

11º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS

16 a 20 de Outubro de 2011
Campos do Jordão - SP



MINERALIZAÇÃO *IN VITRO* DE ESPONJAS DE QUITOSANA:COLÁGENO

Virginia da C. A. Martins, Gustavo M. Silva, Ana Maria G. Plepis

Instituto de Química de São Carlos- IQSC, Universidade de São Paulo – São Carlos – SP

virginia@iqsc.usp.br

Resumo: A regeneração de tecido ósseo é um problema que afeta muitas pessoas e a utilização de matrizes que possam auxiliar no crescimento tecidual ósseo tem sido amplamente estudada. O objetivo deste trabalho foi realizar a mineralização *in vitro* de esponjas de quitosana, de quitosana:colágeno nativo e quitosana:colágeno aniônico. As esponjas foram obtidas da liofilização das respectivas soluções e mineralização foi feita através da imersão alternada das esponjas em soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . A mineralização foi confirmada por espectroscopia no infravermelho, energia dispersiva de raio-X e difração de raio-X observando-se a formação de hidroxiapatita possivelmente carbonatada, devido à $\text{Ca/P}=1,80$. O grau de mineralização foi determinado por termogravimetria pela quantidade de resíduo a 750°C . A esponja de quitosana:colágeno aniônico foi a que apresentou maior grau de mineralização devido ao fato de o colágeno aniônico proporcionar sítios adicionais para interação com a fase inorgânica.

Palavras-chave: mineralização, quitosana, colágeno, hidroxiapatita.

Chitosan:Collagen Sponges. In Vitro Mineralization.

Abstract: The regeneration of bone tissue is a problem that affects many people and scaffolds for bone tissue growth has been widely studied. The aim of this study was the *in vitro* mineralization of chitosan, chitosan:native collagen and chitosan:anionic collagen sponges. The sponges were obtained by lyophilization and mineralization was made by soaking the sponges in alternating solutions containing Ca^{2+} and PO_4^{3-} . The mineralization was confirmed by infrared spectroscopy, energy dispersive X-ray and X-ray diffraction observing the formation of phosphate salts, possibly a carbonated hydroxyapatite since $\text{Ca/P}=1.80$. The degree of mineralization was obtained by thermogravimetry calculating the amount of residue at 750°C . The chitosan:anionic collagen sponge showed the highest degree of mineralization probably due to the fact that anionic collagen provides additional sites for interaction with the inorganic phase.

Keywords: mineralization, chitosan, collagen, hydroxyapatite.

Introdução

Matrizes derivadas de polímeros naturais, ou seja, biomatrizes têm sido amplamente estudadas para regeneração tecidual. Elas podem fornecer estabilidade estrutural e proporcionar um sistema que favoreça o crescimento celular para a formação do novo tecido [1]. A regeneração de tecidos ósseos é um dos problemas que afeta milhões de pessoas e os métodos tradicionais de enxertia empregam osso autólogo que contém na sua estrutura células osteogênicas viáveis e fatores de crescimento adequados à osteogênese [2]. No entanto, esses enxertos devem ocorrer a partir de um local doador separado no corpo do paciente e, portanto, requerendo dois procedimentos cirúrgicos, havendo uma oferta limitada de osso disponível, bem como o desconforto e ainda o risco sério de infecção. Assim, na tentativa de superar esses problemas substitutos ósseos têm sido investigados como por exemplo, matrizes obtidas de polímeros naturais como quitosana, colágeno que podem fornecer

matrizes porosas, biodegradáveis e biocompatíveis. O tecido ósseo é constituído de hidroxiapatita (HA - fase mineral) e colágeno (cerca de 95% da fase orgânica) sendo a proteína mais abundante do corpo humano, indicando que matrizes contendo colágeno são de grande interesse para regeneração de tecidos ósseos [3]. A quitosana é um polissacarídeo encontrado em crustáceos, moluscos e fungos e oferece um conjunto único de características, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, bem como a bioatividade que compreende propriedades antibacteriana, hemostática, fungistática, antitumoral [4,5], e tem sido demonstrado que, preferencialmente, apoia à fixação e crescimento de osteoblastos, em comparação com os fibroblastos *in vitro* e facilita a formação de tecido ósseo *in vivo* [6]. Um substituto ósseo ideal seria uma matriz biocompatível, bioreabsorvível que pudesse ser completamente substituída por osso neoformado. A formação do osso ocorre com fosfato de cálcio na forma de HA depositado sobre longos feixes ou fibras de colágeno. Assim, para a compreensão da mineralização *in vivo*, a mineralização *in vitro* de matrizes poliméricas com fosfatos de cálcio sendo diretamente nucleados na matriz polimérica têm sido vastamente estudada [3,7]. Neste trabalho, a precipitação de fosfato de cálcio em esponjas compostas de quitosana e suas blends com colágeno foi realizado através do método de imersão alternada em soluções de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , para se obter uma razão de $\text{Ca/P}=1,67$.

Experimental

Preparação da quitosana

A quitosana foi obtida a partir de gládio de lula (*Loligo sp*) e preparada em três etapas: desmineralização, desproteinização e desacetilação [8]. O grau de acetilação obtido para a quitosana foi de 14,2%. Uma solução de quitosana foi preparada na concentração de 0,5% (massa/massa) em ácido acético 1%.

Preparação de colágeno nativo [9]

Foi obtido por tratamento de tendão bovino com solução de ácido acético pH 2,5 contendo 6% de DMSO sob agitação ocasional por 7 dias. A suspensão foi homogeneizada e dialisada contra solução de ácido acético pH 3,5, até completa remoção do DMSO. A concentração final do gel foi ajustada para 0,5%, determinada por liofilização.

Preparação de colágeno aniônico [9]

Foi obtido por hidrólise alcalina de tendão bovino com solução alcalina contendo sulfatos e cloretos de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} por 120 h a 25°C, seguido da estabilização com uma solução aquosa de cloretos e sulfatos dos mesmos cátions. Após isso, os sais foram removidos por lavagens com ácido bórico,

EDTA e água deionizada. O gel foi extraído e homogeneizado em solução de ácido acético pH 3,5 com concentração final ajustada para 0,5%, determinada por liofilização.

Preparação das esponjas

As esponjas foram obtidas por liofilização, em formas de Teflon®, dos géis de quitosana ou das blends de quitosana:colágeno nativo e quitosana:colágeno aniônico, ambos na proporção 1:1 (massa/massa).

Mineralização

A mineralização foi realizada a 37°C, por de imersão alternada, em soluções de CaCl_2 0,2 mol L^{-1} (pH 7,4) por 9 h e Na_2HPO_4 0,12 mol L^{-1} (pH 9,0), por 15 h, repetindo-se por 4x. Após a mineralização as esponjas foram lavadas com água desionizada, liofilizadas e caracterizadas por: espectroscopia de FTIR, termogravimetria (TG), difração de raios-X, energia dispersiva de raios-X (EDX).

Resultados e Discussão

Os espectros FTIR obtidos para as esponjas mineralizadas, em todos os casos, mostram o aparecimento das bandas oriundas de absorções referentes a grupos fosfato, com uma banda larga e intensa centrada em 1070 cm^{-1} e picos em 604 e 564 cm^{-1} ; e referente ao grupo carbonato em 1380 e 890 cm^{-1} [10] confirmando a incorporação de material inorgânico.

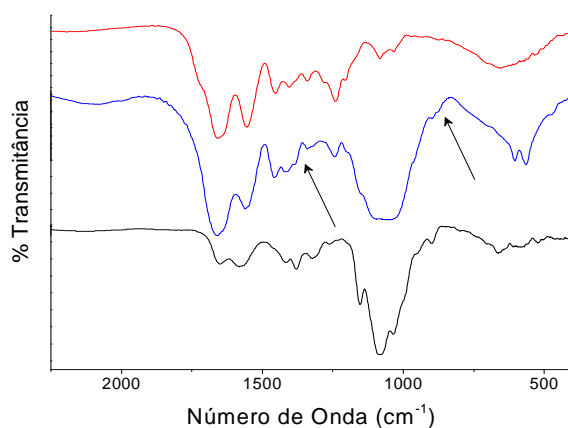


Figura 1. Espectros FTIR para (—) quitosana, (—) quitosana:colágeno aniônico mineralizado; (—) colágeno aniônico.

Não ocorreu o surgimento de bandas em número de ondas diferentes das bandas observadas nos materiais analisados individualmente, sendo observado somente o deslocamento de bandas já existentes nos espectros da quitosana e colágeno e aqueles comuns para fosfatos de cálcio. Tal comportamento ocorre devido a interações de natureza eletrostática entre os íons Ca^{2+} do fosfato de cálcio com os pares de elétrons não ligantes dos grupos N–H e C=O presentes na quitosana e no

colágeno. Há também a possibilidade de interações entre os grupos protonados (NH_3^+) presentes na quitosana e na estrutura do colágeno com os ânions fosfatos (PO_4^{3-}) e carbonatos (CO_3^{2-}). A Fig. 1 mostra como exemplo o espectro comparativo para a mineralização da esponja de quitosana:colágeno aniônico.

A análise termogravimétrica foi feita no intervalo de 25 à 800°C, podendo-se observar a decomposição e carbonização dos biopolímeros que ocorre até 600°C. Acima desta temperatura uma massa residual foi observada para as esponjas mineralizadas. Esse resíduo corresponde aos materiais inorgânicos presentes, tais como as apatitas que são estáveis nesse intervalo de temperatura. Assim, valores de % de massa obtidos à 750°C correspondem aos sais formados pela mineralização e foram de $23,9 \pm 1,8$; $33,0 \pm 1,2$ e $37,0 \pm 0,1\%$ para esponjas de quitosana, quitosana:colágeno nativo e quitosana:colágeno aniônico, respectivamente. As curvas termogravimétricas obtidas para cada esponja após o processo de mineralização são mostradas na Fig. 2.

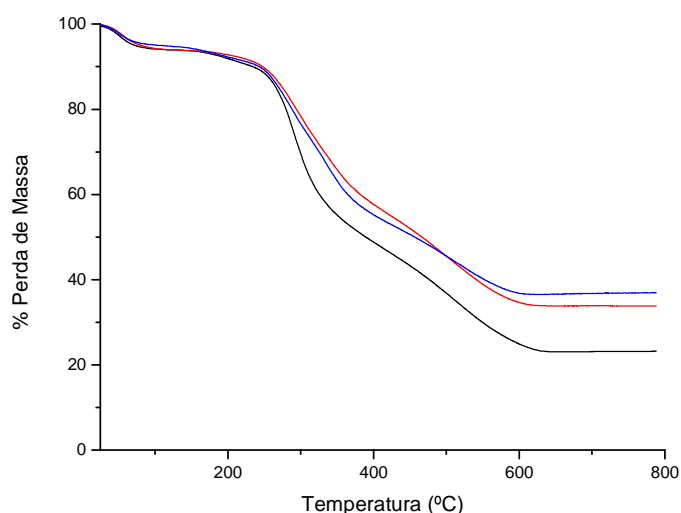


Figura 2. Curvas termogravimétricas para esponjas mineralizadas de: (—) quitosana, (—) quitosana:colágeno nativo e (—) quitosana:colágeno aniônico.

As esponjas de quitosana:colágeno aniônico apresentaram o maior grau de mineralização (37%). A presença de grupos carboxílicos é importante no processo de mineralização óssea como mostrado por Sato [11]. A molécula de tropocolágeno contém em sua estrutura 221 grupos carboxílicos [12] e, portanto, favorecendo o processo de mineralização quando comparado somente com a quitosana. A diferença existente entre os dois colágenos empregados neste trabalho é justamente esse número de grupos carboxílicos presentes na estrutura do colágeno. A hidrólise alcalina (120 h) utilizada para obtenção do colágeno aniônico confere a molécula de tropocolágeno um incremento de 131

grupos carboxílicos em relação ao nativo [12]. O maior número de grupos carregados negativamente na molécula de tropocolágeno, indica uma função importante em regular a distribuição de fosfato de cálcio, devido à boa afinidade destes por íons cálcio produzindo assim uma distribuição da mineralização na superfície do colágeno [13,14], como já observado em trabalhos anteriores do grupo [15].

A análise por dispersão de raios-X foi feita para se verificar a relação cálcio e fósforo (Ca/P) nas esponjas mineralizadas. Os principais elementos encontrados foram: o carbono (0,2keV), o oxigênio (0,5keV), o cálcio (3,7keV e 4,0keV) e o fósforo (2,0keV). A razão Ca/P obtida em todos os casos foi próximo a 1,80 indicando uma possível formação de carbonato apatita [16], como já sugerido por FTIR.

Os difratogramas das esponjas mineralizadas são mostradas na Fig. 3 e foram comparáveis àqueles da HA não cristalina (Fig. 3), nenhuma outra fase de fosfato de cálcio foi detectada. As curvas mostram um pico intenso em torno de 32° (2 θ) e picos menos intensos em 26, 40, 47 e 49° (2 θ), todos largos. Esse alargamento dos picos resulta do pequeno tamanho e baixa cristalinidade da HA formada pela mineralização, que é semelhante a HA presente na fase mineral do osso natural [17]. Essa baixa cristalinidade da HA pode possivelmente, ser atribuída ao processo de mineralização ocorrer a baixa temperatura, ou seja, não sinterizada.

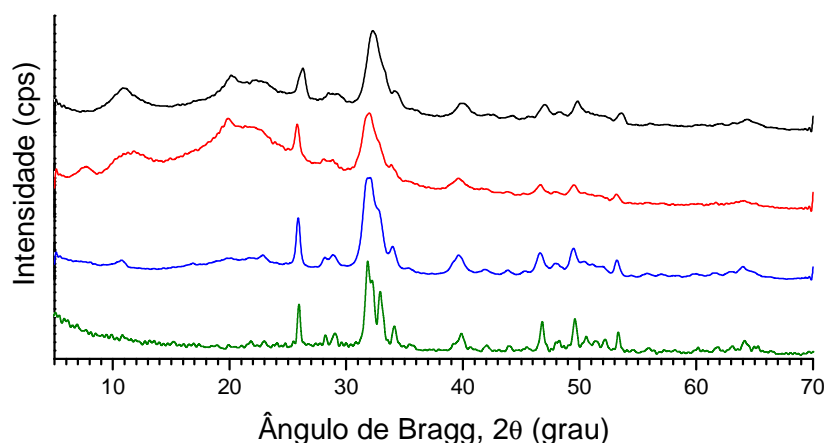


Figura 3: Difratograma de raios-X das esponjas mineralizadas: (—) Quitossana; (—) Quitossana:Colágeno Nativo; (—) Quitossana Colágeno Aniônico e (—) Hidroxiapatita sintética não cristalina.

Conclusão

A mineralização das esponjas é evidenciada pelo aparecimento de picos no infravermelho característicos de grupos fosfatos e carbonatos. O fosfato de cálcio obtido é hidroxiapatita de acordo

com a difração de raio-X, e possivelmente carbonatada como mostrado pela presença de picos no infravermelho e pelo alto valor da relação Ca/P.

A termogravimetria confirma diferentes conteúdos de mineralização para as esponjas através do resíduo a 750°C. A esponja de quitosana:colágeno aniônico apresentou maior grau de mineralização em relação às demais devido ao colágeno aniônico proporcionar sítios adicionais para interação com a fase inorgânica.

Agradecimentos

À Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda (Cananéia – SP) pelo fornecimento dos gládios.

Referências Bibliográficas:

1. D. Logeart-Avramoglou; F. Anagnostou; R. Bizios; H. Petite *J Cell. Mol. Méd.* 2005, 9, 72.
2. A J. Salgado; O. P. Coutinho; L. R. Rui *Macromol. Biosci.*, 2004, 4, 743.
3. L. J. M. Allegretti; C. A. Bertran *Key Eng. Mater.* 2009, 396-398, 195.
4. M. N. V. R. Kumar; R. A. A. Muzzarelli; C. Muzzarelli; H. Sashiwa; A. J. Domb *Chem. Rev.* 2004, 104, 6017.
5. H. Ehrlich; B. Krajewskab; T. Hanke; R. Born; S. Heinemann; C. Knieb; H. Worch *J. Membr. Sci.* 2006, 273, 124.
6. B. M. Chesnutt; Y. Yuan; K. Buddington; D.V.M., W. O. Haggard; J. D. Bumgardner *Tissue Eng. Part A*, 2009, 15, 2571.
7. M. Sandri; A. Tampieri; L. Bertinetti; A. Boskey *Key Eng. Mater.* 2008, 361-363, 543.
8. M. M. Horn, V. C. A. Martins, A. M. G. Plepis *Carbohydr. Polym.*, 2009, 77, 239.
9. C. Lacerda; A. M. G. Plepis; G. Goissis *Quím. Nova*, 1998, 21, 267.
10. Ślósarczyk; Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiewicz *J. Mol. Struct.* 2005, 744–747, 657.
11. K. Sato *J. Ceram. Soc. Japan*, 2007, 115, 124.
12. M. R. BET, Tese de Doutorado, IQSC - Universidade de São Paulo, 2000.
13. L. J. Zhang; X. S. Feng; H. G. Liu; D. J. Qian; L. Zhang; X. L. Yu; F. Z. Cui *Mater. Lett.*, 2004, 58, 719.
14. J. C. Góes; S. D. Figueiró; A. M. Oliveira; A. A. M. Macedo; C. C. Silva; N. M. P. S. Ricardo; A. S. B. Sombra *Acta Biomaterialia*, 2007, 3, 773.
15. T. M. Batista, Tese de Doutorado, IQSC – Universidade de São Paulo, 2008.
16. M. C. Siebers; K. Matsuzaka; X. F. Walboomers; S. C. G. Leeuwenburgh; J. G. C. Wolke; J. A. Jansen *J. Biomed. Mater. Res.*, 2005, 74A, 570.
17. L. Wang; C. Li; *Carbohydr. Polym.*, 2007, 68, 740.