

# AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO.

M. Motisuke<sup>1,a</sup>, A. C. D. Rodas<sup>2</sup>, O. Z.Higa<sup>2</sup>, R. G. Carrodegua<sup>3,4</sup>, C. A. C Zavaglia<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Labiomec – DEMa – FEM – Unicamp – Campinas, SP  
<sup>2</sup> Centro de Biotecnologia, IPEN, São Paulo, SP  
<sup>3</sup> Instituto de Cerámica y Vidrio – CSIC, Madri, Espanha  
<sup>4</sup> Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba  
<sup>a</sup> motisuke@fem.unicamp.br

**RESUMO:** *O [alfa]-TCP dopado com silício deve apresentar, além das propriedades já conhecidas dos fosfatos de cálcio, uma maior biocompatibilidade e bioatividade devido à presença de silício em sua estrutura cristalina. Ainda, a substituição por silício pode representar uma redução nos custos de produção de um TCP puro, uma vez que a temperatura de transformação beta - alfa é abaixada. Assim, a sua utilização como constituinte de uma nova composição de cimento ósseo é desejável. O objetivo deste trabalho é realizar uma análise preliminar da biocompatibilidade deste material através da análise de citotoxicidade de três pós de TCP dopados e não dopados com Si e verificar se ocorre a precipitação de apatita na superfície dos cimentos após imersão em FCS. Verificou-se que os pós de TCP apresentam baixa toxicidade, sendo que nenhum deles apresentou o índice IC50%.*

Palavras-chave: fosfato tricálcico, citotoxicidade, cimento ósseo

## INTRODUÇÃO

Na ciência de desenvolvimento de implantes e/ ou preenchimentos ósseos, os fosfatos de cálcio (CaPs) possuem um perfil biológico altamente atrativo, pois apresentam composição química muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (íons fosfato e cálcio). Podem, então, participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica apresentando grande habilidade em formar ligações com o tecido hospedeiro sem, no entanto, apresentar toxicidade local ou sistêmica, resposta inflamatória ao implante e formação de um tecido fibroso envoltório (1; 2; 3).

Sendo assim, os CaPs, conseguem fornecer um grau de integridade estrutural ao implante a fim de mantê-lo no lugar e intacto até que o novo osso cresça. Além disso, estimulam o crescimento de um tecido ósseo e apresentam solubilidade controlável, de maneira que podem ser absorvidos pelo organismo permitindo que o novo osso substitua o implante (4).

### Fosfato Tricálcico

O polimorfo do fosfato tricálcico mais conhecido e mais fácil de ser obtido é o  $\beta$ -TCP que apresenta propriedades muito semelhantes às calcificações encontradas em cálculos patológicos (5). Porém, este é facilmente hidrolisado a fosfato octacálcico ou a hidroxiapatita. Outra forma do  $\beta$ -TCP bem comum é a que apresenta substituições de alguns cátions de cálcio por magnésio. Este elemento é capaz de aumentar a temperatura de transformação de fase  $\beta \rightarrow \alpha$  para temperaturas acima de 1500°C. Assim, muitos pesquisadores vêm utilizando este elemento para melhorar as propriedades mecânicas do  $\beta$ -TCP (6).

Em contrapartida, o magnésio pode se tornar um problema quando se necessita sintetizar o polimorfo  $\alpha$ -TCP, pois este elemento inibe a formação de uma fase pura quase sempre formando uma mistura  $\beta + \alpha$ . É claro que a formação de  $\beta$ -TCP ocorre de acordo com a concentração de magnésio presente, porém, estudos mostram que quantidades acima de 250ppm já são suficientes para atrapalhar a síntese do  $\alpha$ -TCP puro (7; 8; 9; 10).

### Cimentos de Fosfatos de Cálcio

No início dos anos 80, pesquisadores descobriram que se misturando alguns fosfatos de cálcio com soluções aquosas tinha-se uma pasta viscosa que quando implantada endurecia dentro do organismo formando hidroxiapatita deficiente em cálcio ( $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ , CDHA) ou brushita ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , DCPD), materiais extremamente biocompatíveis que quando implantados são reabsorvidos pelo organismo dando origem a um novo tecido ósseo. Assim, os cimentos ósseos de fosfatos de cálcio apresentam alta osteocondutividade, facilidade de moldagem, e fácil manipulação fazendo com que estes materiais tenham um alto potencial para aplicações em ortopedia na correção de defeitos ósseos que não recebem altos carregamentos (11).

O termo “cimento de fosfato de cálcio” foi introduzido por Gruninger e colaboradores (12). Segundo eles um cimento deste tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir à temperatura ambiente ou corpórea dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfatos de cálcio, ocorrendo a pega pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado.

Os cimentos de fosfato de cálcio são constituídos por um componente ácido e outro básico, os quais quando se misturam com água reagem para formar um ou vários produtos com uma acidez intermediária a dos produtos de partida (4).

Estes cimentos reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituição de partes danificadas do sistema ósseo dentro das quais estão:

- Não ser necessário dar forma ao preenchimento;
- Mínima cavidade do preenchimento;
- A preparação é realizada durante o ato cirúrgico;
- Existe um ótimo contato entre osso e implante; e
- Biocompatibilidade e bioatividade.

Para que um CFC possa ter aplicação clínica é necessário que o material satisfaça algumas propriedades, tais como: ausência de toxicidade, perfeita adesão ao tecido ósseo, ausência de propriedades alogênicas ou carcinogênicas, fácil manipulação, dar pega e endurecer *in vivo* em intervalos de tempo controláveis, resistência mecânica apropriada e permanente, ser absorvível e condutor e estimulador da formação de novo tecido ósseo.

O estudo de cimentos baseados em fosfatos de cálcio substituídos ainda não está muito difundido, porém espera-se que a dopagem com elementos que melhoram a biocompatibilidade, a bioatividade e a osteocondução tragam grandes avanços no desenvolvimento de novos sistemas de fosfatos de cálcio. Já existem alguns estudos no desenvolvimento do cimento ósseo baseado no  $\alpha$ -TCP dopado com Si, porém estes não são muito conclusivos (13; 14).

### Fosfatos de Cálcio Substituídos

O tecido ósseo humano é demasiadamente complexo sendo formado por um composto de células envoltas em uma matriz orgânica mineralizada que apresenta

composição química muito parecida a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA) com alguns defeitos em sua estequiometria. Muitos estudos mostraram que estes defeitos são derivados de substituições por traços de alguns íons que atuam diretamente nos processos fisiológicos dos tecidos humanos, pois influenciam na solubilidade, na química de superfície e na morfologia. Os principais íons são carbonatos, Na, Mg, K, Sr, Zn, Ba, Cu, Al, Fe, F, Cl e Si. Este último é o íon responsável pelo crescimento normal de ossos e cartilagens (3; 2; 15; 16; 17).

### Silício

O silício quando presente em traços na formulação do fosfato tricálcico além de melhorar sua biocompatibilidade e bioatividade (18) é responsável pela estabilização da fase  $\alpha$ , estável somente em temperaturas acima de  $1300^\circ\text{C}$  (3; 18; 19; 17). O Si- $\alpha$ -fosfato tricálcico (Si- $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , Si- $\alpha$ -TCP) apresenta estrutura cristalina idêntica ao  $\alpha$ -TCP diferenciando-se apenas nos parâmetros do cristal e no fato de que 1 a cada 10 átomos de fósforo é substituído pelo Si (18). A faixa solubilidade do Si na estrutura do TCP ainda não é bem definida e muitos estudos tentam determiná-la. Estudos mais recentes (17; 19) mostram que é possível obter Si- $\alpha$ -TCP puro em uma faixa de 0,6 a 0,9% em massa de Si. Valores abaixo resultam em uma mistura de  $\beta$  e  $\alpha$ -TCP e acima, uma mistura de HA e  $\alpha$ -TCP.

Além disso, a qualidade dos reagentes precursores do TCP é extremamente importante, uma vez que algumas impurezas podem estabilizar fases indesejadas (3; 20). No caso do Si- $\alpha$ -TCP, a impureza que mais influencia na estabilização de fases indesejadas é o Mg que estando presentes em concentrações maiores que 250 ppm estabiliza o  $\beta$ -TCP elevando a temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  para acima de  $1400^\circ\text{C}$  e inviabilizando a obtenção de Si- $\alpha$ -TCP puro em temperaturas mais baixas (20; 21; 9; 22).

Quando se tem uma quantidade de Si ideal e reagentes livres de magnésio, é possível obter Si- $\alpha$ -TCP a temperaturas tão baixas quanto  $700^\circ\text{C}$  (19) e  $1150^\circ\text{C}$  (21), porém conforme a quantidade de Mg aumenta, a temperatura para se conseguir uma fase pura pode chegar a  $1400^\circ\text{C}$  ou mais (22; 21). Outro fator que pode ser determinante para a obtenção de uma fase pura é a relação  $\text{Ca}/(\text{P}+\text{Si})$  que deve ser mantida sempre igual a 1,50, pois qualquer desvio pode levar a formação de uma segunda fase, como a HA, que tem sua relação  $\text{Ca}/\text{P}$  igual a 1,67.

A inclusão de silício ocorre basicamente pela substituição de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  por grupos  $\text{SiO}_4^{4-}$ . A compensação eletrônica acontece dependendo das condições termodinâmicas do processo, podendo acontecer vacâncias de oxigênio ou excesso de Ca, sendo que neste caso, cada um compensa a substituição por dois Si (23; 19).

Ainda, o Si tende a inibir o crescimento de grão resultando em materiais de microestrutura mais fina e, conseqüentemente, necessitando menores tempos de moagem. Quando se está trabalhando no sistema bifásico Si- $\alpha$ -TCP/ HA, o silício tende a inibir mais o crescimento de grão do  $\alpha$ -TCP que da HA (19).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram preparados três lotes de amostras conforme descrito na Tabela 2. Os fosfatos de cálcio estudados (Si- $\alpha$ -TCP-RC,  $\alpha$ -TCP-RL e Si- $\alpha$ -TCP-RL) foram obtidos através da reação no estado sólido de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), monetita ( $\text{CaHPO}_4$ ) segundo a reação da Equação (A). Para as amostras dopadas com silício (Si- $\alpha$ -TCP-RC e Si- $\alpha$ -TCP-RL) foram adicionados 2% em massa de wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ). A variação existente entre cada lote consiste apenas da quantidade de Si adicionada e da origem dos reagentes empregados. Em trabalhos publicados anteriormente verificou-se que devido às grandes quantidades de Mg presentes nos reagentes comercialmente encontrados no Brasil era praticamente impossível obter  $\alpha$ -TCP puro, assim determinou-se rotinas de síntese destes reagentes de maneira a eliminar esta contaminação (21). As amostras foram analisadas quanto a sua pureza de fase cristalina por difração de raios X (DRX).

**Tabela 1 - Características dos Pós de TCP utilizados.**

<b>Amostra</b>	<b>Origem dos Reagentes</b>	<b>% em massa de Si</b>	<b>T (°C)</b>	<b>D<sub>m</sub> (µm)</b>
Si- $\alpha$ -TCP-RL	Laboratório	0,48	1250°C	10,42
Si- $\alpha$ -TCP-RC	Comerciais (Synth, Brasil)	0,48	1400°C	15,40
$\alpha$ -TCP	Laboratório	---	1300°C	9,43



Em seguida, os pós de fosfato de cálcio foram submetidos a ensaio de citotoxicidade utilizando-se um método calorimétrico no qual as substâncias MTS e PMS foram utilizadas (24). Foram preparadas diluições (de 100 a 6,25%) em meio RPMI 1640 de cada material (extrato). Em seguida, a cada diluição foi adicionado

50µL de células CHO-k1 ( $6.10^4$  células/mL) que permaneceram em incubação durante 72h a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A citotoxicidade foi medida em um espectrofotômetro (495 nm) sendo os controles negativo e positivo alumina e fenol (solução a 5%), respectivamente.

Para a confecção dos cimentos de fosfato de cálcio (CFC) foi utilizada como fase líquida uma solução aquosa contendo 2,5% em massa de fosfato de sódio bibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 1,5% em massa de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>). A relação líquido-pó utilizada foi de 0,6 mL/. Ainda, o tempo de mistura da pasta foi de aproximadamente 1 minuto. Depois de misturado o líquido e o pó, a pasta resultante foi vertida em moldes de Teflon<sup>®</sup> (cilindros de 6 X 12 mm e 12 X 6 mm) e levados a um ambiente com 100% de umidade durante 24h e, em seguida, deixados para secar ao ar sendo, então, retirados dos moldes (25).

Para cada amostra, os corpos de prova foram submetidos à imersão em fluido corpóreo simulado (FCS) a 36,5°C por 0 e 7 dias sendo que a solução foi trocada a cada 2 dias. A composição do FCS está presente na Tabela 2.

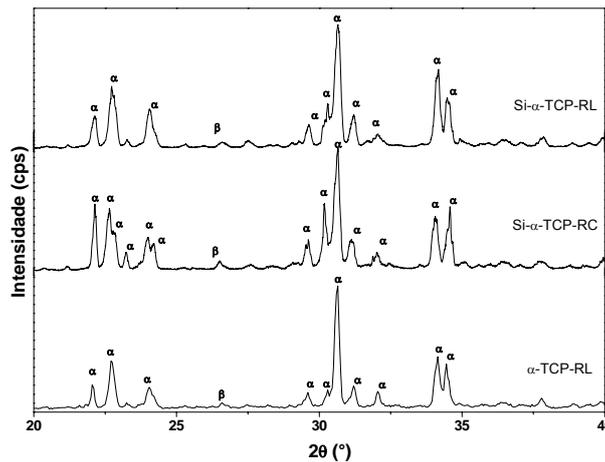
**Tabela 2 - Composição Iônica do FCS em comparação com a do Plasma Sanguíneo (26).**

<b>Composição (mMol/L)</b>	<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Cl<sup>-</sup></b>	<b>HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	<b>SO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	<b>pH</b>
FCS	142,0	5,0	2,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,40
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	2,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,20-7,40

A precipitação de apatita na superfície dos cimentos ósseos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

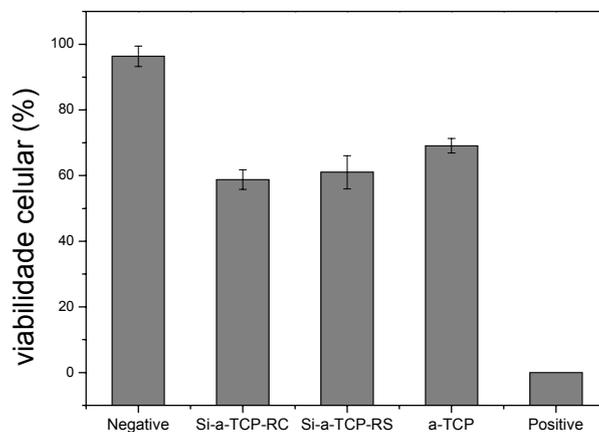
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi possível obter α-TCP puro em todos os lotes como mostrado nos difratogramas de raios X da Figura 1. Verificou-se, no entanto, que as amostras obtidas a partir dos reagentes sintetizados em laboratório apresentaram o pico referente ao plano cristalográfico (214) bem menos pronunciado que para o material feito a partir de reagentes comerciais. Este fato é justificado pela quantidade de Mg, um conhecido estabilizante da fase β, presente nos reagentes comercialmente disponíveis no Brasil (21).



**Figura 1 - Difratograma de raios X dos pós de fosfato de cálcio.**

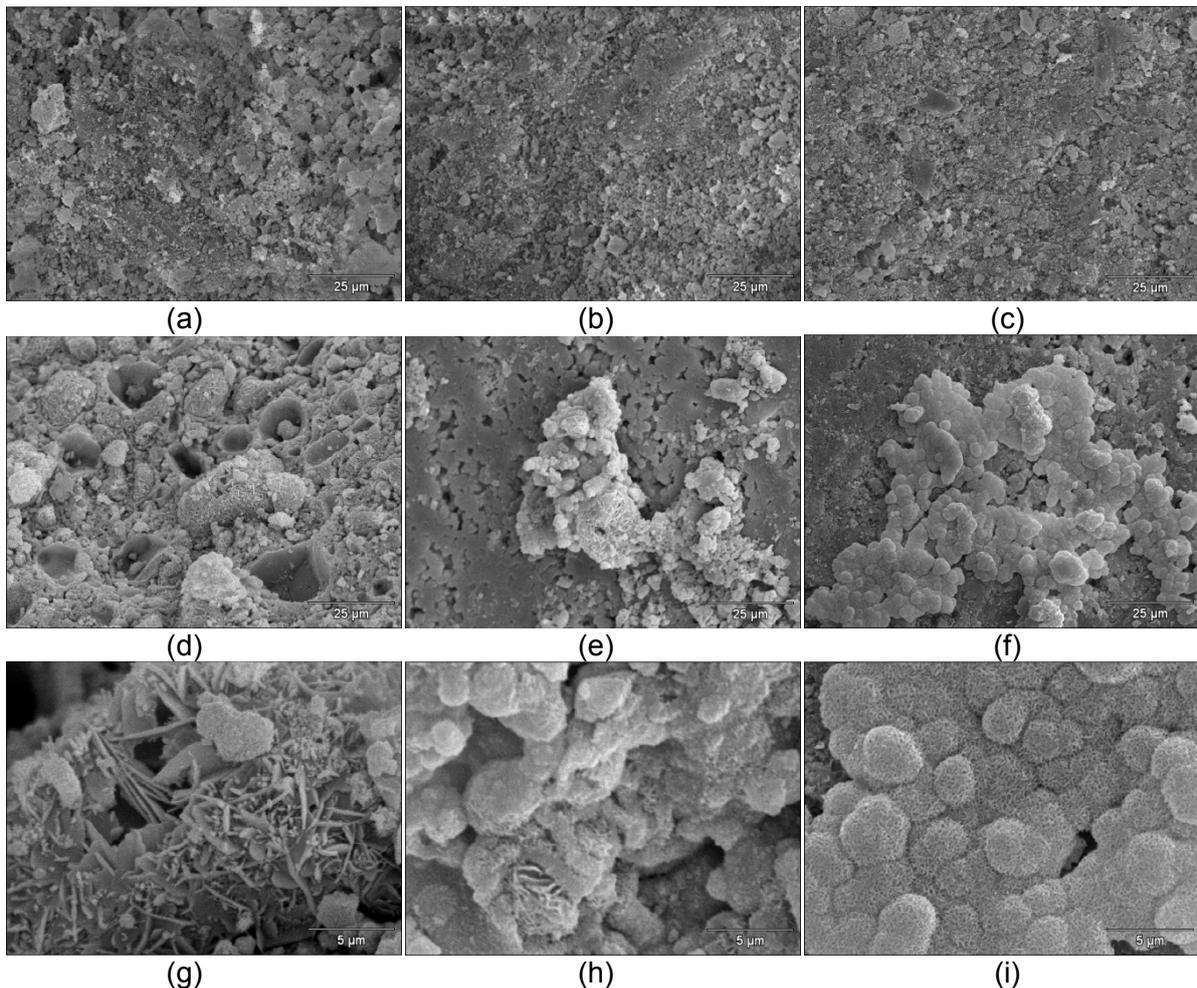
Os pós de fosfato de cálcio apresentaram uma leve citotoxicidade (Figura 2), porém, nenhuma das amostras apresentou o índice  $IC_{50\%}$  que demonstra a concentração de extrato que mata 50% da população de células. Ainda, verificou-se que as amostras dopadas com silício tiveram um pequeno aumento da citotoxicidade, porém este fator foi mais pronunciado para a amostra sintetizada com reagentes comerciais. Fato este que pode ser um indício de que os reagentes obtidos em laboratório podem melhorar a biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio.



**Figura 2 - Citotoxicidade dos pós de fosfato de cálcio.**

Apesar de apresentarem um certo teor de citotoxicidade, todos os cimentos ósseos induzem a precipitação de CDHA após imersão em FCS de acordo com o mostrado na Figura 3. Verifica-se também que nas amostras dopadas com silício (Figura 3 (d), (f), (g) e (i)) essa precipitação ocorre de maneira mais pronunciada e, ainda, para o cimento obtido a partir de reagentes sintetizados em laboratório e com

adição de silício, a apatita precipitada apresenta forma globular, ainda mais parecida com a morfologia da apatita biológica.



**Figura 3 - Micrografias da superfície dos cimentos ósseos antes e após 7 dias de imersão em FCS. (a) Si- $\alpha$ -TCP-RC antes da imersão; (b)  $\alpha$ -TCP antes da imersão; (c) Si- $\alpha$ -TCP-RS antes da imersão; (d) Si- $\alpha$ -TCP-RC após 7 dias de imersão; (e)  $\alpha$ -TCP após 7 dias de imersão; (f) Si- $\alpha$ -TCP-RS após 7 dias de imersão; (g) Si- $\alpha$ -TCP-RC após 7 dias de imersão maior aumento; (h)  $\alpha$ -TCP após 7 dias de imersão maior aumento; (i) Si- $\alpha$ -TCP-RS após 7 dias de imersão maior aumento.**

## CONCLUSÕES

Foi possível verificar as propriedades preliminares que indicam a biocompatibilidade dos cimentos de fosfato de cálcio estudados. Observou-se que o silício pode aumentar sutilmente a citotoxicidade do fosfato tricálcio, porém ao analisar a superfície dos cimentos após imersão em FCS verificou-se que as amostras com este elemento aumentam de maneira significativa a precipitação de

CDHA e que a amostra obtida com reagentes sintetizados em laboratório e com adição de silício induz a precipitação de CDHA com morfologia muito semelhante à apatita biológica. Assim, a conclusão de que o silício é um elemento que melhora ou não a biocompatibilidade, a osteocondução e a osteointegração somente será possível após ensaios “in vitro” e “in vivo” dos cimentos ósseos aqui estudados.

## REFERÊNCIAS

1. **Kawachi, E. Y., et al.** Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. *Química Nova*. 2000, Vol. 23 (4), pp. 518-522.
2. **Hench, L. L. e Wilson, J.** *An Introduction to Bioceramics*. s.l. : World Scientific Publishing Co, 1993.
3. **Groot, K., et al.** *Bioceramics of Calcium Phosphate*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1983.
4. **Vanderschoot, P.** Treatment Options and Development of a Vertebral Replacement Implant, Tese de Doutorado. Holanda : Universidade Católica de Leuven, 2002.
5. **LeGeros, R. Z.** *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Nova Iorque : Karger, 1991. 3-8055-5236-X.
6. **Sader, M. S., LeGeros, R. Z. e Soares, G. A.** Human Osteoblast Adhesion and Proliferation on Magnesium-substituted tricalcium phosphate. *V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*. 2008.
7. **Reid, J. W., et al.** The Influence of Trace Magnesium Content on the Phase Composition of Silicon-Stabilized Calcium Phosphate Powders. *Materials Letters*. 18, 2007, Vol. 61.
8. **Motisuke, M., Carrodeguas, R. G. e Zavaglia, C. A. C.** Mg-free precursors for the synthesis of pure phase Si-doped  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. *Key Engineering Materials*. 2008. 2008, Vols. 361-363.
9. **Enderle, R., et al.** Influence of Magnesium Doping on the Phase Transformation Temperature of  $\beta$ -TCP Ceramics Examined by Rietveld Refinement. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26.
10. **Carrodeguas, R. G., et al.** New approach to the b  $\rightarrow$  a polymorphic transformation in magnesium-substituted tricalcium phosphates and its practical implications. *Journal of the American Ceramic Society*. 2008, Vol. 91.

11. **Dorozhkin, Sergey V.** Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal of Materials Science*. 9, 2008, Vol. 43.
12. **Bermudez, O, et al.** Development of Some Calcium Phosphate Cements form Combinations of  $\alpha$ -TCP, MCPM and CaO. *Journal of Materials in Medicine*. 1994, Vol. 5.
13. **Camire, C. L., et al.** Material Characterization and In Vivo Behavior of Silicon Substituted  $[\alpha]$ -Tricalcium Phosphate. 2005.
14. **Leroux, T., Perez-Ordenez, B. e P., von Schroeder H.** Osteolysis After the Use of a Silicon-Stabilized Tricalcium Phosphate-Based Bone Substitute in a Radius Fracture: A Case Report. *The Journal of Hand Surgery*. 4, 2007, Vol. 32.
15. **Camiré, C. L.,Jegou Saint-Jean, S., et al.** Production Methodology and Reactivity of Silica Substituted  $\alpha$  phase Tricalcium Phosphate. *Congresso Mundial de Biomateriais*. 2004.
16. **Pietak, A. M., et al.** Silicon Substitution in the Calcium Phosphate Bioceramics. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28.
17. **Reid, J. W., et al.** Shynthesis and Characterization of Single-Phase Silicon-Substituted  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27.
18. **Pietak, A. M., et al.** Silicon Substitution in the Calcium Phosphate Bioceramics. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28.
19. **Reid, J.W., et al.** Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26.
20. **Reid, J.W., et al.** The influence of Trace Magnesium Content on the Phase Composition of Silicon-Stabilized Calcium Phosphate Powders. *Materials Letters*. 18, 2007, Vol. 61.
21. **Motisuke, M., Carrodegua, R. G. e Zavaglia, C. A. C.** Mg-Free Precursors for the Synthesis of. *Key Engineering Materials*. 2008, Vols. 361-363, pp. 199-202.
22. **Carrodegua, R. G., et al.** New Approach to the b-a Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications. *Journal of the American Ceramic Society*. 4, 2008, Vol. 91.
23. **Yin, X. e Stott, M. J.** Theoretical Insights Into Bone Grafting Silicon-Stabilized  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate. *The Journal of Chemical Physics*. 2005, Vol. 122.
24. **ISO10993-5.** International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Test for Cytotoxicity in Vitro. 1992.

25. **Motisque, M., Carrodeguas, R. G. e Zavaglia, C. A. C.** A Comparative Study between  $\alpha$ -TCP and Si- $\alpha$ -TCP Calcium Phosphate Cement. *Key Engineering Materials*. 2009, Vols. 396-398.

26. **Kokubo, T. e Takadama, H.** How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27.