

Marcos Roberto Bet, Gilberto Goissis e Ana Maria de Guzzi Plepis
Instituto de Química de São Carlos - USP - CP 369 - 13560-970 - São Carlos - SP

Recebido em 23/8/96; aceito em 21/5/97

COLLAGEN:CALCIUM PHOSPHATE COMPOSITES. PREPARATION AND CHARACTERIZATION. Anionic collagen: calcium phosphate composite was obtained by controlled mixing of collagen and calcium phosphate until the consistence of a past. Material was characterized by a Ca/P ratio of 1.55, with a X-ray diffraction pattern similar to that for hydroxyapatite. Differential Scanning Calorimetry showed that the protein is not denatured under the processing conditions. Scanning Electronic Microscopy showed that the mineral phase are regularly covered with collagen fibers, indicating that anionic collagen is efficient in the preparation of stable form of calcium phosphate ceramic paste.

Keywords: composite; collagen; calcium phosphate.

INTRODUÇÃO

A maioria das biocerâmicas atualmente utilizadas serve apenas como suporte ou matriz para crescimento ósseo. Embora efetivo, esse crescimento é um processo muito lento, fazendo-se necessária a busca de materiais que tornem esse processo mais rápido. Os esforços para obtenção de novas biocerâmicas de fosfato de cálcio têm sido direcionados no sentido de melhorar suas propriedades tanto mecânicas como osteoindutoras, o que pode ser conseguido por meio da associação com polímeros sintéticos¹, biopolímeros², outras cerâmicas³ e fatores de indução⁴.

A grande aceitação das biocerâmicas à base de sais de fosfato de cálcio deve-se, principalmente, ao seu alto grau de biocompatibilidade, que provavelmente está associado à sua similaridade química com os materiais normalmente encontrados no tecido ósseo. Entre as cerâmicas com melhor desempenho estão os biovidros, alumina, β -tricalcônio fosfato e hidroxiapatita (HA)⁵. São utilizadas em ortopedia e traumatologia para correções buco-maxilo-faciais, tumores músculo-esqueléticos, traumatismos raquimedulares e coluna cervical e, em odontologia, nos casos de doenças periodontais, implantes dentários, preenchimento de cavidades císticas e aumentos do rebordo ósseo alveolar⁶. Um dos maiores problemas na utilização da hidroxiapatita na forma particulada é sua dispersão para zonas de tecidos moles, causando problemas como a perda de partículas, redução da zona de correção, desconforto para o paciente, podendo até levar a uma nova cirurgia. A utilização de cerâmicas de fosfato de cálcio na forma de pasta é uma boa alternativa para se evitar tais problemas. De modo particular, o que não ocorre com as biocerâmicas ou qualquer outro material rígido, tais implantes podem ajustar-se perfeitamente aos defeitos, sem haver necessidade de moldagem prévia, já que podem ser moldados e endurecidos *in situ*, assegurando um melhor ajuste aos tecidos circundantes. A combinação de hidroxiapatita com colágeno^{7,8} vem sendo sugerida pois o colágeno constitui-se em agente de união biocompatível e reabsorvível, responsável pela prevenção da migração das partículas cerâmicas até a incorporação pelos tecidos, além de ser um bom suporte para crescimento celular.

Este trabalho descreve a preparação e a caracterização de um novo tipo de biocerâmica do tipo fosfato de cálcio:colágeno, na forma de pasta, obtida por um processo de mineralização orientado pela estrutura macromolecular das fibrilas de colágeno. Foi utilizado fosfato de cálcio com razão Ca/P 1,55, que embora não seja uma biocerâmica comumente usada, foi

escolhida pois é o material precursor da HA *in vitro* e tem aproximadamente a mesma razão Ca/P encontrada em ossos em seu estágio inicial de desenvolvimento.

PARTE EXPERIMENTAL

Colágeno: utilizou-se colágeno aniônico obtido por tratamento de serosa bovina em meio alcalino contendo cloretos e sulfatos de sódio, potássio e cálcio⁹, seguido por solubilização em solução de ácido acético pH 3,5, de tal maneira que a concentração final foi próxima de 1% (m/m). Sua caracterização foi feita por espectroscopia de infravermelho (Nicolet 55XC-FTIR), estabilidade térmica (DSC 910 Du Pont), determinação de pesos moleculares e análise de aminoácidos.

Fosfato de cálcio : foi sintetizado a partir de solução 1,00 MolL⁻¹ de nitrato de cálcio tetrahidratado, Ca(NO₃)₂. 4H₂O, e solução 0,60 MolL⁻¹ de fosfato ácido de amônio, (NH₄)₂HPO₄, ajustando-se o pH das soluções entre 11,0 e 12,0 com hidróxido de amônio concentrado. A síntese foi feita em atmosfera de nitrogênio¹⁰. Sua caracterização foi feita por espectroscopia iv, estabilidade térmica, difração de raios-X (difratômetro automático (ânodo rotatório) Rigaku Rotaflex modelo RU-200B), microscopia eletrônica de varredura (Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss modelo DSM 960), microanálise por dispersão de energia de raios-X (EDX Link Analytical, modelo QX 2000, acoplado a um Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss, modelo DSM 960) e determinação da relação Ca/P por via úmida, pelo método do molibdato de amônio(P)¹¹ e EDTA(Ca).

Compósito - O compósito foi preparado pela mistura controlada de colágeno e o sal de fosfato de cálcio até a obtenção de um material que possuísse consistência similar a uma pasta. O sal de fosfato de cálcio foi adicionado lentamente sobre a solução de colágeno, de forma que este fosse precipitando e eliminando água. A mistura final, cujo aspecto e consistência eram parecidos com a de uma pasta, foi separada da água com o auxílio de papel de filtro. Foram preparados compósitos colágeno aniônico:fosfato de cálcio em várias proporções, observando-se que a composição de maior estabilidade foi a de 20:1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração da preparação de colágeno empregada neste trabalho foi calculada indiretamente pela determinação da hidroxiprolina¹². As análises de aminoácidos foram realizadas

em hidrolizados ácidos da proteína¹³ e os resultados expressos apenas em função dos aminoácidos Glicina (Gly), Prolina (Pro) e Hidroxiprolina (Hypro), por serem os mais representativos da estrutura primária do colágeno. As concentrações de Gly, Pro e Hypro (Tabela 1) mostraram, como esperado, que o colágeno obtido é do tipo I, caracterizado por concentrações médias de 25,6, 15,2 e 13,3 g/100g de proteína respectivamente¹⁴.

Os pesos moleculares dos componentes proteicos presentes nos materiais preparados foram determinados por eletroforese em géis de poliacrilamida/ SDS a 10%¹⁵, por comparação com padrões de pesos moleculares variáveis entre 200.000 e 14.000 Da e em comparação com colágeno comercial. Os resultados obtidos mostraram que o material preparado é caracterizado pela presença de bandas correspondentes a proteínas com pesos moleculares de 98.000 e 95.500 Da, valores similares àqueles descritos para as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, típicas do colágeno do tipo I¹⁶, material predominante na matéria prima empregada.

O espectro vibracional FTIR mostrou a integridade da tripla hélice da estrutura colagênica através da relação das absorvâncias medidas em 1235 e 1450 cm^{-1} , devidas à amida III e a ligação C-H do anel pirrolidínico¹⁷. Para materiais formatados em solução ácida pH 3,5, a integridade da estrutura secundária do tropocolágeno pode ser verificada quando o valor da relação 1235/1450 cm^{-1} for maior ou igual a unidade. Para o material preparado e utilizado neste trabalho, o valor encontrado para esta relação foi de 1,01, portanto, significativamente maior do que aquele que seria observado para estruturas desnaturadas, cujos valores estão por volta de 0,5¹⁸.

A microanálise por raios-X (EDX) da amostra de fosfato de cálcio sintetizado mostrou a presença de apenas três picos (Figura 1), dois deles referentes ao elemento cálcio, em 3,69 (K_{α}) e 4,01 KeV (K_{β}) e um referente ao elemento fósforo, em 2,01keV (K_{α}), sugerindo que não há contaminação por outros elementos químicos.

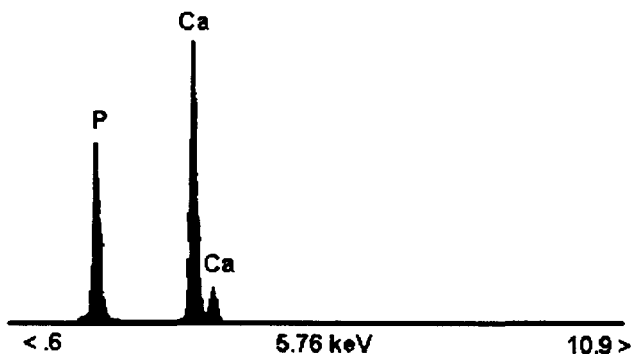


Figura 1. Espectro de EDX para o fosfato de cálcio sintetizado, utilizando-se um feixe de elétrons de 20keV

A relação cálcio/fósforo (Ca/P) determinada por via úmida foi de 1,55, valor próximo ao do osso em seu estágio inicial de mineralização, entretanto menor que o da hidroxiapatita que é de 1,67. Esta diferença poderia, provavelmente, estar relacionada com fato do fosfato de cálcio sintetizado ser uma mistura de HA + β -fosfato tricálcio, como mostrado pelo difratograma

de Raios-X (Figura 2a) com picos característicos de hidroxiapatita em 2,82; 2,79; 2,73 e 3,45 e outros picos de menor intensidade em 2,88, 5,20 e 3,23, característicos do β -fosfato tricálcio (β -TCP), de acordo com difratogramas padrões do JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards). Entretanto, os resultados de difração de raios-X mostram que a fase predominante constituiu-se de HA, e portanto o valor da relação de Ca/P deveria ser próximo de 1,67. Essa diferença tem como possível explicação a presença de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio, cujo padrão de difração é similar ao da HA estequiométrica^{19,20}.

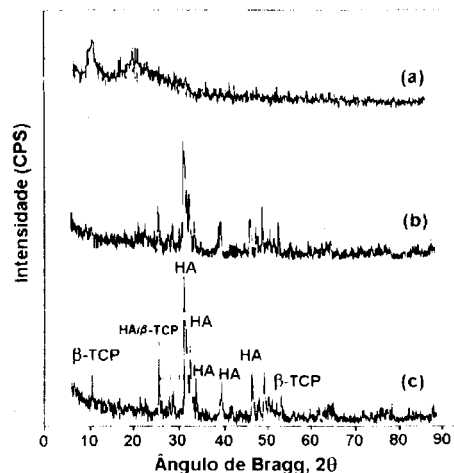


Figura 2. Comparação entre os difratogramas: (a) membrana de colágeno manufacturada a pH 3,5; (b) compósito fosfato de cálcio/colágeno; (c) fosfato de cálcio

O compósito foi preparado pela mistura de fosfato de cálcio e colágeno em várias proporções, observando-se que a melhor relação (m/m) encontrada foi de 20:1, respectivamente. Para relações fosfato de cálcio:colágeno menores do que a mencionada, verificou-se que o compósito não apresentava a consistência de uma pasta e sim de uma solução viscosa de difícil manipulação, devido a grande quantidade de colágeno solúvel ainda presente. Para relações maiores observou-se o processo inverso, ou seja, a quantidade de colágeno era insuficiente para fazer com que todas as partículas de fosfato de cálcio ficassem agregadas para formar um compósito estável, devido a intensa separação da água do material.

Os resultados obtidos nas análises dos espectros iv e difração de raios-X para o compósito 20:1 foram similares aos obtidos para o fosfato de cálcio (Figura 3). A característica principal observada na micrografia de MEV (Figura 4) foi a presença de partículas de fosfato de cálcio recobertas com estruturas filamentosas que também são vistas interligando uma partícula a outra. Outra característica é que aparentemente o colágeno apresenta-se sob a forma fibrilar (Figura 4).

O processamento não induz à desnaturação do colágeno, como mostrado pela estabilidade térmica (Tabela 1) e MEV (Figura 4), preservando portanto sua estrutura para que possa exercer sua função de estímulo de crescimento celular. Conclui-se portanto que

Tabela 1. Características da solução do colágeno solubilizado.

aminoácidos			PM (Da) ^(a)		Est. Term(^o C)	relação
Gly	Pro	Hypro	$\alpha 1$	$\alpha 2$	T _d	1235/1450 cm^{-1} ^(b)
25,6	15,5	13,3	98.000	95500	48,6	1,01

a - relação de áreas determinadas por densitometria dos géis de poliacrilamida após coloração do colágeno com Comassie Blue R.
b - obtida a partir das absorvâncias no infravermelho

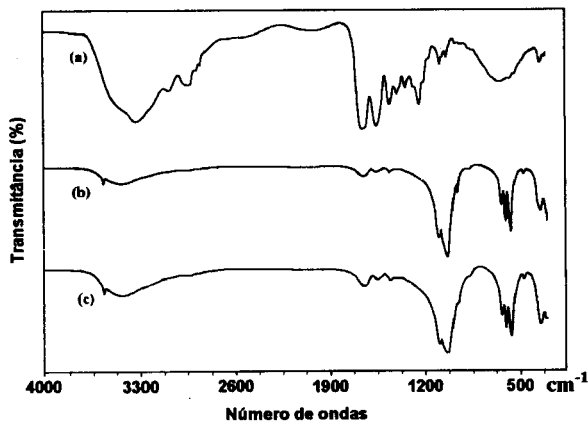


Figura 3. Comparação entre os espectros de iv obtidos para: (a) membrana de colágeno pH 3,5; (b) compósito fosfato de cálcio/colágeno (relação 20:1); (c) fosfato de cálcio



Figura 4. Micrografia de MEV do compósito fosfato de cálcio/colágeno, numa proporção 20:1 (m/m), aumento de 10.000x.

colágeno aniônico é um suporte adequado para a estabilização de hidroxiapatita particulada em compósitos na forma de pasta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ezer Biazin e Glauco D. Broch pela assistência técnica prestada. Este trabalho foi financiado

pela PADCT/CNPq (620.228/91-1). Trabalho realizado em colaboração com o Instituto de Ciência de Materiales de Barcelona (Progr. Iberoamer. Ciên. Tecn. para el Desar. CYTED) dentro do projeto "Obtencion y caracterizacion de biomateriales de compuestos com carga de hidroxiapatito".

REFERÊNCIAS

1. Verheyen, C. C.; de Wijn, J. R.; van Blitterswijk, C. A.; de Groot, K.; *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 1277.
2. Kawakami, T.; Antoh, M.; Hasegawa, H.; Yamagishi, T.; Ito, M.; Eda, S.; *Biomaterials* **1992**, *13*, 759.
3. Ishikawa, K.; Eanes, E. D.; *J. Dent. Res.* **1993**, *72*, 474.
4. Fujita, Y.; Yamamuro, T.; Nakamura, T.; Kitsugi, T.; Kotani, S.; Ohtsuki, C.; Kokubo T.; *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 1311.
5. Hench, L. L.; *J. Am. Ceram. Soc.* **1991**, *74*, 1487.
6. Aoki, H.; *Science and medical applications of hydroxyapatite*, Takayama Press System Center Co., Inc., Tokyo, 1991.
7. Rovira, A.; Bareille, R.; Lopez, I.; Rouais, F.; Bordenave, L.; Rey, C.; Rabaud, M.; *J. Mater. Sci.* **1993**, *4*, 372.
8. Hemmerle, J.; Leize, M.; Voegel J. C.; *J. Mat. Sci.- Mat. in Medic.* **1995**, *6*, 360.
9. Goissis, G.; Plepis, A. M. G.; Rocha, J. L.; *Processo de extração de colágeno de tecidos animais com auxílio de solventes orgânicos e meio alcalino*. Patente BR PI 9.405.043-0, 1994.
10. Jarcho, M.; Bolen, C. H.; Thomas, M. B.; Bobick, J.; Kay, J. F.; Doremus, R. H.; *J. Mat. Sci.* **1976**, *11*, 2027.
11. Murphy, J.; Riley, J. P.; *Anal. Chim. Acta* **1962**, *27*, 31.
12. Jamali, I. S.; Finelli, V. N.; Que Hee, S. S.; *Analytical Biochemistry* **1981**, *112*, 70
13. Spackman, D. H.; Stein, W. H.; Moore, S.; *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1185.
14. Ramachandran, G. N.; *Tratise on collagen - Chemistry of collagen*, London, Academic Press, v. I., 163, 1967.
15. Laemmli, U. K.; *Nature* **1970**, *227*, 680.
16. Huc, A.; *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **1985**, *80*, 195.
17. Silvester, M. F.; Yannas, I. V.; Forbes, M. J.; *Thromb. Res* **1989**, *55*, 135.
18. Gordon, P. L.; Huang, C.; Lord, R. C.; Yannas, I. V.; *Macromol.* **1974**, *7*, 954.
19. Osaka, A.; Miura Y.; Takeuchi, K.; Asada, M.; Takahashi, K.; *J. Mater. Sci. Mater. in Medic.* **1991**, *2*, 51.
20. Ishikawa, K.; Ducheyne, P.; Radin, S.; *J. Mater. Sci. Mater. in Medic.* **1993**, *4*, 165