

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO

E. de Sousa^{1,a}, M. Motisuke¹, C. A. Bertran²

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFESP, São José dos Campos, SP

² Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP

^a Rua Talim, 330, Vila Nair, São José dos Campos,

CEP 12231-280, São José dos Campos, SP

eliandra.sousa@unifesp.br

RESUMO

Em Engenharia Tecidual, a fabricação de scaffolds capazes de guiar o crescimento, a organização e a diferenciação de células no processo de formação de novos tecidos apresenta grande relevância. Várias são as técnicas de processamento para a fabricação desta classe de material: réplica de esponjas poliméricas, incorporação de material orgânico ao pó cerâmico, gelcasting, emulsão, entre outras. Na fabricação de scaffolds focados na terapia de tecidos ósseos, os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) apresentam grande destaque, pois além de reabsorvíveis, apresentam morfologia e composição química semelhante à fase mineral óssea. Este trabalho tem como objetivo a obtenção de scaffolds de CFC por meio de duas técnicas, emulsão e gelcasting. Os scaffolds foram caracterizados quanto suas propriedades físicas e mecânicas e as fases cristalinas formadas após a cura do cimento foram determinadas por difração de raios X. As amostras obtidas por ambos os métodos apresentaram porosidade entre 61-65% e microestrutura constituída de poros aproximadamente esféricos ($d_{50}=50-100\ \mu\text{m}$). A resistência mecânica das amostras variou entre 5,5-1,5 MPa. As fases cristalinas encontradas foram monetita (CaHPO_4) e brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Palavras-chave: Cimento de fosfato de cálcio, emulsão, gelcasting, scaffolds.

INTRODUÇÃO

Os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) são formados pela combinação de um ou mais sais de fosfatos de cálcio (FCa) que ao serem misturados com uma fase líquida formam uma pasta que endurece espontaneamente a temperatura ambiente ou corpórea como resultado da precipitação de um ou vários FCa ^(1,2). Estes materiais representam uma alternativa às cerâmicas cristalinas de FCa obtidas por sinterização em altas temperaturas (>1000°C) como a hidroxiapatita e o fosfato tricálcico. Os CFCs apresentam excelentes biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e são reabsorvíveis. No entanto, existem alguns aspectos a serem melhorados, questões cruciais como o controle da taxa de reabsorção, a valorização do potencial osteogênico, e o cumprimento das exigências e necessidades clínicas do cirurgião ⁽³⁾.

Nos últimos anos, novas estratégias que exploram as propriedades intrínsecas dos CFCs têm sido investigadas, como a possibilidade de empregá-los na fabricação de *scaffolds* para o cultivo celular. Estudos biológicos e práticas clínicas mostram que em adição a composição química do material, a estrutura de poros tridimensional é necessária para permitir adesão, proliferação e diferenciação celular e promover o fluxo de nutrientes e remoção de produtos metabólicos ⁽⁴⁾.

Vários são os métodos de processamento para a obtenção de *scaffolds* cerâmicos: método da esponja polimérica, incorporação de materiais orgânicos ao pó cerâmico, geração de bolhas dentro da suspensão, controle nas condições de sinterização com o objetivo de alcançar uma parcial densificação, *gelcasting*, emulsão, entre outros ⁽⁵⁻⁸⁾. Neste trabalho duas rotas de processamento foram usadas para a geração de *scaffolds* de cimento de fosfato de cálcio (SCFC), emulsão e *gelcasting*.

O método de emulsão consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis em que um deles está disperso em outro na forma de gotículas, geralmente estabilizadas por um emulsificante, que se localiza na interface entre as fases líquidas, reduzindo a tensão interfacial. As emulsões podem ser classificadas conforme sua fase contínua: água em óleo (w/o) apresenta gotículas de água dispersas na fase óleo contínua, enquanto óleo em água (o/w) consiste em gotículas de óleo dispersas em água ⁽⁹⁾. O processo de *gelcasting* desenvolvido pelo Oak Ridge National Laboratory ^(10,11) foi

inicialmente aplicado a produção de materiais de alta densidade. O método baseia-se na introdução de monômeros orgânicos a uma suspensão aquosa do pó cerâmico, que por meio da polimerização *in situ* produzem um reticulado tridimensional que consolida a matriz cerâmica. Para a produção de *scaffolds*, esta técnica foi associada à aeração de uma suspensão cerâmica contendo um agente espumante. Em ambos os casos, a gelificação ocorre por meio da cura do CFC, a qual se dá pela hidratação das partículas de fosfato de cálcio. Nesse processo há a dissolução de íons, a nucleação e a precipitação das fases hidratadas que formam fortes ligações com as partículas vizinhas e, desta maneira, promovem o endurecimento do sistema ⁽¹²⁾.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo estudar a viabilidade da produção de *scaffolds* de CFC por emulsão e *gelcasting*. Os SCFC foram caracterizados quanto suas propriedades físicas, mecânicas e morfológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os *scaffolds* de cimento de fosfato de cálcio foram preparados com base no sistema β -TCP/ H_3PO_4 . O cimento foi obtido por meio da mistura ($\text{L/P} = 0,80 \text{ mL/g}$) do pó de β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Sigma Aldrich, $d_{50}=7\mu\text{m}$, $10\%<d<90\%=0,987<d<15,934$) e uma solução aquosa de 3 mol/L de ácido ortofosfórico (Vetec, H_3PO_4) e 0,08 mol/L de ácido cítrico (Vetec, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$). A principal função do ácido cítrico é envolver as partículas de TCP dando-lhes cargas altamente negativas, gerando repulsão e criando uma defloculação. Consequentemente, a molhabilidade das partículas e a fluidez da pasta do cimento são aumentadas. Por causa deste processo, o ácido cítrico interfere na cinética da reação de cura tornando-a mais lenta ⁽¹³⁾.

No método da emulsão (SE), o hexano (Synth) foi adicionado à pasta de cimento, que continha duas gotas de surfactante (Renex 40, Oxiten), em uma relação volume-volume de 1:1. Em seguida, este sistema foi mantido sob agitação mecânica por 2 minutos. No método de *gelcasting* (SG), foi adicionado à fase líquida do cimento 12% em massa de surfactante (Renex 40, Oxiten). Em seguida, esta mistura foi submetida à agitação por 2 minutos até a formação de uma espuma que foi misturada cuidadosamente com o pó cerâmico. A Tabela 1 resume as condições de obtenção de cada amostra bem como a sua nomenclatura.

Tabela 1 - Condições de fabricação de *scaffolds* e nomenclatura das amostras.

Amostra	Método	L/P (mL/g)	Condições
CFC	Convencional	0,80	L/P = 0,80 mL/g
SE	Emulsão		Adição de hexano em relação 1:1 (v/v)
SG	<i>Gelcasting</i>		Adição de 12% em massa de surfactante

Em ambos os casos, após a homogeneização do sistema, a pasta resultante foi vertida em moldes cilíndricos de Teflon® (12 mm de diâmetro e 6 mm de altura) e deixados secar em temperatura ambiente por 24 horas e, em seguida, desmoldados.

A densidade geométrica (ρ_{geo}) foi medida a partir das dimensões e massa dos corpos de prova. A fração de vazios dos *scaffolds* foi determinada pela porosidade ϵ , expressa por $[1-(\rho_{geo}/\rho_t)]$, considerando-se $\rho_t = 3,07 \text{ g/cm}^3$. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste ANOVA. A morfologia e a microestrutura dos *scaffolds* de cimento de fosfato de cálcio foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (JEOL, JEOL 5900LV). As amostras foram dispostas sobre uma fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro (Bal-Tec MCS 010). As fases cristalinas formadas após a cura do cimento foram determinadas por difração de raios X (Shimadzu XRD 7000, $2\theta=10-40^\circ$, 30 mA e 40 kV). A resistência mecânica dos SCFC foi determinada por meio de ensaio de compressão uniaxial que foi realizado a temperatura ambiente em uma máquina de ensaios universal (Instron 5500R) com velocidade de carregamento de 0,5 mm/min e célula de carga de 2kN. Para cada grupo estudado, foram testados pelo menos 10 corpos de prova. Os resultados obtidos foram também analisados estatisticamente por meio do teste ANOVA.

Como material de controle, o CFC sem aditivos foi preparado e suas propriedades foram comparadas com as dos *scaffolds*.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 1 apresenta os difratogramas de raios X dos *scaffolds*, do CFC e do pó de β -TCP. A cura do cimento resultou, em todos os casos, em uma mistura de

monetita (CaHPO_4 , DCPA, JCPDS 9-0080), brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). De fato, analisando as micrografias da superfície de fratura das amostras (Figura 2) verifica-se a presença de agulhas que são as responsáveis pela resistência mecânica do material (monetita e brushita) e de partículas de fosfato de cálcio (β -TCP) que não reagiram. Além disso, observa-se que os métodos propostos não alteram a morfologia do material final em nenhum dos casos.

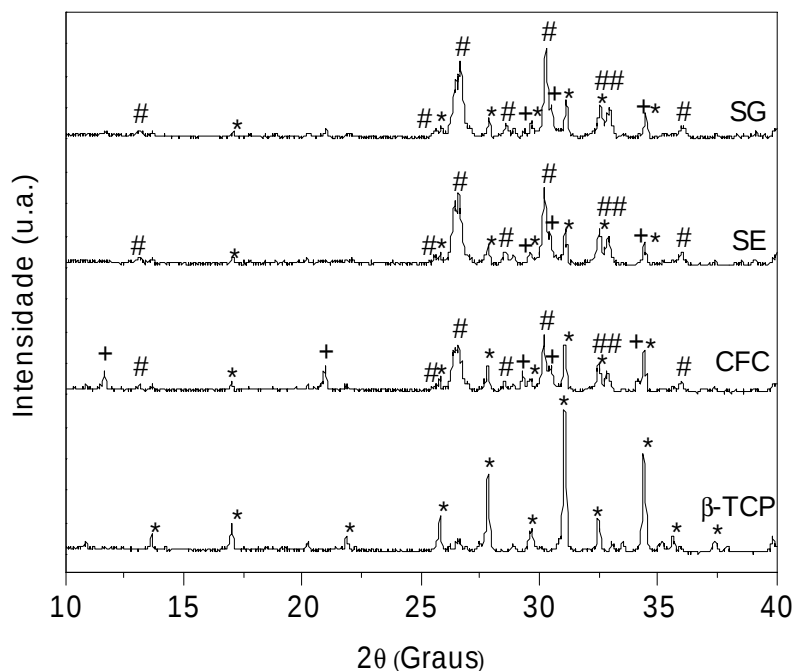


Figura 1 - Difratomogramas de raios X dos *scaffolds*, do CFC e do β -TCP. CFC: cimento de β -TCP; SE: *scaffolds* obtidos por emulsão; SG: *scaffolds* obtidos por *gelcasting*. Legenda: * - β -TCP, # DCPA, + DCPD.

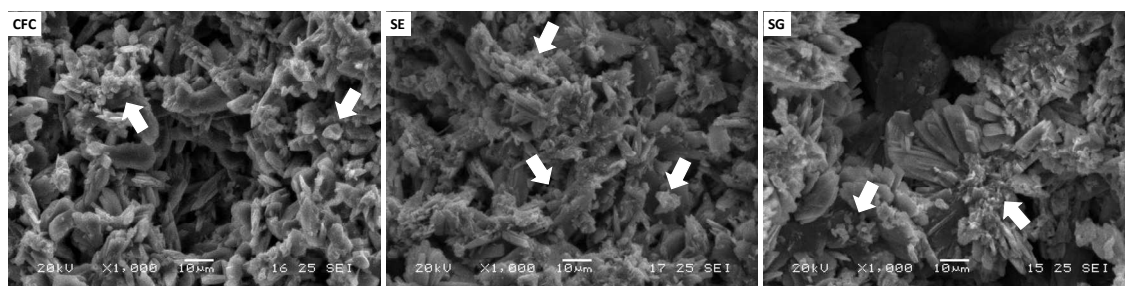


Figura 2 – Morfologia do cimento e dos *scaffolds* obtidos neste estudo. Setas brancas indicam partículas de β -TCP sem reagir.

Ambos os métodos foram eficientes em fabricar *scaffolds* com porosidade variando entre 60,3-64,3% (Tabela 2). Quando comparados com o cimento de fosfato de cálcio, observa-se um aumento de 9% e 15% na porosidade das amostras preparadas pelo método de emulsão e *gelcasting*, respectivamente. Após análise ANOVA dos resultados obtidos, pode-se afirmar com 95% de certeza que o método de *gelcasting* é o que garante maior porosidade às amostras uma vez que o valor p encontrado foi igual a zero.

Tabela 2 - Porosidade aparente das amostras. As amostras são estatisticamente diferentes. (ANOVA, $p = 0$).

Porosidade aparente (%)		
CFC	SE	SG
55,7 ± 0,8	60,3 ± 0,9	64,3 ± 1,9

A porosidade dos *scaffolds* e do cimento de β -TCP bem como a sua morfologia podem ser observadas na Figura 3. Para os *scaffolds* produzidos pelo método de emulsão nota-se uma distribuição homogênea de poros, os quais apresentam uma geometria que tende à esférica e tamanho médio de 100 μm (Figuras 3-b-1 a b-3). Enquanto que pelo método de *gelcasting*, observa-se também uma distribuição homogênea de poros, porém os poros apresentam um formato irregular e tamanho médio de 50 μm (Figuras 3-c-1 a c-3). Outra diferença entre os dois métodos é a presença de interconectividade dos poros. Pelo método de emulsão os poros se apresentaram de maneira isolada enquanto que pelo método de *gelcasting* observa-se uma certa conectividade entre os poros.

É importante observar que os cimentos de fosfato de cálcio são materiais que apresentam elevada porosidade (aproximadamente 50%); entretanto o tamanho de poros é extremamente pequeno (aproximadamente 1 μm) não permitindo a migração e a adesão celular. Dessa forma, além dos métodos propostos terem elevado o teor de porosidade, os tamanhos de poros obtidos são relevantes para a reabsorção do material *in vivo*.

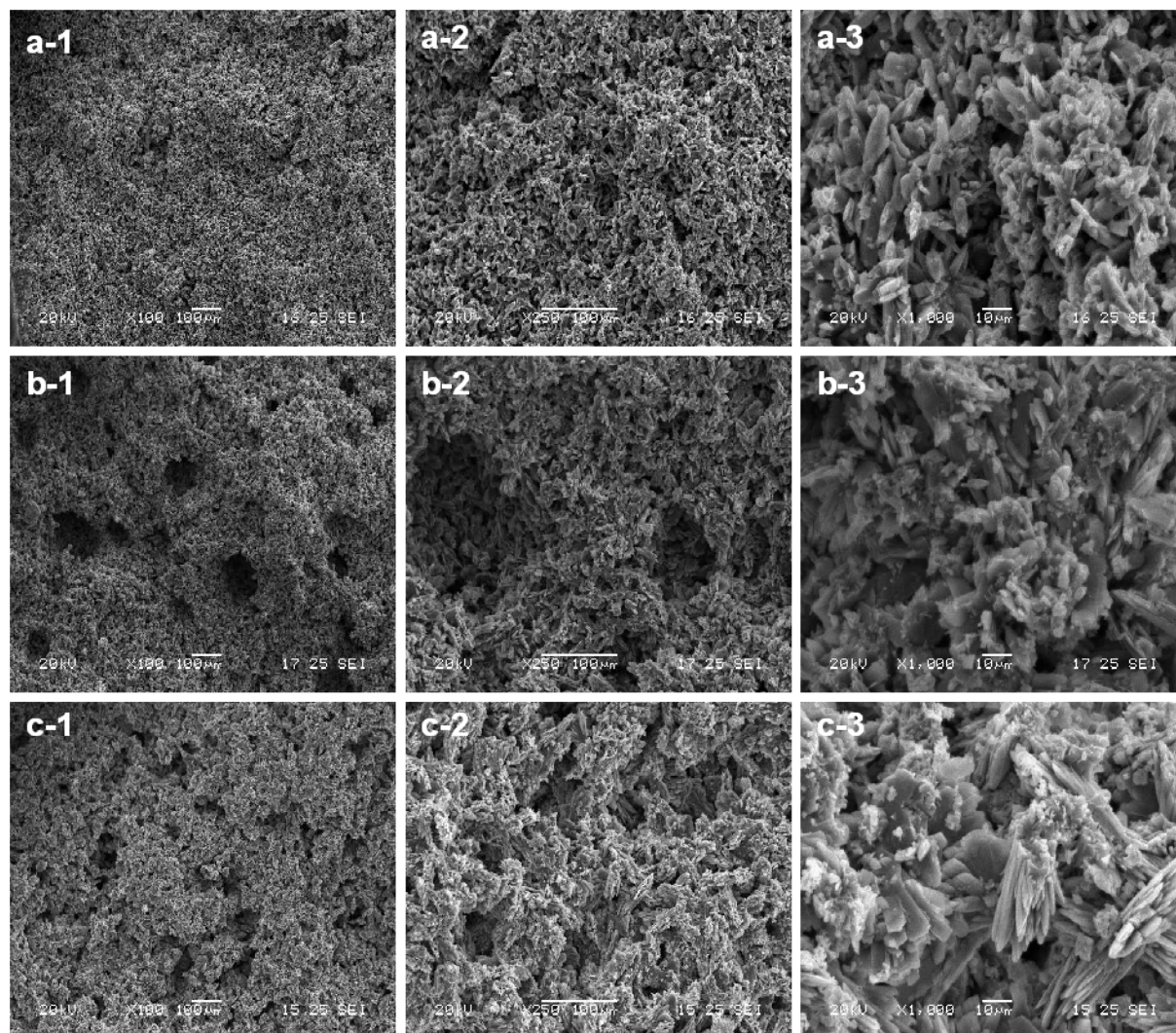


Figura 3 - Micrografias de superfície de fratura das amostras: a) CFC; b) SE e c) SG.

Como esperado, o aumento na porosidade das amostras refletiu na resistência mecânica dos *scaffolds*, conforme mostra a Figura 4. Observa-se uma queda de 35% e 75% na resistência mecânica quando a porosidade apresenta um incremento de 9% (SE) e 15% (SG), respectivamente. De fato, após teste estatístico ANOVA, é possível afirmar com 95% de chance ($p=0,000$) que as amostras são estatisticamente diferentes. Uma vez que estes materiais são fabricados para serem utilizados como substitutos ósseos, é importante levar em consideração a resistência à compressão do osso humano: cortical (100 e 230 MPa) e esponjoso (2 e 12 MPa) ⁽¹⁴⁾. Portanto, a aplicação dos SCFC fica restrita a situações onde elevadas cargas não são solicitadas.

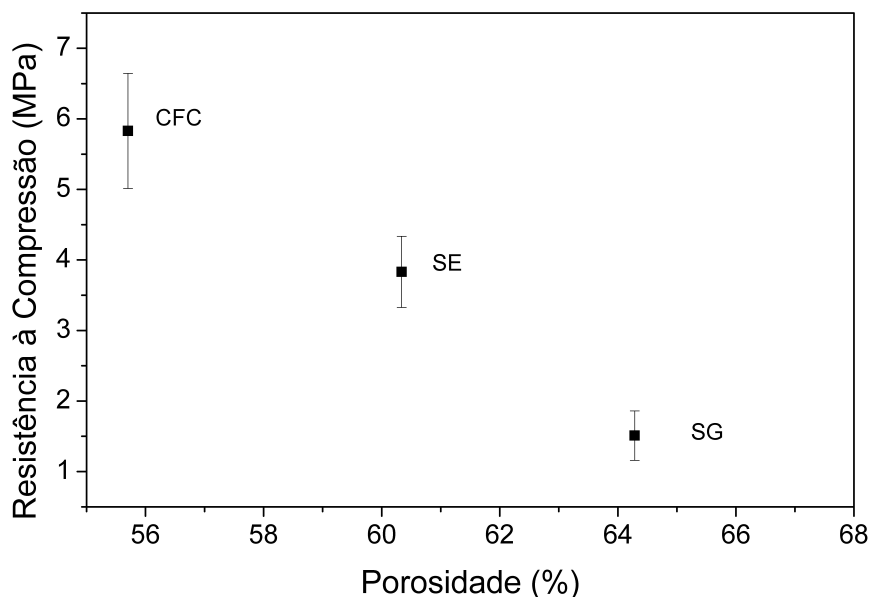


Figura 4 - Resistência à compressão dos *scaffolds* de cimento de fosfato de cálcio em função da porosidade.

CONCLUSÕES

Scaffolds de cimento à base de fosfato de cálcio foram obtidos com sucesso por meio das rotas de processamento propostas, emulsão e *gelcasting*. A porosidade dos *scaffolds* variou numa faixa de 61-65% e a resistência mecânica variou entre 3,83-1,51 MPa. Apesar de se ter tido uma brusca redução na resistência mecânica dos *scaffolds*, os valores obtidos ainda estão dentro da faixa referente ao osso esponjoso podendo ser aplicados na Engenharia Tecidual.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela utilização do microscópio eletrônico de varredura e ao Prof. Dr. Sergio Frascino Muller de Almeida pelo auxílio na realização dos ensaios mecânicos.

REFERÊNCIAS

1. DOROZHUKIN, S.V. Calcium orthophosphate cements and concretes. *Materials*, v.2, p.221-291, 2009.
2. GINEBRA, M.P.; ESPANOL, M.; MONTUFAR, E.B.; PEREZ, R.A.; MESTRES, G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomater.*, v.6, p.2863–2873, 2010.
3. BOHNER, M.; GBURECK, U.; BARRALET, J.E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*, v.26, p.6423–6429, 2005.
4. RAMAY, H.R.; ZHANG, M. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials*, v.24 p.3293-3302, 2003.
5. MONTANARO, L.; JORAND, Y.; FANTOZZI, G.; NEGRO, A. ceramic foams by powder processing, *J. Eur. Ceram. Soc.*, v.18, p.1339-1350, 1998.
6. SAGGIO-WOYANSKY, J.; SCOTT, C.E.; MINNEAR, W.P. Processing of porous ceramics. *Am. Ceram. Soc. Bull.* v.71, p.1674-1681, 1992.
7. SEPULVEDA, P. Gelcasting foams for porous ceramics, *J. Am. Ceram. Soc.*, v.76, p.61-65, 1997.
8. SOUSA, E.; DELLÚ JÚNIOR, M.; PANDOLFELLI, V.C.; ORTEGA, F.S. Production of cellular ceramics by gel casting ceramic emulsions. *Mater. Sci. Forum*, v. 498, p.591-593, 2008.
9. LEAL-CALDERON, F.; SCHMITT, V.; BIBETTE, J. *Emulsion science: basic principles*. New York: Springer, 2007.
10. JANNEY, M.A.; OMATETE, O.O. Method for moulding ceramic powders using water-based gel casting”, US Patent 5028362, 1991.
11. YOUNG, A.C.; OMATETE, O.O.; JANNEY, M.A.; MENCHHOFER, P.A. Gelcasting of alumina. *J. Am. Ceram. Soc.* v.74, p.612-618, 1991.
12. GINEBRA, M.P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL, J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J. Contr. Rel.*, v.113, p.102–110, 2006.
13. BOHNER, M.; MERKLE, H. P; VAN LANDUYT, P.; Trophard, G.; Lemaitre, J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v.11, p.111-116, 2000.
14. HENCH, L.L; WILSON, J. *An introduction to bioceramics*. Singapore: World Scientific, 1993.

FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF CALCIUM PHOSPHATE CEMENT SCAFFOLDS

ABSTRACT

In Tissue Engineering, the need for scaffolds which are capable of guiding the organization, differentiation and growth of cells leading to the formation of new tissues is highly relevant. For the development of new scaffolds focused on bone tissue therapy, calcium phosphate cements (CPC) have great potential, because besides their resorbability, they present morphology and chemical composition similar to the bone mineral phase. Moreover, there are several processing techniques to produce ceramic scaffolds: polymeric sponge replication, incorporation of organic material into the ceramic powder, gelcasting, emulsion, among others. The aim of this work was to obtain CPCs scaffolds by using two techniques, emulsion and gelcasting. The scaffolds were characterized by their physical and mechanical properties and the crystalline phases formed after the setting reaction of cement were determined by X-ray diffraction. The samples obtained by both methods presented porosity between 61-65% and the microstructure consists of nearly spherical pores ($d_{50} = 50-100 \mu\text{m}$). The mechanical strength of the samples ranged from 5.5 to 1.5 MPa. The crystalline phases found were monetite (CaHPO_4) and brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Key-words: Calcium phosphate cement, emulsion, gelcasting, scaffolds.