132,6	284,6	286,1	288,9	
	±0,0	±0,1	±0,0	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,3	±0,2	
OCP	528,7	530,5	531,8	344,8	346,8	132,7	284,6	286,3		
	±0,0	±0,0	±0,4	±0,0	±0,1	±0,0	±0,0	±0,1		

Os espectros de XPS dos elementos Ca, O, P nas amostras HAp5, OCP, SrHA e ZnHA, apresentaram a mesma deconvolução, com as mesmas energias de ligação conforme mostra a Tabela 5.10 e as Figuras 5.18 a 5.21. O pico do carbono para a amostra de OCP não apresentou o pico referente à ligação COOH, o que é esperado, uma vez que o mesmo não contém a hidroxila em sua estrutura. Para a ZnHA temos o pico de Zn-O em 1021,9 eV [193] e no caso da SrHA, o Sr-O em 268,5 eV e em 134,5 eV, que fica dentro do pico do fósforo 2p, Tabela 5.10, [194,195].

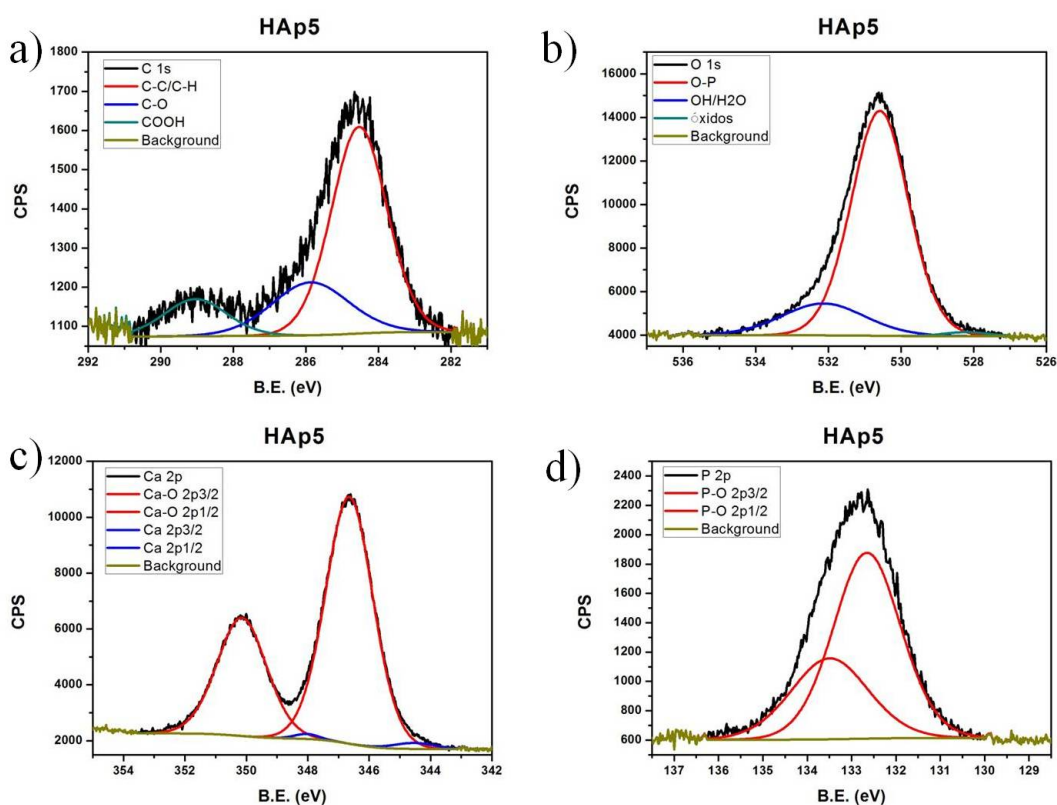


Figura 5.18: Espectro XPS de alta resolução da amostra HAp5: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.

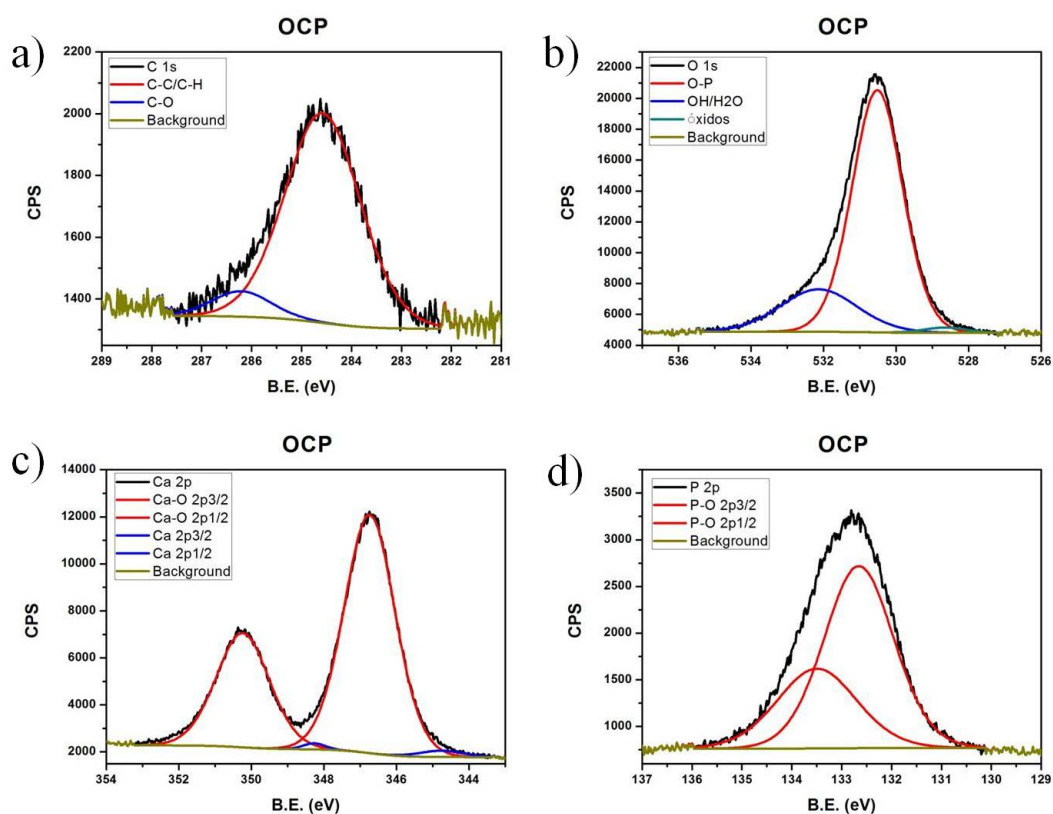


Figura 5.19: Espectro XPS de alta resolução da amostra OCP: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.

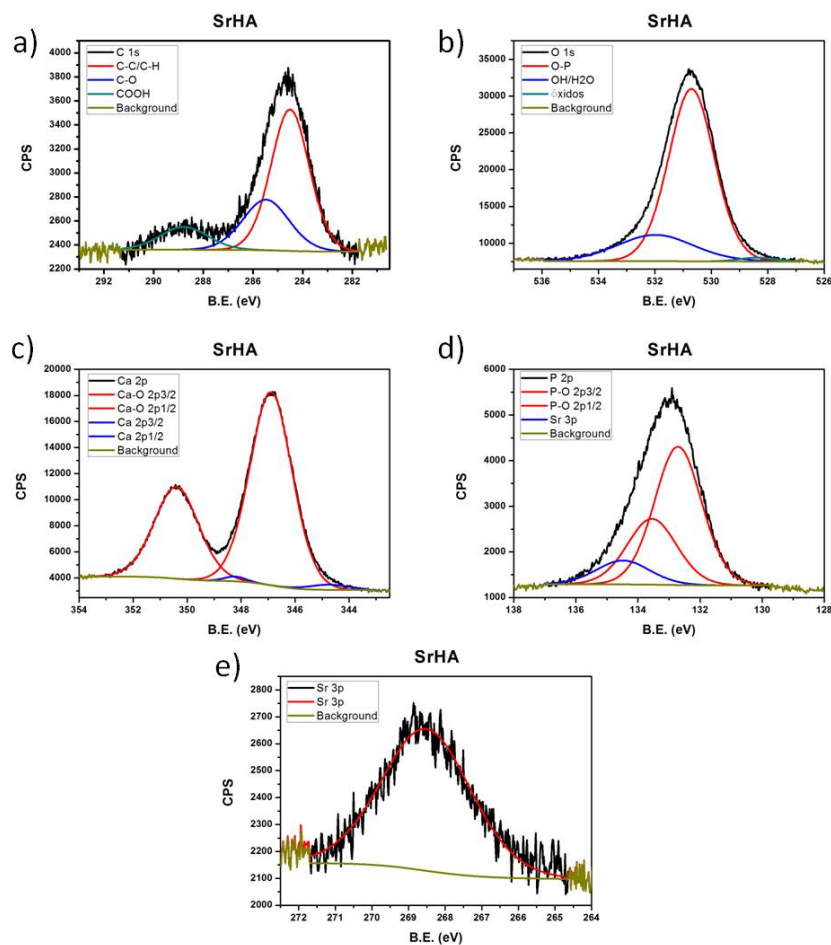


Figura 5.20: Espectro XPS de alta resolução da amostra SrHA: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) estrôncio. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.

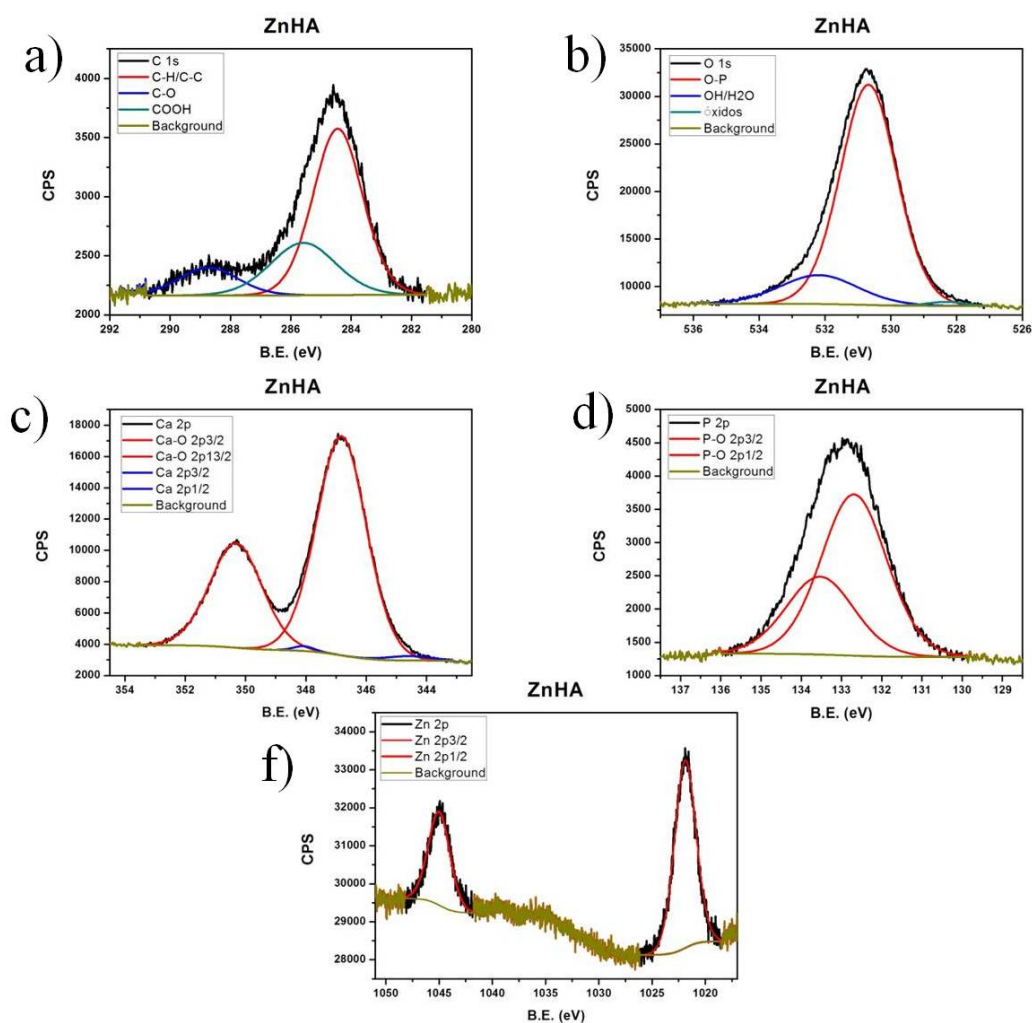


Figura 5.21: Espectro XPS de alta resolução da amostra ZnHA: a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio, d) fósforo e e) zinco. Na cor preta o espectro experimental, nas demais cores as energias de ligação obtidas pela deconvolução do espectro experimental.

Filmes Finos de Hidroxiapatita

Filmes finos (540 nm) tratados termicamente a 400 °C posteriormente e deixados em tampão Tris durante 3 h foram analisados por XPS. O espectro de XPS apresenta os picos de O, Ca e P e C, Figura 5.22.

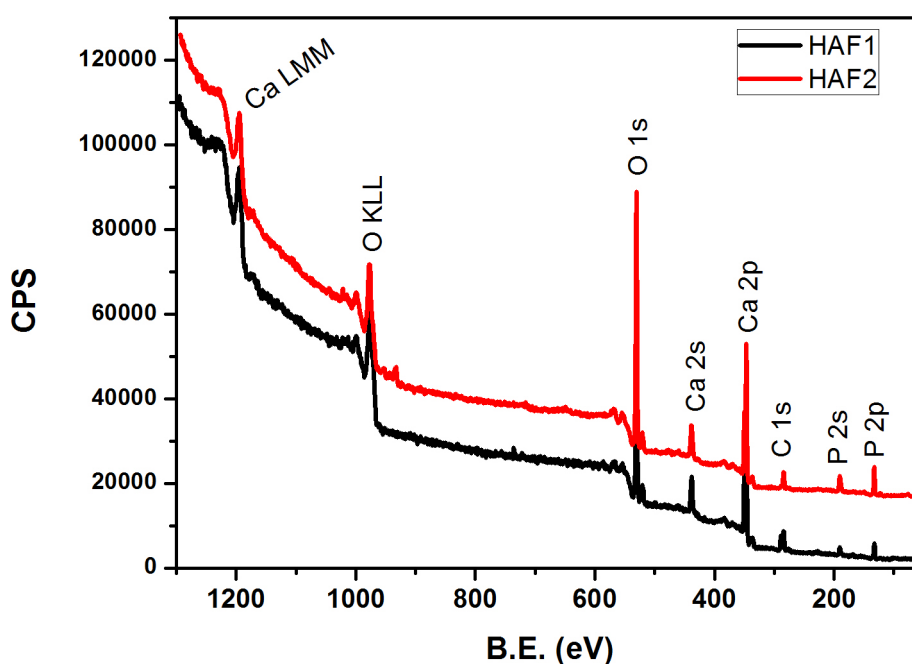


Figura 5.22: Espectro de XPS dos filmes HAF1 e HAF2 tratados termicamente a 400 °C e com tampão Tris por 3 h usados na adsorção com insulina bovina e humana, respectivamente.

Para os filmes produzidos para a adsorção de insulina humana (HAF2), a razão Ca/P foi menor do que a razão teórica da HA (1,67), estando de acordo com o encontrado para os pós, em que a razão Ca/P da superfície sempre foi menor do que a do *bulk* e a estequiométrica. Comportamento contrário foi encontrado para os filmes produzidos para a insulina bovina (HAF1), em que a razão foi acima da

teórica, Tabela 5.11. Isso pode ter ocorrido porque na presença do tampão ocorre uma resuspensão e redeposição do material da superfície do filme, o que pode mudar a estequiometria e até mesmo a composição da superfície do filme. No entanto, mesmo com esse processo ocorrendo, os picos se encontram nas mesmas posições do caso da HAp90, Tabela 5.12. Além disso é possível ver que essa energia de ligação não varia com o material, ou seja, não importa se é HA ou OCP, se é pó ou filme ou por qual rota foi produzido, todos os elementos se ligam com a mesma energia.

Tabela 5.11: Porcentagens de cada pico fotoelétrico e a razão Ca/P para os filmes depositados sobre Ti. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	O 1s [%]	Ca 2p [%]	P 2p [%]	C 1s [%]	Ca/P
HAF1	53,3±0,2	21,8±0,4	8,0±1,1	16,9±1,4	2,73±0,35
HAF2	53,7±0,2	20,0±1,8	13,4±0,3	12,9±2,3	1,49±0,10

Tabela 5.12: Energia de ligações de cada pico fotoelétrico das amostras em pó e dos filmes. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	Zn 2p [eV]	Sr 3p [eV]
HAp90	530,7±0,2	346,8±0,1	132,7±0,1	284,6±0,1		
HAp5	530,4±0,1	346,6±0,1	132,6±0,1	284,6±0,0		
OCP	530,6±0,1	346,8±0,0	132,9±0,1	284,6±0,0		
ZnHA	530,7±0,1	346,8±0,0	132,9±0,1	284,6±0,1	1022,0±0,0	
SrHA	530,7±0,1	346,7±0,1	132,7±0,2	284,6±0,1		268,4±0,3
HAp	530,5±0,1	346,7±0,1	132,7±0,2	284,6±0,2		
HAF1	531,0±0,1	346,9±0,0	133,1±0,1	284,6±0,1		
HAF2	530,7±0,1	346,7±0,0	132,9±0,2	284,6±0,1		

A deconvolução de cada pico dos filmes para o experimento com insulina bovina (Figura 5.23) e humana (Figura 5.24) apresentou as mesmas ligações presentes no

pó para o oxigênio, o fósforo e o cálcio, Tabela refARfilmes. No entanto, para o pico do carbono, além dos picos referentes às ligações de C-C/C-H em 284,5 eV, de C-O em 285,7 eV e COOH em 288,0 eV, a série HAF1 apresentou um pico com alta energia em 289,3 eV referente à ligação C=O [196, 197].

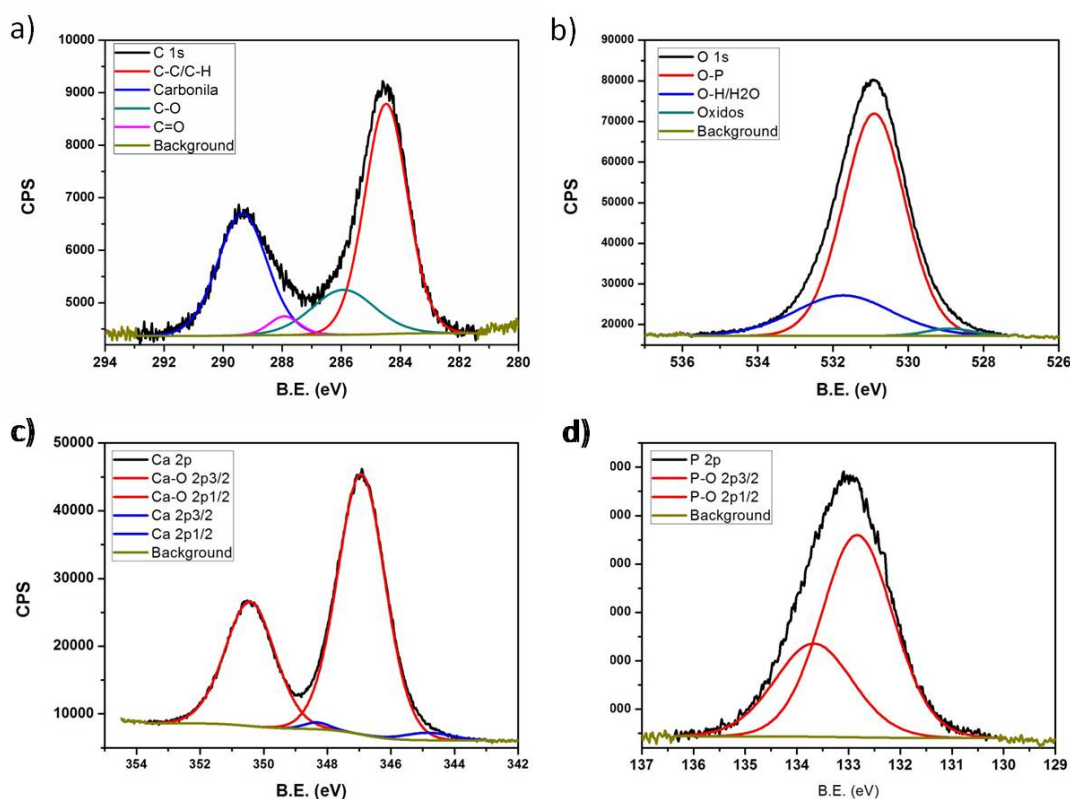


Figura 5.23: Espectro XPS de alta resolução dos picos de a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo, do filme controle para a adsorção com insulina bovina (HAF1), mostrando a deconvolução e a ligação referente a cada deconvolução.

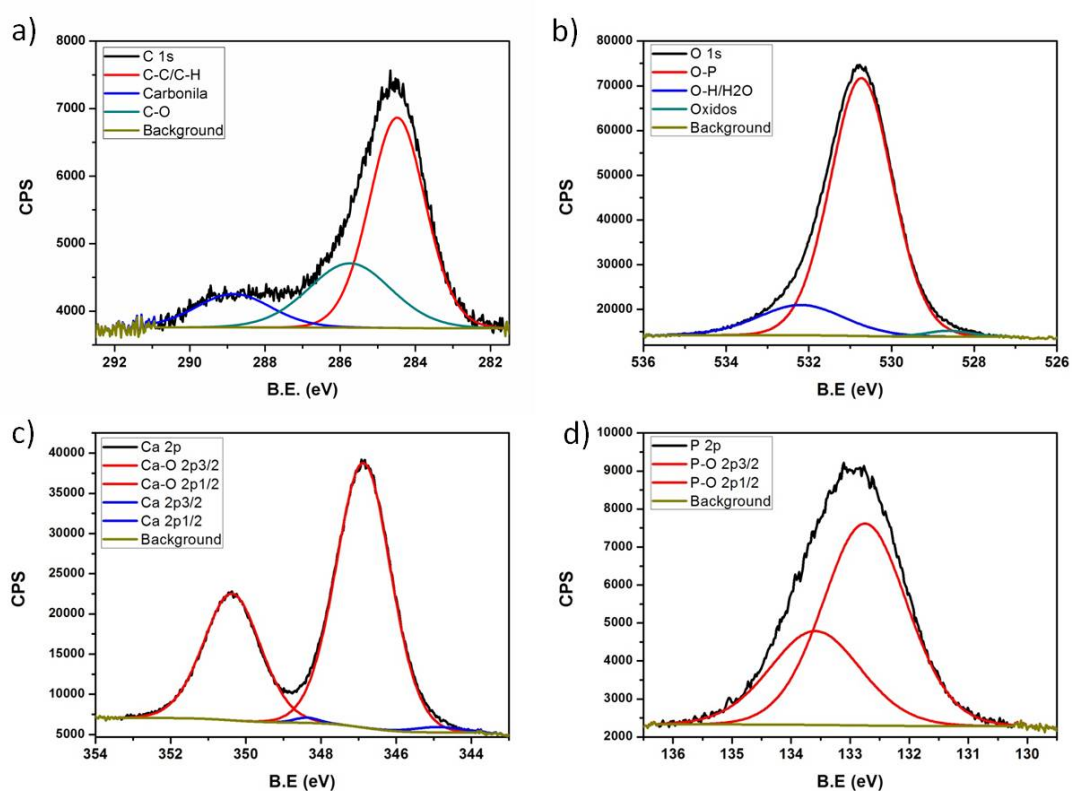


Figura 5.24: Espectro XPS de alta resolução dos picos de a) carbono, b) oxigênio, c) cálcio e d) fósforo, do filme controle para a adsorção com insulina humana (HAF2), mostrando a deconvolução e a ligação referente a cada deconvolução.

Tabela 5.13: Energia de ligação da deconvolução de cada pico presentes nos filmes de HAF1 e HAF2. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	O 1s [eV]			Ca 2p [eV]		P 2p [eV]		C 1s [eV]		
	Óxidos	O-P	O-H/ H2O	Ca	Ca-O	P-O	C-C/ C-H	C-O	Carbonila	C=O
HAF1	529,1	531,1	531,9	344,9	347,0	133,0	284,6	285,8	288,0	289,4
	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,3	±0,1	±0,1
HAF2	528,7	530,8	532,0	344,9	347,0	132,9	284,6	285,8	288,6	
	±0,0	±0,1	±0,3	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,2	±0,8	

Apesar dos parâmetros utilizados na deposição do filme sobre o substrato de titânio serem os mesmo, como o alvo foi diferente entre as deposições, com abertura do equipamento, houve diferenças entre os dois filmes, como crescimento preferencial na direção (002), maior razão Ca/P e presença da ligação C=O na superfície para a série HAF1, o que pode influenciar o resultado do experimento, sendo mais uma variável a ser considerada. Esse resultado deixa claro que há um problema de reprodutibilidade das amostras, que há diferenças entre lotes, sendo necessário então fazer todo o experimento com o mesmo lote.

Vimos também que a superfície do material é diferente do material como um todo (interior e superfície). Esta diferença pode ser originada, principalmente, pela absorção de CO₂ e carbono orgânico do ar, que reage com a superfície reativa dos materiais. Esta absorção e difusão forma carbonatos (CO₃), aumentando os defeitos que são inerentes à baixa coordenação dos átomos da superfície. Estes defeitos levam a modificação das energias de ligação e estequiometria da superfície, o que pode ser verificado nos espectros de XPS apresentados. Sendo assim, analisar e conhecer o material *bulk* não é suficiente, ainda mais se o experimento envolve mais superfície do que *bulk*. Logo, saber como essa superfície é diferente do interior é de suma importância para a interpretação e compreensão dos resultados. Com o experimento de XPS antes e após o tratamento com solução tampão Tris, foi possível detectarmos que a solução remove o carbono orgânico, o que acaba por modificar a razão cálcio fósforo. Isso pode ocorrer pois a solução pode provocar uma remoção e redeposição dos constituintes da hidroxiapatita, formando uma outra fase ou simplesmente porque sem o carbono, os elementos aparecem com mais intensidade. A deconvolução do carbono mostrou que uma outra ligação ocorre na superfície, o que reforça a ideia da redeposição de outras fases.

5.2 Adsorção de osteocalcina em fosfatos de cálcio e silício

A adsorção da osteocalcina em nanopartículas de fosfatos de cálcio tem sido pouco reportada na literatura [113, 114, 198, 199]. Isto se deve principalmente as limitações das técnicas experimentais para caracterizar a interação de estruturas proteicas complexas tal como a osteocalcina em superfícies inorgânicas nanoestruturadas como os fosfatos de cálcio. Como foi apresentado anteriormente no Item 5.1 deste trabalho, a superfície de fosfatos de cálcio apresenta grande variabilidade de estrutura, estequiometria e perfil textural. Esta característica intrínseca do sistema dificulta o estudo sistemático sobre interações de moléculas com a superfície. Soma-se a isto o limitado espectro de técnicas experimentais para identificar os sítios de interação e mudanças conformacionais de moléculas na superfície de nanopartículas a nível manométrico.

Neste trabalho, procurou-se utilizar as técnicas experimentais tais como o XPS e ToF-SIMS para identificar a osteocalcina na superfície de fosfato de cálcio e caracterizar possíveis regiões da interação da molécula com a superfície. Para isto, foram realizados três grupos de experimentos de adsorção da osteocalcina em substrato de fosfato de cálcio.

No primeiro grupo foi realizadas adsorções da OC em silício e em hidroxiapatita constituída por nanopartículas com tamanho médio de 50 nm a 100 nm e alto grau de cristalinidade. A adsorção em silício foi realizada para servir como elemento controle, sem a presença do cálcio.

Num segundo grupo de experimentos adsorvemos a OC foi adsorvida na superfície de NPs das amostras HAp90, HAp5 e o OCP. Neste caso, procurou-se identificar diferenças no processo de adsorção induzidas por variações na estrutura e estequiometria da superfície do fosfato de cálcio. Nos experimentos de adsorção

foram usadas a osteocalcina nativa (hOC) e a descarboxilada (hdOC).

Por fim, no último grupo temos o estudo de como a razão Ca/P da superfície pode afetar o processo de adsorção da osteocalcina.

5.2.1 Interação da Osteocalcina com íons Ca

Para investigar a indução de mudanças conformacionais entre hOC e hdOC, induzidas pela ligação das mesmas com íons Ca^{2+} , espectros de dicroísmo circular, CD, foram obtidos da proteína pura e depois da adição de cálcio na solução. Na Figura 5.25a,b temos o espectro das proteínas hdOC e hOC sem e com 5 mM de Ca^{2+} , respectivamente. A proteína hOC apresenta uma banda negativa em 205 nm que representa uma estrutura randômica, no entanto, após a adsorção de cálcio há uma mudança em sua conformação, com duas bandas negativas, uma em 208 nm e outra em 222 nm, correspondendo a uma estrutura do tipo α -hélice, como já relatado em [200]. Embora a hdOC apresente uma helicidade um pouco maior que a hOC na ausência de Ca^{2+} , esta não muda de forma com a presença do cálcio. Estes resultados estão de acordo com outros estudos usando espectroscopia e cristalografia de raios X feitos previamente com outras espécies de osteocalcina, como a bovina, da galinha e do peixe [66, 200–203].

Curvas de titulação por CD para a hOC foram feitas com adição de Ca^{2+} de forma que sua concentração variasse de 0 mM a 5 mM, Figura 5.26a. O máximo de indução de mudança conformacional foi obtido para a concentração de 3 mM de Ca^{2+} . Através da curva da diferença de elipticidade molar em 222 nm entre a medida da proteína com cálcio e sem cálcio em função da concentração de Ca^{2+} , foi obtida o valor de $K_d = 0,33 \pm 0,04$ mM, Figura 5.26b. O ajuste foi feito usando a curva OneSiteBind do programa OriginPro8, que é a mesma curva relatada no Item 3.4.10, Equação 3.20. O valor obtido de K_d está próximo do encontrado na literatura, que varia de 0,8 mM a 3 mM dependendo da espécie [204].

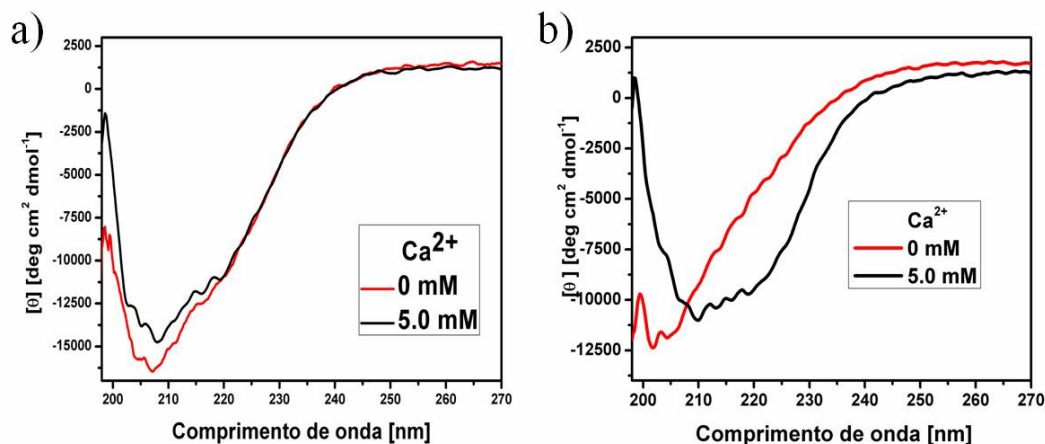


Figura 5.25: Espectro de Dicroísmo de (a) 20 μM hdOC (b) 20 μM hOC em 20 mM Tris com 150 mM NaCl em pH 7,4 antes e depois de tratamento com 5 mM Ca^{2+} a 25 °C.

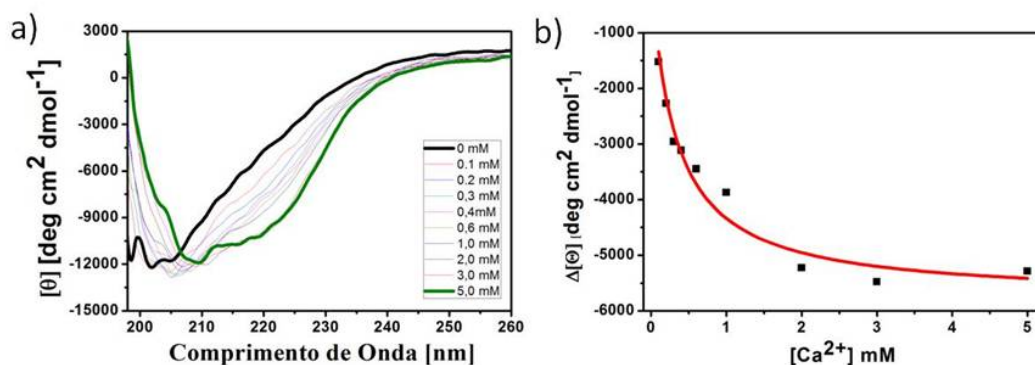


Figura 5.26: (a) Titulação de CD para a hOC; (b) mudança na elipticidade molar em 222 nm relativo à hOC sem Ca^{2+} com variação da concentração de Ca^{2+} de 0 to 5 mM em 20 mM Tris com 150 mM NaCl em pH 7,4 a 25 °C.

A eficiência da ligação da osteocalcina com a HAp foi examinada ao colocar quantidades crescente de HAp (de 1 mg/mL a 4 mg/mL) em 40 μM de proteína. O experimento foi feito na presença e na ausência de 3 mM Ca^{2+} para avaliar se o mesmo aumenta a absorção da proteína pelo pó. Como mostrado na Figura 5.27a,

HAp captou ~ 80 % de hOC com 1 mg de HAp na presença de Ca^{2+} enquanto na ausência do cálcio a captura foi de ~ 55 %. O mesmo comportamento foi observado para a hdOC, no entanto a quantidade de proteína capturada foi menor em ambos experimentos (com e sem Ca^{2+} para 1 mg de HAp). Apesar da hdOC não passar para uma estrutura α -hélice na presença de Ca^{2+} , a afinidade da ligação com a HAp cresceu significativamente na presença dos íons cálcio, o que claramente indica que o cálcio participa em alguma parte do processo de adsorção e não somente nas mudanças conformacionais.

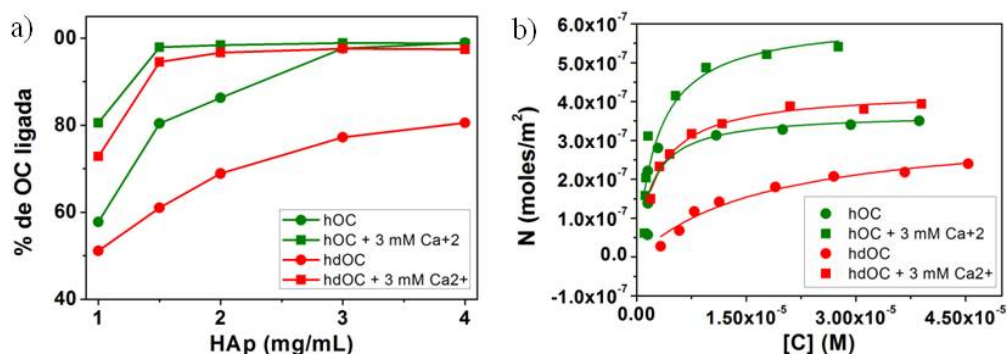


Figura 5.27: (a) Porcentagem de proteína ligada à HAp e (b) isoterma de equilíbrio de adsorção. O experimento foi realizado com hOC (verde) e hdOC (vermelho) ligado à HAp à 22 °C na presença (■) e na ausência (●) de 3 mM de Ca^{2+} em 20 mM Tris com 150 mM NaCl, pH 7,4. Medida feita por Selvi Srinivasan, pesquisadora da University of Washington em Seattle.

A cobertura da superfície (Q_{max}) e a afinidade da ligação (K) na presença e na ausência de Ca^{2+} foi medida usando o ajuste da isoterma de Langmuir, Figura 5.27b. Como pode-se ver pela Tabela 5.14, hOC tem maior cobertura de superfície ($61,2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$) na presença de Ca^{2+} e esta cobertura praticamente dobrou se comparado com o valor na ausência dos mesmos ($37,0 \mu\text{mol}/\text{m}^2$). Isso pode ter ocorrido pois na presença de Ca^{2+} a hOC aumenta sua estrutura α -hélice e provavelmente a proteína se liga mais facilmente à HAp quando tem esta conformação. Este comportamento,

no entanto, não foi observado para o caso da hdOC, ou seja, a cobertura foi praticamente a mesma em ambos os casos e isso provavelmente se deve ao fato da hdOC não alterar sua conformação estrutural. Apesar disso, para a hdOC houve um aumento maior na afinidade da ligação na presença do Ca^{2+} , se comparada com a ausência dos íons. Este valor é comparável com o valor encontrado para a hOC, que não varia com a adição de Ca^{2+} . Vale aqui ressaltar que a cobertura da superfície da HAp foi aproximadamente igual para o caso da hOC e hdOC na ausência de Ca^{2+} , mas a eficiência da ligação é muito baixa para a hdOC. Podemos então concluir que o íon Ca em solução tem efeitos diferentes no processo de adsorção, aumentando a quantidade de proteína hOC adsorvida e melhorando a interação da hdOC com a superfície.

Tabela 5.14: Cobertura de superfície e afinidade de ligação da hOC e hdOC à 22 °C na presença e na ausência de 3 mM de Ca^{2+} em 20 mM Tris com 150 mM NaCl, pH 7,4. Medida feita por Selvi Srinivasan, pesquisadora da University of Washington em Seattle.

Proteína	Ca^{2+} [mM]	Q_{max} [$10^{-7} mol/m^2$]	K [$10^5/M$]
hOC	0	3,70±0,38	4,87±1,98
hOC	3	6,12±0,57	3,54±1,06
hdOC	0	3,37±0,33	0,56±0,13
hdOC	3	4,28±0,10	3,45±0,32

5.2.2 Adsorção da osteocalcina em silício e HAp

A detecção de hOC e hdOC na superfície do silício e da HAp foi realizada através da medida do percentual atômico de nitrogênio no espectro de XPS das amostras. O espectro de XPS antes da adsorção da proteína, Figura 5.28, apresenta os picos característicos do Si (amostra de silício) e de Ca, P, O (amostra HAp). Após a

adsorção da osteocalcina nativa e descarboxilada o espectro passa a apresentar um pico extra do elemento nitrogênio confirmando a adsorção da osteocalcina em ambos os substratos.

As Tabelas 5.15 e 5.16 mostram a energia de ligação dos picos de XPS de cada elemento e a sua concentração relativa nas amostras de Si e HAp, respectivamente. Verifica-se que o processo de adsorção da OC não modifica a energia de ligação dos elementos presentes da superfície indicando que a proteína não estabelece ligação covalente com a superfície. A presença do pico de nitrogênio, a diminuição da concentração de Ca e P e o aumento da quantidade relativa de carbono na superfície, após a adsorção da OC, comprovam a presença das proteínas cobrindo parte da superfície da HAp, Tabela 5.16.

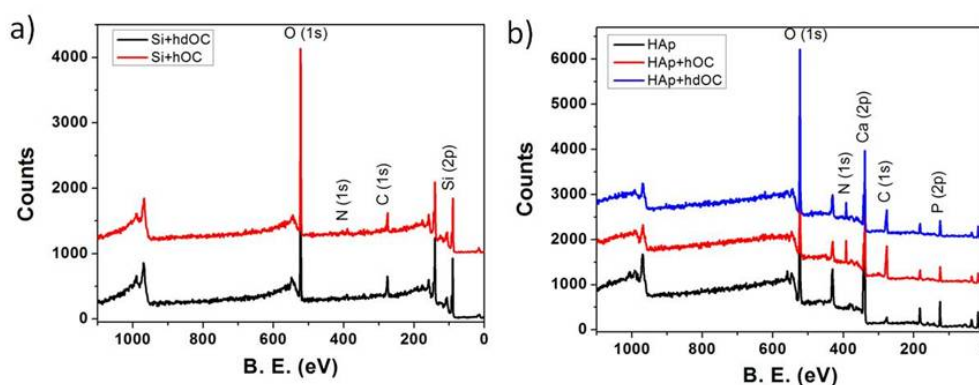


Figura 5.28: Espectros de XPS a) após a adsorção de ambas as proteínas em substrato de silício e b) antes e após a adsorção na HAp.

Tabela 5.15: Energia de ligação de cada pico presente nas amostras de HAp e silício. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	N 1s [eV]	Si 2p [eV]
HAp	530,5±0,2	346,7±0,1	132,7±0,2	284,6±0,2		
HAp-hdOC	530,3±0,1	346,4±0,1	132,4±0,2	284,6±0,0	399,2±0,2	
HAp-hOC	530,3±0,1	346,3±0,1	132,4±0,1	284,6±0,0	399,4±0,2	
Si-hdOC	531,0±0,6			284,6±0,1	399,3±0,6	97,6±0,1
Si-hOC	531,3±0,6			284,6±0,1	399,6±0,5	97,9±0,6

Tabela 5.16: Porcentagem de cada pico e a razão Ca/P nas amostras de HAp e silício. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	O 1s [%]	Ca 2p [%]	P 2p [%]	C 1s [%]	N 1s [%]	Si 2p [%]	Ca/P
HAp	59,8±0,9	21,0±0,5	12,8±0,5	6,3±0,5			1,64±0,01
HAp-hdOC	47,3±1,5	15,8±0,6	10,0±0,4	21,2±2,9	5,0±0,4		1,58±0,09
HAp-hOC	42,2±4,0	13,2±1,9	8,3±1,1	29,3±5,4	7,0±1,6		1,59±0,60
Si-hdOC	35,2±1,2			28,9±2,3	3,7±0,5	32,3±1,5	
Si-hOC	37,1±1,5			24,5±2,2	3,1±0,2	35,1±1,3	

A Figura 5.29 mostra que a concentração atômica de nitrogênio na superfície do silício, após a adsorção da osteocalcina nativa (hOC) e da osteocalcina descarboxilada (hdOC) não apresentou diferença dentro da incerteza da medida de XPS (3-4 %). Este resultado indica que a concentração da proteína adsorvida na superfície do silício independe da proteína estar ou não descarboxilada. Efeito diferente foi observado na adsorção da hOC e da hdOC na superfície da HAp. Neste caso, a concentração de nitrogênio adsorvida pela HAp foi maior que no Si. Este resultado pode ser explicado pela afinidade química de aminoácidos presentes na osteocalcina com o cálcio da HAp.

Além disto, observa-se que a proteína nativa (não descarboxilada) apresenta

maior adsorção na HAp (~ 5 % atômica de N para hdOC e ~ 7 % atômica de N para hOC) o que pode ser atribuído ao fato da hdOC não possuir os aminoácidos Gla que se ligam preferencialmente ao cálcio da HAp. A superfície da HAp adsorvida com a hOC apresenta menor concentração de Ca e P e maior concentração de C (ver Tabela 5.16). Este resultado reforça a conclusão anterior que a hOC possui mais afinidade com a HAp que a hdOC. O resultado do XPS não está de acordo com o resultado da análise usando a isoterma de Langmuir, em que a absorção de ambas proteínas foi praticamente a mesma na presença somente de HAp. Esse aparente desencontro pode ser explicado pelo fato de o XPS ser uma medida em relação à proteína que realmente está ligada à superfície, enquanto a análise anterior foi feita usando o sobrenadante da adsorção. Além disso, para a medida de XPS o pó de HAp foi lavado 5 vezes, o que remove as proteínas que estão somente presas nos poros do material e não realmente ligada e como pode-se ver na Tabela 5.14, a afinidade da adsorção da hdOC é muito menor que para a hOC, fazendo com que esta seja removida mais facilmente no processo de lavagem.

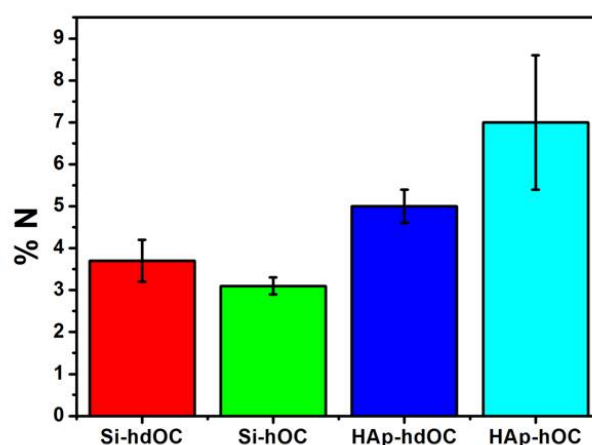


Figura 5.29: % atômica de N no espectro de XPS para a hOC e hdOC adsorvidas em silício e em HAp.

Análise por ToF-SIMS

Os gráficos de *score* e *loading* foram gerados pela técnica de PCA após a calibração, seleção dos picos de interesse, normalização pela soma dos picos selecionados e suas centralizações. A Figura 5.30 mostra o resultado da análise multivariacional para o primeiro componente que capturou 91 % da variância total dos dados de adsorção de hOC e hdOC na HAp e no Si.

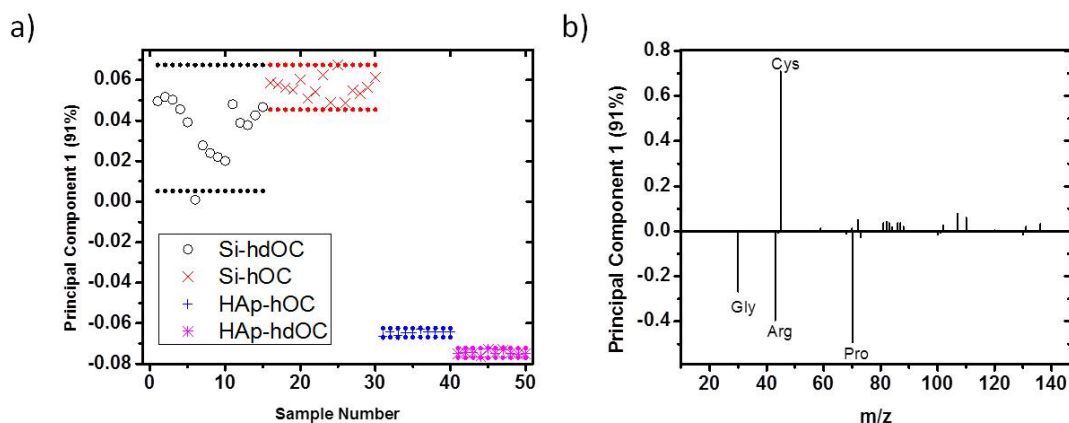


Figura 5.30: Gráficos score (a) e loading (b) para PC1 das proteínas hOC e hdOC adsorvidas em Si e em HAp.

Os gráficos da Figura 5.30 mostram que o *score* separa claramente a adsorção nos dois substratos: o silício na parte positiva e a hidroxiapatita na parte negativa do gráfico. Além da separação entre as duas superfícies, o *score* mostra que os dados não distinguem aminoácidos das proteínas hOC e hdOC adsorvidas na superfície do silício. Para a HAp verifica-se que fragmentos da hOC se separam daqueles formados pela hdOC. Já o gráfico *loading*, Figura 5.31b, mostra que na adsorção da OC no silício (parte positiva do gráfico *score*) a Cys é o aminoácido detectado com maior intensidade e, portanto, mais relevante para esse sistema.

Uma nova análise foi feita usando somente os dados de adsorção da hOC e hdOC na HAp com o intuito de explicar a diferença verificada no gráfico *score* da

Figura 5.30a. O principal componente 1 do *score* da Figura 5.31a capturou 85 % da variância total dos dados evidenciando a separação entre a adsorção das duas proteínas (hdOC na parte positiva e hOC na parte negativa). Os aminoácidos presentes nas partes positivas (Gly, Arg e Pro) e negativas (Gln/Glu, Ile/Leu, His, Phe, Trp e Tyr) não são os mesmos, o que sugere diferentes orientações das duas proteínas na superfície da HAp.

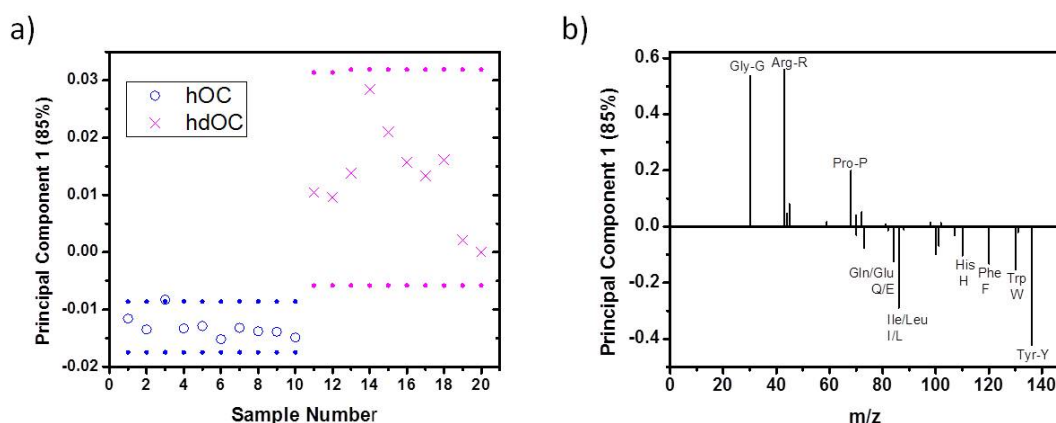


Figura 5.31: Gráficos score (a) e loading (b) para PC1 das proteínas hOC e hdOC adsorvidas em HAp.

Segundo a estrutura da osteocalcina, Figura 3.10, os aminoácidos Asn, com massas dos fragmentos iguais a (70, 87, 88 e 98) u, His, massas dos fragmentos iguais a (81, 82 e 110) u e Phe cujas massas dos fragmentos são (120 e 131) u estão presentes somente nas α -hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, respectivamente. Portanto, as intensidades dos picos destes aminoácidos podem indicar quais as α -hélices da proteína estão mais expostas na superfície do material.

As Figuras 5.32a-b mostram as razões de intensidade Asn($\alpha 1$)/His($\alpha 2$), Asn($\alpha 1$)/Phe($\alpha 3$) e His($\alpha 2$)/Phe($\alpha 3$) nas adsorções da hOC e hdOC na HAp e no silício, respectivamente. No silício, as razões de intensidade entre os fragmentos Asn($\alpha 1$)/His($\alpha 2$), Asn($\alpha 1$)/Phe($\alpha 3$) e His($\alpha 2$)/Phe($\alpha 3$) são similares na hdOC e na hOC indicando

que a descarboxilação não afeta a conformação da proteína na superfície do silício.

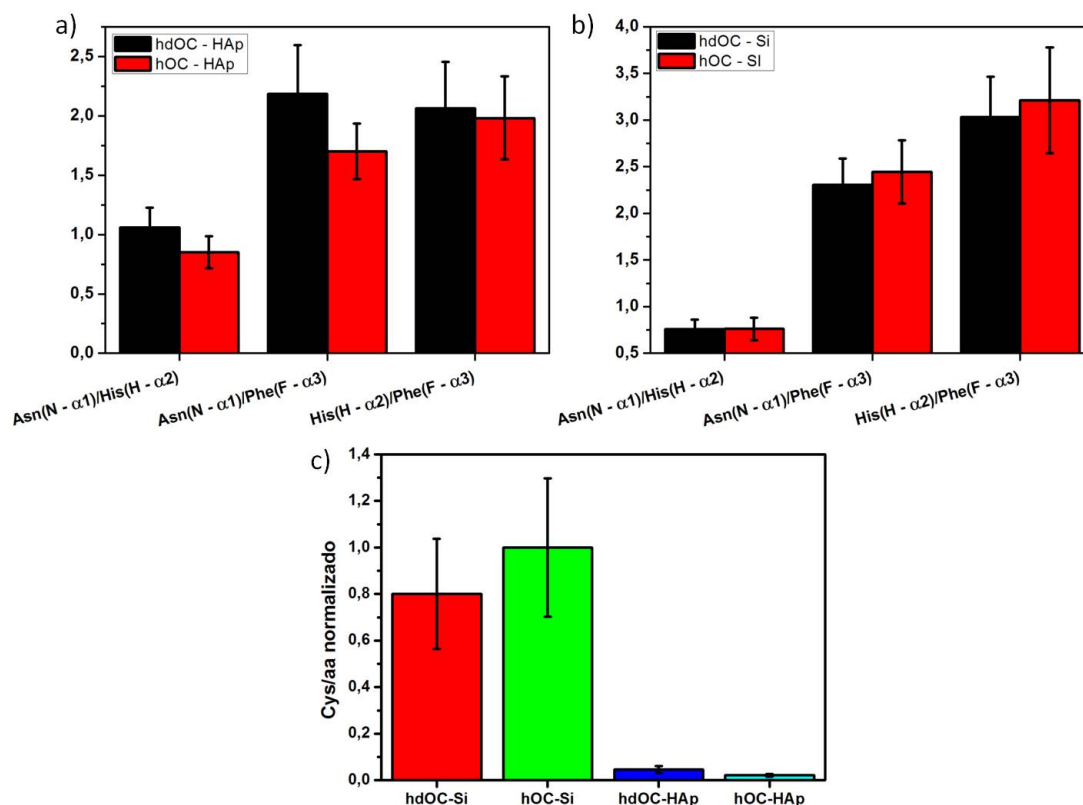


Figura 5.32: Razão entre os picos das regiões de α -hélices α 1/ α 2, α 1/ α 3 e α 2/ α 3 para adsorção em a) HAp e em b) Si e em c) a razão do aminoácido Cys/(soma dos aminoácidos) normalizados.

Comparando-se as razões entre as intensidades dos aminoácidos para a hOC adsorvida na superfície da HAp e na superfície do silício pode-se verificar que Asn(α 1)/His(α 2) passa de 0,85 para 0,76, Asn(α 1)/Phe(α 3) passa de 1,70 para 2,44 e His(α 2)/ Phe(α 3) de 1,98 para 3.21. Estes resultados indicam que as exposições das hélices α 1, α 2 e α 3 da hOC ocorrem na sequência α 2> α 1> α 3 para as duas superfícies (HAp e Si).

No caso da hdOC verifica-se que Asn(α 1)/His(α 2) passa de 1,06 para 0,76,

Asn($\alpha 1$)/Phe($\alpha 3$) passa de 2,19 para 2,30 e His($\alpha 2$)/Phe($\alpha 3$) de 2,06 para 3,03. Estes resultados indicam que as exposições das hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da hdOC ocorrem na sequência $\alpha 2 > \alpha 1 > \alpha 3$ para o Si e $\alpha 2 \approx \alpha 1 > \alpha 3$ para a HAp.

Conforme descrição no Item 3.2.1 o aminoácido Cys localiza-se na região central e interior da OC. Este aminoácido foi o mais relevante no *loading* da adsorção das OCs no substrato de silício (Figura 5.30b). O mesmo não ocorreu com a HAp. Por outro lado, os valores da razão normalizada entre as intensidade da Cys e os demais aminoácidos da OC (hOC e hdOC) no Si e na HAp foram de 1,00/0,81 e 0,05/0,02, respectivamente, Figura 5.32c. O baixo valor da razão para a HAp sugere que a adsorção de ambas OCs mantém a cisteína protegida pelos demais aminoácidos não havendo alteração da estrutura da proteína. Por outro lado, o alto valor da razão no Si indica que a cisteína encontra-se exposta na superfície com sua estrutura tridimensional provavelmente modificada.

Podemos concluir então que ambas as osteocalcinas preferem se ligar à substratos que contém cálcio em sua estrutura, sendo que, neste caso, a hOC, por ter maior afinidade com o Ca, adsorve mais que a hdOC. Além de preferirem superfícies com Ca, as proteínas não perdem sua conformação após a adsorção, o que ocorre para o substrato de Si, com as cisteínas das proteínas expostas.

5.2.3 Adsorção em HAp90, HAp5 e OCP

Análise por XPS

Os espectro de XPS das amostras HAp90, HAp5 e OCP apresentam as mesmas energias de ligação para os elementos Ca, P, O e C conforme é mostrado na Figura 5.33 e Tabela 5.17.

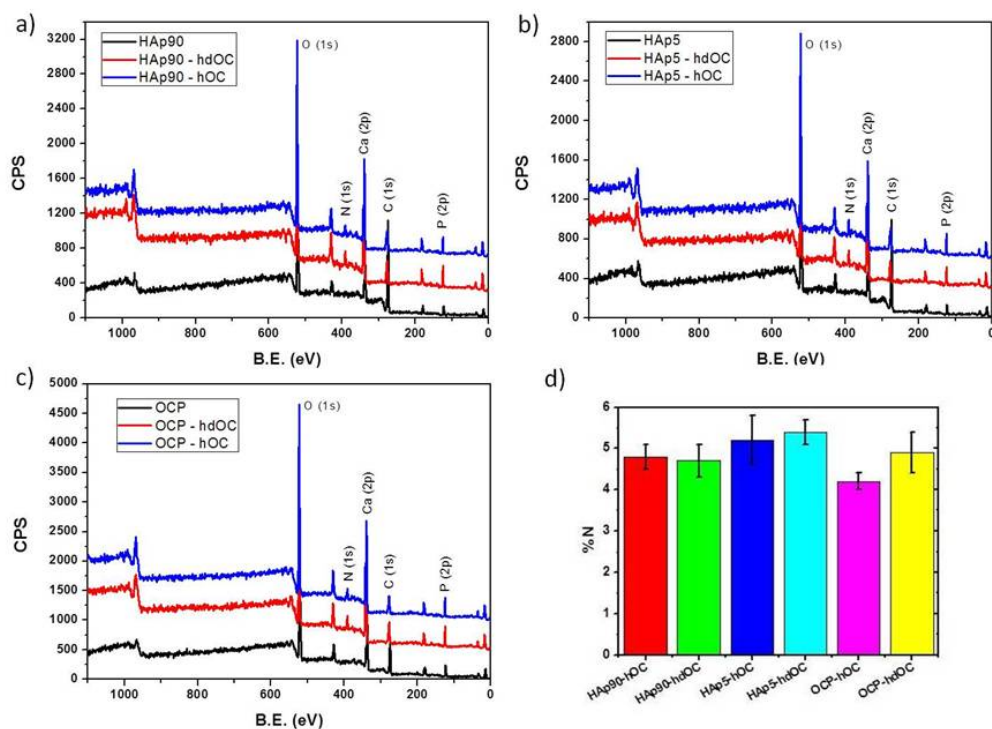


Figura 5.33: % atômica de nitrogênio dividido pela área superficial das amostras para a hOC e a hdOC adsorvidas na HAp90 (cristalina), HAp5 (menos cristalina) e OCP.

As energias de ligação dos elementos não sofrem modificações após a adsorção da OC. Tal como foi observado na adsorção da amostra HAp, este fato reforça a hipótese que a adsorção da OC não se dá por ligação covalente nos fosfatos de cálcio, mesmo com modificações na estequiometria e estrutura. A energia de ligação do nitrogênio da hdOC e hOC adsorvidas na HAp5 é ligeiramente menor que na HAp90 e OCP indicando que a cristalinidade da superfície da hidroxiapatita pode ser um elemento importante na interação da proteína descarboxilada com a superfície.

Tabela 5.17: Energia de ligação de cada pico presente nas amostras de HAp5, HAp90 e OCP. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	N 1s [eV]
HAp5	530,4±0,1	346,6±0,1	132,6±0,1	284,6±0,0	
HAp5-hdOC	530,1±0,6	346,1±0,6	132,1±0,6	284,6±0,1	399,1±0,6
HAp5-hOC	530,1±0,5	346,1±0,5	132,1±0,5	284,6 ±0,1	399,1±0,5
HAp90	530,7±0,2	346,8±0,1	132,7±0,1	284,6±0,1	
HAp90-hdOC	530,6±0,1	346,6±0,1	132,6±0,1	284,6±0,1	399,6±0,1
HAp90-hOC	530,6±0,1	346,6±0,1	132,6±0,1	284,6 ±0,1	399,6±0,1
OCP	530,6±0,1	346,8±0,0	132,9±0,1	284,6±0,0	
OCP-hdOC	530,6±0,1	346,6±0,1	132,6±0,1	284,6±0,0	399,6±0,1
OCP-hOC	530,6±0,1	346,6±0,1	132,6±0,1	284,6±0,1	399,6±0,1

Apesar dessa diferença, a concentração de nitrogênio nas superfícies da HAp5 e HAp90 adsorvida com a hOC e hdOC são iguais mostrando que a cristalinidade não afeta a eficiência da adsorção e que a descarboxilação da proteína não altera o processo de adsorção. Esta conclusão não é válida para a superfície do OCP. Neste caso, a adsorção ocorreu prioritariamente na superfície adsorvida com a hdOC. Em todos os casos houve uma diminuição da quantidade de Ca e P depois da adsorção de hOC e hdOC, o que indica que a proteína se encontra na superfície das amostras, encobrindo-as. Além disso, a quantidade de C é maior, indicando também a presença de proteína, já que a mesma contém grande quantidade de carbono em sua estrutura, Tabela 5.18.

Tabela 5.18: Porcentagem de cada pico e a razão Ca/P nas amostras de HAp5, HAp90 e OCP. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Amostras	O (1s) %	Ca (2p) %	P (2p) %	C (1s) %	N (1s) %	Ca/P
HAp5	46,8±0,9	24,7±0,3	19,4±0,6	9,2±0,5		1,27±0,06
HAp5-hdOC	46,2±1,2	13,2±0,6	8,6±0,5	24,0±1,7	5,2±0,3	1,55±0,10
HAp5-hOC	47,4±1,7	13,5±0,7	8,7±0,5	22,7±2,2	5,4±0,6	1,55±0,11
HAp90	48,6±0,6	23,8±0,1	18,3±0,3	9,3±0,2		1,30±0,01
HAp90-hdOC	47,2±1,7	14,2±0,7	9,3±0,5	21,6±2,2	4,7±0,3	1,55±0,10
HAp5-hOC	47,4±2,1	15,5±0,8	9,9±0,5	22,5±3,42	4,8±0,3	1,56±0,10
OCP	48,7±0,1	24,2±0,1	21,0±0,3	6,2±0,3		1,15±0,01
OCP-hdOC	48,0±1,2	14,9±0,5	10,7±0,2	21,5±1,2	4,9±0,5	1,40±0,05
OCP-hOC	49,2±0,8	15,6±0,3	11,0±0,3	20,0±0,6	4,2±0,2	1,43±0,05

Análise por ToF-SIMS

Tal como verificado para a amostra HAp, Figura 5.31a, o *score* das amostras HAp90, HAp5, e OCP, Figura 5.34a, também mostrou a separação da hOC (parte negativa do gráfico) e da hdOC (parte positiva do gráfico) para o principal componente PC1 (captura de 68 % da variância total dos dados). Este resultado sugere que mudanças na estrutura química da proteína, tal como a descarboxilação, tem influência na adsorção da proteína adsorvida na superfície. Foram realizadas medidas em 10 componentes principais e em nenhum deles houve separação dos dados relativos às amostras HAp5 e HAp90, indicando que pela técnica de ToF-SIMS as duas superfícies são equivalentes frente a adsorção de cada uma das proteínas. Novamente o gráfico *loading*, Figura 5.34b, não nos forneceu maiores informações sobre o motivo dessa separação ocorrer.

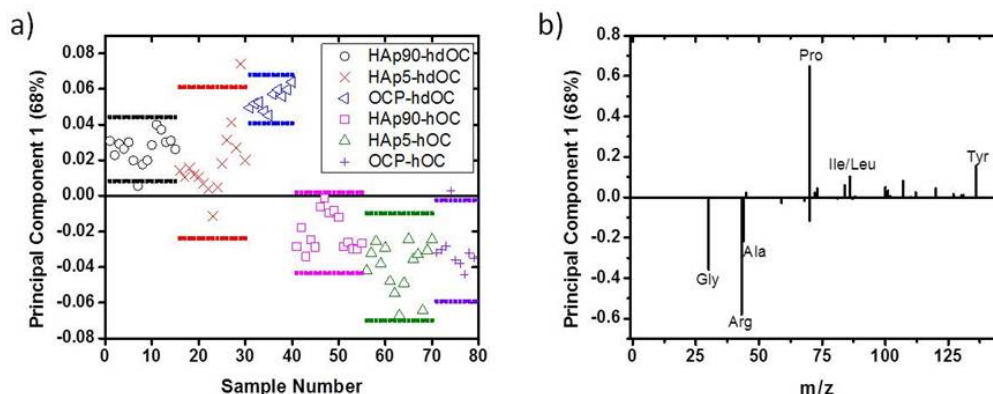


Figura 5.34: Gráfico do *score* (a) e do *loading* (b) para PC1 da adsorção das hdOC e hOC adsorvidas na HAp90, HAp5 e OCP. PC1 capturou 68 % da variância total dos dados.

Analisando a distribuição dos dados ToF-SIMS da hOC e da hdOC adsorvidas nas amostras HAp90 e OCP no gráfico PC1xPC2, Figura 5.35a, a hOC localiza-se no lado negativo e a hdOC no lado positivo do PC1 (capturando 93 % da variância). Em relação ao eixo PC2 (capturando 5 % da variância), os dados referentes à amostra OCP distribuem-se no lado positivo e os da HAp90 majoritariamente no lado negativo. Como os dois fosfatos têm composições químicas diferentes, conclui-se que a natureza do fosfato de cálcio modifica a característica da adsorção da cada proteína.

O gráfico *loading* que identifica os fragmentos de aminoácidos responsáveis pela separação observada no gráfico *score*, não traz informações relevantes que possam caracterizar prováveis regiões das proteínas que estão ligadas a superfície, Figuras 5.35b-c.

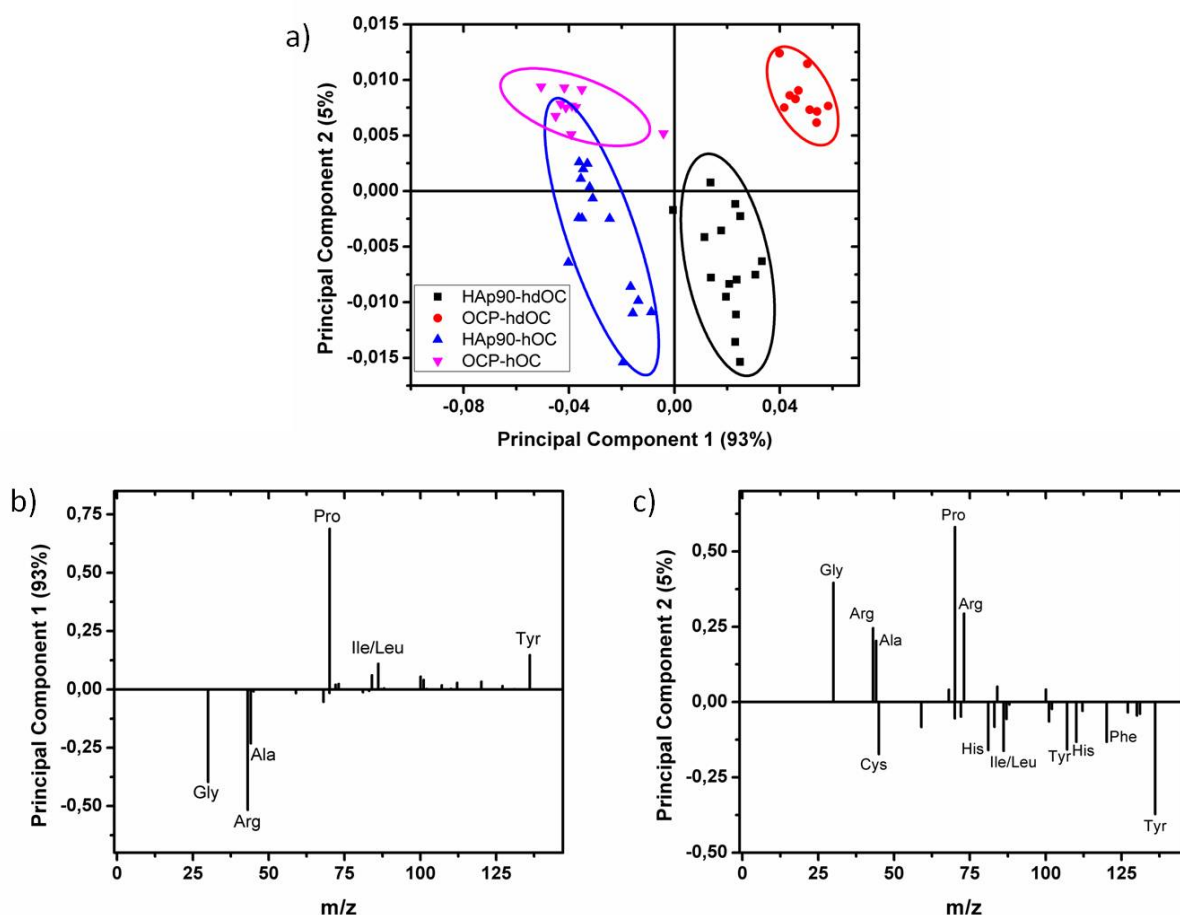


Figura 5.35: Gráfico de PC1 x PC2 (a), PC1 loading (b) e PC2 loading (c) da adsorção de hOC e hdOC em amostras cristalinas de hidroxiapatita (HAp90) e OCP. PC1 e PC2 capturam 93 % e 5 % da variância total dos dados, respectivamente.

A intensidade dos fragmentos dos aminoácidos Asn (massas dos fragmentos 70 u, 87 u e 88 u), His (massas dos fragmentos 81 u, 82 u e 110 u) e Phe (massas dos fragmentos 120 u e 131 u) foram usados para o cálculo das razões entre as α -hélices α_1 , α_2 e α_3 , respectivamente. As Figuras 5.28a-c mostram as razões de intensidade Asn(α_1)/His(α_2), Asn(α_1)/Phe(α_3) e His(α_2)/Phe(α_3) nas adsorções da hOC e hdOC na HAp5, HAp90 e no OCP, respectivamente.

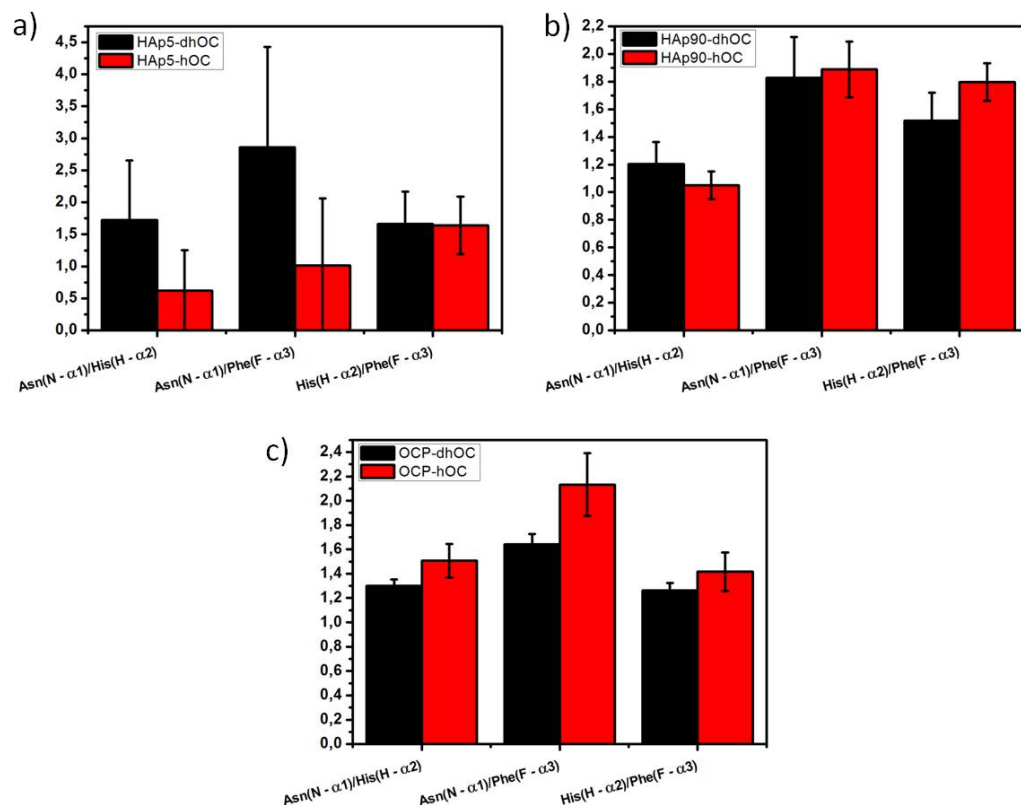


Figura 5.36: Razão entre os picos das regiões de α -hélices $\alpha1/\alpha2$, $\alpha1/\alpha3$ e $\alpha2/\alpha3$ para adsorção em a) HAp5, em b) HAp90 e em c) OCP.

Na HAp5, as razões de intensidade entre os fragmentos His($\alpha2$)/Phe($\alpha3$) são similares na hdOC e na hOC, sendo $\alpha2/\alpha3=1,65$. No entanto, Asn($\alpha1$)/His($\alpha2$) passa de 0,62 para 1,72 e Asn($\alpha1$)/Phe($\alpha3$) passa de 1,01 para 2,86 ao comparar hOC com hdOC, Figura 5.28a. Os grandes desvios nos dados experimentais das medidas de Asn($\alpha1$)/His($\alpha2$) e Asn($\alpha1$)/Phe($\alpha3$) dificultam a interpretação sobre possíveis orientações das proteínas na superfície.

Comparando a razão entre fragmentos da hOC e hdOC adsorvidas na superfície da HAp90 conforme Figura 5.28b verifica-se: Asn($\alpha1$)/His($\alpha2$) passa de 1,05 para 1,20, Asn($\alpha1$)/Phe($\alpha3$) passa de 1,89 para 1,82 e His($\alpha2$)/Phe($\alpha3$) de 1,80 para 1,52. Para a adsorção em OCP, Figura 5.28c temos: Asn($\alpha1$)/His($\alpha2$) passa de 1,51

para 1,30, Asn($\alpha 1$)/Phe($\alpha 3$) passa de 2,13 para 1,64 e His($\alpha 2$)/Phe($\alpha 3$) de 1,42 para 1,26.

Esses resultados indicam que i) as exposições das hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da hOC ocorrem na sequência $\alpha 2 > \alpha 1 \approx \alpha 3$ para a HAp90, ii) a sequência $\alpha 1 > \alpha 2 > \alpha 3$ é observada na adsorção da hdOC nas superfícies de HAp90 e OCP, iii) a sequência $\alpha 1 > \alpha 2 > \alpha 3$ também é verificada para a hOC na superfície do OCP. Destes resultados se conclui que as duas proteínas possuem orientação diferentes após a adsorção na HAp90 mas similares no OCP. Destes resultados se conclui que as duas proteínas possuem orientações diferentes após a adsorção na HAp90 mas similares no OCP. Ou seja, apesar de superfície da HAp90 adsorver quantidades iguais das duas proteínas, elas se orientam de forma diferente nesta superfície, o que não ocorre na OCP. Nesta superfície, elas se orientam da mesma maneira, mas adsorvem quantidades diferentes, mostrando mais uma vez que a composição do substrato afeta de forma diferente a adsorção de hOC e hdOC. Isso no entanto, não é verdade para a HAp5 e HAp90, em que a cristalinidade não afeta a adsorção.

5.2.4 Adsorção em HAp90 e HAp

A amostra HAp adsorvida com hOC apresentou maior concentração relativa de nitrogênio que a amostra HAp90, que por sua vez teve a mesma concentração de nitrogênio que as duas amostras adsorvidas com hdOC, como mostra os resultados de XPS da Figura 5.37. Como a hOC tem maior afinidade com os Ca da HA, este fato pode ser explicado pela HAp apresentar mais cálcio em sua superfície (Ca/P=1,64) se comparada com a HAp90 (Ca/P=1,30).

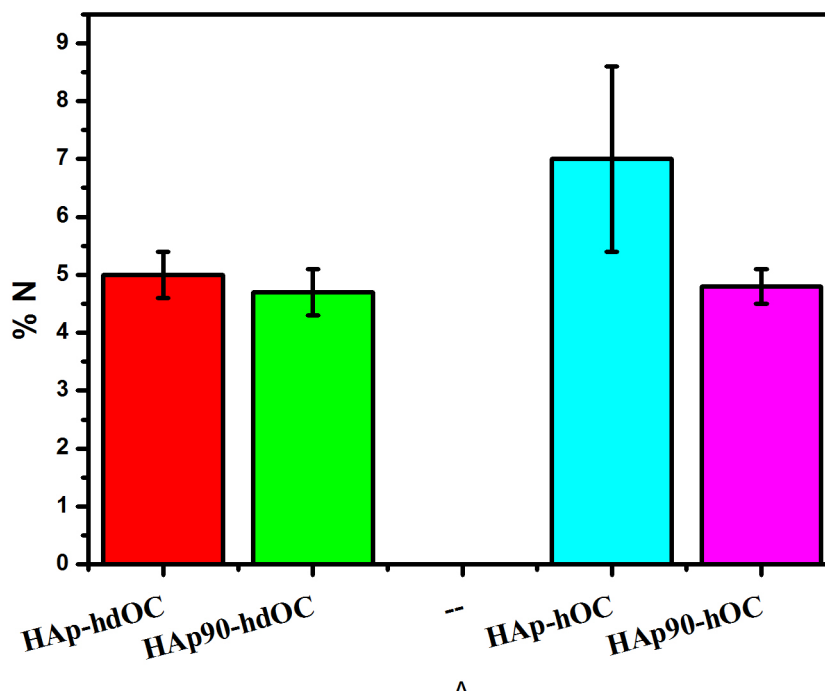


Figura 5.37: % atômica de N para hOC e hdOC adsorvidas em HAp90 e HAp.

As análises de ToF-SIMS, Figura 5.38, mostram que a separação entre hOC (parte negativa) e hdOC (parte positiva) do *score* PC2 que captura 5 % da variância total dos dados continua existindo, mas a separação entre HAp90 e HAp só existe para a osteocalcina humana, o que vai de acordo com os dados de XPS que mostraram uma maior adsorção para a hOC em HAp.

Como as duas amostras apresentaram valores próximos de área superficial, tamanho e volume de poro, variando somente a razão Ca/P da superfície, podemos concluir então que a maior quantidade de cálcio na superfície só é relevante para a proteína que apresenta o aminoácido Gla em sua estrutura, hOC, uma vez que este se liga preferencialmente ao Ca. Para uma superfície deficiente em Ca, a presença destes aminoácidos não é sentida quanto à quantidade de proteína adsorvida e ao processo de adsorção.

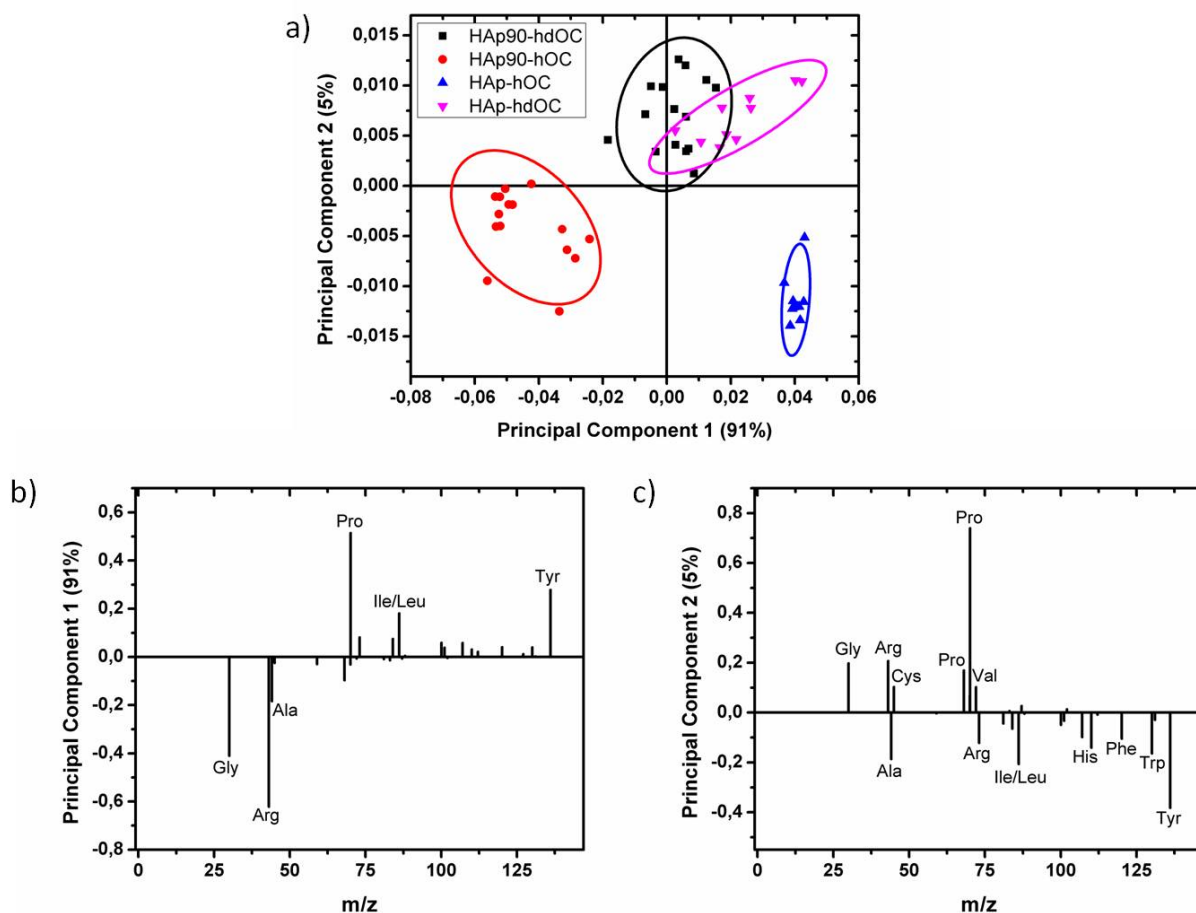


Figura 5.38: Gráfico de PC1 x PC2 (a), PC1 loading (b) e PC2 loading (c) para a adsorção de hOC e hdOC em HAp e em HAp90.

5.3 Adsorção de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio

A adsorção da insulina na superfície da HAp90, ZnHA e SrHA foi realizada utilizando-se soluções aquosas contendo concentrações de insulina entre 0,01 mg/mL e 1,20 mg/mL e tempo de adsorção de 3 horas. Este é o tempo necessário para que a adsorção atingisse a saturação para todas as concentrações da proteína (experimento

realizado anteriormente para determinação do melhor pH, tempo de adsorção e da melhor solução tampão). O processo de adsorção foi caracterizado pelas técnicas de FTIR, XRD, XPS, Potencial Zeta e CD.

5.3.1 Composição e Estequiometria da Superfície

Após os experimentos de adsorção da insulina, as amostras HAp90, ZnHA e SrHA foram analisadas por difração de raios X em incidência rasante para investigar possíveis modificações na estrutura das nanopartículas devido os efeitos de dissolução e coprecipitação quando tratadas na solução tampão contendo a proteína. Verificou-se que o tratamento em tampão contendo a insulina não modifica a cristalinidade e os parâmetros de rede da célula unitária das amostras, mantendo o material com a mesma fase do material antes do tratamento com proteína, Figura 5.39a-b e Tabela 5.19. Este resultado indica que o processo de adsorção não induz efeitos detectáveis de dissolução das NPs e coprecipitação de outros fosfatos de cálcio na superfície das NPs.

Tabela 5.19: Parâmetros de rede e tamanho de cristalito para as amostras com e sem insulina.

Amostras	c [nm]	a=b [nm]	Tamanho cristalito [nm]
HAp90	0,689	0,944	42
HAp90 1,0 mg/mL	0,690	0,944	43
ZnHA	0,687	0,944	36
ZnHA 1,0 mg/mL	0,687	0,944	36
SrHA	0,690	0,945	41
SrHA 1,0 mg/mL	0,690	0,945	40

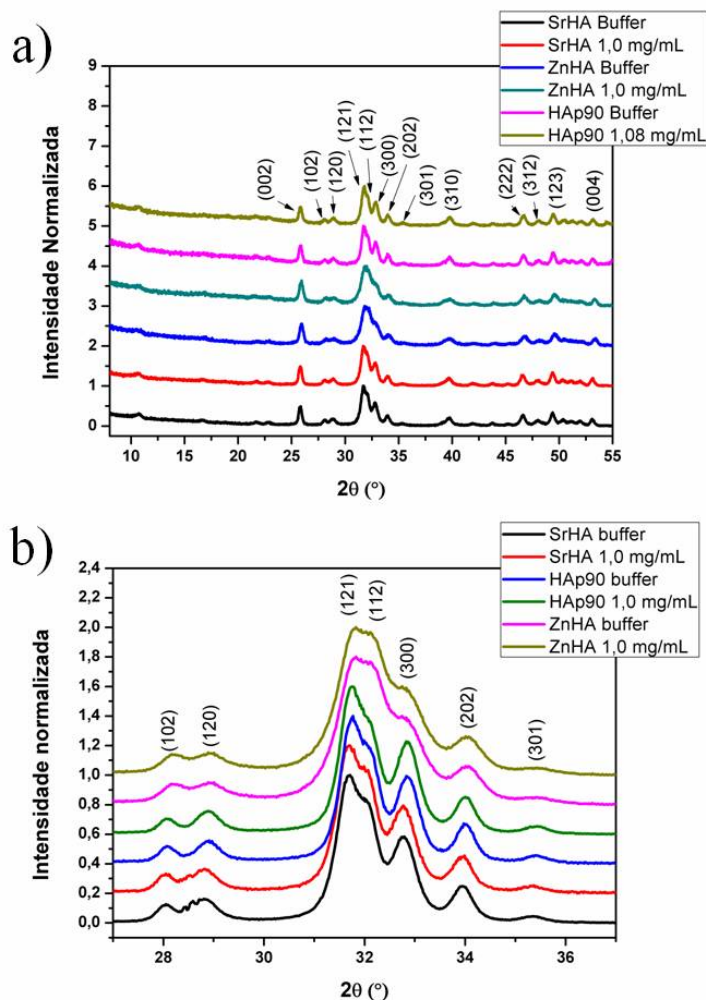


Figura 5.39: Difratoogramas de Raios X da SrHA, HAp90 e ZnHA antes e após a adsorção 1,0 mg/mL de insulina: a) região $10^\circ < \theta < 55^\circ$ e b) região $29^\circ < \theta < 37^\circ$.

Medidas de FTIR foram realizadas nos pós de HAp90, ZnHA e SrHA, antes e após a adsorção da proteína nas concentrações de 0,5 mg/mL e 1,2 mg/mL. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr que foram preparadas com alta concentração dos fosfatos de forma a aumentar as intensidade das bandas vibracionais da amida I e II da insulina.

As Figuras 5.40a-c apresentam os espectros de FTIR da HAp90, SrHA e da

ZnHA, antes e após a adsorção da insulina.

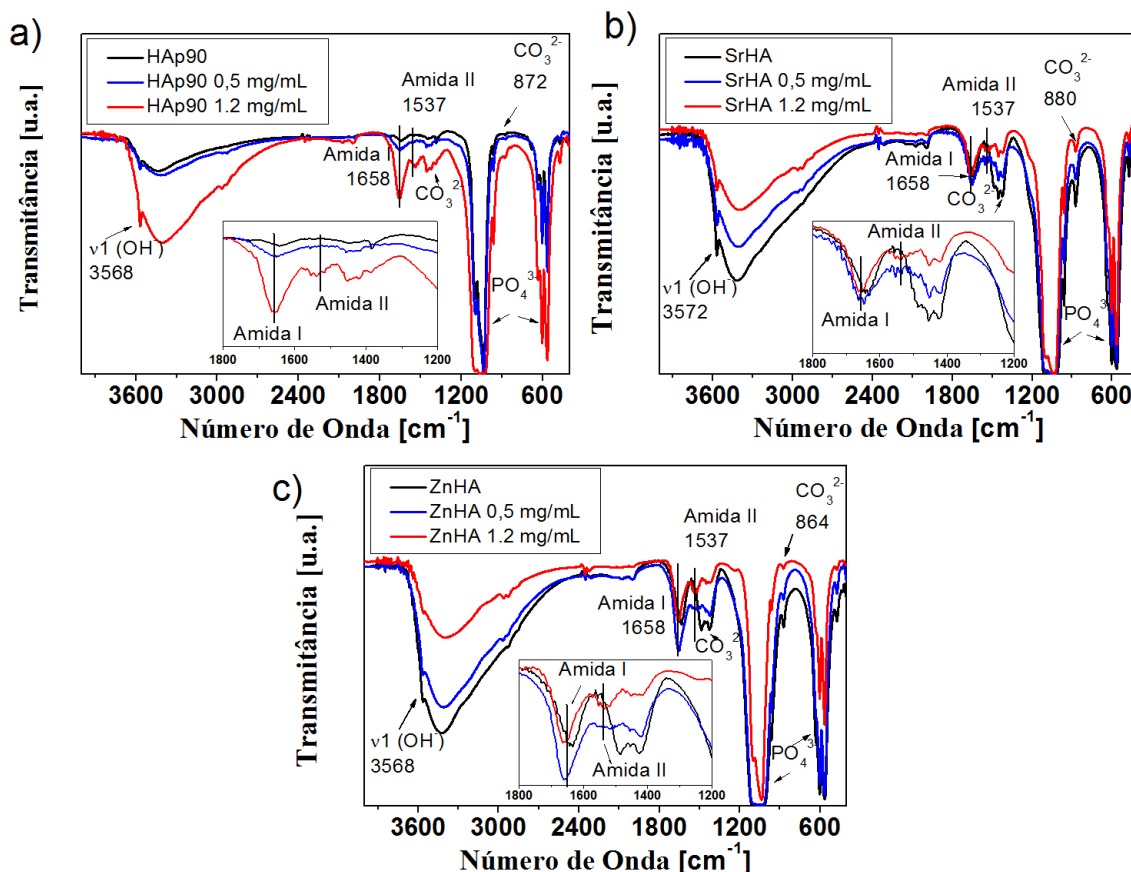


Figura 5.40: Espectro de FTIR das amostras a) HAp90, b) SrHA e c) ZnHA mostrando as bandas da hidroxiapatita e da proteína, com o zoom de cada espectro mostrando as bandas de amida I e II da proteína.

Em todas as amostras identifica-se bandas associadas à OH^- em $(3568-3572) \text{ cm}^{-1}$, ao CO_3^{2-} em $(1470-1420)$ e $(880-864) \text{ cm}^{-1}$ e PO_4^{3-} em $(1095-960)$ e $(603-470) \text{ cm}^{-1}$. O tratamento das amostras em solução tampão contendo insulina não altera as posições das bandas vibracionais do fosfato. Este resultado reforça o resultado das análises de XRD no qual se verificou que o processo de adsorção não induz efeitos detectáveis de dissolução das NPs e coprecipitação de outros fosfatos de cálcio na

superfície das NPs.

As bandas da amida I e amida II são identificadas em 1658 cm^{-1} e 1537 cm^{-1} , respectivamente, para HAp90, SrHA e ZnHA. Estes valores não apontam para mudanças na frequência vibracional do radical com a substituição do Ca pelo Sr ou Zn na superfície da HA, mostrando que a adsorção não é sensível a estas substituições.

A técnica de XPS foi usada para investigar o processo de adsorção da insulina, pois ela permite determinar a quantidade relativa dos elementos presentes na superfície dos materiais, antes e após a adsorção da proteína. A variação da concentração da proteína na superfície durante o processo de adsorção foi determinado a partir da medida da porcentagem atômica do nitrogênio em relação aos demais elementos presentes na superfície dos fosfatos de cálcio (HAp90, ZnHA e SrHA).

O espectro de XPS da HAp90, Figura 5.41, antes da adsorção da insulina é constituído por picos referentes ao cálcio (Ca 2p em $346,8\text{ eV}$), fósforo (P 2p em $132,7\text{ eV}$) e oxigênio (O 1s em $530,7\text{ eV}$) da HA além de impurezas de carbono existente na superfície devido a substituição do PO_4^{3-} pelo CO_3^{2-} (O 1s em $530,7\text{ eV}$) e de carbono orgânico ($284,6\text{ eV}$). O pico de nitrogênio aparece com energia de $399,7\text{ eV}$ para as amostras com insulina adsorvida, Tabela 5.20.

As composições elementares relativas de N e C aumentam e a de Ca e P diminuem com o aumento da concentração de insulina na solução usada nos experimentos de adsorção, como mostra a Tabela 5.21. Isto indica que: i) a proteína se liga a superfície da HAp90 e que ii) a quantidade de proteína adsorvida na superfície da HAp90 aumenta com a concentração inicial de insulina na solução. O aumento da concentração de N e C é esperado já que a proteína é composta por carbono, nitrogênio e oxigênio. A diminuição da concentração de cálcio e do fósforo se deve ao fato da superfície estar sendo recoberta pela proteína.

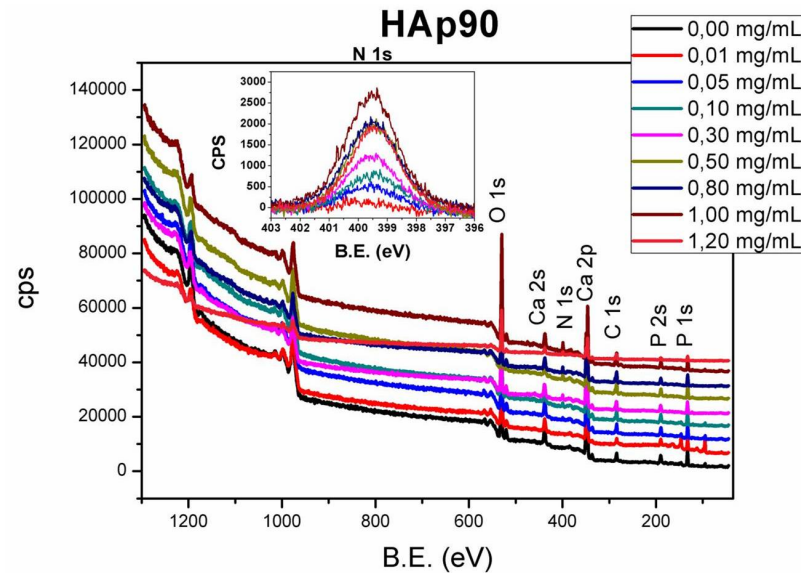


Figura 5.41: Espectro de XPS da amostra de HAp90, antes e depois da adsorção da insulina em soluções com diferentes concentrações da proteína.

Tabela 5.20: Energia de ligação de cada pico presentes nas amostras de HAp90 com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

HAp90					
Concentração [mg/mL]	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	N 1s [eV]
0,00	530,7±0,2	346,8±0,1	132,7±0,1	284,6±0,1	
0,01	530,5±0,1	346,6±0,0	132,7±0,2	284,6±0,2	399,6±0,4
0,05	530,4±0,1	346,6±0,1	132,7±0,1	284,6±0,1	399,6±0,2
0,10	530,5±0,0	346,7±0,0	132,6±0,1	284,6±0,1	399,5±0,3
0,30	530,5±0,0	346,6±0,1	132,8±0,1	284,6±0,1	399,5±0,1
0,50	530,5±0,1	346,6±0,1	132,5±0,1	284,6±0,1	399,5±0,1
0,80	530,5±0,1	346,5±0,1	132,6±0,1	284,6±0,0	399,6±0,1
1,00	530,5±0,1	346,5±0,1	132,4±0,1	284,6±0,0	399,4±0,1
1,20	530,6±0,1	346,6±0,1	132,6±0,1	284,6±0,0	399,6±0,0

Tabela 5.21: Porcentagem de cada pico presentes nas amostras de HAp90 com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

HAp90					
Concentração [mg/mL]	O 1s [%]	Ca 2p [%]	P 2p [%]	C 1s [%]	N 1s [%]
0,00	48,6±0,6	23,8±0,1	18,3±0,3	9,3±0,2	
0,01	54,8±1,2	19,8±0,8	12,8±0,3	12,3±0,9	0,4±0,1
0,05	51,6±0,6	20,4±0,4	13,6±0,5	13,4±0,3	1,0±0,2
0,10	50,4±0,3	20,2±0,2	13,6±0,4	14,1±0,9	1,7±0,1
0,30	49,6±0,4	18,8±0,1	12,6±0,2	16,4±0,3	2,6±0,0
0,50	46,6±0,3	18,5±0,1	12,6±0,3	18,4±0,3	3,9±0,1
0,80	46,1±0,4	17,5±0,4	11,8±0,0	20,4±0,7	4,1±0,1
1,00	44,9±0,6	17,0±0,1	11,8±0,2	21,3±0,4	5,1±0,2
1,20	44,3±0,5	16,7±0,4	11,2±0,3	22,7±0,8	5,0±0,3

A análise dos espectros de alta resolução de XPS nas regiões do Ca, P, O e C mostra ligações do íon O de 528,5 eV, referente à formação de óxidos, 530,6 eV associada a ligação simples O-P e 532,4 eV referente à hidroxila ou água na superfície. A ligação P-O está associada ao pico na energia de 132,7 eV. O pico do cálcio é composto majoritariamente pela energia em 346,8 eV devido a ligação Ca-O. O pico do nitrogênio é composto pela energia em 399,7 eV atribuída a grupos aminas e a energia de 397,2 eV, somente para as duas últimas concentrações, provavelmente a nitretos (PON), [205–208]. As energias de ligação do Ca, P e N não apresentaram variações em amostras com diferentes concentrações de insulina, Figura 5.42 e Tabela 5.22, logo, pode-se concluir que a proteína estabelece fraca ligação com a superfície, provavelmente de origem coulombiana.

O pico do carbono foi decomposto em energias atribuídas a i) carbono de origem orgânica em 284,6 eV, ii) ligação C-O em 286,1 eV e a iii) radicais COOH da insulina em 288,7 eV. Esta última ligação desloca-se 1 eV para baixas energias com o aumento da concentração de insulina na superfície, Tabela 5.22. Isto pode ser atribuído à interação de origem eletrostática de íons Ca^{2+} da superfície com sítios carboxílicos da insulina. Interações Ca-COOH foram identificadas por R. Bhowmik *et al* e H. Zhou *et al* em estudos da adsorção da albumina e da proteína BMP na hidroxiapatita, [101, 209]. Um pico de baixa energia, 281,0 eV, foi observado para as amostras com adsorção de 0,01 mg/mL e 0,05 mg/mL de insulina, no entanto uma explicação ainda não foi encontrada para este pico.

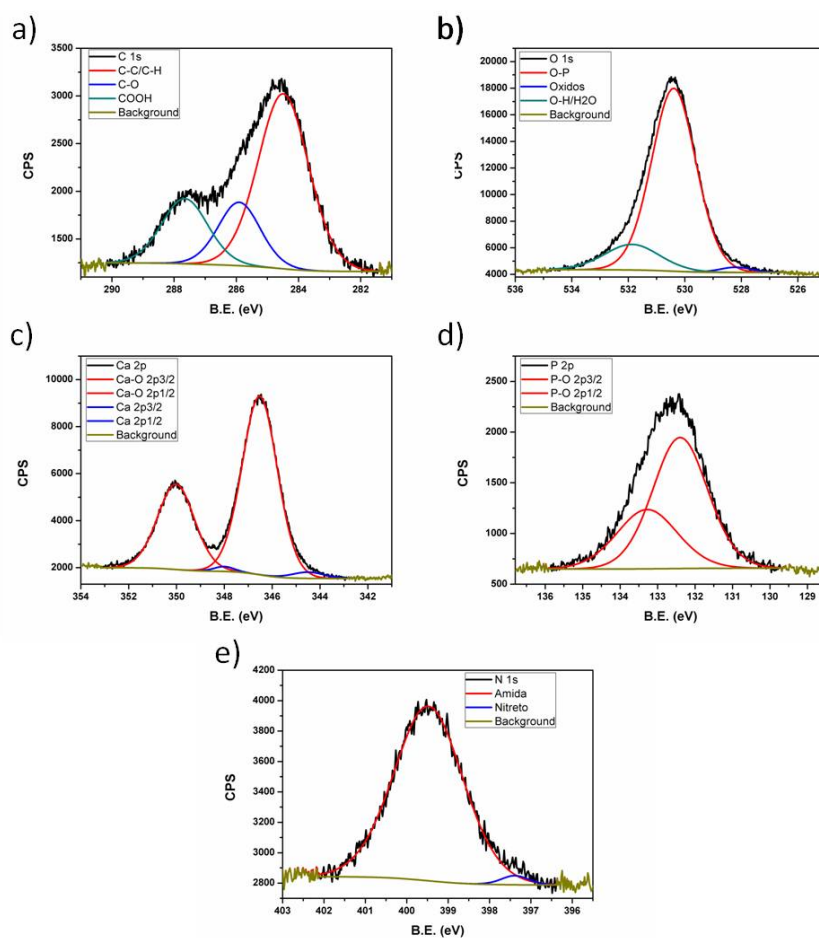


Figura 5.42: Espectros de XPS mostrando as energias de ligação para diferentes componentes dos elementos a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p e e) N 1s. Amostra HAp90 após a adsorção com 1,2 mg/mL de insulina.

5.3 Adsorção de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio

152

Tabela 5.22: Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, C e N em amostras de HAp90, após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

		HAp90								
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]								
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00	1,20
O (1s)	B.E.	528,5	528,5	528,2	528,3	528,5	528,3	528,5	528,4	528,5
	[eV]	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1
	%	1,6±	15,2±	5,8±	3,9±	2,0±	2,3±	1,6±	3,2±	1,5±
		0,1	5,1	2,0	0,8	0,7	0,7	0,2	1,4	0,4
	B.E.	530,6	530,6	530,5	530,5	530,6	530,5	530,6	530,4	530,6
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,0	±0,1	±0,0
	%	85,2±	69,4±	78,7±	77,6±	77,5±	82,7±	82,7±	70,7±	82,6±
		0,4	5,0	4,7	3,7	0,3	4,9	0,4	5,4	1,6
	B.E.	532,4	532,1	532,1	531,8	531,9	531,9	532,1	531,3	532,1
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,3	±0,3	±0,0	±0,3	±0,0	±0,3	±0,1
	%	13,3±	15,3±	15,5±	18,6±	20,5±	15,0±	15,9±	26,1±	16,0±
		0,5	0,9	4,0	4,4	2,0	5,1	0,1	5,1	2,1
Ca (2p)	B.E.	344,7	344,7	344,5	344,5	344,7	344,5	344,6	344,4	344,7
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1
	%	2,5±	2,6±	3,2±	3,0±	2,5±	2,7±	2,8±	3,2±	2,9±
		0,0	0,6	0,5	0,6	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2
	B.E.	346,8	346,8	346,7	346,6	346,7	346,6	346,7	346,5	346,7
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,1	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,1	±0,0

Continua na próxima página

5.3 Adsorção de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio

153

Tabela 5.22 – *Continuação da página anterior*

		HAp90								
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]								
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00	1,20
	%	97,5±	97,4±	96,8±	97,0±	97,6±	97,3±	97,3±	96,8±	97,2±
		0,0	0,6	0,5	0,6	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2
C (1s)	B.E.		281,1	281,0						
	[eV]		±0,2	±0,2						
	%		15,2	6,9						
			±3,0	±0,4						
	B.E.	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,0	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1
	%	75,7±	64,1±	71,5±	74,6±	57,6±	60,8±	48,3±	65,9±	56,1±
		5,3	8,8	5,2	0,5	4,2	5,6	9,7	8,7	6,9
	B.E.	286,1	286,2	286,2	286,6	285,9	285,9	285,9	285,9	286,0
	[eV]	±0,3	±0,4	±0,1	±0,9	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,2
	%	12,8±	6,9±	5,3±	4,0±	24,7±	16,2±	31,2±	10,5±	22,9±
		5,2	5,8	1,7	1,1	3,0	9,6	9,3	8,0	6,4
	B.E.	288,7	288,2	287,9	287,1	287,9	287,7	287,9	287,6	287,8
	[eV]	±0,1	±0,2	±0,1	±1,0	±0,0	±0,2	±0,0	±0,1	±0,1
	%	11,6±	13,8±	18,6±	21,4±	17,8±	23,0±	20,7±	23,7±	21,1±
		0,1	5,2	2,4	0,9	1,2	4,2	0,5	2,8	0,5
P (2p)	B.E.	132,7	132,7	132,5	132,5	132,5	132,4	132,5	132,3	132,6
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Continua na próxima página

Tabela 5.22 – *Continuação da página anterior*

		HAp90								
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]								
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00	1,20
N (1s)	B.E.		399,7	399,6	399,5	399,6	399,5	399,7	399,4	399,7
	[eV]		±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,0	±0,0	±0,1	±0,1
	%		100	100	100	100	100	100	98,8±	97,5±
									2,1	0,7
	B.E.								397,2	397,7
	[eV]								±0,0	±0,1
	%								1,2±	2,5±
									0,2	0,7

Os espectros de XPS da SrHA e ZnHA após a adsorção em soluções contendo diferentes concentrações da insulina, Figuras 5.43 e 5.44, apresentam picos dos elementos Ca, Sr, O, P, C e N e Ca, Zn, O, P, C e N, respectivamente. Nas duas amostras a intensidade do pico do N aumenta com a concentração da insulina em solução e os picos de Ca e P diminuem, indicando que a quantidade de proteína na superfície da SrHA e ZnHA aumenta com o aumento da concentração da proteína em solução, Tabelas 5.23 e 5.24. Dentro da incerteza da medida de XPS (0,5 eV) as energias dos picos de Ca, P, O e Sr (SrHA) e Ca, P, O e Zn (ZnHA) não se modificam com a ligação da insulina na superfície da amostra, sendo as mesmas encontradas para a amostra sem substituição, HAp90, Tabelas 5.25 e 5.26. As Figuras 5.45 e 5.46 mostram que a deconvolução das amostras de SrHA e ZnHA, respectivamente, é igual à da amostra HAp90. Os picos referentes à ligação Sr-O (268,5 eV) e Zn-O (1021,9 eV) continuam existindo e também não sofreram deslocamentos depois da adsorção da insulina. Tal como foi observado na amostra HAp90, a energia do

carbono associadas ao radical COOH (288,7 eV) diminui por até 1,0 eV quando a adsorção é realizada na SrHA e ZnHA em solução contendo 1,2 mg/mL de insulina, Tabela 5.27 e 5.28. Este efeito reforça a hipótese da ligação preferencial da insulina com a superfície através de sítios de carboxilas e não ser alterada com a presença dos metais.

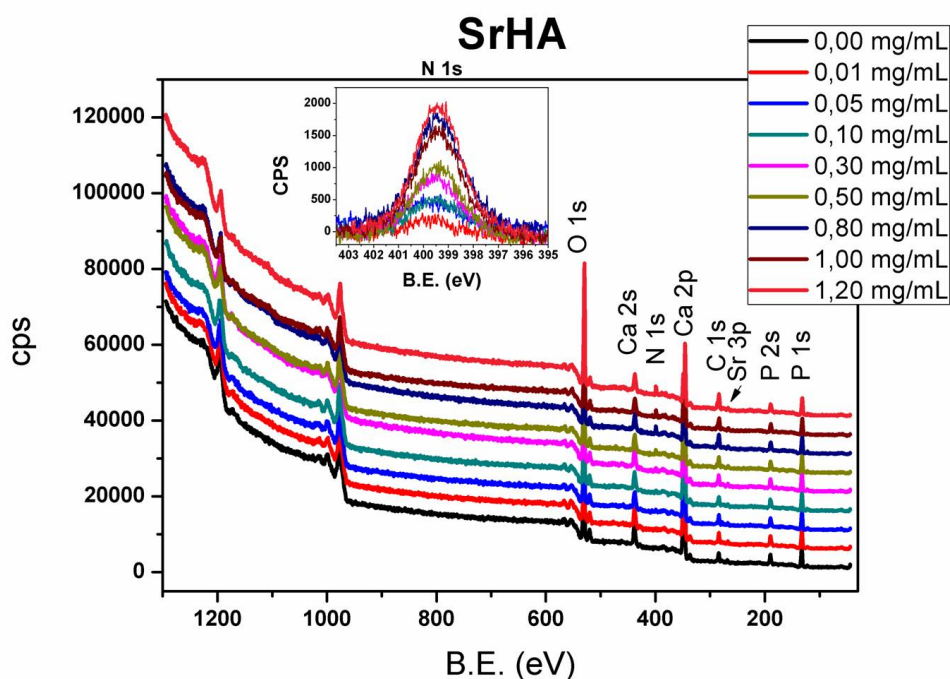


Figura 5.43: Espectro de XPS da amostra de SrHA antes e depois da adsorção da insulina para várias concentrações da proteína.

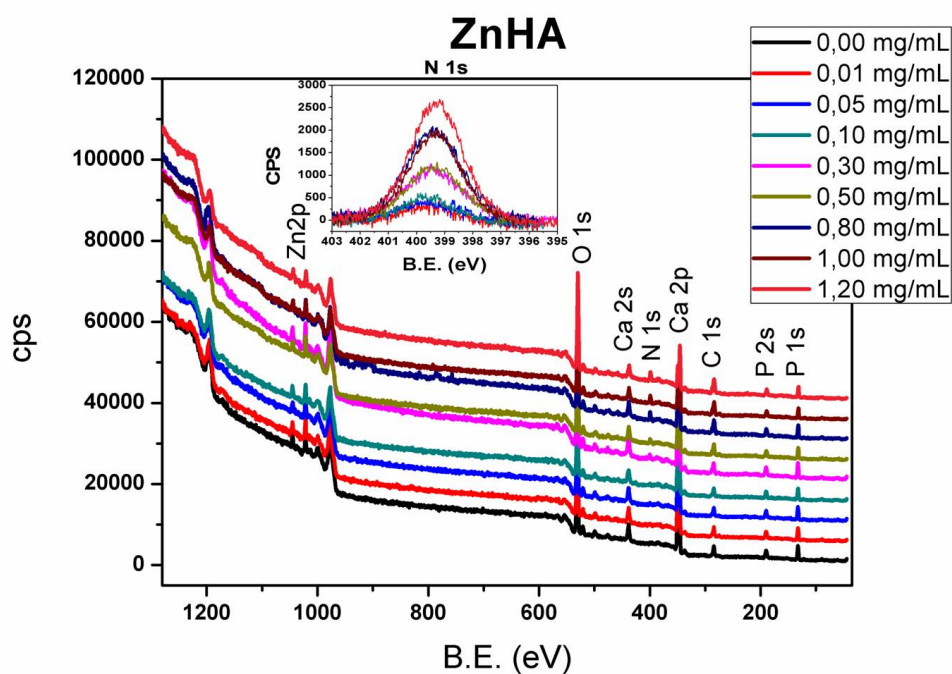


Figura 5.44: Espectro de XPS da amostra de ZnHA antes e depois da adsorção da insulina para várias concentrações da proteína.

Tabela 5.23: Concentração relativa dos elementos O, Ca, P, C e N na amostra SrHA determinada por XPS após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

SrHA						
Concentração [mg/mL]	O 1s [%]	Ca 2p [%]	P 2p [%]	C 1s [%]	N 1s [%]	Sr 3p [%]
0,00	51,3±1,0	19,6±0,3	18,0±0,2	10,4±1,1		0,7±0,0
0,01	50,3±0,5	19,0±0,0	17,4±0,3	11,9±0,2	0,7±0,1	0,7±0,0
0,05	50,7±0,2	19,0±0,0	17,5±0,0	11,2±0,1	0,9±0,1	0,7±0,0
0,10	50,1±0,1	18,7±0,1	17,1±0,2	12,2±0,1	1,2±0,1	0,7±0,0
0,30	49,4±0,1	18,7±0,2	16,7±0,2	12,6±0,4	1,9±0,1	0,6±0,0
0,50	48,3±0,6	17,8±0,1	16,3±0,1	14,3±0,3	2,6±0,1	0,6±0,0
0,80	45,5±0,0	16,8±0,3	15,5±0,3	17,9±0,4	3,7±0,2	0,6±0,0
1,00	45,9±0,5	16,5±0,2	15,4±0,1	17,8±0,2	3,8±0,1	0,6±0,0
1,20	44,6±0,6	16,2±0,1	14,9±0,2	19,4±0,5	4,3±0,1	0,6±0,0

Tabela 5.24: Concentração relativa dos elementos O, Ca, P, C e N na amostra ZnHA determinada por XPS após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Concentração [mg/mL]	ZnHA					
	O 1s [%]	Ca 2p [%]	P 2p [%]	C 1s [%]	N 1s [%]	Zn 2p [%]
0,00	47,5±0,5	20,0±0,2	15,8±0,3	15,8±0,4		1,0±0,1
0,01	49,7±1,1	18,2±1,2	12,9±0,4	17,5±2,9	0,9±0,1	1,8±0,1
0,05	50,1±0,7	19,0±0,0	13,7±0,1	15,4±0,6	1,4±0,2	1,9±0,0
0,10	50,7±0,1	19,2±0,1	13,2±0,3	13,6±0,1	1,6±0,1	1,8±0,1
0,30	49,6±0,3	18,5±0,1	12,6±0,1	14,9±0,3	2,6±0,1	1,8±0,0
0,50	47,3±0,2	17,4±0,2	11,9±0,0	18,1±0,5	3,7±0,1	1,6±0,1
0,80	44,6±0,7	15,7±0,3	11,3±0,3	21,9±0,5	5,1±0,4	1,5±0,1
1,00	43,3±0,6	15,1±0,5	10,7±0,0	24,2±1,3	5,4±0,1	1,4±0,0
1,20	41,3±0,5	13,8±0,1	9,9±0,0	27,2±0,5	6,6±0,0	1,3±0,1

Tabela 5.25: Energia de ligação de cada pico presentes nas amostras de SrHA com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Concentração [mg/mL]	SrHA					
	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	N 1s [eV]	Sr 3p [eV]
0,00	530,7±0,1	346,6±0,1	132,7±0,2	284,6±0,1		268,5±0,3
0,01	530,8±0,1	346,9±0,0	132,9±0,1	284,6±0,0	400,2±0,1	268,7±0,2
0,05	530,8±0,1	346,8±0,1	132,8±0,1	284,6±0,1	399,6±0,4	268,2±0,1
0,10	530,6±0,0	346,7±0,1	132,7±0,1	284,6±0,1	399,4±0,3	268,1±0,3
0,30	530,7±0,1	346,7±0,1	132,8±0,1	284,6±0,0	399,5±0,0	268,5±0,3
0,50	530,5±0,1	346,6±0,0	132,6±0,1	284,6±0,0	399,5±0,2	268,1±0,3
0,80	530,7±0,3	346,7±0,2	132,7±0,2	284,6±0,1	399,6±0,3	268,3±0,2
1,00	530,4±0,1	346,5±0,1	132,5±0,1	284,6±0,1	399,4±0,1	268,2±0,2
1,20	530,2±0,1	346,3±0,1	132,3±0,1	284,6±0,0	399,2±0,2	267,7±0,3

Tabela 5.26: Energia de ligação de cada pico presentes nas amostras de ZnHA com e sem insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Concentração [mg/mL]	ZnHA					
	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	N 1s [eV]	Zn 2p [eV]
0,00	530,7±0,1	346,8±0,1	132,9±0,1	284,6±0,1		1022,0±0,0
0,01	530,5±0,1	346,7±0,1	132,7±0,3	284,6±0,1	399,7±0,4	1021,6±0,3
0,05	530,6±0,1	346,7±0,1	132,8±0,1	284,6±0,1	399,4±0,7	1021,7±0,1
0,10	530,6±0,1	346,6±0,1	132,8±0,1	284,6±0,2	399,5±0,3	1021,8±0,2
0,30	530,5±0,1	346,7±0,1	132,7±0,1	284,6±0,2	399,5±0,1	1021,7±0,1
0,50	530,6±0,1	346,7±0,1	132,6±0,2	284,6±0,1	399,6±0,2	1021,7±0,2
0,80	530,4±0,1	346,4±0,0	132,5±0,1	284,6±0,2	399,3±0,1	1021,3±0,2
1,00	530,4±0,1	346,5±0,1	132,5±0,2	284,6±0,2	399,3±0,1	1021,4±0,2
1,20	530,6±0,1	346,5±0,1	132,5±0,1	284,6±0,1	399,3±0,1	1021,5±0,2

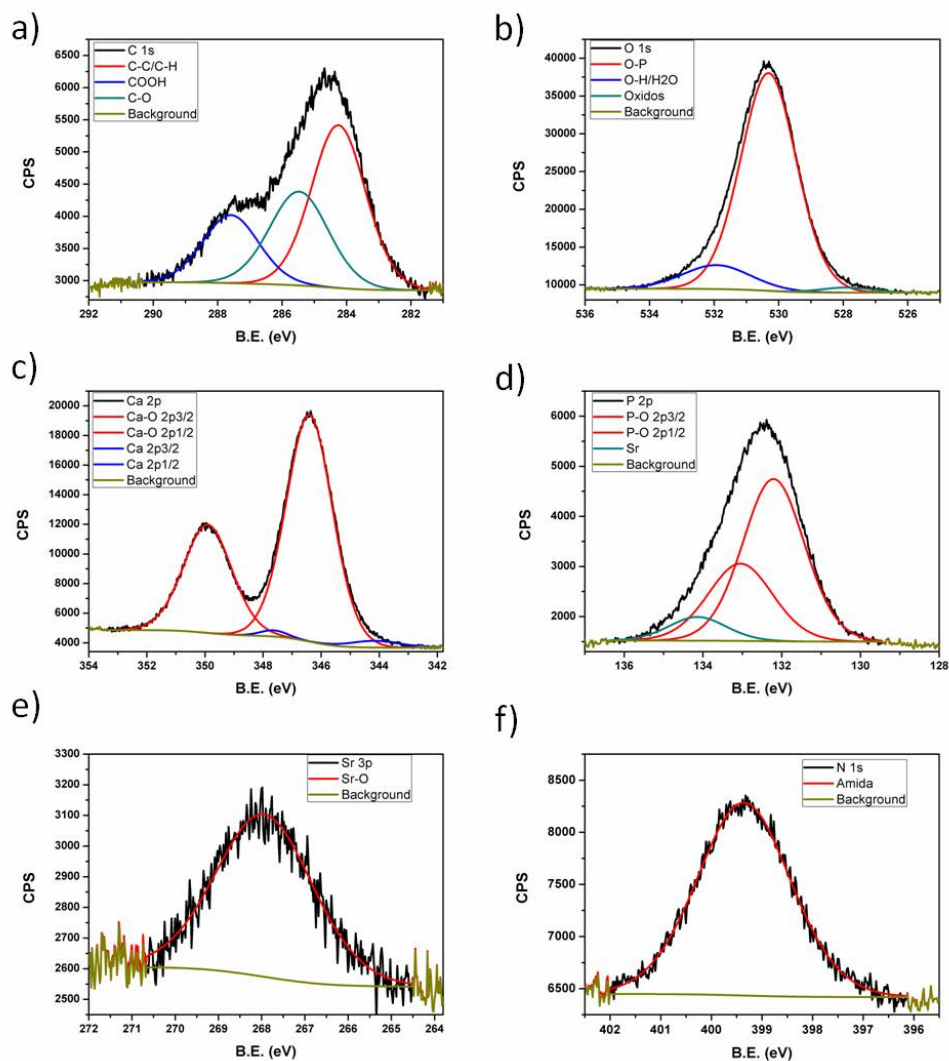


Figura 5.45: Espectros de XPS mostrando as energias de ligação para diferentes componentes dos elementos a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p, e) Sr 3p e f) N 1s. Amostra SrHA após a adsorção com 1,2 mg/mL de insulina.

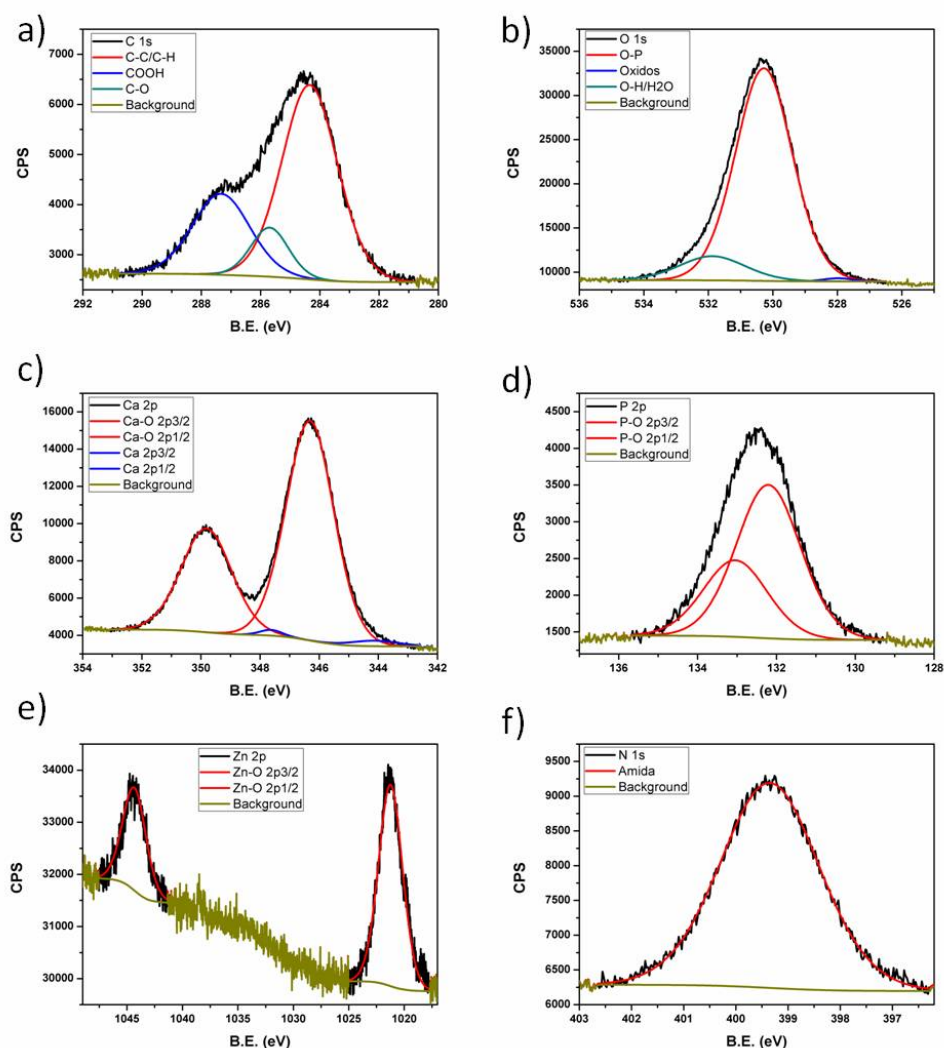


Figura 5.46: Espectros de XPS mostrando as energias de ligação para diferentes componentes dos elementos a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p, e) Zn 2p e f) N 1s. Amostra ZnHA após a adsorção com 1,2 mg/mL de insulina. B.E. é a energia de ligação.

5.3 Adsorção de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio

163

Tabela 5.27: Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, Sr, C e N em amostras de SrHA, após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

		SrHA								
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]								
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00	1,20
O (1s)	B.E.	528,6	528,4	528,4	528,4	528,4	528,4	528,3	528,2	528,3
	[eV]	±0,2	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,2	±0,2	±0,1	±0,2
	%	2,0±	1,7±	1,8±	1,7±	1,2±	1,3±	1,1±	1,3±	1,6±
		0,1	0,3	0,2	0,2	0,5	0,2	0,3	0,1	0,4
	B.E.	530,9	530,7	530,7	530,8	530,6	530,6	530,7	530,5	530,5
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1
	%	83,9±	80,0±	83,8±	85,4±	85,8±	82,5±	87,2±	80,2±	85,4±
		2,2	1,9	2,1	0,8	0,7	4,7	2,6	6,7	1,1
	B.E.	532,5	532,2	532,4	532,4	532,3	532,0	532,3	531,8	532,0
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,3	±0,3	±0,3	±0,1
	%	14,2±	18,3±	14,4±	13,0±	13,0±	16,3±	11,7±	18,5±	13,0±
		2,3	2,1	2,1	0,6	0,2	4,8	2,3	6,7	1,2
Ca (2p)	B.E.	344,8	344,8	344,7	344,7	344,6	344,6	344,6	344,5	344,4
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1
	%	2,9±	2,7±	2,7±	2,4±	2,8±	2,7±	2,7±	3,0±	3,2±
		0,6	0,3	0,2	0,4	0,5	0,3	0,4	0,6	0,1
	B.E.	347,1	346,9	346,9	346,9	346,8	346,8	346,8	346,7	346,7
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1

Continua na próxima página

5.3 Adsorção de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio

164

Tabela 5.27 – *Continuação da página anterior*

		SrHA								
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]								
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00	1,20
	%	97,1± 0,6	97,3± 0,3	97,3± 0,2	97,6± 0,4	97,2± 0,5	97,3± 0,3	97,3± 0,4	97,0± 0,6	96,8± 0,1
C (1s)	B.E.	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1
	%	59,3± 12,0	68,1± 5,6	62,6± 11,0	56,8± 14,7	57,0± 12,9	52,7± 14,8	56,9± 4,8	55,3± 5,0	52,4± 9,6
	B.E.	285,7	286,0	285,9	285,8	285,8	285,8	285,9	285,8	285,8
	[eV]	±0,2	±0,2	±0,3	±0,5	±0,3	±0,4	±0,1	±0,1	±0,2
	%	31,4± 10,1	17,9± 5,2	21,7± 11,4	29,0± 16,0	23,1± 13,8	27,1± 12,2	19,9± 5,7	22,0± 2,7	24,8± 10,9
	B.E.	288,8	288,6	288,4	287,7	288,0	288,0	287,9	287,8	287,8
	[eV]	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1
	%	9,3± 2,0	14,0± 2,0	15,8± 0,6	14,3± 2,7	19,9± 1,7	20,2± 4,5	23,1± 2,0	22,7± 2,9	22,9± 1,8
P (2p)	B.E.	132,9	132,7	132,7	132,8	132,6	132,5	132,6	132,6	132,5
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100
N (1s)	B.E.		399,9	399,8	399,6	399,6	399,7	399,7	399,6	399,6
	[eV]		±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,2	±0,0	±0,0
	%		100	100	100	100	100	100	100	100
Sr (3p)	B.E.	268,7	268,5	268,4	268,4	268,4	268,3	268,3	268,2	268,2
	[eV]	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,0	±0,2	±0,1	±0,1

Continua na próxima página

Tabela 5.27 – Continuação da página anterior

[illegible]

Tabela 5.28: Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, Zn C e N em amostras de ZnHA, após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

		ZnHA								
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]								
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00	1,20
O (1s)	B.E.	528,3	528,2	528,3	528,3	528,4	528,3	528,4	528,3	528,3
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,4	±0,1	±0,1
	%	1,3±	1,4±	1,5±	1,4±	1,1±	1,0±	1,7±	0,6±	0,9±
		0,4	0,4	0,3	0,5	0,2	0,5	0,9	0,1	0,2
	B.E.	530,8	530,6	530,7	530,8	530,7	530,6	530,7	530,5	530,6
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0
	%	82,7±	85,2±	84,8±	87,1±	84,8±	85,6±	86,8±	85,6±	85,4±
		3,2	2,1	2,7	1,7	5,6	3,1	4,4	4,2	8,7
	B.E.	532,4	532,2	532,4	532,6	532,3	532,1	532,3	532,0	532,0
	[eV]	±0,0	±0,2	±0,2	±0,2	±0,4	±0,2	±0,3	±0,3	±0,4
	%	16,0±	13,3±	13,7±	11,4±	14,1±	13,4±	11,5±	13,8±	13,7±
		3,5	1,8	2,5	1,4	5,5	3,3	3,5	4,2	8,7
Ca (2p)	B.E.	344,7	344,4	344,7	344,6	344,6	344,5	344,5	344,5	344,4
	[eV]	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1
	%	2,4±	2,3±	2,2±	2,7±	2,3±	3,1±	2,9±	1,8±	2,8±
		0,6	0,4	0,8	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,4
	B.E.	346,9	346,7	346,8	346,9	346,8	346,7	346,7	346,6	346,6
	[eV]	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1

Continua na próxima página

5.3 Adsorção de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio **167**

Tabela 5.28 – *Continuação da página anterior*

		ZnHA								
Elemento	B.E. e %	Concentração[mg/mL]								
		0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00	1,20
	%	97,6± 0,6	97,7± 0,4	97,8± 0,8	97,3± 0,2	97,7± 0,2	96,9± 0,3	97,1± 0,2	98,5± 0,6	97,2± 0,4
C (1s)	B.E.	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,1
	%	68,7± 3,9	71,2± 2,2	72,7± 2,5	57,0± 6,1	52,8± 3,5	53,3± 9,2	50,6± 7,7	57,8± 7,9	58,9± 6,5
	B.E.	286,1	286,1	287,6	285,8	285,9	285,9	285,4	286,1	285,9
	[eV]	±0,2	±0,1	±0,3	±0,4	±0,3	±0,2	±0,6	±0,7	±0,2
	%	17,0± 5,5	7,0± 0,9	27,4± 10,4	22,4± 6,8	25,5± 13,8	27,2± 12,3	24,9± 8,8	14,3± 11,8	15,9± 6,7
	B.E.	288,4	287,9		288,1	288,0	287,9	287,8	287,6	287,6
	[eV]	±0,2	±0,3		±0,2	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1
	%	14,3± 2,0	21,9± 2,7		20,6± 2,0	21,7± 3,5	19,5± 3,3	24,5± 3,3	28,0± 4,0	25,2± 1,7
P (2p)	B.E.	132,8	132,5	132,7	132,7	132,7	132,6	132,6	132,4	132,4
	[eV]	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100
N (1s)	B.E.		399,6	399,6	399,7	399,7	399,7	399,6	399,5	399,6
	[eV]		±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1
	%		100	100	100	100	100	100	100	100
Zr (2p)	B.E.	1022,0	1021,6	1021,9	1021,9	1021,9	1021,7	1021,7	1021,5	1021,5
	[eV]	±0,1	±0,3	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1

Continua na próxima página

5.3 Adsorção de insulina na hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio

Tabela 5.28 – Continuação da página anterior

[illegible]

5.3.2 Isotermas de Adsorção

O percentual de nitrogênio em relação aos demais elementos (Ca, P e C) na superfície das amostras determinado por XPS foi usado para levantar as isotermas de adsorção relativa de moléculas de insulina adsorvidas na HAp90, SrHA e ZnHA. A Figura 5.47 mostra as isotermas para HAp90, ZnHA e SrHA construídas a partir de experimentos de adsorção por 3 horas utilizando soluções aquosas contendo a insulina em concentrações iniciais de 0,01 mg/mL a 1,20 mg/mL e tempo de adsorção de 3 horas. Neste tempo a adsorção atingia a saturação máxima.

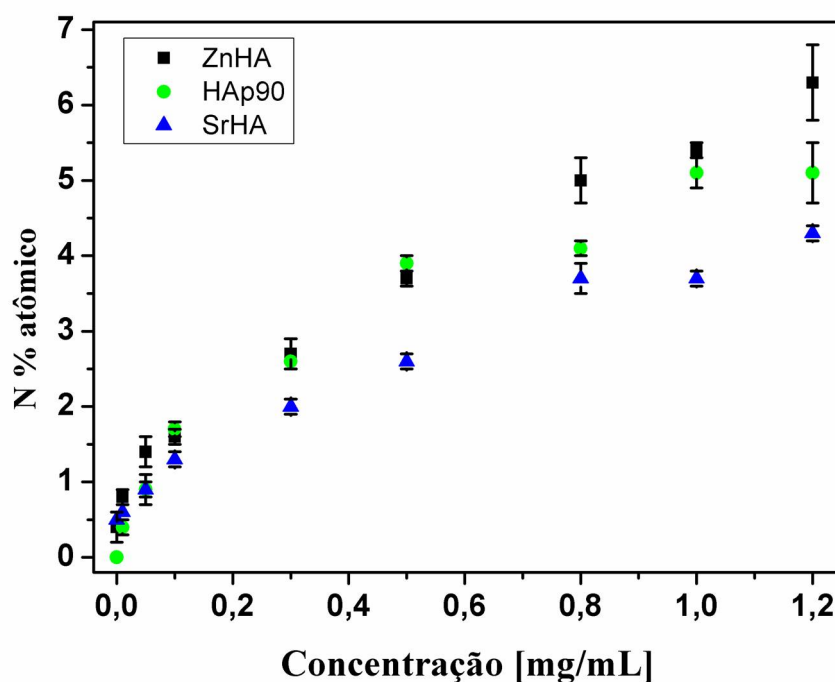


Figura 5.47: Isoterma de adsorção da insulina determinada pela técnica de XPS a partir do % atômico de nitrogênio relativo aos demais elementos (Ca, P e C).

Como se pode observar na Figura 5.47, as isotermas dos três materiais apresentam perfis diferentes indicando que a substituição do zinco e do estrôncio na estrutura da HA altera o perfil da cinética de adsorção da insulina. O maior percen-

tual de insulina adsorvida pelos sítios da superfície ocorreu na ZnHA seguindo pela HA e SrHA. Ao comparar a estequiometria destas superfícies, temos que a razão $(Ca+M)/P$ é aproximadamente igual para HAp90 e ZnHA, (com ZnHA um pouco maior, 1,33 contra 1,30 da HAp90) e menor para a SrHA (1,13). Ou seja, a insulina prefere superfícies onde há maior quantidade de cálcio. Vale aqui lembrar que o mesmo comportamento ocorreu no caso da osteocalcina nativa (hOC). Neste caso foi encontrado que houve maior adsorção para a amostra estequiométrica (HAp) do que para a deficiente em cálcio (HAp90). Como a estequiometria da superfície da HAp90 e ZnHA são iguais, o que determinou a maior adsorção pela ZnHA foi a presença dos íons Zn que são conhecidos pela sua afinidade com a insulina, sendo usado inclusive na formação e estabilidade dos hexâmeros [85].

Os dados experimentais foram ajustados com funções características de processos cinéticos do tipo Langmuir, Freundlich e de Langmuir-Freundlich, Figura 5.48.

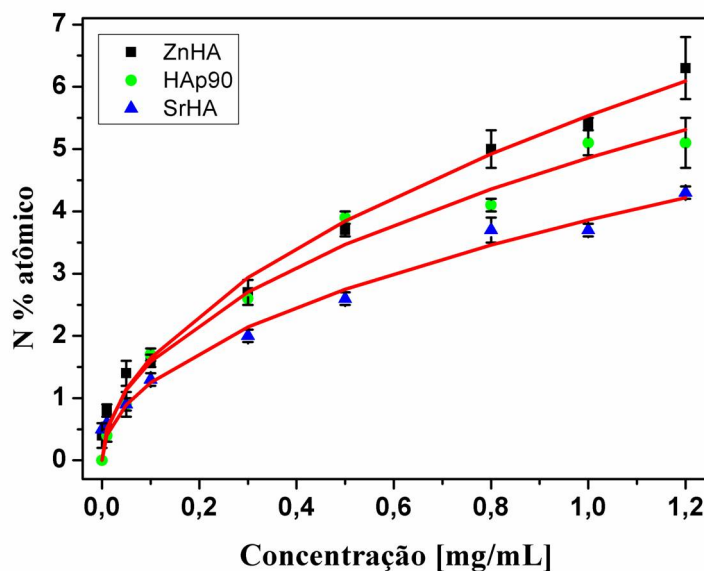


Figura 5.48: Curva da adsorção de proteína calculada pelo % atômico de nitrogênio medido pelo XPS ajustada pela isoterma de Freundlich.

As funções Langmuir e Freundlich foram as que melhores ajustaram os dados experimentais, sendo que os valores de R^2 mais próximos à unidade foram obtidos para os ajustes com funções do tipo Freundlich, nas três amostras, Tabela 5.29. Para altas concentrações da solução não se verifica uma saturação da concentração de insulina adsorvida, o que indica que o processo cinético nesta etapa segue claramente uma função do tipo Freundlich onde ocorre interação entre moléculas com a formação de agregados e multicamadas moleculares. O maior valor de k foi o apresentado pela ZnHA seguido da HAp90 e a SrHA. Este resultado sugere que a substituição do Ca por Zn aumenta a ligação da insulina com a superfície da hidroxiapatita. Além disso, o valor positivo de “ p ” indica que temos um bom processo de adsorção física e está de acordo com a literatura, uma vez que $p > 1$ é o valor mais encontrado por outros autores e mencionado por Mulu B. D., [210]. Este resultado também está de acordo com o encontrado anteriormente, em que, através da deconvolução do pico do C, foi encontrado que a ligação entre proteína e superfície ocorre por meio de interação eletrostática entre os Ca^{2+} da hidroxiapatita e o terminal $COOH^-$ da proteína, ou seja, não há ligações químicas, como proposto pela isoterma de Langmuir.

Tabela 5.29: Parâmetros cinéticos das isotermas de adsorção da insulina na HAp90, SrHA e ZnHA determinados a partir das equações de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich.

Isoterma	Langmuir			Freundlich			Langmuir-Freundlich			
Amostras	Q_{max}	K	R^2	k	p	R^2	Q_{max}	K	r	R^2
HAp90	6,4	2,9	0,982	4,8	2,1	0,985	4,8e3±	4,7e-7	0,47	0,985
	±0,5	±0,7		±0,1	±0,2		4,6e5	±9,5e-5	±0,04	
SrHA	6,0	1,8	0,960	3,9	2,0	0,988	5,7e3	5,6e-7	0,41	0,988
	±1,0	±0,7		±0,1	±0,1		±6,4e5	±0,001	±0,04	
ZnHA	10,0	1,3	0,956	5,7	1,8	0,985	9,2e3	1,4e-6	0,55	0,985
	±2,1	±0,6		±0,2	±0,2		±2,5e6	±0,001	±0,05	

5.3.3 Carga da Superfície

Medida do potencial zeta, PZ, das amostras, antes e após a adsorção da insulina foram realizadas em uma solução de KCl com pH 6,0. Neste pH as três amostras apresentam valores similares de PZ e levemente negativos. A adsorção da insulina diminui o PZ de HAp90, SrHA e ZnHA, Figura 5.49, devido a carga negativa da proteína que foi medida em aproximadamente -21 mV. A diminuição de PZ aumenta com a concentração de proteína adsorvida na superfície da hidroxiapatita e atinge valores mais negativos para a amostra substituída com Zn devido a maior concentração da proteína nesta amostra, como foi detectada nas análises de XPS. O mesmo raciocínio é válido para a amostra SrHA. Ela foi a que menos teve alteração em seu PZ e também a que menos adsorveu proteína.

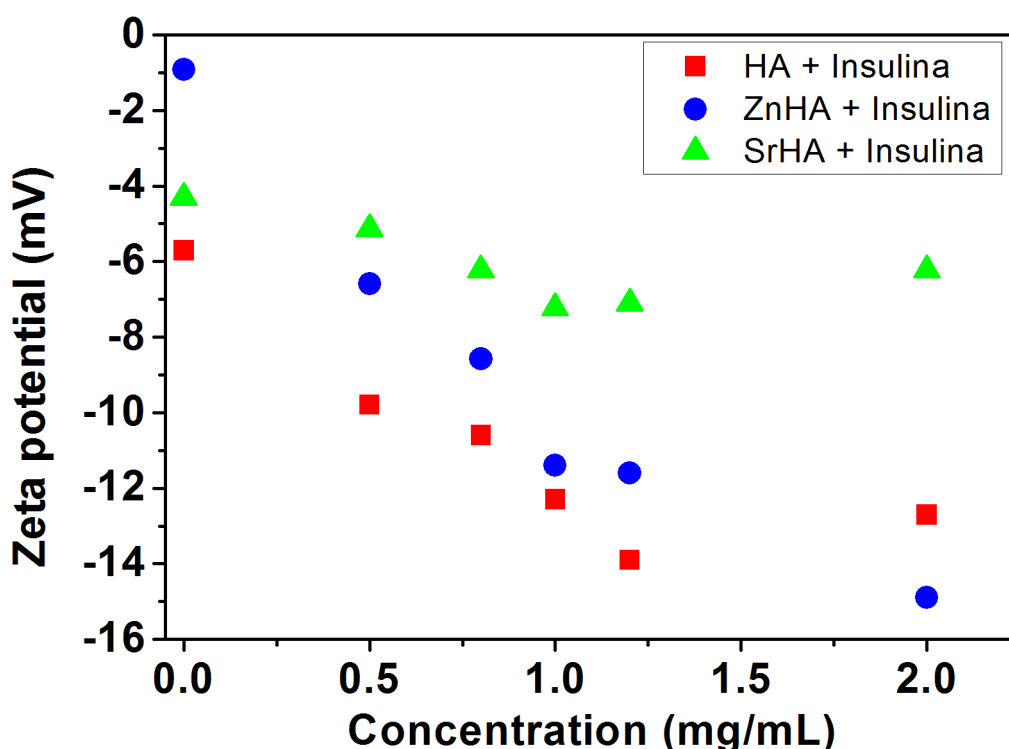


Figura 5.49: Potencial Zeta para HAp90, SrHA e ZnHA, com e sem insulina.

5.3.4 Efeito da adsorção na estrutura da Insulina

A técnica de dicroísmo circular foi usada para detectar possíveis modificações na estrutura secundária e na conformação da insulina quando a proteína é adsorvida na superfície do fosfato de cálcio. A medida de CD é difícil do ponto de vista experimental porque deve ser feita com baixa concentração de partículas em suspensão na solução para evitar a perda de sinal devido à absorção de UV-Vis pelas NPs e a decantação das mesmas. Entretanto, o uso de concentrações muito baixas de NPs também diminui o sinal de CD devido à pequena quantidade de proteína adsorvida nas NPs e devido à adsorção da luz pelas NPs.

O espectro de CD da insulina em água com concentração de 0,2 mg/mL mostra duas bandas com mínimos negativos em 208 nm e outra em 222 nm, características de α -hélice. A Figura 5.50 mostra que o perfil da curva não se modifica com a adsorção, mesmo em altas concentrações da proteína (1,0 mg/mL), apesar do ruído presente nas amostras em pó, natural da medida. Para confirmar essa observação, uma análise quantitativa da estrutura secundária da proteína foi feita usando o programa Dichroweb, tendo o CDSSTR como método. Os valores da quantificação estão listados na Tabela 5.30.

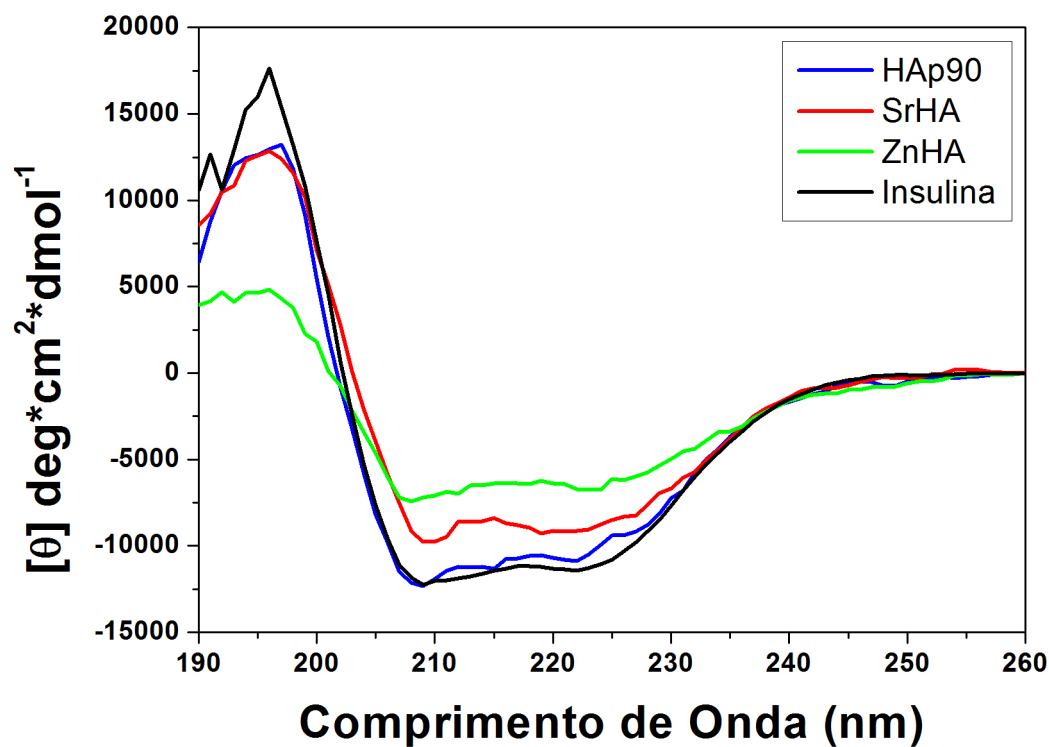


Figura 5.50: Curvas de dicroísmo circular da insulina pura (0,2 mg/mL) e adsorvida na superfície dos pós de HAp90, SrHA e ZnHA (1,0 mg/mL).

Tabela 5.30: Quantificação da estrutura secundária da proteína pura e após ser adsorvida na superfície dos pós.

Amostra	α -hélice	β -sheet	Turns	Desordenado	Total
Insulina	33	24	16	28	101
SrHA	30	21	19	29	99
ZnHA	21	26	26	28	101
HAp90	11	46	14	27	98

Como podemos perceber na Tabela 5.30, a insulina apresenta 33 % de estrutura α -hélice, como descrito previamente por Elsayed *et al* [211], e este mesmo comportamento é apresentado para a insulina adsorvida na SrHA. Como o processo de adsorção é baseado nas características físico-químicas da superfície do material e das características da proteína, ao voltarmos na Tabela 5.9, vemos que a razão $(Ca+M)/P$ é menor para a SrHA, se comparada com a HAp90 e ZnHA, o que indica uma superfície mais deficiente em cálcio. Este menor valor pode significar uma interação menor entre proteína e superfície, o que consequentemente pode induzir menores mudanças na estrutura secundária da insulina. Por outro lado, apesar do gráfico da Figura 5.50 mostrar o mesmo comportamento, a quantificação nos diz que a insulina diminui em 12 % a estrutura α -hélice quando adsorvida na ZnHA, aumentando sua estrutura Turn. Na literatura já é estabelecido que a mudança de α -hélice para β -sheet passa pela formação de estrutura Turn, [212, 213]. Uma modificação mais drástica na estrutura da insulina pode ser observada quando a proteína está adsorvida na superfície da HAp90, em que a insulina tem apenas 11 % de α -hélice e 46 % de β -sheet, mudando, portanto, completamente sua estrutura, o que pode levar à perda de sua função. Esta mudança já foi observada anteriormente, sendo primeiramente mencionada para o caso de formação fibrosa de amiloides devido a mudanças no ambiente como a variação do solvente orgânico e do pH, [214, 215].

Deste resultado conclui-se que a interação com a superfície pode perturbar a estrutura secundária da proteína através de um aumento da estrutura β -sheet, dependendo do material na qual ela está adsorvida. Ou seja, a presença ou ausência do metal na estrutura da HA é fundamental para manter a estrutura da proteína. Apesar da proteína não desnaturar ou perder completamente sua estrutura secundária, quando adsorvida na HAp90, a mesma pode perder sua atividade, uma vez que a mesma pode ter formado estrutura fibrilar.

Podemos concluir então que a presença do metal está afetando diretamente o

processo de adsorção da insulina, sendo que no caso do Zn temos um aumento da quantidade de proteína adsorvida, mas com alteração da sua estrutura secundária, o que pode levar a uma perda de função. Já o Sr faz com que o material adsorva menos proteína, mas a proteína mantém a sua atividade, não alterando sua estrutura após estar ligada à superfície.

5.4 Adsorção de insulina em filme de hidroxiapatita sobre titânio

A adsorção das insulinas bovina e humana na superfície dos filmes de HA depositados sobre um substrato de titânio foi realizada utilizando-se soluções aquosas contendo concentrações de insulina entre 0,01 mg/mL e 1,20 mg/mL e tempo de adsorção de 3 horas. Este é o tempo necessário para que a adsorção atinja a saturação para todas as concentrações da proteína. O processo de adsorção foi caracterizado pelas técnicas de FTIR, XRD, XPS e imunomarcagem.

5.4.1 Ligação da Insulina com a Superfície e Isotermas de Adsorção

Os espectros de FTIR dos filmes depositados sobre titânio mostraram bandas de grupos fosfato em (1090, 1028 e 966) cm^{-1} e de hidroxila em 3580 cm^{-1} e de água em 1633 cm^{-1} . Bandas associadas a grupos carbonato são também detectados na região de (1441-1407) cm^{-1} . Após a adsorção da insulina humana, bandas devido a grupos amida não foram detectadas, 5.51b, devido à baixa concentração da proteína na superfície do filme.

O espectro de FTIR de filmes finos após a adsorção de insulina bovina, Figura 5.51a, apresentam bandas de amida I em 1691 cm^{-1} , amida II em 1529 cm^{-1} , amida

III em 1263 cm^{-1} e amida V em 802 cm^{-1} . Este resultado indicou que a insulina bovina apresentou maior capacidade de adsorção que a insulina humana, Figura 5.51b, [22, 138].

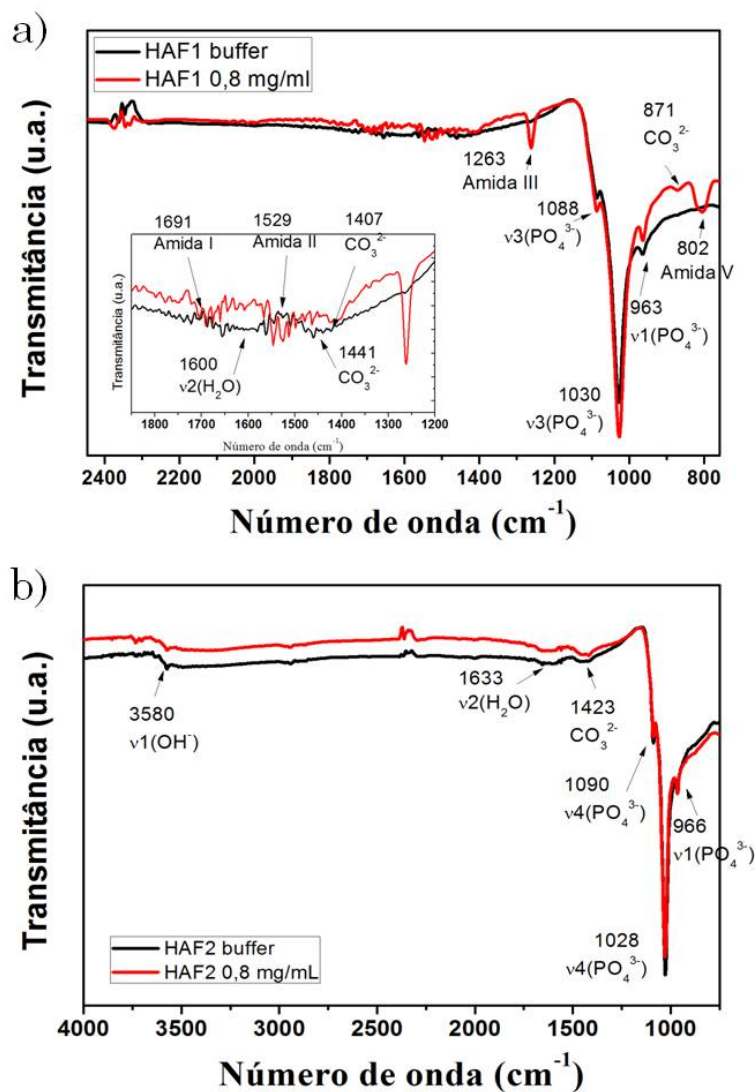


Figura 5.51: Espectro de FTIR das amostras de hidroxiapatita com e sem insulina a) bovina e b) humana.

Os filmes foram analisados por difração de raios X com incidência rasante, antes e após a adsorção da insulina, Figura 5.52. Verificou-se que o processo de adsorção da insulina não altera a cristalinidade, os parâmetro de rede e o tamanho de cristalito do filme, Tabela 5.31. Novamente isto indica que o filme é estável, não havendo redeposição de novas fases após o contato com a solução de insulina.

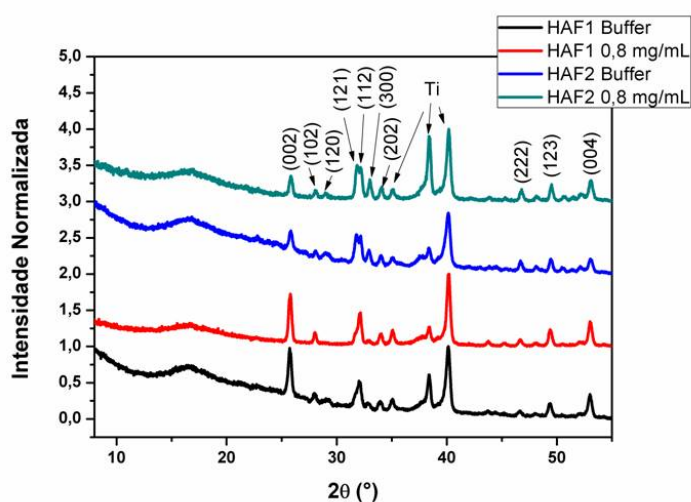


Figura 5.52: Difração das amostras dos filmes (HAF1 e HAF2) de hidroxiapatita sem e com insulina.

Tabela 5.31: Tabela com os parâmetros de rede e do tamanho de cristalito para as amostras com e sem insulina.

Amostras	c [nm]	a=b [nm]	Tamanho cristalito [nm]
HAF1	0,691	0,942	41
HAF1 0,8 mg/mL	0,691	0,941	45
HAF2	0,689	0,941	43
HAF2 0,8 mg/mL	0,689	0,940	44

O espectro de XPS dos filmes de HA após a adsorção da insulina bovina apresenta picos em energias de ligação do O 1s (531,0 eV), do Ca 2p (347,0 eV), do P 2p (133,1 eV) e do nitrogênio (399,5 eV), Figura 5.53 e Tabela 5.32. A intensidade do pico do nitrogênio aumenta com a concentração inicial da insulina na solução usada nos experimentos de adsorção, Tabela 5.33.

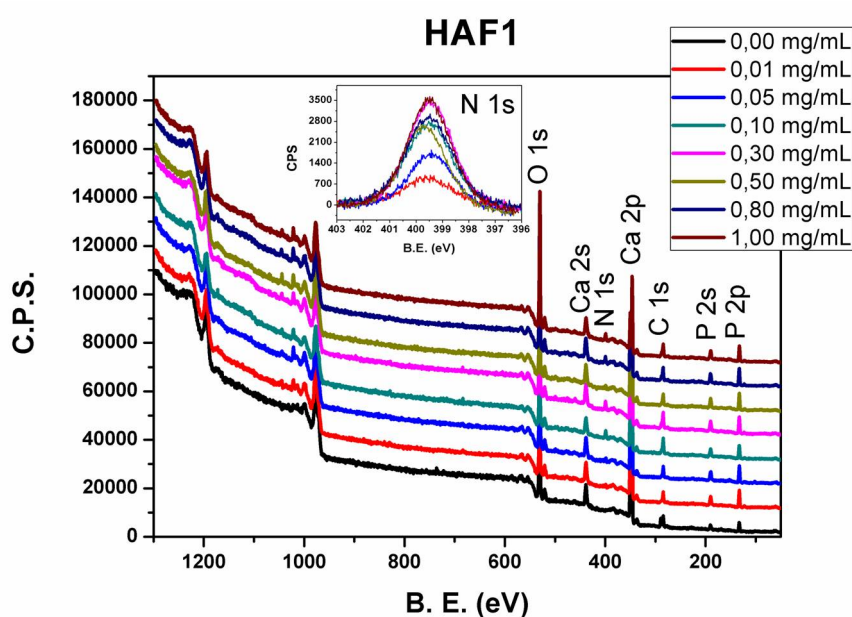


Figura 5.53: Survey das amostras HAF1 pura e com insulina bovina adsorvida mostrando os picos de cada elemento.

Tabela 5.32: Energia de ligação de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Concentração [mg/mL]	HAF1				
	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	N 1s [eV]
0,00	531,0±0,1	346,9±0,0	133,1±0,1	284,6±0,1	
0,01	530,8±0,1	347,0±0,1	133,0±0,1	284,6±0,1	399,6±0,0
0,05	530,7±0,2	346,8±0,1	132,8±0,2	284,6±0,2	399,5±0,1
0,10	530,8±0,1	346,9±0,1	133,0±0,1	284,6±0,1	399,6±0,2
0,30	530,6±0,1	346,7±0,1	132,7±0,1	284,6±0,1	399,5±0,1
0,50	530,7±0,2	346,8±0,2	132,9±0,2	284,6±0,2	399,6±0,3
0,80	530,7±0,1	346,7±0,1	132,8±0,1	284,6±0,1	399,4±0,1
1,00	530,7±0,1	346,7±0,1	132,8±0,1	284,6±0,1	399,5±0,1

Tabela 5.33: Porcentagem de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Concentração [mg/mL]	HAF1				
	O 1s [%]	Ca 2p [%]	P 2p [%]	C 1s [%]	N 1s [%]
0,00	53,3±0,2	21,8±0,4	8,0±1,1	16,9±1,4	
0,01	51,0±0,3	21,6±0,2	13,4±0,1	12,9±0,3	1,0±0,1
0,05	52,2±0,6	20,3±0,5	12,5±0,3	13,6±0,7	1,4±0,2
0,10	50,2±4,0	19,0±1,1	12,0±0,7	16,3±4,6	2,5±1,1
0,30	47,2±0,7	18,8±0,3	11,7±0,3	18,6±1,1	3,7±0,1
0,50	49,2±2,5	18,8±1,4	12,3±0,8	16,7±3,3	3,0±1,1
0,80	48,4±0,5	19,9±0,6	12,4±0,4	16,4±1,0	3,0±0,4
1,00	46,4±2,6	18,1±0,7	11,7±0,4	19,6±2,9	4,1±0,7

A deconvolução dos picos de XPS das amostras de filme após a adsorção de insulina bovina é mostrado na Figura 5.54. O oxigênio apresenta energia de ligação em 531,0 eV correspondente a ligações com o fósforo, em 529,0 eV devido a formação de óxidos e em 531,8 eV devido a ligação com água e a hidroxila. A energia em 132,7 eV do fósforo é atribuída a ligação P-O. As energias de ligação do cálcio em 346,8 eV e em 344,8 eV são devidas a ligações Ca-O e do cálcio na forma metálica, respectivamente. Já o carbono, apresenta os picos usuais devido a contaminação na superfície com radicais orgânicos em 284,6 eV (C-C/C-H) e em 285,7 eV (C-O). Além disto, obtêm-se picos em 287,9 eV e em 289,2 referente aos grupos carbonila e à ligação C=O, respectivamente. O nitrogênio presente na forma de amina aparece com energia de 399,5 eV, Tabela 5.34.

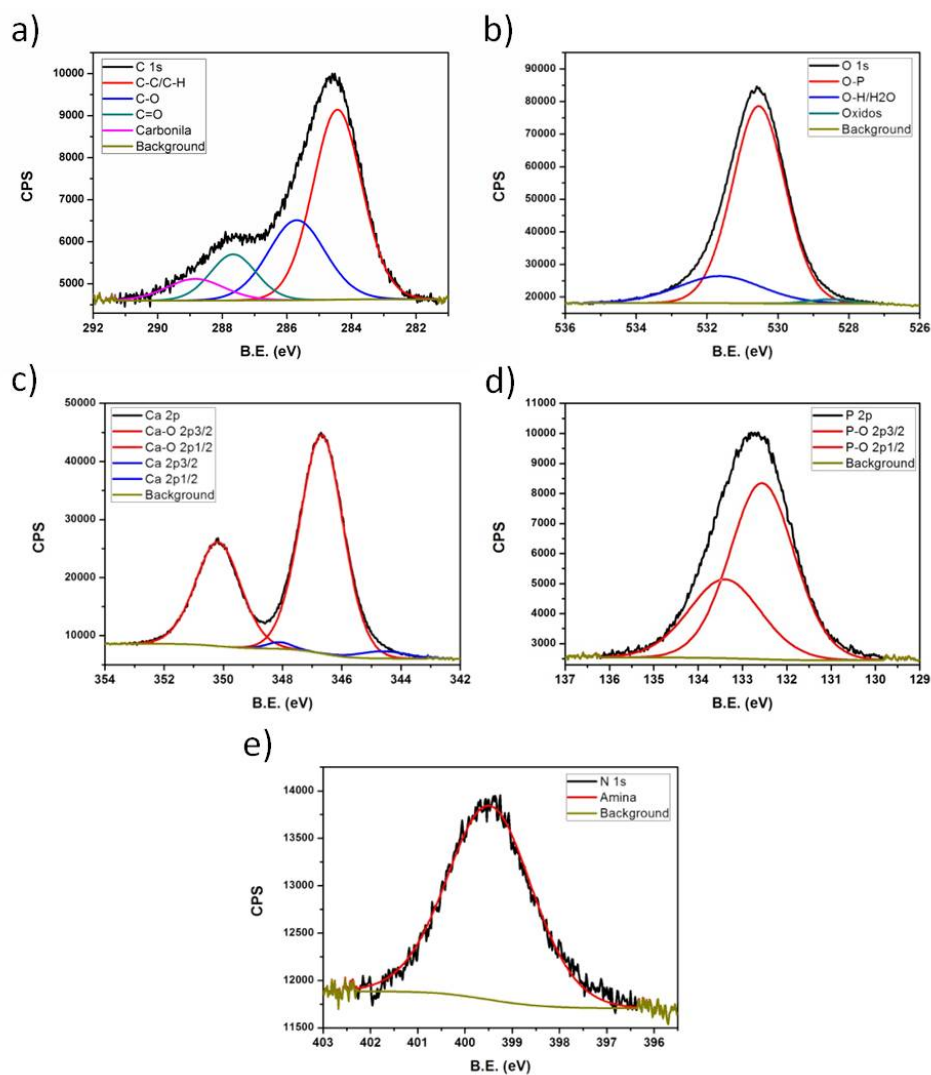


Figura 5.54: Alta resolução dos picos do a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p e e) N 1s, para a filme de HA com 0,8 mg/mL de insulina bovina.

Tabela 5.34: Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, C e N em amostras de HAF1, após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

		HAF1							
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]							
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00
O (1s)	B.E.	529,1	528,6	528,5	529,5	525,5	528,7	528,7	528,6
	[eV]	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,0	±0,1
	%	2,6±	1,5±	1,1±	1,2±	2,3±	1,6±	1,2±	1,3±
		1,6	0,1	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4
	B.E.	531,1	530,6	530,8	531,0	530,8	530,9	530,8	530,8
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0
	%	77,6±	79,8±	69,6±	78,7±	82,7±	74,7±	82,1±	78,9±
		2,8	1,5	4,5	23,2	3,0	3,3	3,9	6,4
	B.E.	531,9	531,9	531,7	532,0	532,0	531,9	531,9	531,7
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,3	±0,4	±0,3	±0,2	±0,2	±0,2
	%	19,7±	18,7±	29,2±	30,1±	15,0±	23,7±	16,7±	19,8±
		2,2	1,6	4,5	18,2	3,3	3,7	3,6	6,3
Ca (2p)	B.E.	344,9	344,8	344,9	344,9	344,7	344,9	344,8	344,8
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,0	±0,1
	%	2,9±	3,2±	2,4±	2,6±	3,1±	2,7±	3,1±	3,6±
		0,1	0,3	0,3	0,3	0,2	0,8	0,7	0,4
	B.E.	347,0	346,9	347,0	347,1	346,9	347,0	346,9	346,9
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1

Continua na próxima página

Tabela 5.34 – *Continuação da página anterior*

		HAF1							
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]							
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00
	%	97,1±	96,8±	97,6±	97,4±	96,9±	97,3±	96,8±	96,4±
		0,1	0,3	0,4	0,3	0,2	0,8	0,7	0,4
C (1s)	B.E.	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6
	[eV]	±0,0	±0,1	±0,2	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0
	%	45,8±	48,7±	51,4±	45,2±	50,7±	51,8±	53,6±	49,1±
		4,6	6,7	7,8	20,3	11,6	3,2	1,0	8,7
	B.E.	285,8	285,5	285,6	285,7	285,8	285,9	285,9	285,9
	[eV]	±0,3	±0,2	±0,1	±0,4	±0,2	±0,2	±0,0	±0,2
	%	16,2±	33,9±	29,7±	35,5±	25,5±	30,1±	25,1±	28,4±
		4,7	8,9	9,7	17,5	13,2	2,8	2,3	11,2
	B.E.	288,0	288,0	287,9	288,0	287,8	288,0	287,9	287,8
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1
	%	2,7±	10,7±	13,5±	15,6±	22,1±	14,5±	16,8±	19,1±
		0,9	5,8	4,3	2,9	3,3	1,8	4,6	3,2
	B.E.	289,4	289,5	289,3	289,9	289,8	289,5	289,3	289,5
	[eV]	±0,1	±0,2	±0,2	±0,3	±0,2	±0,2	±0,4	±0,1
	%	35,3±	6,7±	5,4±	3,7±	1,7±	3,6±	4,5±	3,4±
		6,1	2,2	2,3	3,3	1,5	0,7	2,8	0,5
P (2p)	B.E.	133,0	132,8	132,8	133,0	132,7	132,9	132,8	132,8
	[eV]	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,0
	%	100	100	100	100	100	100	100	100

Continua na próxima página

Tabela 5.34 – *Continuação da página anterior*

		HAF1							
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]							
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00
N (1s)	B.E.		399,6	399,7	399,8	399,8	399,8	399,7	399,7
	[eV]		±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1
	%		100	100	100	100	100	100	100

Os espectros de XPS dos filmes finos antes e após a adsorção da insulina humana (HAF2) são mostrados na Figura 5.55. As energias de ligação do Ca, P, O e C não variam com a concentração de insulina adsorvida na superfície do filme. As intensidades dos picos do Ca, P e O apresentam pequena diminuição de intensidade com a adsorção da proteína sugerindo um moderado recobrimento da superfície pela proteína. As intensidades dos picos do nitrogênio (399,6 eV) e do carbono aumentam de intensidade mas saturam rapidamente para concentração de insulina da ordem de 0,30 mg/mL, Tabelas 5.35-5.36. Estes resultados indicam que a adsorção da insulina é dependente da origem da proteína e que a insulina de origem humana tem menor afinidade com a superfície da HA que a de origem bovina. Este resultado no entanto deve ser cauteloso, uma vez que há diferenças nas duas séries de filmes, como orientação preferencial e maior razão Ca/P para o filme HAF1. Infelizmente estes parâmetros não são facilmente controláveis na produção do filme e podem influenciar no processo de adsorção.

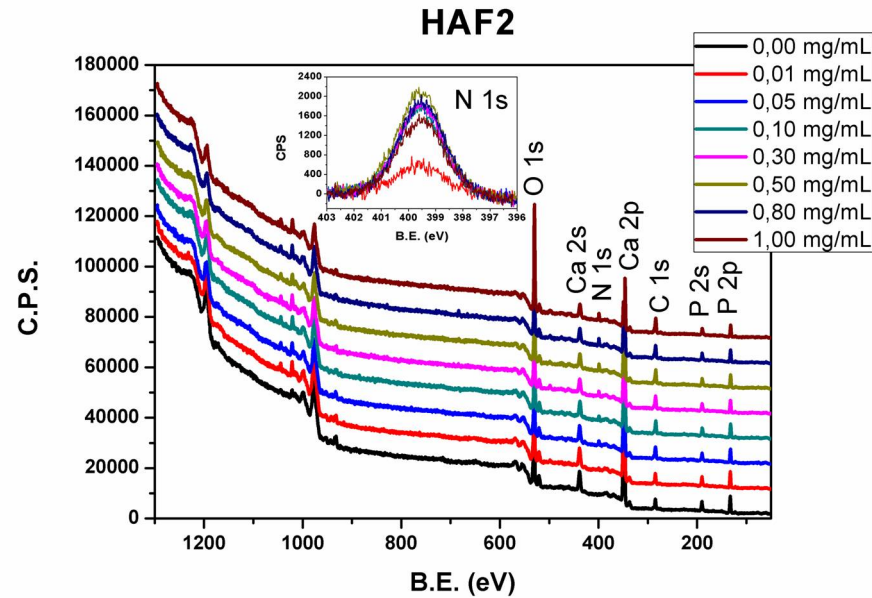


Figura 5.55: Survey das amostras HAF2 pura e com insulina humana adsorvida mostrando os picos de cada elemento.

Tabela 5.35: Energia de ligação de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina bovina. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

HAF2					
Concentração [mg/mL]	O 1s [eV]	Ca 2p [eV]	P 2p [eV]	C 1s [eV]	N 1s [eV]
0,00	530,7±0,1	346,7±0,0	132,9±0,2	284,6±0,1	
0,01	530,9±0,1	347,0±0,1	133,1±0,1	284,6±0,1	399,8±0,2
0,05	530,9±0,1	347,0±0,1	133,0±0,1	284,6±0,1	399,6±0,1
0,10	530,7±0,1	346,8±0,1	132,8±0,2	284,6±0,1	399,6±0,2
0,30	530,8±0,1	346,8±0,1	132,9±0,1	284,6±0,1	399,6±0,1
0,50	530,8±0,0	346,8±0,1	132,9±0,1	284,6±0,1	399,6±0,2
0,80	530,7±0,1	346,8±0,0	132,8±0,1	284,6±0,0	399,4±0,1
1,00	530,8±0,1	347,0±0,1	133,0±0,1	284,6±0,1	399,7±0,0

Tabela 5.36: Porcentagem de cada pico presentes nos filmes com e sem insulina humana. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

Concentração [mg/mL]	HAF2				
	O 1s [%]	Ca 2p [%]	P 2p [%]	C 1s [%]	N 1s [%]
0,00	53,7±0,2	20,0±1,8	13,4±0,3	12,9±0,2	
0,01	52,8±0,2	20,7±0,3	13,1±0,1	12,8±0,3	0,7±0,1
0,05	48,5±1,6	18,6±0,8	12,1±0,5	18,1±2,4	2,8±0,5
0,10	48,8±0,3	18,9±0,3	12,3±0,2	17,3±0,7	2,6±0,3
0,30	48,2±0,7	18,2±0,7	11,9±0,3	18,8±0,9	3,0±0,8
0,50	47,6±0,8	18,2±0,7	11,9±0,5	19,4±1,2	3,0±0,8
0,80	47,7±2,3	18,3±1,4	11,9±0,4	19,0±3,1	3,1±1,1
1,00	47,9±2,2	18,8±1,9	11,9±0,8	18,4±4,0	3,0±1,0

A deconvolução dos picos de Ca, P e O da amostra de insulina humana adsorvida no filme de HA, Figura 5.56, segue o mesmo perfil daquele verificado na amostra de insulina bovina adsorvida na HA. A deconvolução do espectro do elemento carbono nas amostras de filme com insulina mostrou a presença de um pico em 287,8 eV não observado nas amostras sem insulina. Esta energia de ligação é atribuída a ligação C=O existente na estrutura insulina, Tabela 5.37.

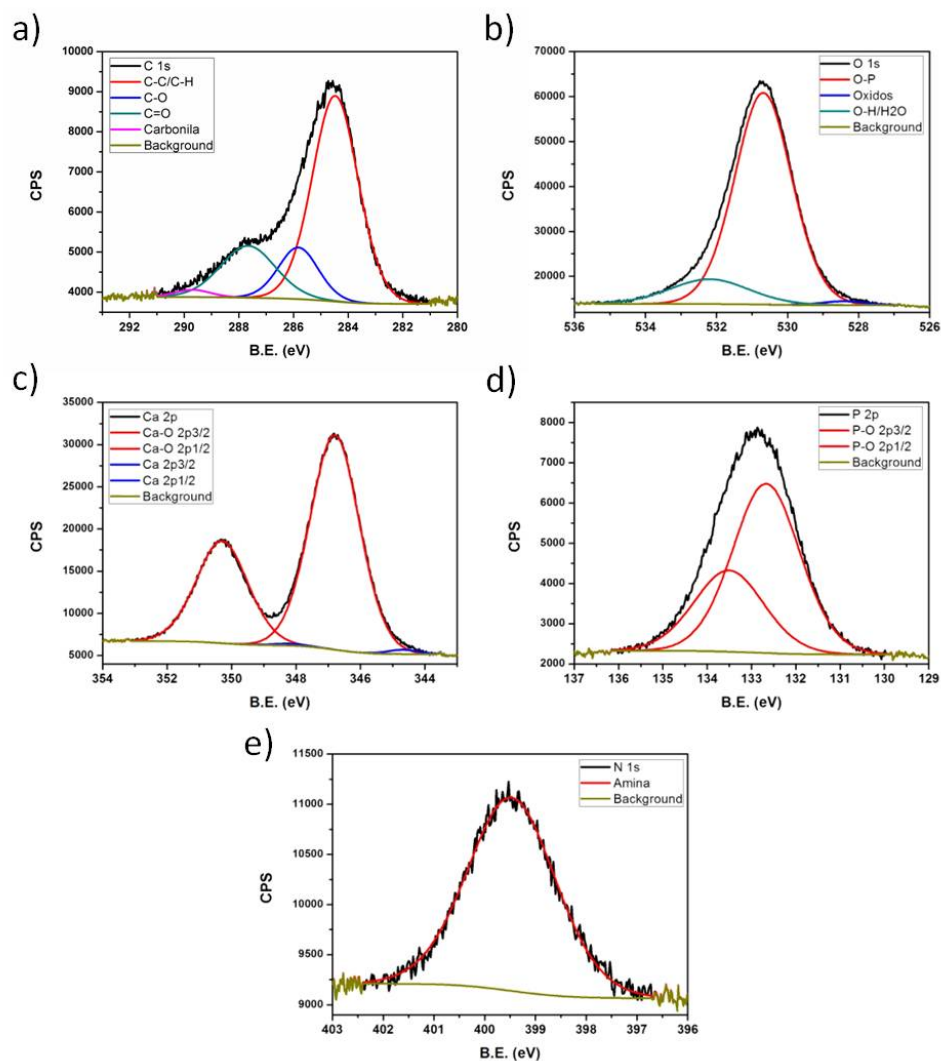


Figura 5.56: Alta resolução dos picos do a) C 1s, b) O 1s, c) Ca 2p, d) P 2p e e) N 1s, para a filme de HA com 0,8 mg/mL de insulina humana.

Tabela 5.37: Energia de ligação (B.E.) e contribuição percentual (%) das áreas dos picos de O, P, Ca, C e N em amostras de HAF2, após adsorção em soluções contendo diferentes concentrações de insulina humana. Os erros se referem à divergência entre as triplicatas.

		HAF2							
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]							
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00
O (1s)	B.E.	528,7	528,3	528,8	529,6	528,8	528,7	528,7	528,7
	[eV]	±0,0	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,2	±0,1	±0,0
	%	1,7±	1,4±	0,8±	1,2±	1,1±	1,1±	1,2±	1,3±
		0,7	0,2	0,3	0,1	0,7	0,1	0,3	0,3
	B.E.	530,8	530,5	530,9	530,9	530,9	530,9	530,9	530,9
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,1	±0,0
	%	78,8±	80,4±	86,0±	86,9±	82,5±	85,5±	83,6±	81,7±
		6,2	3,0	2,8	6,1	2,0	4,5	1,6	4,9
	B.E.	532,0	531,9	532,4	532,4	532,2	532,4	532,2	532,1
	[eV]	±0,3	±0,2	±0,2	±0,5	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2
	%	19,6±	18,2±	13,1±	12,4±	16,5±	13,7±	15,2±	17,0±
		5,7	2,8	2,5	5,5	1,5	3,9	1,5	5,2
Ca (2p)	B.E.	344,9	344,6	344,9	344,8	345,0	344,9	344,9	344,9
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,0	±0,3	±0,1	±0,2	±0,1	±0,1
	%	1,9±	2,4±	2,3±	2,8±	1,8±	1,8±	2,4±	1,8±
		0,1	0,3	0,2	0,6	0,8	0,4	1,1	0,7
	B.E.	347,0	346,7	347,0	347,1	347,0	347,0	347,5	347,0
	[eV]	±0,1	±0,0	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,8	±0,1

Continua na próxima página

Tabela 5.37 – *Continuação da página anterior*

		HAF2							
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]							
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00
	%	98,1±	97,6±	97,7±	97,2±	98,2±	98,2±	97,6±	98,2±
		0,1	0,3	0,2	0,6	0,8	0,4	1,1	0,7
C (1s)	B.E.	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6	284,6
	[eV]	±0,0	±0,6	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1
	%	56,1±	56,6±	49,8±	54,1±	47,5±	46,1±	58,6±	55,1±
		6,1	3,7	7,3	6,4	8,8	10,8	7,5	6,8
	B.E.	285,8	285,6	285,8	285,8	285,8	285,7	285,9	285,9
	[eV]	±0,2	±0,2	±0,2	±0,3	±0,1	±0,3	±0,1	±0,2
	%	26,4±	27,6±	32,5±	24,5±	30,8±	30,3±	18,3±	24,0±
		8,5	2,6	9,6	5,2	11,9	11,4	8,2	0,1
	B.E.			288,0	287,9	287,9	287,8	287,9	287,9
	[eV]			±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1
	%			14,1±	20,2±	18,9±	21,3±	20,8±	17,8±
				4,9	2,6	3,7	3,9	1,9	2,7
P (2p)	B.E.	288,6	288,4	289,6	289,8	289,7	289,9	289,8	289,7
	[eV]	±0,8	±0,2	±0,3	±0,1	±0,1	±0,3	±0,1	±0,1
	%	17,6±	15,8±	3,5±	1,9±	2,9±	2,3±	2,4±	3,2±
		5,3	1,5	1,3	0,8	0,6	1,5	0,7	1,7

Continua na próxima página

Tabela 5.37 – *Continuação da página anterior*

		HAF2							
Elemento	B.E.	Concentração[mg/mL]							
	e %	0,00	0,01	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80	1,00
N (1s)	B.E.		399,4	399,8	399,8	399,7	399,7	399,7	399,7
	[eV]		±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,0	±0,0	±0,1
	%		100	100	100	100	100	100	100

A Figura 5.57 mostra as isotermas de adsorção da insulina bovina (HAF1) e humana (HAF2) em filme fino de HA utilizando a concentração percentual atômica do nitrogênio como indicador da adsorção da proteína na superfície da HA. Pode-se observar, Figura 5.57, que a concentração relativa de nitrogênio é maior no filme contendo a insulina bovina do que com a insulina humana. Novamente este resultado concorda com os resultados anteriores em que, tanto para hOC quanto para insulina humana, houve maior adsorção nos pós com maior razão Ca/P. Aqui, o filme HAF1 teve razão Ca/P (2,73) muito maior do que o filme HAF1 (1,49), o que pode ter influenciado a adsorção. Os dados experimentais da Figura 5.57 foram ajustados com funções cinéticas de Langmuir, de Freundlich e de Langmuir-Freundlich, Tabela 5.38. Os dados experimentais da isoterma de adsorção para a insulina humana tiveram um melhor ajuste com a função Langmuir-Freundlich enquanto que a função Freundlich ajustou melhor os dados experimentais da isoterma de adsorção da insulina bovina. Estes resultados indicam que: i) a ocupação de sítios da superfície do filme pela insulina ocorre principalmente pela formação de agregados de proteína com interação entre as moléculas (Freundlich e de Langmuir-Freundlich) e não pela formação de monocamadas (modelo Langmuir), ii) a insulina bovina demonstra maior afinidade com a superfície da HA.

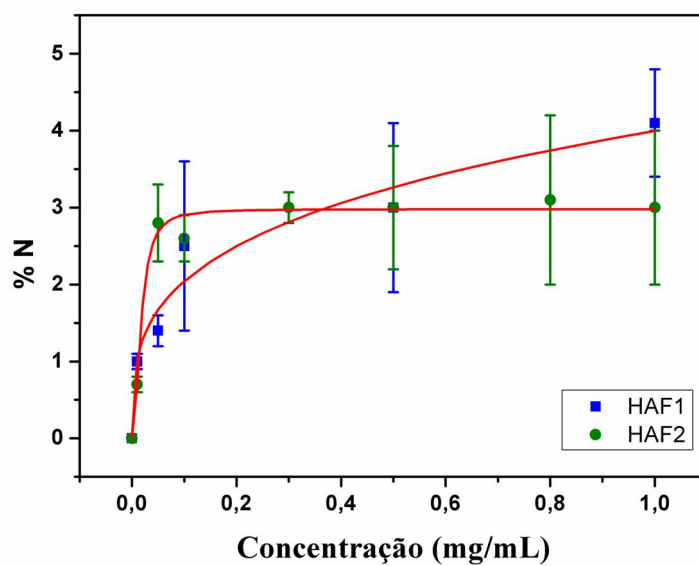


Figura 5.57: Curva da adsorção de proteína calculada pelo % atômico de nitrogênio para amostra com insulina humana e bovina, ajustado com a curva de Langmuir-Freundlich e Freundlich, respectivamente.

Tabela 5.38: Ajustes encontrados para a adsorção de insulina humana e bovina em filme de HA em titânio para os três modelos de isoterma estudados.

Isoterma	Langmuir		Freundlich			Langmuir-Freundlich			
Amostras	Q_{max}	K	R^2	k	p	R^2	Q_{max}	K	r
HAF1	4,0	14,7	0,93	4,0	3,4	0,97	36,0±	0,001	0,3
	±0,4	±6,1		±0,3	±0,5		455,1	±0,066	±0,3
HAF2	3,2	52,1	0,96	3,3	6,4	0,84	3,0	57,6	2,1
	±0,2	±16,3		±0,3	±2,4		±0,1	±8,3	±0,4

5.4.2 Imunomarcação

Pela técnica de imunomarcação foi possível ver a presença de proteína na forma de aglomerados tanto para a insulina humana quanto para a insulina bovina para todas as concentrações utilizadas. Na Figura 5.58a-b temos a imagem do filme de HA sobre Ti somente com o tampão e o filme com insulina humana na concentração de 0,8 mg/mL, respectivamente. Nas Figuras 5.58c-d temos a mesma comparação para o filme sem e com insulina bovina, respectivamente. Além da presença de aglomerados de proteína, podemos ver através da imagem que há uma maior quantidade de insulina bovina se comparada com a insulina humana, o que reforça o resultado obtido pela técnica de XPS. Além disso, pode-se ver que não há uma formação de monocamada em toda a superfície do filme, tendo várias regiões sem insulina adsorvida.

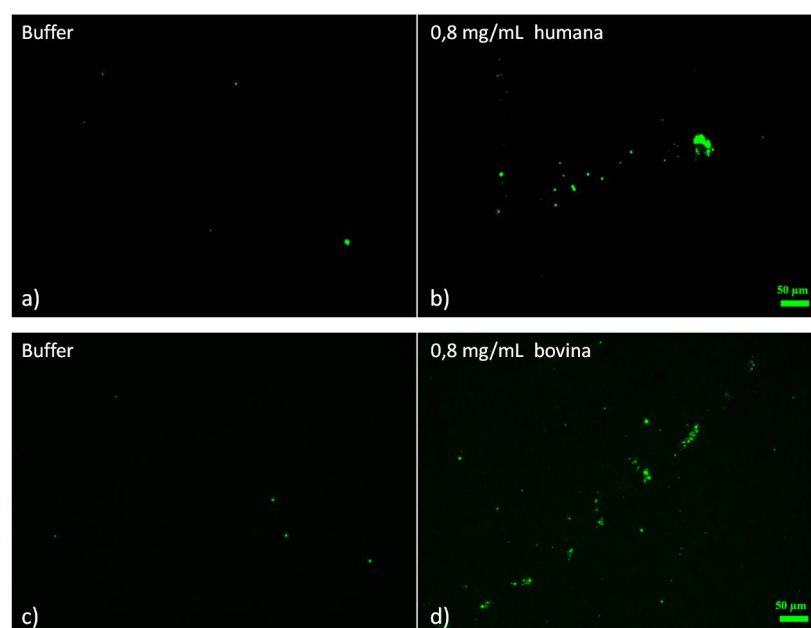


Figura 5.58: Figura da técnica de imunomarcção para os filmes de HA crescidos sobre titânio. Em a) HAF2 e c) HAF1, somente tratado com tampão e em b) e d) o filme com proteína humana e bovina, respectivamente, adsorvida na concentração de 0,8 mg/mL.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas

Neste trabalho estudou-se a interação das proteínas osteocalcina e insulina com a hidroxiapatita sem substituições iônicas e substituída com íons carbonato, zinco e estrôncio e também com filmes finos de HA depositados em substratos de Si. A partir dos experimentos dessa tese, podemos concluir que:

1. Neste trabalho de tese sintetizou-se por via úmida diferentes fosfatos de cálcio nanoestruturados. As análises por XPS mostraram que a superfície destes materiais apresenta estequiometria bem diferente do interior da estrutura. Este resultado, pouco comentado na literatura, é fundamental para o entendimento das complexas interações entre estes materiais, proteínas e moléculas de água que constituem elementos essenciais para a atividade biológica.
2. Vimos com o experimento de XPS antes e após o tratamento com solução tampão Tris, que a solução remove o carbono orgânico, o que acaba por modificar a razão cálcio fósforo. Isso pode ocorrer pois a solução provoca uma remoção e redeposição dos constituintes da hidroxiapatita, formando uma outra fase. Essa hipótese é reforçada pela deconvolução do carbono que mostrou que uma outra ligação ocorre na superfície.

3. A osteocalcina descarboxilada não tem a sua estrutura secundária alterada ao adicionar Ca em sua solução, comportando-se como uma proteína desnaturada ou com estrutura aleatória. Já a osteocalcina nativa passa de desordenada para uma estrutura tipo α -hélice, o que pode ser explicado pela presença dos aminoácidos Gla. Íons de Ca em solução favoreceram à adsorção de hOC em hidroxiapatita, não alterando a afinidade entre elas, mas no caso da hdOC, apesar da quantidade de proteína adsorvida pela HAp não ser alterada, a afinidade entre proteína-superfície aumenta. Isso mostra que o Ca em solução, de alguma forma (a ser estudada) modifica o processo de adsorção.
4. A adsorção de osteocalcina em silício foi possível, mesmo com a ausência de íons de cálcio. Entretanto, a proteína tem sua estrutura secundária modificada, expondo os aminoácidos cisteínas após a adsorção, perdendo, portanto, suas funções. Já na amostra de hidroxiapatita a adsorção foi muito maior, se comparada com o silício. Além disso, a amostra de osteocalcina descarboxilada adsorve menos que a proteína na forma nativa, o que pode ser explicado pela ausência dos aminoácidos Gla, conhecidos por se ligarem ao Ca. Comprovamos então a preferência da osteocalcina por superfícies que contêm cálcio em sua estrutura e o efeito do aminoácido Gla para a adsorção.
5. Quando comparados os efeitos da cristalinidade e da composição dos fosfatos de cálcio na adsorção da osteocalcina, verificou-se que a cristalinidade não afeta a adsorção. Já a composição afeta o processo de adsorção da osteocalcina carboxilada e descarboxilada, adsorvendo quantidades diferentes de proteínas e tendo sua orientação modificada. A razão Ca/P da superfície, mostrou ter influência apenas para a adsorção com a osteocalcina na sua forma ativa, novamente comprovando o efeito do aminoácido Gla, que tem afinidade grande com os íons cálcio.

6. A adsorção da insulina humana nos pós de hidroxiapatita pura e substituída com zinco e estrôncio mostrou que a presença do metal influencia a adsorção. A SrHA tem menor capacidade de adsorção da insulina que a HAp90 e a ZnHA apresentou maior capacidade. Este fato pode ser explicado pela diferença na razão Ca/P, com a insulina, assim como a osteocalcina nativa, preferindo adsorver em superfície com maior quantidade de cálcio ou pela afinidade, já conhecida, entre Zn e insulina. Entretanto, todas as amostras seguem a isoterma de Freundlich, evidenciando que não há uma saturação na quantidade de proteína adsorvida e o processo é de adsorção física, sendo portanto mais fracas que ligações químicas, o que permite mais facilmente a liberação da proteína, sendo útil para tratamentos de doenças.
7. A deconvolução dos picos medidos por XPS mostrou que apenas o pico referente à ligação COOH sofre alteração na energia de ligação, ao se deslocar para baixas energias ao adsorver maior quantidade de proteína. Esse deslocamento sugere que a ligação do Ca^{2+} da HA se dá através de interações eletrostáticas com o terminal $COOH^-$ da proteína.
8. A adsorção da insulina diminui a carga de superfície da HAp90, SrHA e ZnHA. A diminuição do PZ aumenta com a concentração de proteína adsorvida na superfície da hidroxiapatita e atinge valores mais negativos para a amostra substituída com Zn.
9. A análise de CD mostrou que a insulina adsorvida nas superfícies das hidroxiapatitas sofre alteração da sua estrutura secundária ao adsorver na HAp90 e na ZnHA. A adsorção da insulina na HA substituída com Sr, mantém a estrutura nativa da insulina. Como a alteração da estrutura secundária pode afetar a atividade da proteína, a presença do metal pode ser determinante para que a proteína exerça sua função. Para confirmação da atividade da insulina

adsorvida, estudo quantificando a presença de glicose em meio biológico deve ser realizado para então definir se o material substituído com metal que vai adsorver mais proteína é melhor ou se o melhor é o metal que não altera a estrutura secundária da proteína.

10. Experimentos de adsorção da insulina de origem humana e bovina foram realizados em filmes finos de HA. Os resultados revelaram que a insulina de origem bovina teve maior afinidade com a superfície da HA, apesar de ambas as proteínas terem praticamente o mesmo tamanho, peso molecular e estrutura secundária. Como a estrutura dos filmes era diferente nos dois experimentos, com crescimento preferencial e alta razão Ca/P para os filmes adsorvidos com insulina bovina, estudos complementares devem ser realizada para explicar este efeito.
11. Experimentos com filmes finos de igual estrutura devem ser realizados para estudar somente o efeito da origem da proteína. No caso do estudo do efeito de uma determinada orientação, devem ser realizados experimentos de adsorção em fases diferentes dos cristais de HA.
12. Apesar da técnica de ToF-SIMS mostrar grande potencial para o entendimento de mudanças estruturais da osteocalcina quando ligada à superfície de materiais, como as proteínas são mais orientadas em superfícies lisas, como nos filmes finos, do que em pó, análises de ToF-SIMS com a proteína ligada à superfície de filmes finos de diferentes materiais pode ser útil para melhor esclarecer por qual terminal a proteína se liga à superfície.
13. Estudos *in vitro* e *in vivo* com os diferentes materiais estudados e com as diferentes proteínas devem ser realizados para determinar qual efeito (maior quantidade, diferente orientação, diferente estrutura secundária etc) é mais benéfico para a regeneração óssea, o crescimento de células e o tratamento de

doenças.

Bibliografia

- [1] V.,J., Shirliff, L.L. Hench, “Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair”, Journal of materials science, **38**, 4607 - 4707 (2003).
- [2] Hong Lee, Heungsoo Shin, “Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering”, Advance Drug Delivery Reviews, **59**, 339 - 359, (2007).
- [3] LeGeros, R., “Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials”, Chem. Rev., **108** (11), 4742 - 4753, (2008).
- [4] Samar J. Kalita, Abhilasha Bhardwaj, Himesh A. Bhatt, “Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering”, Materials Science and Engineering: C, **27**, 441 - 449, (2007).
- [5] Anselme K, “Osteoblast adhesion on biomaterials”, Biomaterials, **21**, 667 - 681, (2000).
- [6] Lijun Wang and George H. Nancollas, “Calcium orthophosphates: Crystallization and Dissolution”, Chem. Rev., **108** (11), 4628 - 4669, (2008).
- [7] Handoll HH, Watts AC., “Bone grafts and bone substitutes for treating distal radial fractures in adults”, Cochrane Database Syst Rev., **16**;(2):CD006836, (2008).

-
- [8] Reynolds MA, "The Efficacy of Bone Replacement Grafts in the Treatment of Periodontal Osseous Defects. A Systematic Review", *Ann. Periodontol.*, **8**(1), 227 - 265, (2003).
- [9] Trombelli L., "A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects", *J Clin Periodontol.*, **29**, Suppl 3, 117 - 135, (2002).
- [10] Merckx MA., "Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports", *Int J Oral Maxillofac Surg.*, **32**(1), 1 - 6, (2003).
- [11] Tong DC, "A review of survival rates for implants placed in grafted maxillary sinuses using meta-analysis", *Int J Oral Maxillofac Implants.*, **13**(2), 175 - 182, (1998).
- [12] Wang G, "The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone-marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect", *J Bone Joint Surg Br.*, zbf 92(2), 320 - 325, (2010).
- [13] Petricca SE., "Chemical synthesis of poly(lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites for orthopaedic applications", *Acta Biomater.*, **2**(3), 277 - 286, (2006).
- [14] Sebastien A. Gittensa, *et al*, "Designing proteins for bone targeting", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 1011 - 1036, (2005).
- [15] Jeffrey J Gray, "The interaction of proteins with solid surfaces", *Current Opinion in Structural Biology*, **14**, 110 - 115, (2004).
- [16] Kefeng Wang, *et al*, "A review of protein adsorption on bioceramics", *Interface Focus*, Published online, 1-19, (2012).

- [17] Campbell, A. A.; “Bioceramics for implant coatings”, *Mater. Today* **26**, (2003).
- [18] Feng, Q. L.; *et al*, “Influence of solution conditions on deposition of calcium phosphate on titanium by NaOH-treatment”, *J. Cryst. Growth* **210**, 735, (2000).
- [19] Hench, L. L., “An Introduction to Bioceramics”, World Scientific: Londres, Caps. 1-4, (1993).
- [20] Anderson, JM., “The Bone-Biomaterial Interface”, University of Toronto Press: Toronto, Cap. 5, (1991).
- [21] Dorozhkin S, “Bioceramics of calcium orthophosphates”, *Biomaterials* **31**, 1465-85, (2010).
- [22] Koutsoukos, P. G.; *et al*, “Crystallization of calcium phosphates. A constant composition study”, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 1553, (1980).
- [23] Aparecida, A. H.; *et al*, “Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP)”, *Química Nova*, **30** (4), 892 - 896, (2007).
- [24] M. Kavitha *et al*, “Optimization of process parameters for solution combustion synthesis of Strontium substituted Hydroxyapatite nanocrystals using Design of Experiments approach”, *Powder Technology*, **271**, 167-81, (2015).
- [25] Mavropoulos, E., “A hidroxiapatita como removedora de chumbo”, Dissertação, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia, Rio de Janeiro, (1999).
- [26] Fernandez, E; Gil, F.J.; Ginebra, M.P., “Calcium phosphate bone cements for clinical applications - part II”, *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, **10**, 177-183, (1999).

- [27] Posner, A. S., Perloff, A. and Diorio, A. F., "Refinement of the hydroxyapatite structure", *Acta Crystallographica*, **11**, 308-309, (1958).
- [28] M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Posner, "Crystal Structure of Hydroxyapatite", *Nature*, **204**, 1050-1055, (1964).
- [29] Vuk Uskoković, "The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite", *RSC Adv.*, **5**, 36614-36633, (2015).
- [30] Brigitte Wopenka T, Jill D. Pasteris, "A mineralogical perspective on the apatite in bone", *Materials Science and Engineering C*, **25**, 131-143, (2005).
- [31] Alhava E M, *et al*, "Zinc content of human cancellous bone", *Acta Orthop. Scand.*, **48**, (1977).
- [32] Yamaguchi M, Oishi H and Suketa Y, "Stimulatory effect of zinc on bone-formation in tissue-culture", *Biochem. Pharmacol.*, **36**, (1987)
- [33] Kishi S and Yamaguchi M, "Inhibitory effect of zinc-compounds on osteoclast-like cell-formation in mouse marrow cultures", *Biochem. Pharmacol.*, **48**, (1994).
- [34] Moonga B S and Dempster D W, "Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone-resorption in vitro", *J. Bone Miner. Res.*, **10**(3), 453-457, (1995).
- [35] Y. Tang, *et al*, "Zinc incorporation into hydroxylapatite", *Biomaterials*, **30**, 2864-2872, (2009).
- [36] E. S. Thian, *et al*, "Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties", *J Mater Sci: Mater Med*, **24**, 437-445, (2013).

- [37] J. Terra, M. Jiang and D.E. Ellis, "Characterization of electronic structure and bonding in hydroxyapatite: Zn substitution for Ca", *Philos. Mag. A*, **82**, 2357-2377, (2002).
- [38] Ming'ou Li , "Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method", *J Mater Sci: Mater Med*, **19**, 797-803, (2008).
- [39] E. Bonnelye, *et al*, "Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro", *Bone*, **42**(1), 129-138, (2008).
- [40] E. Shorr, A.C. Carter, "The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in man", *Bull. Hosp. Joint Dis.*, **13**(1), 59-66, (1952).
- [41] J. Christoffersen, *et al*, "Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection", *Bone*, **20**, 47-54, (1997)
- [42] A. Monkawa, *et al*, "Fabrication of hydroxyapatite ultra-thin layer on gold surface and its application for quartz crystal microbalance technique", *Biomaterials*, **27**(33), 5748-5754, (2006).
- [43] Querido W, Rossi AL, Farina M, "The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches", *Micron* **80**, 122-134, (2016).
- [44] M. Kavitha, *et al*, "Solution combustion synthesis and characterization of strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals", *Powder Technology*, **253**, 129-137, (2014).

-
- [45] Adriana Bigi, *et al*, “Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals”, *Inorganica Chimica Acta*, **360**, 1009-1016, (2007).
- [46] Querido W, *et al*, “Strontium ranelate changes the composition and crystal structure of the biological bone-like apatite produced in osteoblast cell cultures”, *Cell Tissue Res*, **357**, 793-801, (2014).
- [47] Oliveira JP, *et al*, “Strontium Is Incorporated in Different Levels into Bones and Teeth of Rats Treated with Strontium Ranelate”, *Calcif Tissue Int*, **91**, 86-195, (2012).
- [48] Joice Terra, *et al*, “The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**, 568-577, (2009)
- [49] A. Bigi, *et al*, “Structural refinements of strontium substituted hydroxyapatites”, *Mater. Sci. Forum*, **814**, 278-281, (1988).
- [50] Suzuki O, “Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials”, *Jpn Dent Sci Rev*, **49**, 58-71, (2013).
- [51] Ishihara S, *et al*, “New concept bioceramics composed of octacalcium phosphate (OCP) and dicarboxylic acid-intercalated OCP via hydrothermal hot-pressing”, *Mater. Sci. Eng. C*, **29**, 1885-1888, (2009).
- [52] Imaizumi H, *et al*, “Comparative Study on Osteoconductivity by Synthetic Octacalcium Phosphate and Sintered Hydroxyapatite in Rabbit Bone Marrow”, *Calcif Tissue Int*, **78**, 45-54, (2006).
- [53] Erika Davies, *et al*, “Applications of NMR Crystallography to Problems in Biomineralization: Refinement of the Crystal Structure and ³¹P Solid-State

- NMR Spectral Assignment of Octacalcium Phosphate”, J. Am. Chem. Soc., **134**, 12508-12515, (2012).
- [54] Walter E. Brown, LeRoy W. Schroeder and James S. Ferris, “Interlayering of Crystalline Octacalcium Phosphate and Hydroxylapatite”, The Journal of Physical Chemistry, **83**(11),1385-1388, (1979).
- [55] Alberts B, *et al*, “Fundamentos da biologia celular”, 3a ed. Artmed, (2011).
- [56] <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2009/protein-structure.html>
- [57] <http://cbm.msoe.edu/teachingResources/proteinStructure/secondary.html>
- [58] <http://pt.slideshare.net/lnribeiro/aminocidos-e-protenas>
- [59] <http://sbb.uvm.edu/sje/351/sub2.3.html>
- [60] Hauschka, P. V., *et al*, “Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone”, Physiol. Rev. **69**, 990 - 1047 (1989).
- [61] Calvo, M. S., Eyre, D. R., Caren, M. G., “Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover” Endocr. Rev. **17**, 333 - 368 (1996).
- [62] Vigorita V., “Orthopedic pathology”, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; (1999).
- [63] Oury F, *et al*, “Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions”, Cell, **155**, 228-241, (2013).
- [64] Booth SL, *et al*, “The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator?”, Nat Rev Endocrinol, **9**, 43-55, (2012).

-
- [65] Peter V. Hauschka and Steven A. Carr, "Calcium-Dependent α -Helical Structure in Osteocalcin", *Biochemistry*, **21**, 2538 - 2547, (1982).
- [66] Hoang QQ, *et al*, "Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure", *Nature*, **425**, 977-980, (2003).
- [67] Lee AJ, Hodges S, Eastell R, "Measurement of osteocalcin", *Ann Clin Biochem*, **37**, (Pt 4), 432-46, (2000).
- [68] Booth SL, *et al*, "Associations between Vitamin K Biochemical Measures and Bone Mineral Density in Men and Women", *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 4904-4909, (2004).
- [69] Lee, N. K.; *et al*, "Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton", *Cell*, **130**, 456 - 469, (2007)
- [70] Patti, A.; *et al*, "Endocrine Actions of Osteocalcin", *Int. J. Endocrinol.*, ID 846480 ; (2013)
- [71] Bulló, M.; *et al*, "Total and undercarboxylated osteocalcin predict changes in insulin sensitivity and β cell function in elderly men at high cardiovascular risk", *Am J Clin Nutr.*, **95**, 249 - 255, (2012)
- [72] Oury, F.; *et al*, "Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton", *Cell*, **144**, 796 - 809, (2011).
- [73] Schuh-Huerta, S. M.; Reijo Pera, R. A., "Reproductive biology: Bone returns the favour", *Nature*, **472**, 46 - 47, (2011)
- [74] Ferron, M.; Hinoi, E.; Karsenty, G.; Ducy P., "Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 5266 - 5270, (2008)

- [75] Wolf, G., “Energy regulation by the skeleton”, *Nutr. Rev.*, **66**, 229 - 233, (2008)
- [76] Wei, J.; *et al*, “Osteocalcin Promotes β Cell Proliferation During Development and Adulthood Through Gprc6a”, *Diabetes* **63**, 1021 - 1031, (2014).
- [77] Rammelt, S.; *et al*, “Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites”, *J Biomed Mater Res A.*, **73**(3), 284 - 294, (2005).
- [78] Mansur HS, *et al*, “Adsorption/desorption behavior of bovine serum albumin and porcine, insulin on chemically patterned porous gel networks”, *Adsorption*, **7**(2), 105-116, (2001).
- [79] Sonksen P., Sonksen J., “Insulin: understanding its action in health and disease”, *Br J Anaesth*, **85**(1), 69-79, (2000).
- [80] Klein GL, “Insulin and bone: Recent developments”, *World J Diabetes*, **5**(1), 14-16, (2014).
- [81] Yosten GLC, Kolar GR, “The Physiology of Proinsulin C-Peptide: Unanswered Questions and a Proposed Model”, *Physiology*, **30**, 327-332, (2015).
- [82] Humphrey W, Dalke A, Schulten K, “VMD: Visual molecular dynamics”, *J Mol Graph*, **14**, 33-38, (1996).
- [83] Catarina Silva, *et al*, “Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **39**(1), 21 - 40, (2003)
- [84] Xiaoqing Chang, *et al*, “Solution Structures of the R6 Human Insulin Hexamer”, *Biochemistry*, **36**, 9409-9422, (1997).
- [85] Margaret C. Carpenter and Dean E. Wilcox, “Thermodynamics of Formation of the Insulin Hexamer: Metal Stabilized Proton-Coupled Assembly of Quaternary Structure”, *Biochemistry*, **53**, 1296-1301, (2014)

- [86] J. Brange and L. Langkjaer, "Insulin structure and stability", *Pharm. Biotechnol.*, **5**, 315-350 ,(1993).
- [87] K.Y. Foo, B.H. Hameed, "Insights into the modeling of adsorption isotherm systems", *Chemical Engineering Journal*, **156**, 2-10, (2010).
- [88] Chie Kojima and Kenji Watanabe, "Adsorption and Desorption of Bioactive Proteins on Hydroxyapatite for Protein Delivery Systems", *Journal of Drug Delivery*, **2012**, (2012), Article ID 932461, 4 pages.
- [89] Petr Praus and Martina Turicová, "A Physico-Chemical Study of the Cationic Surfactants Adsorption on Montmorillonite", *J. Braz. Chem. Soc.*, **18**(2), 378-383, (2007).
- [90] Gautham P. Jeppu, T. Prabhakar Clement, "A modified Langmuir-Freundlich isotherm model for simulating pH-dependent adsorption effects", *Journal of Contaminant Hydrology*, **129-130**, 46-53, (2012).
- [91] Norde W, Buijs J, Lyklema H, Chapter 3 â Adsorption Of Globular Proteins. In: *Fundam. Interface Colloid Sci.* p 3.1-3.59, (2005).
- [92] X.D. Zhu, et al, "Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption", *Acta Biomaterialia*, **6**, 1536-1541, (2010).
- [93] X.D. Zhu, et al, "Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium phosphate ceramics in vitro and in vivo", *Acta Biomaterialia*, **5**(4), 1311-1318, (2009).
- [94] J.R. Sharpe, R.L. Sammons and P.M. Marquis, "Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics", *Biomaterials*, **18**, 471-476, (1997).

-
- [95] T. Ballet, *et al*, "Protein conformational changes induced by adsorption onto material surfaces: an important issue for biomedical applications of material science", Bulletin of the Polish Academy of Sciences Technical Sciences, **58**(2), 303-315, (2010).
- [96] K. Kandori, A. Masunari, T. Ishikawa, "Study on Adsorption Mechanism of Proteins Onto Synthetic Calcium Hydroxyapatites Through Ionic Concentration Measurements", Calcif Tissue Int, **76**, 194-206, (2005).
- [97] Fujii, E., *et al*, "Selective protein adsorption property and characterization of nanocrystalline zinc-containing hydroxyapatite", Acta Biomater., **2**, 69-74, (2006).
- [98] Takashima, S., *et al*, "Synthesis of carbonate-hydroxyapatite and selective adsorption activity against specific pathogenic substances", Key Eng. Mater., **218**, 175-178, (2001).
- [99] Takemoto, S., *et al*, "Selective protein adsorption and blood compatibility of hydroxycarbonate", J. Biomed. Mater. Res. A., **69**, 544-551, (2004).
- [100] Roach, P., *et al*, "Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications", J. Mater. Sci. Mater. Med., **18**, 1263-1277, (2007).
- [101] Zhou, H., *et al*, "Adsorption mechanism of BMP-7 on hydroxyapatite (001) surfaces", Biochem. Biophys. Res. Commun., **361**, 91-96, (2007).
- [102] Shen, J. W., *et al*, "Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces", Biomaterials, **29**, 513-532, (2008).
- [103] Wassell, D. T. H., Hall, R. C. and Embury, G., "Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite", Biomaterials, **16**, 697-702, (1995).

-
- [104] M. Lasgorceix, *et al*, “In vitro and in vivo evaluation of silicated hydroxyapatite and impact of insulin adsorption”, *J Mater Sci: Mater Med*, **25**(10), 2383-2393, (2014).
- [105] E. Vanea and V. Simon, “XPS and Raman study of zinc containing silica microparticles loaded with insulin”, *Applied Surface Science*, **280**(1), 144-150, (2013).
- [106] K. Navaneetha Pandiyaraj, “Glow discharge plasma-induced immobilization of heparin and insulin on polyethylene terephthalate film surfaces enhances antithrombogenic properties”, *Materials Science and Engineering C*, **29**, 796-805, (2009).
- [107] Lee, WH, *et al*, “Osteoblast response to the surface of amino acid-functionalized hydroxyapatite”, *Journal of biomedical materials research A*, **103A**(6), 2150-2160, (2015).
- [108] Zhao, JF, *et al*, “Solution combustion synthesis of calcium phosphate particles for controlled release of bovine serum albumin, *Materials Science and Engineering C*, **50**, 194-200, (2015).
- [109] Sai Wu, Xuanyong Liu and Changyou Gao, “Role of adsorbed proteins on hydroxyapatite-coated titanium in osteoblast adhesion and osteogenic differentiation”, *Science Bulletin*, **60**(7), 691-700, (2015).
- [110] Wu, F., *et al*, “Effect of the Materials Properties of Hydroxyapatite Nanoparticles on Fibronectin Deposition and Conformation”, *Cryst. Growth Des.*, **15**, 2452-2460, (2015).
- [111] Matsui N, *et al*, “Concentration-dependent effects of fibronectin adsorbed on hydroxyapatite surfaces on osteoblast adhesion”, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, **48**, 378-383, (2015).

- [112] Rosa Torres, Concepcion de la Piedra and Aurelio Rapado, "Binding of serum osteocalcin to hydroxyapatite in Paget's disease of bone", *Bone and Mineral*, **14**, 55-65, (1991).
- [113] T.L. Dowd, *et al*, "The effect of Pb^{2+} on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin", *Biochimica et Biophysica Acta*, **1535**, 153-163, (2001).
- [114] N. Ribeiro, *et al*, "Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology", *Journal of Colloid and Interface Science*, **351**, 398-406, (2010).
- [115] Yen-Jye Shyong, *et al*, "Insulin-loaded hydroxyapatite combined with macrophage activity to deliver insulin for diabetes mellitus", *J. Mater. Chem. B*, **3**, 2331-2340, (2015).
- [116] Susanne H. Mollmann, "Interfacial adsorption of insulin Conformational changes and reversibility of adsorption", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **27**, 194-204, (2006).
- [117] Michael V. "Adsorption Isotherms of Insulin onto Various Materials", *Diabetes*, **33**, 674-680, (1984).
- [118] Baio JE, *et al*, "Probing Albumin Adsorption onto Calcium Phosphates by XPS and ToF-SIMS", *J Vac Sci Technol B Microelectron Nanometer Struct Process Meas Phenom*, **29**, 4D113, (2011).
- [119] Powell CJ, Jablonski A, NIST Standard Reference Database 82 NIST Electron Effective-Attenuation-Length Database, (2011).
- [120] http://mmrc.caltech.edu/SS_XPS/XPS_PPT/XPS_Slides

-
- [121] C. Brundle and A.D. Baker, “Electron Spectroscopy: Theory, Thechniques and Applications”, Vols. 1-4, Academic Press, New York (1977 – 1981).
- [122] C. D. Wagner, *et al*, “Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy”, Published by Physical Electronic Division, USA, (1979).
- [123] A.M. Belu et al., “Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces”, *Biomaterials* **24**, 3635-3653, (2003)
- [124] Nan Xia, *et al*, “Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Conformational Changes in Adsorbed Protein Films”, *Langmuir*, **18**(10), 4090-4097, (2002).
- [125] Wang H, *et al*, “Probing the orientation of surface-immobilized immunoglobulin G by time-of-flight secondary ion mass spectrometry”, *Langmuir*, **20**, 1877-87, (2004).
- [126] Liu F, *et al*, “Immobilized antibody orientation analysis using secondary ion mass spectrometry and fluorescence imaging of affinity-generated patterns”, *Anal Chem*, **82**, 2947-58, (2010).
- [127] Baio JE, *et al*, “Probing the orientation of electrostatically immobilized cytochrome C by time of flight secondary ion mass spectrometry and sum frequency generation spectroscopy”, *Biointerphases*, **8**:18, (2013).
- [128] Foster RN, Harrison ET, Castner DG, “ToF-SIMS and XPS Characterization of Protein Films Adsorbed onto Bare and Sodium Styrenesulfonate-Grafted Gold Substrates”, *Langmuir*, **32**, 3207-3216, (2016).
- [129] Jones, E.A., N.P. Lockyer, J. Kordys, and J.C. Vickerman, “Suppression and enhancement of secondary ion formation due to the chemical environment in

- static-secondary ion mass spectrometry”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **18**(8), 1559 - 1567, (2007)
- [130] Jackson, J. E. A, *Users’ Guide to Principal Components*, John Wiley & Sons: New York, (1991)
- [131] Jackson, J. E. J., “Principal components and factor analysis: Part I-principal components”, *Quality Technol.*, **12**, 201-213, (1980)
- [132] Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., “Principal component analysis”, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2**, 37 - 52, (1987)
- [133] Lee JLS, Gilmore IS, “Chapter 10: The Application of Multivariate Data Analysis Techniques in Surface Analysis” In: *Surf. Anal. Princ. Tech.*, John Wiley Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 563-612, (2009).
- [134] http://www.nb.uw.edu/sites/nb.uw.edu/files/tutorials/GeneralIntroductionToPCA_2010.pdf
- [135] M. S. Wagner and D. G. Castner, “Characterization of Adsorbed Protein Films by Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with Principal Component Analysis”, *Langmuir*, **17** 4649-4660, (2001).
- [136] <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>
- [137] www.niu.edu/analyticallab/_pdf/ftir/FTIRintro.pdf
- [138] Jilie Kong and Shaoning Yu, “Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **39**(8), 549-559, (2007).
- [139] Cerruti M, “Surface characterization of silicate bioceramics”, *Philos. Trans. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci.* **370**, 1281-312 (2012).

- [140] http://www.chemistryviews.org/details/ezone/2064331/100th_Anniversary_of_the_Discovery_of_X-ray_Diffraction.html
- [141] <http://www.tu-cottbus.de/zal/zal/prakt/aas.htm>
- [142] <http://cnx.org/contents/uieDnVBC@21.1:N9BIjSqJ@1/Characterization-of-Group-12-1>, http://namrataheda.blogspot.com.br/2013_0_01_archive.html
- [143] http://www.masontechnology.ie/files/SALD_2300.pdf
- [144] <http://particle.dk/methods-analytical-laboratory/particle-size-by-laser-diffraction/laser-diffraction-theory/>
- [145] Stojanovic Z, Markovic S, “Determination of Particle Size Distributions by Laser Diffraction”, *Tech - New Mater*, **21**, 11-20, (2012)
- [146] <https://cnx.org/contents/9cBY4EHy@1/BET-Surface-Area-Analysis-of-N>
- [147] <http://www.particletechlabs.com/b-e-t-specific-surface-area>
- [148] S. Brunauer, P. H. Emmett, and E. Teller, “Adsorption of gases in multimolecular layers”, *Journal of American Chemical Society*, **60**, 309-319, (1938).
- [149] HUNTER RJ, HUNTER RJ, “Chapter 1 - Introduction”, In: *Zeta Potential Colloid Sci.* pp 1-10, (1981).
- [150] http://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential
- [151] <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=9787>
- [152] <http://pg.gda.pl/info/polimery/files/2013/10/im-swp-l-002f.pdf>
- [153] S.M. Kelly *et al.*, “How to study proteins by circular dichroism”, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1751**, 119-139, (2005).

- [154] Zaida C. Lourenço de Almeida, “CINÉTICA DE AGREGAÇÃO DA PROTEÍNA TRANSTIRRETINA: Contribuição Para A Compreensão Dos Processos De Formação De Amilóide”, dissertação de mestrado, 2010.
- [155] <http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/images/1.png>
- [156] Greenfield NJ, “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure”, *Nat Protoc*, **1**, 2876-90, (2006).
- [157] Coons AH, *et al*, “Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group”, *Proc Soc Exp Biol Med*, **47**, 200-202, (1941).
- [158] Coons AH and Kaplan MH, “Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody”, *Journal of Exp Med*, **91**(1), 1-13, (1950).
- [159] Weber K, *et al*, “Specific visualization of tubulin-containing structures in tissue culture cells by immunofluorescence. Cytoplasmic microtubules, vinblastine-induced paracrystals, and mitotic figures”, *Exp Cell Res*, **95**, 111-120, (1975).
- [160] Valeria Aoki, *et al*, “Imunofluorescência direta e indireta”, *An Bras Dermatol*, **85**(4), 490-500, (2010)
- [161] Paul Robinson, *et al*, “Chapter 10: Immunofluorescence”, *IHC Staining Methods*, Fifth Edition, Chapter 10.
- [162] http://www.nupeb.ufop.br/lip/pdf/tecnicas_imunologicas.pdf
- [163] LeGeros, R., “Preparation of Octacalcium Phosphate (OCP): A Direct Fast Method”, *Calcif. Tissue Int.*, **37**, 194 - 197, (1985).
- [164] Alexandre M. P. Silva, “Filmes Finos Cristalinos de Hidroxiapatita: Uma Abordagem Original com Magnetron Sputtering de Alvos Opostos”, tese de doutorado, (2007).

- [165] Naoe, M., Hoshi, Y., Yamanaka, S. "High rate deposition of magnetic films by sputtering from two facing targets", *Journal of Crystal growth*, **45**, 361-364, (1978).
- [166] Zheng, J. Q., *et al*, "A miniature X-ray compatible sputtering system for studying in situ high Tc thin film growth", *J. Vac. Sci. Tech. A*, **9**(1), 128-132, (1991).
- [167] Tamara, M. David, C. and Cameron, B., "On the ion flux and energy gain during pulsed DC operation of an opposed target magnetron" *Surface & Coatings Technology*, **200**, 5306-5317, (2006).
- [168] <http://www.sigmaaldrich.com/>
- [169] D.J. Graham and D.G. Castner, "Multivariate Analysis of ToF-SIMS Data from Multicomponent Systems: The Why, When, and How", *Biointerphases*, **7**, 49 (2012).
- [170] Iafisco M, *et al*, "Biomimetic magnesium carbonate-apatite nanocrystals endowed with strontium ions as anti-osteoporotic trigger", *Mater Sci Eng C*, **35**, 212-219, (2014).
- [171] K. Venkateswarlu, A. Chandra Bose, N. Rameshbabu, "X-ray peak broadening studies of nanocrystalline hydroxyapatite by Williamson-Hall analysis", *Physica B*, **405**, 4256-4261, (2010).
- [172] B.D. Cullity, "Elements of X-Ray Diffraction", Ed. Addison-Wesley, Boston, MA, (1956).
- [173] Sreerama N, Woody RW, "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set", *Anal Biochem*, **287**, 252-260, (2000).

- [174] Whitmore L, Wallace BA, "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases", *Biopolymers*, **89**, 392-400, (2008).
- [175] Whitmore L, Wallace BA, "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data", *Nucleic Acids Res.* **32**, 668-673, (2004).
- [176] Limin Sun *et al*, "Preparation and Properties of Nanoparticles of Calcium Phosphates With Various Ca/P Ratios", *J Res Natl Inst Stand Technol.*, **115**(4), 243-255, (2010).
- [177] H. ESLAMI *et al*, "Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite obtained by the wet chemical technique", *Materials Science-Poland*, **28**(1), 5-13, (2010).
- [178] Sophie C. Cox, "Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation", *Materials Science and Engineering C*, **35**, 106-114, (2014).
- [179] Stanić V, Dimitrijević S, Antić-Stanković J, *et al*, "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders", *Appl Surf Sci*, **256**, 6083-6089, (2010).
- [180] S. Koutsopoulos, "Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods", *J Biomed Mater Res.*, **62**(4), 600-612, (2002).
- [181] Shi H, He F, Ye J, "Synthesis and structure of iron- and strontium-substituted octacalcium phosphate: effects of ionic charge and radius", *J Mater Chem B*, **4**, 1712-1719, (2016).

- [182] Jinhui Tao, *et al*, “Roles of Amorphous Calcium Phosphate and Biological Additives in the Assembly of Hydroxyapatite Nanoparticles”, *J Phys Chem B.*, **111**(47), 13410-13418, (2007).
- [183] Mahabole MP, *et al*, “Synthesis, characterization and gas sensing property of hydroxyapatite ceramic”, *Bull Mater Sci*, **28**, 535-545, (2005).
- [184] López EO, *et al*, “Growth of crystalline hydroxyapatite thin films at room temperature by tuning the energy of the RF-magnetron sputtering plasma”, *ACS Appl Mater Interfaces*, **5**, 9435-9445, (2013).
- [185] França R, *et al*, “Nanoscale surface characterization of biphasic calcium phosphate, with comparisons to calcium hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate bioceramics”, *J Colloid Interface Sci*, **420**, 182-188, (2014).
- [186] V. Dorozhkin S, “Nanodimensional and Nanocrystalline Calcium Orthophosphates”, *Am J Biomed Eng*, **2**, 48-97, (2012).
- [187] Dorozhkin S V., “Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications”, *Biomatter*, **1**, 121-164, (2011).
- [188] V.I. Bukhtiyarov, V.A. Kondratenko and A.I. Boronin, “Features of the interaction of a $CO + O_2$, mixture with silver under high pressure”, *Surface Science Letters*, **293**, L826-L829, (1993).
- [189] Fulvio Parmigiani and Laura E. Depero, “Diffraction and XPS Studies of Cu Complexes of Intercalated Compounds of α -Zirconium Phosphate. II: XPS Electronic Structures”, *Structural Chemistry*, **5**(2), 117-122, (1994).

- [190] Bo Fenga, Jiyong Chen, Xingdong Zhang, "Interaction of calcium and phosphate in apatite coating on titanium with serum albumin", *Biomaterials*, **23**, 2499-2507, (2002).
- [191] Hongbo B. Lu, *et al*, "Surface Characterization of Hydroxyapatite and Related Calcium Phosphates by XPS and TOF-SIMS", *Anal. Chem.*, **72**, 2886-2894, (2000).
- [192] Charles C. Chusuei and D. Wayne Goodman, "Calcium Phosphate Phase Identification Using XPS and Time-of-Flight Cluster SIMS", *Anal. Chem.*, **71**, 149-153, (1999).
- [193] http://srdata.nist.gov/xps/EngElmSrchQuery.aspx?EType=PE&CSOpt=Retri_ex_dat&Elm=Zn
- [194] A.R. Boyd *et al*, "Strontium-substituted hydroxyapatite coatings deposited via a co-deposition sputter technique", *Materials Science and Engineering C*, **46**, 290-300, (2015).
- [195] G.D. Khattak, N. Tabet, M.A. Salim, "X-ray photoelectron spectroscopic studies of vanadium-strontium-borate $[(V_2O_5)_x(SrO)_{0.2}(B_2O_3)_{0.8-x}]$ oxide glasses", *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **133**, 103-111, (2003).
- [196] Fang Cheng, *et al*, "X-ray Photoelectron Spectroscopy, Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, and Principal Component Analysis of the Hydrolysis, Regeneration, and Reactivity of N-Hydroxysuccinimide-Containing Organic Thin Films", *Analytical Chemistry*, **79**(22), 8781-8788, (2007).
- [197] A. Maho *et al*, "Tantalum oxide/carbon nanotubes composite coatings on titanium, and their functionalization with organophosphonic molecular films:

- A high quality scaffold for hydroxyapatite growth”, Journal of Colloid and Interface Science, **371**, 150-158, (2012).
- [198] Hauschka P V., Wians FH, “Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone”, Anat Rec, **224**, 180-188, (1989).
- [199] Quyen Quoc Hoang, “Crystal structure and hydroxyapatite binding of osteocalcin from porcine”, McMaster University, (2003).
- [200] Atkinson, R. A.; *et al.*, “Conformational studies of osteocalcin in solution”, Eur. J. Biochem, **232**, 515-521, (1995).
- [201] Lee, A. J.; Hodges, S.; Eastell, R., “Measurement of osteocalcin”, Ann. Clin. Biochem., **37**, 432-446, (2000).
- [202] Dowd, T. L.; *et al.*, “The three-dimensional structure of bovine calcium ion-bound osteocalcin using ¹H NMR spectroscopy”, Biochemistry, **42**, 7769-7779, (2003).
- [203] Nishimoto, S. K.; *et al.*, “Structure, activity, and distribution of fish osteocalcin”, Biol. Chem., **278**, 11843-11848, (2003).
- [204] P.V. Hauschka PMG, “Calcium-binding Proteins and calcium function”, Volume 2, Ed. Knovel, (1977).
- [205] T. Ramanathan, *et al.*, “Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems”, Chem. Mater., **17**, 1290-1295, (2005).
- [206] J. R. Pels, *et al.*, “Evolution of nitrogen functionalities in carbonaceous materials during pyrolysis”, Carbon, **33**(11), 1641-1653, (1995).
- [207] <http://xpssimplified.com/elements/nitrogen.php>

- [208] A. SADOUGH VANINI - J.P. AUDOUARD - P. MARCUS, "The Role of Nitrogen in the Passivity of Austenitic Stainless Steels", *Corrosion Science*, **36**(11), 1825-1834, (1994).
- [209] R. Bhowmik, *et al.*, "Molecular dynamics simulation of hydroxyapatite-epolyacrylic acid interfaces", *Polymer*, **48**, 664-674, (2007).
- [210] Mulu Berhe Desta, "Batch Sorption Experiments: Langmuir and Freundlich Isotherm Studies for the Adsorption of Textile Metal Ions onto Teff Straw (*Eragrostis tef*) Agricultural Waste", *Journal of Thermodynamics*, Volume 2013, Article ID 375830, 6 pages
- [211] Elsayed A, *et al.*, "Development of insulin loaded mesoporous silica injectable particles layered by chitosan as a controlled release delivery system", *Int J Pharm*, **461**, 448-458, (2014).
- [212] Skolnick J, Kolinski A, "Dynamic Monte Carlo simulations of a new lattice model of globular protein folding, structure and dynamics", *J Mol Biol*, **221**, 499-531, (1991).
- [213] Dill K A, Fiebig KM, Chan HS, "Cooperativity in protein-folding kinetics", *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 1942-1946, (1993).
- [214] Ding F, *et al.*, "Mechanism for the α -helix to β -hairpin transition", *Proteins Struct Funct Genet*, **53**, 220-228, (2003).
- [215] Qin Z and Buehler MJ, "Molecular dynamics simulation of the α -helix to β -sheet transition in coiled protein filaments: Evidence for a critical filament length scale", *Phys Rev Lett*, **104**(19), 198304, (2010).

Apêndice A

Anexos

Datasheet insulina bovina

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

Insulin solution from bovine pancreas - 10 mg/mL insulin in 25 mM HEPES, pH 8.2, BioReagent, sterile-filtered, suitable for cell culture

Product Number: **I0516**

MDL: MFCD00131380

Formula Weight: 5,734.00 g/mol

Storage Temperature: 2 - 8 °C

TEST	Specification
Appearance (Turbidity)	Clear
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Solution
pH	7.9 - 8.5
Endotoxin Level	≤ 50 EU/ml
Cell Culture Test	Pass
Insulin	9.5 - 10.5 mg/ml
Concentration by HPLC	
Sterility by USP guidelines	Negative

Specification: PRD.0.ZQ5.10000038192

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Datasheet insulina humana

SIGMA-ALDRICH®sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.comEmail USA: techserv@sial.comOutside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

Insulin solution human – Chemically defined, recombinant from *Saccharomyces cerevisiae*, sterile-filtered, BioXtra, suitable for cell culture

Product Number: I9278

Storage Temperature: 2 - 8 °C

TEST	Specification
Origin	Non-Animal Source
Appearance (Turbidity)	Clear
Appearance (Form)	Solution
pH	7.9 - 8.5
Endotoxin Level	≤ 50 EU/ml
Cell Culture Test	Pass
at 1 mL/L	
Insulin	9.5 - 11.5 mg/ml
Sterility by USP guidelines	Negative

Specification: PRD.2.ZQ5.10000048866

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.