

# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ENXERTO DE OSSO BOVINO LIOFILIZADO

## PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF LYOPHILIZED BOVINE BONE GRAFTS

Carlos Roberto Galia<sup>1</sup>, André Luis Lourenço<sup>2</sup>, Ricardo Rosito<sup>3</sup>, Carlos Alberto Souza Macedo<sup>4</sup>, Lourdes Maria Araujo Quaresma Camargo<sup>5</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar as características físico-químicas do enxerto bovino liofilizado manufaturado em escala semi-industrial (OrthoGen, Baumer S/A\*) de acordo com protocolo previamente desenvolvido pelos autores. **Métodos:** A caracterização do enxerto de osso bovino liofilizado foi feita por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), *energy dispersive spectroscopy* (EDS), difratometria de raios-X, análise por termogravimetria, análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia por infravermelho *Fourier-transform* (FT-IR). **Resultados:** Ca foi o principal componente (60%) encontrado nas amostras, seguido por P (28%) e O (5%). O tamanho médio (dp) dos poros foi 316µm (146,7), variando de 91,2 a 497,8µm, e 333,5µm (304,8), variando de 87,2 a 963,9µm com 50x e 150x magnificação, respectivamente. Picos de hidroxiapatita foram a 26°C e 32°C, e perda de massa foi observada entre 250°C e 640°C, correspondendo material orgânico e água. Duas transições de temperatura (45,67°C e 91,89°C) mostraram desnaturação de colágeno tipo I e desidratação da hidroxiapatita. **Conclusão:** A avaliação físico-química do enxerto de osso bovino liofilizado, de acordo com o protocolo desenvolvido em escala semi-industrial, confirma que este produto apresenta excelente biocompatibilidade, com características semelhantes ao osso *in natura*.

**Descritores** – Materiais Biocompatíveis; Transplante Ósseo; Cirurgia Geral

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the physicochemical characteristics of lyophilized bovine grafts manufactured on a semi-industrial scale (Orthogen; Baumer S/A\*) in accordance with a protocol previously developed by the authors. **Methods:** The lyophilized bovine bone grafts were characterized by means of scanning electron microscopy (SEM), *energy dispersive spectroscopy* (EDS), *X-ray diffractometry* (XRD), *thermogravimetric* (TG) analysis, *differential exploratory scanning calorimetry* (DSC) and *Fourier-transform infrared* (FT-IR) spectroscopy. **Results:** Ca was the main component (60%) found in the samples, followed by P (28%) and O (5%). The mean (sd) pore size was 316 µm (146.7), ranging from 91.2 to 497.8 µm, and 333.5 µm (304.8), ranging from 87.2 to 963.9 µm, at 50x and 150x magnification, respectively. The hydroxyapatite peaks were at 26°C and 32°C, and mass losses were observed between 250°C and 640°C, corresponding to organic material and water. Two temperature transitions (45.67°C and 91.89°C) showed denaturation of type I collagen and dehydration of hydroxyapatite. **Conclusion:** The physicochemical assessment of lyophilized bovine bone grafts in accordance with the protocol developed at semi-industrial scale confirmed that this product presents excellent biocompatibility, with characteristics similar to natural bone.

**Keywords** – Biocompatible Materials; Bone Transplantation; General Surgery

1 – Médico do Grupo do Quadril; Coordenador Técnico do Banco de Tecidos do HCPA; Mestre em Cirurgia pela UFRGS – Porto Alegre, RS, Brasil.

2 – Médico Ortopedista e Traumatologista; Residente de Cirurgia da Mão do Hospital das Clínicas de Curitiba-UFPR – Curitiba, PR, Brasil.

3 – Médico do Grupo do Quadril e Banco de Tecidos do HCPA – Porto Alegre, RS, Brasil.

4 – Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRGS e Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA; Chefe do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HCPA; Chefe do Grupo do Quadril – Porto Alegre, RS, Brasil.

5 – Pesquisadora Convidada, Banco Tecidos HCPA – Porto Alegre, RS, Brasil.

Trabalho realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS, Brasil

Correspondência: André Luis Lourenço - Rua Ramiro Barcelos, 2.350, Bairro Rio Branco – 90035-903 – Porto Alegre, RS - E-mail: alalourenco@ig.com.br

Trabalho recebido para publicação: 27/07/2010, aceito para publicação: 23/12/2010.

Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho / *The authors declare that there was no conflict of interest in conducting this work*

## INTRODUÇÃO

A utilização de enxertos ósseos em cirurgias ortopédicas, crânio-maxilo-faciais e odontológicas está cada vez mais difundida<sup>(1)</sup>. O enxerto autólogo fresco permanece como padrão ouro devido a suas propriedades, como resposta imune e capacidades osteoindutora, osteocondutora e osteogênica. Porém, suas desvantagens, como o aumento do tempo cirúrgico, a pequena quantidade obtida e a morbidade associada a esse procedimento, têm limitado sua utilização<sup>(2,3)</sup>.

O enxerto homólogo congelado também é muito utilizado e considerado excelente alternativa, uma vez que evita a morbidade relacionada ao sítio doador. Sua disponibilidade, entretanto, ainda é muito limitada em nosso meio e, embora raras, existem possibilidades de transmissão de doenças infectocontagiosas e tumorais relacionadas ao seu uso<sup>(4-6)</sup>.

Dessa forma, biomateriais alternativos de natureza sintética ou natural e diferentes métodos de processamento e armazenamento de tecido ósseo têm sido propostos e exaustivamente estudados. Entre eles está o enxerto ósseo, de origem bovina, processado e liofilizado<sup>(7)</sup>. O osso bovino possui disponibilidade praticamente ilimitada além de grande similaridade físico-química e estrutural com o humano<sup>(8)</sup>.

Baseados nesses dados, os autores desenvolveram um protocolo de processamento de enxerto ósseo bovino integral medular liofilizado visando diminuir significativamente sua antigenicidade, além de alterar minimamente a sua composição em relação aos enxertos ósseos não processados<sup>(9)</sup>. Os ossos *in natura* são constituídos, basicamente, de: uma matriz orgânica de colágeno tipo I contendo proteoglicanas de baixa massa molecular e proteínas não colágenas que correspondem a 25% do seu peso; uma parte mineral que corresponde a 65% e 10% de água<sup>(10,11)</sup>. Para tanto, é fundamental a determinação das características físico-químicas do produto final processado para validação do protocolo desenvolvido.

O objetivo deste estudo é caracterizar as propriedades físico-químicas do osso bovino integral medular liofilizado, OrthoGen, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) *energy dispersive spectroscopy* (EDS), difratometria de raios-X, análise por termogravimetria, análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise por infravermelho (FT-IR).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

São amostras de OrthoGen, e que seguem basicamente as seguintes etapas: a matéria prima é submetida a processos físicos e químicos para remoção de agentes antigênicos, bacterianos, virais ou proteínas infecciosas. Os ossos são expostos a banhos sucessivos de agentes oxidantes, solventes orgânicos e soluções alcalinas. Após, são cortados em diversos formatos, liofilizados, embalados e esterilizados com irradiação gama.

Os ensaios relatados foram realizados no Centro de Qualidade Analítica (CQA) e Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM-UFSCar/UNESP) e no Centro Tecnológico Tecno PUC/RS, em Porto Alegre.

Foram utilizadas as seguintes técnicas para caracterização da amostra de enxerto ósseo medular liofilizado em estudo: MEV/EDS, difração de Raios-x (DRX), análise termogravimétrica (TG), calorimetria exploratória diferencial (DCS) e análise por infravermelho (FT-IR).

### Análise MEV/EDS

A análise via MEV/EDS permite a determinação da composição química (qualitativa e semiquantitativa) na superfície da amostra. As quantidades indicadas nas tabelas de microanálise por EDS são apenas semiquantitativas, servindo como um indicador das quantidades de cada elemento presente e não podem ser tomadas como análises quantitativas. Foram, ainda, medidos por essa técnica, os tamanhos dos poros da amostra e calculado seu tamanho médio.

### Difratometria de Raios-X (DRX)

Esta técnica consiste em incidir um feixe de raios-X de comprimento de onda igual a 1,5418 Angstroms na amostra para o registro das fases cristalinas presentes. Através desse registro, pela determinação das intensidades das linhas de difração correspondentes às fases, é possível a determinação qualitativa das fases presentes. O equipamento utilizado para a caracterização foi o difratômetro de raios-X Siemens modelo Kristaloflex D500 operando com tubo de alvo de Cobalto seguindo a geometria de focalização de Bragg-Brentano. A base de procedimentos foi a IT-DRX-220 calibração do equipamento, IT-DRX-108 obtenção de figuras de pólo e/ou difratogramas<sup>(11,12)</sup>.

### Termogravimetria (TG)

Uma pequena quantidade de OrthoGen foi colocada em um suporte de amostra de alumina, onde sua massa

é constantemente monitorada por uma termobalança. O resultado da análise é mostrado sob a forma de um gráfico cuja abscissa contém os registros de temperatura (ou tempo) e a ordenada, a massa residual.

A curva termogravimétrica (TG) e sua derivada em relação à temperatura (DTG) foram obtidas em um analisador térmico TA 2050 (TA Instruments). As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente (23°C) até 950°C, utilizando-se uma taxa de aquecimento de 20°C/min, em um suporte de alumina sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (N<sub>2</sub>), com vazão de gás da ordem de 50mL/min<sup>(13)</sup>.

### Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Técnica termoanalítica na qual se mede a diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência em função da temperatura, enquanto a substância e o material são submetidos a uma programação controlada de temperatura. As transições térmicas dos materiais ocorrem liberando (processos exotérmicos) ou absorvendo calor (processos endotérmicos). Desta forma, podem-se estudar as transições térmicas de materiais, tais como: temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>); temperatura de fusão (T<sub>m</sub>); temperatura de cristalização (T<sub>k</sub>), temperatura de oxidação. As curvas DSC foram obtidas utilizando suporte de amostra de alumínio tampado. As amostras foram aquecidas de -23°C até 250°C, a uma razão de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> e com dois aquecimentos. Os experimentos foram realizados sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (N<sub>2</sub>), a uma vazão de 30mL min<sup>-1</sup>, utilizando um 822° da Mettler Toledo<sup>(14)</sup>.

### Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

Esta técnica consiste em incidir radiação eletromagnética correspondente à faixa do infravermelho (4.000 – 400cm<sup>-1</sup>) na amostra. A energia associada a estes comprimentos de onda, uma vez absorvida pela molécula, converte-se em energia de rotação-vibração molecular. Este fenômeno de absorção é extremamente quantizado e altamente dependente dos grupamentos químicos que estão presentes na amostra, demonstrando, dessa forma, sua estrutura. Foi utilizado um espectrofotômetro *Nexus 4700 FTIR da Thermo Nicolet*. Os espectros foram obtidos com 32 repetições, leitura de 4.000 a 400cm<sup>-1</sup>, e resolução igual a 4cm<sup>-1</sup>. À amostra foi incorporada uma pastilha de brometo de potássio (KBr) para esta análise<sup>(14)</sup>.

A análise estatística foi feita pelo teste *t* de Student. Foi considerada significância  $p < 0,05$  com 95% de intervalo de confiança.

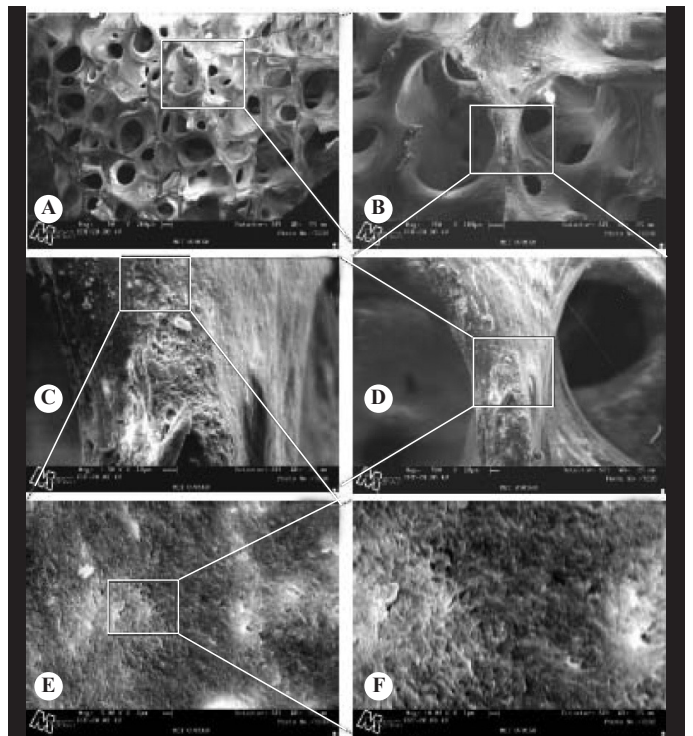
## RESULTADOS

### MEV/EDS

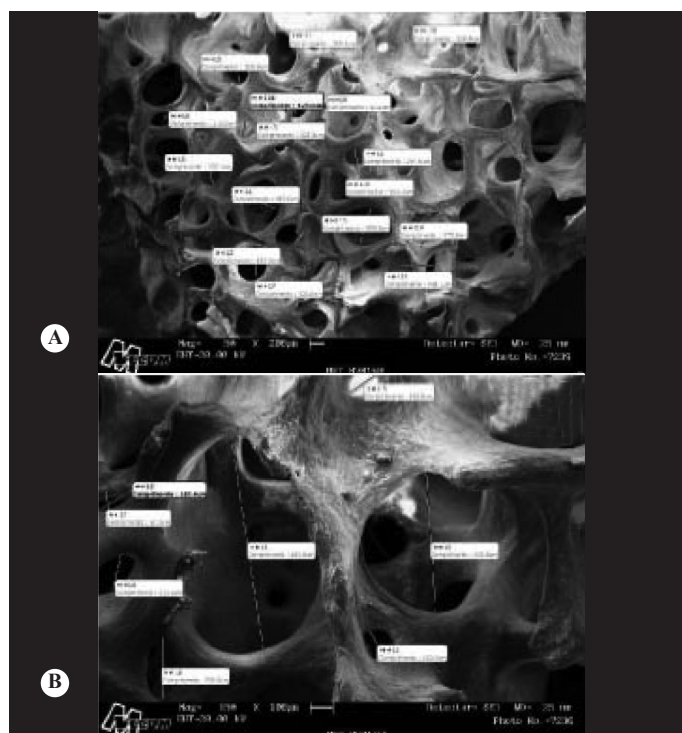
Os resultados obtidos da composição química, de pontos aleatórios da superfície da amostra, via MED/EDS, estão apresentados na Tabela 1. A Figura 1 mostra as imagens da superfície da amostra obtidas via MEV. O tamanho dos poros está representado nas imagens de medidas na Figura 2, e seus respectivos resultados demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 1** – Resultados da composição química obtida pelo EDS.

Elementos	MET 070160 (%)		
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
C	3,94	5,01	3,71
Al	0,46	0,29	0,18
P	28,71	27,85	27,94
O	5,89	5,96	3,96
Na	0,41	0,51	0,55
Mg	0,75	0,49	0,50
Cl	0,26	0,46	0,25
Ca	59,25	59,42	62,91



**Figura 1** – Imagens obtidas via MEV da superfície da amostra: A) aumento de 50x; B) aumento de 150x; C) aumento de 500x; D) aumento de 1.500x; E) aumento de 5.000x e F) aumento de 10.000x.



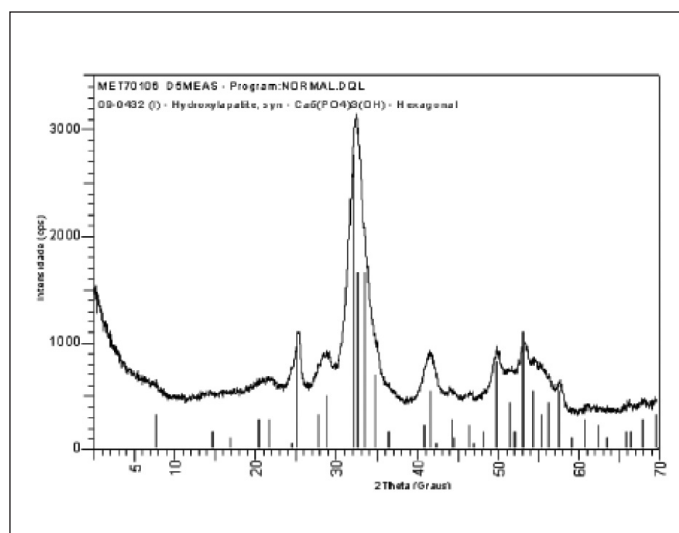
**Figura 2** – Imagens obtidas da superfície da amostra para a mensuração do tamanho de poros: A) aumento de 50x; B) aumento de 150x.

**Tabela 2** – Resultados dos tamanhos de poros.

	Aumento 50 X	Aumento 150 X
	Comprimento (µm)	
L1	264,6	150,3
L2	435,3	628,8
L3	225,9	142,8
L4	497,8	233,3
L5	333,1	963,9
L6	116,3	276,6
L7	322,6	87,2
L8	91,2	185,4
L9	320,3	
L10	136,9	
L11	210,1	
L12	193,7	
L13	458,1	
L14	475,9	
L15	555,0	
L16	429,0	
Média	316,6	333,5
Desvio padrão	146,7	304,8

### Difratometria de Raios-X (DRX)

A partir do espectro obtido, observou-se a presença dos picos característicos da hidroxiapatita, sendo o primeiro por volta de 26° e o segundo, 32°, em dois tempos, que são designados pela reflexão (002) e (211), respectivamente. A Figura 3 apresenta o espectro obtido para a amostra de enxerto ósseo analisada.



**Figura 3** – Curva obtida no ensaio de difrato.

### Termogravimetria (TG)

Os resultados obtidos pela termogravimetria da amostra analisada (Tabela 3) revelaram que a perda de massa inicial (22,8279mg) em temperatura ambiente e 250°C, 250°C e 640°C, 640°C e 950°C, foi de 8,99%, 22,4% e 6,2%, respectivamente, que, juntamente com o DSC, apontam para uma perda inicial de água da amostra. O nível de resíduos estáveis a 950° foi 62,6%. A segunda perda de massa (22,4%) corresponde, provavelmente, à perda do material orgânico e de água estrutural. Já a terceira perda pode estar associada à decomposição térmica do carbonato da hidroxiapatita (Figura 4).

**Tabela 3** – Resumo dos resultados da termogravimetria.

	Perda de massa	Perda de massa	Perda de massa	
<b>Amostra</b>	entre T <sub>Amb</sub> e 205°C (%)	entre 205°C e 640°C (%)	entre 640°C e 950°C (%)	Teor de resíduos estáveis a 950°
MET070160	8,99	22,4	6,2	62,6

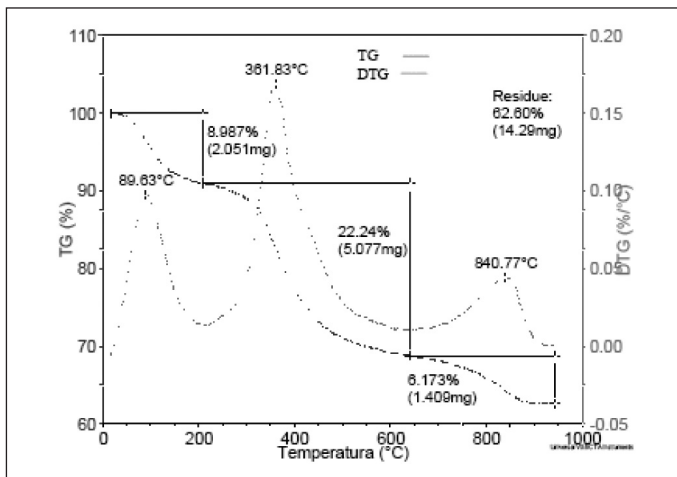


Figura 4 – Curva obtida da análise via termogravimetria.

### Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

É possível observar a curva DSC obtida, tanto no primeiro quanto no segundo aquecimento. No primeiro aquecimento, há três transições térmicas distintas: a 45,67°C, 91,89°C e 125,89°C. A primeira temperatura de transição observada foi (45,67°C) provavelmente correspondente à temperatura de desnaturação do colágeno tipo I. O grande pico endotérmico a 91,89°C está associado à perda de água da hidroxiapatita, sendo isso corroborado pela inexistência deste pico endotérmico durante o segundo aquecimento (Figura 5).

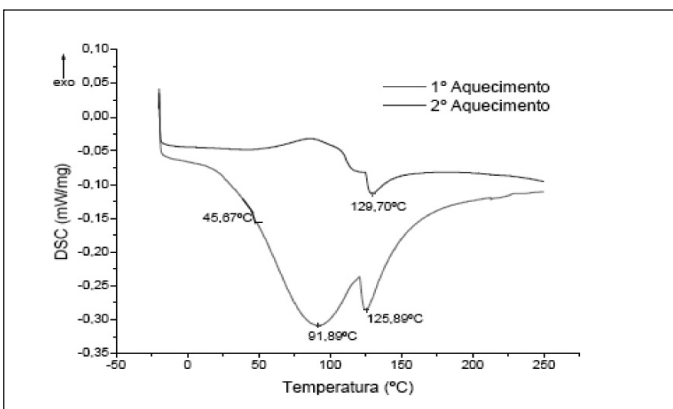


Figura 5 – Curva obtida no DSC.

### Espectroscopia no infravermelho (FT-IR)

O espectro no infravermelho da amostra de enxerto ósseo na região de 4.000cm<sup>-1</sup> a 400cm<sup>-1</sup> está demonstrado na Figura 6, na qual estão indicadas as principais bandas (picos) observadas.

Bandas características foram identificadas para os grupos de fosfato de hidroxiapatita (entre 600 e 1.100), para colágeno – deformação axial da cadeia C=O e de-

formação angular das cadeias N-H e C-N -, e moléculas estruturais de água.

A Tabela 4 apresenta a descrição das bandas destacadas e numeradas da esquerda para direita na Figura 6. As bandas de absorção encontradas e apresentadas na Tabela 4 são as esperadas para compostos a base de colágeno e hidroxiapatita.

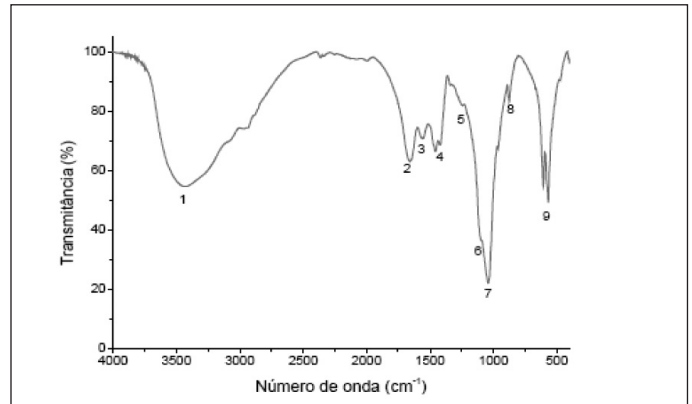


Figura 6 – Espectro de FT-IR indicando as principais bandas observadas.

Tabela 4 – Descrição das bandas de absorção destacadas na Figura 6.

Pico	Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupamento Característico
1	3.427	Moléculas de água estruturais ou absorvidas
2	1.654	Deformação axial da ligação C=O
3	1.559	Deformação angular da ligação N-H e estiramento C-N
4	1.454	Ligação C-H do anel pirlidínico
5	1.243	Vibração no plano da amina III, devido ao estiramento C-N e à deformação N-H
6	1.100	Íons fosfato
7	1.037	Íons fosfato
8	872	Íons OH <sup>-</sup> da ligação P-OH
9	564	Íons fosfato

## DISCUSSÃO

A estrutura microscópica do enxerto ósseo Baumer – Integral (OrthoGen), analisada por MEV/EDS, revelou que o produto apresenta estrutura típica de osso medular com poros interconectados, e que, após o processo físico-químico ao qual a matéria prima é submetida para fabricação, foi possível manter a estrutura característica desse tipo de tecido. A presença dos poros e a manutenção da estrutura cristalina trabeculada do osso são fatores fundamentais para sucesso dos fenômenos ce-

lulares de deposição de células osteoprogenitoras sobre o enxerto, reabsorção do mesmo e formação de osso novo no lugar<sup>(15,16)</sup>.

Alguns autores relataram as mesmas observações quanto à estrutura microscópica, tanto para produtos comerciais submetidos a processos térmicos de desproteinização quanto BioOss ou GenOx Inorg<sup>(10,11,17)</sup> ou submetidos a processamentos físico-químicos não envolvendo tratamentos a altas temperaturas como Tutoplast *bovine*, Tutobone ou Tutoplast *human*<sup>(17)</sup>, bem como para produtos não comerciais submetidos a processos físico-químicos de limpeza e purificação OBM<sup>(10)</sup> ou *Kiel bone*<sup>(17)</sup>.

A análise com EDS, acoplada ao MEV, permitiu determinar a composição química qualitativa e semi-quantitativa na superfície da amostra. Com a técnica de EDS, analisando três regiões diferentes da mesma amostra, observa-se a homogeneidade do material. Pelo resultado apresentado, observa-se que há uma distribuição homogênea da fase química do produto, tendo sido detectada a presença dos elementos Alumínio, Cloro e Sódio em quantidades muito baixas. Os elementos Oxigênio, Carbono e os minerais Ca e P foram encontrados em teores esperados para material derivado de tecido ósseo não submetido a processo de desmineralização. Os resultados obtidos estão de acordo com os relatados por outros autores para produtos derivados de tecido ósseo de origem humana ou bovina não submetidos a processos de desmineralização<sup>(10)</sup>.

Foi determinada a porcentagem e tamanho dos poros a partir das análises obtidas no MEV. O tamanho médio dos poros foi 316µm (146,7µm), variando de 91,2 a 497,8µm, e 333,5µm (304,8µm), variando de 87,2 a 963,9µm com 50x e 150x magnificação, respectivamente (Tabela 2)<sup>(17,18)</sup>.

O estudo de difração de raios-X foi utilizado para determinar a composição química do OrthoGen, sendo indicativo da presença de diferentes fases na amostra, da pureza do material e do percentual de cristalinidade<sup>(17,19,20)</sup>. Existem diversos sistemas que permitem determinar o pico produzido por um dado elemento e o localizar na amostra em teste, produzindo, assim, um mapa de sua distribuição. Há uma relação entre a largura do pico e a cristalinidade da amostra, sendo que amostras mais cristalinas apresentam picos mais estreitos, enquanto que a caracterização se faz pela localização dos picos característicos para cada componente.

Os espectros obtidos nas amostras de OrthoGen (Figura 3) apresentaram picos principais referentes à hidroxiapatita. O primeiro estando a cerca de 26°2θ e o segundo a 32°2θ, denotando que o processo de produção permite a manutenção da fase mineral característica do tecido ósseo original, com menor cristalinidade e similar ao apresentado para outros substitutos de osso derivados de osso natural que não são submetidos a tratamento térmico ou desmineralização durante o processo de fabricação/produção.

No estudo realizado por Tadic e Epple<sup>(17)</sup>, foram caracterizados diversos tipos de substitutos de osso de origem sintética ou natural. Quanto à determinação da fase mineral, o pico característico da hidroxiapatita localizado ao redor de 32°2θ foi detectado em todas as amostras estudadas, estando presente, com maior ou menor pureza ou grau de cristalinidade, tanto nos produtos comerciais de origem bovina (BioOss®, Endobon®, Cerabone® e Tutoplast *bovine*®) ou de origem humana (Tutoplast *human*®) quanto nas amostras de *Kiel bone* (enxerto ósseo de origem bovina tratado com mistura de solventes orgânicos e agentes oxidantes) e nas amostras de calo ósseo ou osso tumoral humanos. Em relação aos produtos estudados que são submetidos a diferentes processos de fabricação, essa informação pode ser utilizada como uma forma de avaliar a eficiência do processamento na manutenção das características químicas funcionais da matéria prima após processamento. Na determinação da cristalinidade das fases minerais através de difração de raios-X, para os produtos de origem bovina Cerabone® e Endobon®, por serem processados termicamente (calcinados) à alta temperatura, apresentam característica de hidroxiapatita altamente cristalina. A rapidez na reabsorção está relacionada com a cristalinidade dessa cerâmica, sendo que quanto mais cristalina mais lentamente reabsorvida será<sup>(10)</sup>. Para o produto BioOss® foi observado padrão de cristalinidade intermediária, e para os produtos Tutoplast® *bovine* ou *human* foi observado padrão mais amorfo ou presença de cristais de pequeno tamanho, o que é denotado pela presença de picos mais largos e com menor intensidade, embora característicos.

Mendonça<sup>(10)</sup> avaliou a fase mineral e a cristalinidade de produtos comerciais BioOss®, GenOx Inorg® e amostras de OBM – osso bovino processado com agente oxidante e agente desnaturante, liofilizado e esterilizado com radiação gama que apresenta composição similar ao osso humano: 60-70% mineral/40-30%

orgânico e água. Foram observados, para todos os produtos, picos característicos da hidroxiapatita a  $32^\circ 2\theta$ . BioOss e OBM apresentaram picos mais largos, o que pode estar associado à presença de cristais em dimensões nanométricas, presença de defeitos na estrutura e baixa cristalinidade do pós-formado. Os resultados apresentados para o OBM são similares aos obtidos para o enxerto ósseo bovino liofilizado utilizado nesta pesquisa, indicando um padrão de cristalinidade bem menor em relação ao apresentado pelos produtos que foram submetidos a alta temperatura durante o processo de fabricação.

Foi determinado o perfil termogravimétrico (TG) de amostras de OrthoGen. A determinação do perfil termogravimétrico permite avaliar a perda ou ganho de massa da amostra em função do aquecimento, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. É uma técnica essencialmente quantitativa que também apresenta informações sobre a estabilidade do material ao calor, o que pode ser traduzido em informações sobre propriedades como decomposição de um material de composição proteica e mineral.

A massa inicial da amostra foi de 22,8270mg. Houve uma perda de massa inicial da ordem de 8,99% (2,052mg) entre a temperatura ambiente e  $205^\circ\text{C}$  que, juntamente com o DSC, indicam uma perda inicial de água. Uma segunda perda ocorre entre  $205^\circ\text{C}$  e  $640^\circ\text{C}$ , equivalendo a 22,4% (5,07mg) e provavelmente correspondendo à perda de material orgânico e água residual. Há uma terceira perda aos  $640^\circ\text{C}$  e que se estende até a temperatura final de  $950^\circ\text{C}$  equivalente a 6,2% (1,04mg) do material inicial, que pode estar relacionada com a perda do carbonato de hidroxiapatita havendo um resíduo final de 62,6% (14,29mg), provavelmente material inorgânico estável até  $950^\circ\text{C}$ . Esses resultados indicam a natureza orgânica e mineral do produto similar à do tecido ósseo integral<sup>(12)</sup>.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma das técnicas de análise térmica utilizada para caracterização de diferentes tipos de produtos quanto às mudanças frente ao calor. Nessa técnica é possível acompanhar a variação de energia (diferença de energia) entre a amostra e um material de referência, enquanto ambos são aquecidos ou resfriados de acordo com uma programação controlada de temperatura. O caráter dos picos, endotérmicos ou exotérmicos, pode variar de acordo com a natureza do fenômeno que se deseja estudar. Fenômenos químicos, como tempera-

tura de degradação oxidativa ou decomposição, são informações importantes quando se faz a caracterização de um produto que possui composição proteica. A identificação dos componentes presentes na amostra se faz através da comparação do comportamento dos picos encontrados com as informações de referência dos grandes grupos de macromoléculas ou materiais, como é o caso do colágeno do tipo I ou hidroxiapatita, que se procura identificar em um material de enxerto. A primeira temperatura de transição observada ao redor dos  $45^\circ\text{C}$  pode ser considerada a temperatura de desnaturação do colágeno tipo I presente na amostra. O grande pico endotérmico, observado aos  $91^\circ\text{C}$ , provavelmente está associado à perda de água da hidroxiapatita, sendo esse dado corroborado pela inexistência desse pico endotérmico durante a segunda exposição da amostra ao calor<sup>(10)</sup>.

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é considerada a ferramenta mais clássica para identificação de tipos de ligações químicas, sendo os comprimentos de ondas de 4.000-1.500 obtidos tipicamente devido à presença de grupos funcionais conhecidos como  $-\text{OH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{N}-\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ . Nesta técnica incide-se radiação eletromagnética correspondente à faixa do infravermelho (ondas de luz entre 4.000-400/ $\text{cm}$ ) e mede a absorção de várias ondas de luz infravermelha pelo material de interesse. As bandas de absorção de infravermelho identificam estruturas e componentes moleculares específicos. Foram identificadas bandas características para grupamentos fosfato da hidroxiapatita (de 600 a 1.100), para colágeno (como a deformação axial da ligação  $\text{C}=\text{O}$ , onda 1.654, e deformação angular da ligação  $\text{N}-\text{H}$  e estiramento  $\text{C}-\text{N}$ , onda 1.559), e ainda para moléculas de água estruturais ou adsorvidas na amostra (onda 3.427).

No estudo de Tadic e Epple<sup>(17)</sup>, no qual foram caracterizados diversos materiais de enxerto comerciais ou não, os resultados obtidos para os enxertos ósseos de natureza parcialmente mineral ou parcialmente orgânica, como o Tutoplast<sup>®</sup> *bovine* e *Kiel bone*, assemelham-se aos obtidos para o material analisado no presente estudo. Foram encontrados os grupamentos correspondentes a colágenos e compostos orgânicos em quantidades variáveis, porém com bandas características nos números de onda de 1.560 a 3.000. Além das bandas características para os grupamentos fosfato, diversas bandas foram observadas referentes ao material orgânico e água incorporada<sup>(17)</sup>.

## CONCLUSÃO

As características físico-químicas estudadas no enxerto ósseo bovino liofilizado (OrthoGen – Baumer) confirmam um produto de excelente qualidade, apresentando

características de acordo com as normas sugeridas na literatura, além de demonstrar similaridade com outros enxertos ósseos processados e amplamente utilizados.

## REFERÊNCIAS

1. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(3):454-64.
2. Laurencin CT, Khan Y. Bone grafts and bone graft substitutes: a brief history. In: Laurencin CT, editor. *Bone graft substitutes*. Bridgport, NJ: ASTM International; 2003.
3. Seiler JG 3rd, Johnson J, Hand G, Microsurgery clinic. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc.* [periódico online]. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/410431>. Acesso em: 11 setembro, 2002.
4. Lind M, Krarup N, Mikkelsen S, Hørlyck E. Exchange impaction allografting for femoral revision hip arthroplasty: results in 87 cases after 3.6 years' follow-up. *J Arthroplasty.* 2002;17(2):158-64.
5. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(2):333-5.
6. Sugihara S, van Ginkel AD, Jiya TU, van Royen BJ, van Diest PJ, Wuisman PI. Histopathology of retrieved allografts of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(2):336-41.
7. Giovani AM, Croci AT, Oliveira CR, Filippi RZ, Santos LA, Maragni GG, et al. Comparative study of cryopreserved bone tissue and tissue preserved in a 98% glycerol solution. *Clinics (Sao Paulo).* 2006;61(6):565-70.
8. Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Revista FOB.* 1999;7(1):85-93.
9. Macedo CA, Galia CR, Silva ALB, César PC, Sanches PRS, Duarte LS, et al. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop.* 1999;34(9/10):529-34.
10. Mendonça TA. Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*) [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.
11. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 11a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2008.
12. Grynblas MD, Bonar LC, Glimcher MJ. Failure to detect an amorphous calcium-phosphate solid phase in bone mineral: a radial distribution function study. *Calcif Tissue Int.* 1984;36(3):291-301.
13. Jong Jin Lim. Thermogravimetric analysis of human femur bone. *J Biol Phys* 1975;3:111-29.
14. Benz M, Euler WB. Determination of the crystalline phases of poly (vinylidene fluoride) under different preparation conditions using differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy. *J Appl Polym Sci.* 2003;89:1093-100.
15. Werner J, Linner-Krcmar B, Friess W, Greil P. Mechanical properties and in vitro cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure. *Biomaterials.* 2002;23(21):4285-94.
16. Ashok M, Sundaram NM, Kalkura SN. Crystallizations of hydroxyapatite at physiological temperature. *Materials Letters.* 2002;57(13/14):2066-70.
17. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials.* 2004;25(6):987-94.
18. Tampieri A, Celotti G, Sprio S, Delcogliano A, Franzese S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials.* 2001;22(11):1365-70.
19. LeGeros RZ, LeGeros JP, Daculsi G, Kijkowska R. Calcium phosphate biomaterials: preparation, properties and biodegradation. In: Wise DL, Trantolo DJ, Altobelli DE, et al. editors. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering.. Part A: Materials*. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 1429-163.
20. Tadic D, Peters F, Epple M. Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials.* 2002;23(12):2553-9.