

Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana

Physicochemical characterization of bovine and human freeze-dried bones

CARLOS ROBERTO GALIA¹; CARLOS ALBERTO DE SOUZA MACEDO¹; RICARDO ROSITO¹; TIELLE MULLER DE MELLO²; CRISTIANO DIESEL¹; LUIS FERNANDO MOREIRA, TCBC-RS¹

R E S U M O

Objetivo: Verificar as similaridades físico-químicas por meio de análises orgânicas e minerais de ossos liofilizados humanos e bovinos produzidos a partir de um protocolo de processamento desenvolvido pelos autores. **Métodos:** Determinaram-se os percentuais de extrato etéreo (gordura bruta), proteína total (nitrogênio total) e composição mineral (fósforo total, P₂O₅ total, cálcio total, sódio total, cinzas e cloretos) das amostras de ossos humanos e bovinos liofilizados. **Resultados:** O percentual de gordura e de proteína bruta foi de 0.14% e 0.06%, e de 27.20% e 27.53%; enquanto que a composição mineral demonstrou 4.3% e 4.3% de nitrogênio; 11.9% e 11.9% de fósforo total; 27.1% e 27.2% de P₂O₅; 24.6% e 23.7% de cálcio total (relação Ca/P: 2.06 e 1.99); 0.57% e 0.46% de sódio total; 64.8% e 64.3% de cinzas; e 1.3% e 1.3% de cloretos, para as amostras de osso humano e bovino, respectivamente. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre ossos bovinos e humanos após o processo de liofilização. **Conclusão:** Avaliações de características físicas e químicas de ossos liofilizados bovinos e humanos claramente demonstraram que estes ossos mantêm virtualmente todas as características de osso original e de similaridades com os ossos humanos, levando a um produto final com boa biocompatibilidade.

Descritores: Testes de toxicidade. Transplante ósseo. Liofilização.

INTRODUÇÃO

A utilização de enxertos ósseos em operações ortopédicas, crânio-maxilo-faciais e odontológicas está cada vez mais difundida e com demanda crescente principalmente pelo aumento na complexidade dos procedimentos e das reconstruções dos defeitos ósseos¹.

O enxerto autólogo fresco permanece como padrão ouro devido a suas propriedades estruturais, ausência de resposta imune e capacidades osteoindutora, osteocondutora e osteogênica. Porém suas desvantagens, como o aumento do tempo cirúrgico devido à retirada do enxerto, a pequena quantidade obtida, e a morbidade associada a esse procedimento, têm limitado sua utilização^{2,3}.

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 infecto contagiosas e tumorais relacionadas ao seu uso⁴⁻⁶.

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 esses méto-

dos está a liofilização que permite o processamento, a esterilização e o armazenamento de enxertos ósseos homólogos e mesmo heterólogos, principalmente de origem bovina, aumentando assim, o leque de opções de tecidos implantáveis. Deve-se levar em consideração que o osso bovino possui disponibilidade praticamente ilimitada e, se processado adequadamente, mantém grande similaridade físico-química e estrutural com o humano⁷.

As dificuldades em obter quantidades adequadas de enxerto ósseo estimularam os autores a desenvolverem um protocolo de processamento de enxerto ósseo liofilizado humano e bovino visando diminuir significativamente sua antigenicidade, além de alterar minimamente a sua composição em relação aos enxertos ósseos não processados.

Segundo dados da literatura 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^{8,9}. Baseados nesses dados, realizou-se a determinação das características físico-químicas dos enxertos ósseos produzidos com a metodologia desenvolvida pelos autores deste trabalho para validação do processo e posterior comparação.

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 1. Professor do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS-BR; 2. Acadêmico da Faculdade de Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS-BR; 3. Pesquisador Senior, Banco de Tecidos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS-BR.

O objetivo desse estudo é verificar as similaridades físico-químicas por meio de análises orgânicas e minerais de ossos liofilizados humanos e bovinos produzidos a partir de um protocolo de processamento especificamente desenvolvido para esse fim.

MÉTODOS

As amostras de osso humano e bovino foram processadas conforme protocolo desenvolvido pelos autores 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. Foram realizados três ensaios em cada amostra de osso humano e bovino.

Os ensaios relatados foram realizados nos Laboratórios de Análises da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Determinaram-se os percentuais de extrato etéreo (gordura bruta), proteína total (nitrogênio total) e composição mineral (fósforo total, P₂O₅ total, cálcio total, sódio total, cinzas e cloretos) das amostras de ossos humanos e bovinos liofilizados.

A determinação do extrato etéreo (DEE) é feita por meio da extração com solvente orgânico das gorduras presentes na amostra (éter etílico, éter de petróleo, éter sulfúrico) seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente. O resíduo obtido contém todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente (lipídios, esteróis, fosfatídeos, vitaminas A e D, carotenóides, óleos, essências, pigmentos, etc.).

A determinação do nitrogênio total (DNT) foi realizada pelo método de Kjeldahl, que mede o nitrogênio total, proteínas e outros compostos, e consiste em três passos: digestão, destilação e titulação. Como este método dosa a amônia, é preciso fazer-se conversão dela em nitrogênio protéico. Convencionou-se entre os Laboratórios de Análises, o uso do fator 6,25 para todas as amostras, independente de ser de origem animal ou vegetal, a fim de evitar erros na comparação dos dados, caso não fosse citado o fator de conversão utilizado.

Para as dosagens do fósforo total, P₂O₅ total, cálcio total, sódio total foi utilizado o método de digestão úmida nítrico-perclórica, conforme descrito por Tedesco com limite de detecção de 0,01%¹⁰.

O percentual de cinzas foi determinado por gravimetria com queima a 550°C, método analítico quantitativo cujo processo envolve a separação e pesagem de um elemento ou composto do elemento na forma mais pura possível.

Para a determinação do percentual de cloreto, optou-se pela argentometria, método de dosagem por meio de uma solução titulada de um sal de prata.

Na análise estatística descritiva foram utilizados média aritmética, desvio padrão, valores máximos e mínimos e mediana para as variáveis quantitativas, e percentuais para as variáveis qualitativas. Para comparação das características físico-químicas das amostras de osso de origem bovina com as amostras de ossos de origem humana foram utilizados o teste t de student ou o teste para tendência linear em proporções quando aplicável.

RESULTADOS

Conforme os métodos de DEE de DNT (método de Kjeldahl) os resultados da composição orgânica das amostras analisadas evidenciaram percentual de gordura de 0,14% na amostra de osso bovino e 0,06% na humana; o DNT apresentou percentual de proteína bruta de 27,20% para a amostra bovina e 27,53% para a humana (Tabela 1). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre ossos bovinos e humanos após o processo de liofilização.

A composição mineral das amostras, obtida pelos métodos descritos demonstrou para o osso humano, 4,3% de nitrogênio, 11,9% de fósforo total, 27,1% de P₂O₅, 24,6% de cálcio total (relação Ca/P: 2,06), 0,57% de sódio total, 64,8% de cinzas e 1,3% de cloreto; o osso bovino apresentou 4,3% de nitrogênio, 11,9% de fósforo total, 27,2% de P₂O₅, 23,7% de cálcio total (relação Ca/P: 1,99), 0,46% de sódio total, 64,3% de cinzas e 1,3% de cloreto (Tabela 2).

Tabela 1 – Resultados da composição orgânica das amostras.

| Elementos | Osso Liofilizado | |
|----------------|------------------|---------|
| | Bovino* | Humano* |
| Proteína Bruta | 27,20 | 27,53 |
| Extrato Etéreo | 0,14 | 0,06 |
| pH | 7,41 | 7,58 |

*NS – não significativo, teste t de Student.

Tabela 2 – Resultados da composição mineral.

| Elementos (%) | Osso Liofilizado | |
|-------------------------------------|------------------|---------|
| | Bovino* | Humano* |
| Nitrogênio (TKN) | 4,30 | 4,30 |
| Fósforo total | 11,90 | 11,90 |
| P ₂ O ₅ total | 27,20 | 27,10 |
| Cálcio total | 23,70 | 24,06 |
| Ca/P | 1,99 | 2,06 |
| Sódio total | 0,46 | 0,57 |
| Cinzas | 64,30 | 64,80 |
| Cloretos | 1,30 | 1,30 |

*NS – não significativo, teste t de Student.

DISCUSSÃO

A similaridade físico-química entre ossos de origem humana e bovina in natura já foi descrita e demonstrada em diversos trabalhos científicos, sendo apontada como um dos fatores positivos em relação à utilização de enxertos ósseos liofilizados de origem bovina em seres humanos⁷.

Entretanto, diversas formas de processamento que visam deliberadamente alterar a composição físico-química óssea, como a desmineralização parcial ou total, desproteinização a altas temperaturas ou outros métodos, acabam por descaracterizar e diminuir essa similaridade¹¹.

O processo de liofilização desenvolvido pelos autores visou manter as características básicas do tecido processado o mais próximo possível do osso in natura, subtraindo apenas os possíveis agentes imunogênicos, como células medulares e gordura; quebrando quimicamente as cadeias protéicas e retirando agentes infecciosos bacterianos, virais e priônicos. Além disso, a completa remoção celular elimina virtualmente ao risco de transmissão de doenças tumorais⁵.

A escolha da liofilização de ossos bovinos, e não de outra espécie, deveu-se aos fatos de haver muitos trabalhos sobre sua composição e interação com pacientes humanos, ter artigos publicados com seu uso em diversos tipos de cirurgias ortopédicas e crânio-maxilo-faciais, além da grande oferta e disponibilidade.

O percentual de gordura residual encontrado nestas análises está dentro dos padrões internacionais de controle de qualidade para biomateriais (dados não apresentados), é comparável às caracterizações de outros produtos e parece não acarretar prejuízo em relação à sua utilização.

Já há algum tempo, existem disponíveis comercialmente enxertos ósseos liofilizados de origem bovina de diversos fabricantes. Um dos mais conhecidos e estudados

é o da marca LUBBOC™. Embora seu processo de manufatura não seja conhecido, sua análise físico-química está relatada na literatura e demonstra a manutenção das características originais ósseas além de resultados clínicos animadores. Realizando a comparação entre as análises do enxerto ósseo obtido pelo protocolo desenvolvido pelos autores e o osso LUBBOC, constatou-se grande similaridade sobretudo na quantificação de proteína, resíduos pós-queima e quantidade de cálcio¹².

Partindo-se do princípio de que há forte similaridade físico-química entre tecidos ósseos com origem humana e bovina in natura, analisou-se quimicamente essa similaridade dos tecidos após serem submetidos ao processamento segundo protocolo aqui apresentado. Dessa forma as análises físico-químicas realizadas, demonstraram características minerais e protéicas similares entre as diferentes amostras mesmo após todo o processamento¹³.

As pequenas diferenças, embora não significativas, entre as amostras podem ser devidas às diferentes faixas etárias ósseas entre as espécies estudadas, uma vez que as amostras de ossos bovinos foram extraídas de animais jovens, enquanto as humanas eram provenientes de indivíduos idosos, geralmente obtidas durante artroplastias totais de quadril, o que certamente influenciou na determinação das características estudadas. Além disso, as diferenças biológicas inerentes entre as espécies do estudo não podem ser desconsideradas.

Em conclusão, os resultados obtidos claramente demonstram que o processo de liofilização utilizado pelos autores potencialmente preserva as características físico-químicas do osso, resultando em produto final que mantém virtualmente a totalidade das características similares ao osso humano original. Entretanto, as características de diferentes fontes de produto ósseo ainda devem ser melhor compreendidas e ter determinado o seu controle de qualidade, o que certamente permitirá utilização mais segura e com maior abrangência.

A B S T R A C T

Objectives: To determine the physical and chemical characteristics and similarities between lyophilized bone from bovine and human sources manufactured in a semi-industrial scale, according to a modified protocol developed by the authors. **Methods:** The percentages of fat extract (raw fat), total protein (total nitrogen) and mineral composition (total phosphorus, total P₂O₅, total calcium, total sodium, ashes and chlorides) was determined on the samples of lyophilized human and bovine bones. **Results:** The percentage of fat extract and raw protein was of 0.14% and 0.06%; and 27.20% and 27.53%; whereas the mineral composition demonstrated 4.3% and 4.3% of nitrogen; 11.9% and 11.9% of total phosphorus; 27.1% and 27.2% of P₂O₅; 24.6% and 23.7% of total calcium (Ca/P relation: 2.06 and 1.99); 0.57% and 0.46% of total sodium; 64.8% and 64.3% of ashes; and 1.3% and 1.3% of chlorides, for samples of bovine and human bones, respectively. No statistical significant difference was observed between bovine and human bones after the lyophilization process. **Conclusion:** The assessment of physical and chemical characteristics of bovine and human lyophilized bones has clearly demonstrated that these bones kept virtually all characteristics of a raw bone and keep similarities to human counterparts, yielding an end product with good biocompatibility.

Key words: Toxicity tests. Bone transplantation. Freeze drying.

REFERENCIAS

- 1 Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am. 2002; 84-A (3):454-64.
- 2 Laurencin CT, Khan Y. Bone grafts and bone graft substitutes: a brief history. In: Laurencin CT, editor. Bone graft substitutes [monograph on the Internet]. Pennsylvania: ASTM International; 2003. Available from: http://www.astm.org/DIGITAL_LIBRARY/MNL/PAGES/MONO10056M.htm

- 3 Seiler 3rd JG, Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. J South Orthop Assoc [serial on the Internet]. 2000 Jan [cited 2002 Set 11]; 9(2): [about 15 p.]. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/410431>
- 4 Lind M, Krarup N, Mikkelsen S, Horlyck 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 Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira OT, 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(3/4):85-93.
- 8 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*) [dissertation]. Bauru (SP): Universidade de São Paulo; 2005.
- 9 Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2008.
- 10 Tedesco MJ, Gianello C, Bissani C A, Bohnen H, Volkweiss S J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1995.
- 11 Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira OT, 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. Rev FOB. 1999; 7(3/4):85-93.
- 12 Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humano e bovino em revisão de artroplastia total de quadril [dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
- 13 An HS, Lynch K, Toth J. Prospective comparison of autograft vs. allograft for adult posterolateral lumbar spine fusion: differences among freeze-dried, frozen, and mixed grafts. J Spinal Disord. 1995; 8(2):131-5.

Recebido em 15/09/2008

Aceito para publicação em 17/11/2008

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Gália CR, Macedo CAS, Rosito R, Mello TM, Diesel C, Moreira LF. Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. Rev Col Bras Cir. [periódico na Internet] 2009; 36(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Carlos Roberto Galia

E-mail: cgalia@hcpa.ufrgs.com.br