

PRODUÇÃO DE COMPÓSITOS BASEADOS EM COLÁGENO-HIDROXIAPATITA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

D.M. CAMPOS¹, L.A. SENA² e G.A. SOARES¹

¹Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais/PEMM/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

²INMETRO, Xerém, Rio de Janeiro, Brasil

doris@metalmat.ufrj.br

Abstract: Recent studies show that similarity between synthetic scaffolds and original tissue is an important characteristic for bone replacement materials. The hydroxyapatite-collagen type I (HA-Col I) composites were prepared by *in vitro* fibrilogenesis of Col I fibrils simultaneously with HA precipitation. Composites obtained were lyophilized and sterilized by γ radiation, and some samples were chemically treated with glutaraldehyde (GTA). By FT-IR characteristics bands of type I collagen and HA were identified. GTA treatment seems to be fundamental in order to maintain composite samples in culture medium for 7 days and no toxic effect were observed by testing according to ISO 10.993-3 standard.

Palavras-chave: colágeno, hidroxiapatita, compósito, biomateriais

Introdução

O colágeno tipo I (Col I) é o biopolímero predominante na maioria dos animais e é encontrado especialmente na pele, tendões e ossos. Na matriz óssea, apresenta-se em feixes fibrilares cuja organização paralela permite o surgimento das regiões que interagem com minerais de fosfato de cálcio. As apatitas biológicas de ossos e dentes consistem basicamente em hidroxiapatita (HA) deficiente em cálcio (razão Ca/P menor que 1,67) contendo algumas substituições iônicas em sua estrutura, como o carbonato. Durante o processo de formação e remodelação óssea, nas regiões interfibrilares das fibras de Col I, ocorre a nucleação e o crescimento dos cristais de HA [1]. Essa matriz compósita permite aos ossos desempenharem inúmeras funções, entre elas, a de sustentação do organismo.

Biomateriais sintéticos com estrutura físico-química similar à matriz óssea têm sido desenvolvidos para permitir a rápida penetração das células, nervos e vasos sanguíneos em direção ao interior do material. Com isso é possível a regeneração e remodelação do tecido natural, mantendo sua função biológica [2]. Adicionalmente, os arcabouços podem carrear células específicas no estágio desejado e/ou moléculas

sinalizadoras a fim de maximizar o crescimento do tecido ósseo e, portanto, a velocidade do reparo [3].

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de extração de colágeno tipo I bovino e produzir um compósito de hidroxiapatita e colágeno tipo I, testando o efeito do glutaraldeído na durabilidade *in vitro* do compósito.

Materiais e Métodos

O protocolo de extração desenvolvido visou a obtenção de uma solução de fibrilas de colágeno oriundas de tendão de pata bovina em meio ácido. Os tendões foram obtidos ainda frescos de frigorífico credenciado na ANVISA e utilizados em uma única extração a fim de evitar o congelamento da peça ou desnaturação da proteína. Assim que foram coletados, os tendões foram lavados, cortados em cubos de 1mm³ e mantidos em álcool 70% por 1 hora. Após esse tempo, os fragmentos foram dissociados em solução de ácido acético 1M (ácido acético glacial, MERCK) e pepsina 10% (pepsina extraída de mucosa suína, SIGMA) a 30 °C sob agitação constante por 24 horas. A solução obtida foi limpa por centrifugação (2000G por 3 horas, CENTRIFUGE 5810R). O sobrenadante foi recolhido e o material restante descartado. Parte da solução limpa recebeu igual volume de solução de NaCl 20% causando a agregação e precipitação das fibrilas de Col I em solução. A solução foi novamente centrifugada (2000G por 3 horas) e o sobrenadante descartado. Ambas as soluções sofreram diálise em água destilada e, posteriormente, em solução de ácido fosfórico 59,32mM. As soluções finais foram mantidas a 4 °C até sua utilização. A concentração de cada solução foi determinada através de seu peso seco e a caracterização das fibrilas de Col I foi realizada através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A produção dos materiais compósitos seguiu o protocolo descrito por SENA [4]. Objetivou-se compósitos com fase orgânica (Col I) e fase inorgânica (HA) na proporção 1:1 (em peso) e com razão Ca/P igual a 1,67. Durante a produção, as duas soluções

(ácido fosfórico com fibrilas de Col I e nitrato de cálcio) foram gotejadas, com o auxílio de bombas peristálticas, em um becher contendo, previamente, 25ml de água destilada. No início da síntese e durante seu decorrer, a temperatura e o pH foram ajustados para 38 °C e 9, respectivamente.

Os produtos das sínteses foram mantidos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 24 horas para ajuste do pH próximo ao fisiológico (pH=7,4). Os materiais foram liofilizados em formas cilíndricas e amostras foram separadas para análises por difração de Raios-X (DRX), FTIR e MEV.

Com a intenção de manter a estrutura do material em ambiente de cultivo celular, as amostras sofreram reticulação por tratamento com glutaraldeído (GTA) 0,25% por 2 horas. Após o período, os compósitos foram lavados com PBS extensivamente para retirada total de resíduos de GTA.

A citotoxicidade foi avaliada segundo a norma ISO 10993-3 [5]. Utilizou-se uma densidade celular mínima da ordem de 10^4 células/cm² semeadas em placas de cultura de 24 poços durante 24 horas em estufa de CO₂. Triplicatas das seguintes amostras foram utilizadas: sem precipitação e sem tratamento com GTA (SPSG); sem precipitação e com tratamento com GTA (SPCG); com precipitação e sem tratamento com GTA (CPSG) e com precipitação e com tratamento com GTA (CPCG).

Para avaliação da manutenção da estrutura dos compósitos em ambiente de cultivo celular, os materiais foram imersos em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino por 3 e 7 dias em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após os tempos selecionados, os compósitos foram fixados, desidratados, secos em aparelho de ponto crítico de CO₂, cobertos com uma camada de ouro e observados em MEV.

Resultados e Discussão

Os espectros de FTIR (Fig 1) das amostras de colágeno tipo I (Col I) extraído em solução de ácido acético 1M sem precipitação salina (SPS) e com precipitação salina (CPS) exibem bandas características da proteína. A presença das bandas 1658cm⁻¹ (amida I), 1540 cm⁻¹ (amida II; N-H) e 1450 cm⁻¹ (amida III; C-N) indicam que a composição das cadeias polipeptídicas presentes nas fibras de Col I foram mantidas. Também podemos notar a presença da banda 1450 cm⁻¹ dos anéis pirrolidínicos do aminoácido prolina (hidroxiprolina), muito abundante nas fibras colágenas [1, 6, 7]. O espectro da amostra CPS apresenta mudanças na intensidade das bandas possivelmente resultantes do tratamento salino. A partir das micrografias de MEV (Fig 2) podemos observar que as fibras SPS estão organizadas em feixes mais finos quando comparada aquelas que sofreram precipitação salina. Os íons Na⁺ e Cl⁻ neutralizam as cargas de superfície e favorecem a agregação das fibrilas de Col I [7].

Os espectros de FTIR dos compósitos apresentados na Figura 3 exibem semelhantes modos vibracionais da estrutura orgânica CPS e SPS aos já apresentados.

Adicionalmente, verificam-se bandas características de PO₄³⁻: 473cm⁻¹, 560cm⁻¹ e 604cm⁻¹ (PO₄³⁻, v4), 961cm⁻¹ (PO₄³⁻, v1) e 1030cm⁻¹ (PO₄³⁻, v3). Também são observadas as bandas: 1550cm⁻¹, 1420cm⁻¹ (CO₃²⁻, v3), características do carbonato em substituição aos grupamentos fosfato, indicando a formação de uma HA carbonatada do tipo B [1, 6].

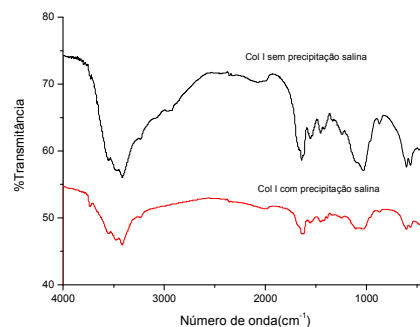


Figura 1: FTIR das amostras de colágeno tipo I sem precipitação salina (SPS) e com precipitação salina (CPS).

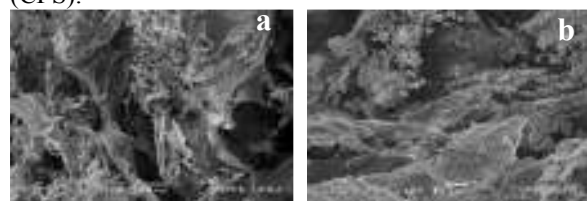


Figura 2: Micrografias (MEV) das amostras de colágeno tipo I sem precipitação salina (SPS) (a) e com precipitação salina (CPS) (b)

Todos os DRX apresentaram padrões semelhantes. Os perfis apresentaram picos largos, indicando baixa cristalinidade da fase mineral formada ou precipitação de fase nanométrica. Pela comparação com as fichas JCPDS foi possível identificar picos característicos de HA (em ambas as amostras) e de halita (cristais de NaCl) na amostra tratada com solução salina. Os picos da halita são observados em: 27.3°, 31.6°, 45.4° e 56.4° (ficha JCPDS número 05-0628). Os espectros do compósito sem tratamento salino apresentam picos melhor definidos, possivelmente por uma melhor organização da fase mineral devido à ausência dos cristais de Halita em contato com a estrutura orgânica.

Todos os compósitos apresentaram espaços e poros interconectados que, a princípio, poderão permitir a vascularização e migração de células para o interior dos materiais, quando implantados *in vivo*. Na superfície de grande parte das fibras foram observados depósitos minerais ricos em cálcio e fósforo (Fig 4). Essa deposição também foi observada nos compósitos HA-Col I produzidos por SENA [4].

Os compósitos constituídos por Col I CPS (Fig. 4b) apresentam fibras ricamente mineralizadas formando estruturas maiores que as observadas nas amostras de Col I SPS (Fig 4a). Essa estrutura tridimensional pode ser produzida pela interação das fibras não-mineralizadas de menor e maior diâmetros.

Provavelmente, essas superfícies apresentam resíduos dos aminoácidos que realizam interações intermoleculares mantendo a interconectividade do compósito da superfície em direção ao interior. Também foi possível notar que a deposição mineral sobre as fibras não possui uma orientação específica. Os depósitos minerais observados sobre as fibras que sofreram tratamento salino (Fig 4b), possuem uma morfologia em forma de rosetas similar a encontrada por LeGeros *et al.* [8]. Dados da literatura afirmam que formação de nanocristais de HA é estável em pH 8-9. Nestas condições é promovido o acúmulo de íons Ca^{2+} , primeira fase da nucleação de HA, nos grupos carboxila da superfície de Col I [7].

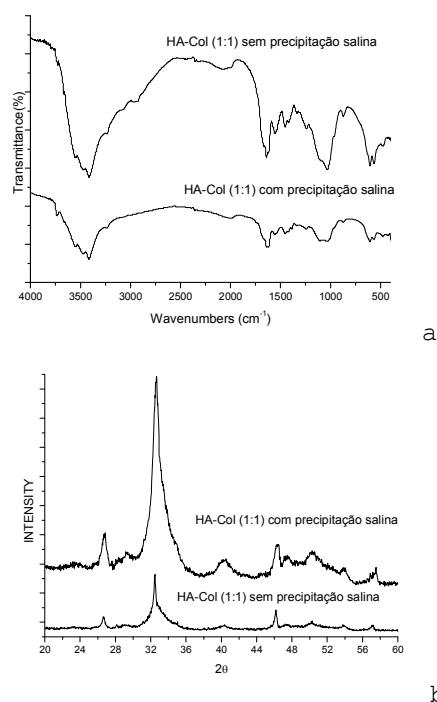


Figura 3: FTIR (a) e DRX (b) dos compósitos formados por HA e Col I sem precipitação salina (SPS) e com precipitação salina (CPS).

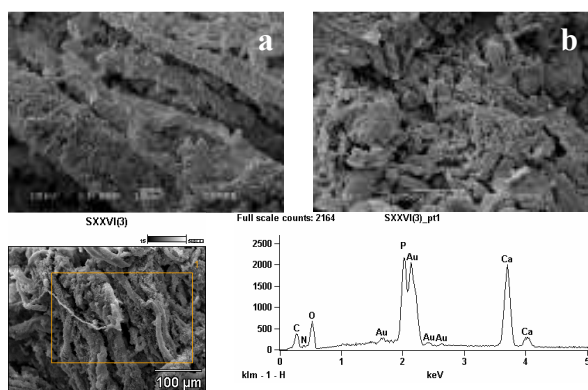


Figura 4: Micrografias de MEV dos compósitos formados por HA e Col I sem precipitação salina (SPS) (a) e com precipitação salina (CPS) (b). Espectro de EDS do compósito formado por HA e

Col I sem precipitação salina (SPS).

Quando mantidos em ambiente de cultivo celular, os compósitos tratados com glutaraldeído (GTA) permaneceram intactos após o período 7 dias. Aqueles que não tratados com GTA sofreram modificações em sua forma já com 3 dias. Nenhuma liberação da fase mineral foi verificada no período de até 7 dias de contato dos compósitos com o meio de cultivo celular. Os compósitos apresentaram uma morfologia adequada à adesão e migração celular, com poros e fibras conectadas. Além disso, são moldáveis, o que lhes permite grande variedade de aplicações em sítios de lesões ósseas.

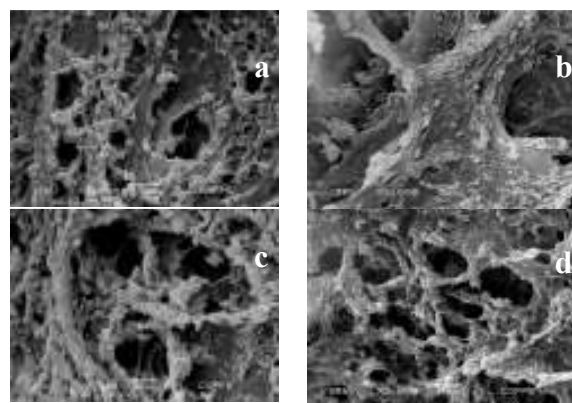


Figura 5: Micrografias de MEV dos compósitos mantidos por 7 dias em ambiente de cultura celular. a: SPSG; b: SPCG; c: CPSG; d: CPCG.

Os resultados do teste de citotoxicidade mostraram que nenhum dos compósitos apresentou resíduos tóxicos sendo, portanto, biocompatíveis *in vitro*. Durante o período de incubação, os compósitos mantiveram-se íntegros e não foi verificada acidificação do meio durante o experimento.

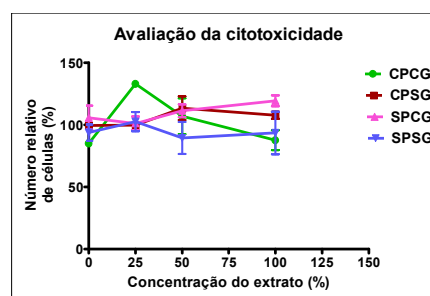


Figura 6 – Avaliação da citotoxicidade dos compósitos HA-Col I com e sem precipitação salina e tratados ou não com GTA.

Conclusão

Mudanças nos padrões de FT-IR foram observadas nas amostras de colágeno tratadas com precipitação salina. Entretanto, a presença dos grupamentos característicos da proteína Col I foram identificados em ambos os espectros. Nos espectros de FTIR dos compósitos, a preservação da proteína Col I e a

incorporação de íons fosfatos e carbonatos à fase mineral formada foram observados. Através dos difratogramas, foi possível identificar a fase mineral constituída por hidroxiapatita e, adicionalmente, nas amostras que tiveram suas fibras precipitadas com NaCl, a fase halita. Através das micrografias de MEV, os compósitos formados por colágeno sem precipitação salina apresentaram a deposição mineral de forma mais homogênea que as amostras com precipitação salina. Durante o ensaio em ambiente de cultivo celular, os compósitos não apresentaram liberação de sua fase mineral por tempos de até 7 dias. O tratamento com glutaraldeído (GTA) mostrou-se fundamental para a manutenção da estrutura do compósito em meio de cultivo celular pelo período de sete dias. Os compósitos que permaneceram em contato com GTA não apresentaram citotoxicidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem Laboratório de Bioengenharia, Biomateriais e Mineralização Biológica (Departamento de Biologia, Universidade Federal Fluminense, UFF) e o suporte financeiro para este trabalho ao CNPq, CAPES e FAPERJ (processos E-26/152.729/2006 e E-26/110.333/2007).

Referências

- [1] Kikuchi, M., Suetsugu, Y., Tanaka, J., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K.S., Hiraoka, Y., Mandai, Y., Nakatani, S. (1999) “The biomimetic synthesis and biocompatibility of self-organized hydroxyapatite/collagen composites”, *Bioceramics*, v.12, p. 393-396.
- [2] Yunoki, S., Ikoma, T., Monkawa, A., Olita, K., Kikuchi, M., Sotome, S., Shinomiya, K., Tanaka, J. (2005) “Control of Pore Structure and Mechanical Property in Hydroxyapatite/Collagen Composite Using Unidirectional Ice Growth”, *Materials Letters*, v.60, p. 999-1002.
- [3] Wahl, D.A., Czernuszka, J.T. (2006) “Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair”, *European Cells and Materials*, v. 11, p. 43-56.
- [4] Sena L.A., Serricella P., Borojevic R., Rossi A.M., Soares G.A. (2004) “Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite on Collagen Gel”, *Key Engineering Materials*, v.254, p. 493 – 496.
- [5] Takamori, E.R. (2004) “Estudo in vitro da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado”, M.Sc. Dissertação, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.
- [6] Zhai, Y., Cui, F.Z., Wang, Y. (2005) “Formation of Nano-Hydroxyapatite on Recombinant Human-Like Collagen Fibrils”, *Current Applied Physics*, v. 5, p.429-432.
- [7] Kikuchi, M., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K., Tanaka, J. (2001) “Self-Organization Mechanism in a Bone-Like Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Synthesizes in vitro and its Biological Reaction in vivo”, *Biomaterials*, v. 22, p. 1705-1711.
- [8] LeGeros, R.Z., Lin, S., Rohanizadeh R., Mijares, D., LeGeros, J.P. (2003) “Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics: Preparation, Properties and Applications”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.14, p. 201-209.