

PREPARAÇÃO DE *SCAFOLDS* CONSTITUIDOS POR HIDROXIAPATITA DISPERSA EM BIOVIDRO

Silva, A. C.^{1,2}, Aparecida. A. H.^{1,3}, Setz L.F.G.², Santos, S.C.²,
Mello-Castanho, S.R.H.², Braga, F. J. C.²

¹Consulmat Materiais de Referência, Soluções e Serviços.Ltda., São Carlos (SP), Brasil

²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo (SP), Brasil

³Instituto de Química de Araraquara – Unesp, Araraquara (SP), Brasil

dasilva.ac@uol.com.br

Resumo

A engenharia de tecidos constitui-se em uma nova e emergente tecnologia biomédica para a qual os biomateriais são indispensáveis para promover um ambiente que facilite a proliferação celular e a diferenciação para tecidos vivos no local do implante. Neste contexto os “scaffolds” assumem um papel muito interessante. A hidroxiapatita (HA) é um material de referência em enxertos ósseos, contudo suas baixas taxas de degradação e de bioatividade (Ib) constituem-se em fatores limitantes para o seu emprego como substituto ósseo. De forma oposta, o biovidro (BG) constitui-se em um material reabsorvível e com propriedades osteoindutivas o qual ainda pode atuar como fluxante para se obter compósitos HA/BG. O presente estudo objetiva o desenvolvimento de “scaffolds” constituídos por tais compósitos, buscando-se obter um biomaterial de alto desempenho na enxertia óssea e que facilite o crescimento de novos tecidos no local do implante. Neste intento utilizou-se hidroxiapatita sintética e uma modificação do biovidro 45S5 com 20% em massa de óxido de cálcio em sua composição. A proporção de HA/BG utilizada foi de 40/60 % em massa. Os scaffolds foram obtidos pelo método de réplica após estudos reológicos da suspensão, seguido de sinterização à 1100°C por 1h. A caracterização foi feita pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X e espectrometria do Infra-vermelho na transformada de Fourier. Os resultados obtidos indicaram o uso potencial deste material para aplicações tais como enxertia óssea e crescimento de novos tecidos no local do implante.

Palavras Chave: Scaffold; Biomateriais compostos; Hidroxiapatita; Biovidro.

1. Introdução

As biocerâmicas são desenvolvidas visando alcançar comportamentos fisiológicos específicos a partir da interação com o organismo vivo hospedeiro do implante. A enxertia óssea constitui-se em exemplo típico do uso de biocerâmicas. Neste caso, é desejável que tais materiais sejam reabsorvíveis pelo organismo hospedeiro, atuando como um material temporário, o qual gradualmente, por ação de processos fisiológicos sobre o implante, poderá ser substituído por novo tecido ósseo (1,2,3).

Utilizada nesse intento, a hidroxiapatita (HA), a qual trata-se de uma biocerâmica cuja composição baseia-se em fosfatos de cálcio, tem sido o principal material utilizado em aplicações tais como enxertia e/ou reposição óssea por sua não toxicidade local ou sistêmica, ausência de resposta inflamatória e demonstrar aparente

habilidade de integrar-se ao tecido hospedeiro. Contudo, a despeito destas interessantes propriedades na interação biológica com o hospedeiro, a HA apresenta baixo índice de bioatividade (Ib) e ainda, uma baixa taxa de degradação que juntos constituem em fatores limitantes deste material nas aplicações de substituição óssea (4).

De forma oposta à HA, os biovidros são materiais reabsorvíveis, que apresentam alto Ib e propriedade osteocondutiva, a qual viabiliza a interface intracelular-extracelular no tecido vivo, permitindo que sua superfície seja colonizada por células tronco quando implantado cirurgicamente.

A adequada combinação de ambos materiais, i.e., biovidro e hidroxiapatita em um compósito pode desta forma, permitir a obtenção de uma biocerâmica que reúna as características desejáveis observadas em cada material individualmente. Buscando obter um compósito que reúna a propriedade osteoindutiva com a osteocondutiva, os autores em trabalhos anteriores ⁽⁵⁾, verificaram uma proporção otimizada entre HA/Biovidro de 40/60 % em massa, sendo que nesta composição, a HA sintética apresentou vantagens sobre a bovina, em aspectos tais como comportamento de sinterização e degradação do material. Em pesquisa posterior ⁽⁶⁾ os autores modificaram o biovidro de Hance (45S5) com respeito ao seu teor de CaO em forma proporcional ao teor de P₂O₅ conseguindo deste modo para o biovidro modificado com 20% de CaO em massa, reduzir sua temperatura de fusão sem, contudo comprometer a bioatividade deste, obtendo-se assim um compósito com melhor interação entre a fase vítrea e a fase composta pela HA, o qual apresentou bioatividade quando emersa em fluidos corpóreos simulados (SBF).

Considerando a aplicação do compósito HA/Biovidro em enxertia óssea e as vantagens na indução do crescimento de novos tecidos proporcionada pelo uso de “scaffolds”, o presente trabalho objetiva o estudo reológico deste material, visando facilitar seu processamento cerâmico e especialmente, produzir “scaffolds” pelo método de réplica.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção do compósito Hidroxiapatita/biovidro

Foi utilizada uma composição de biovidro 45S5 modificado contendo menor teor de CaO, i.e, contendo 50,29% em massa de SiO₂; 26,05% em massa de Na₂O; 19,08% em massa de CaO e 4,58% em massa de P₂O₅. O biovidro foi preparado utilizando-se reagentes de grau analítico, sendo fundido em forno vertical à 1500°C durante 2 horas e a seguir vertido em molde de aço para obtenção de barras com 10x10x50 mm de dimensão. O recozimento foi realizado a 500°C durante 2 horas seguido de resfriamento natural no forno. Parte do material foi a seguir pulverizado ($\leq 250\mu\text{m}$).

A hidroxiapatita sintética (Ca₂(PO₄)₃OH) de alta pureza (99 wt%) para uso em implantes ósseos utilizada, foi gentilmente cedida pela empresa Critéria Ltda.

As matérias-primas foram pulverizadas (60 mesh - $\leq 250\mu\text{m}$) e formuladas na proporção HA/Biovidro 40/60 % em massa e homogeneizadas em graal de ágata.

2.2. Preparação da suspensão

As suspensões resultantes da combinação dos pós de hidroxiapatita e biovidro, foram preparadas utilizando-se água deionizada com concentrações de sólidos de 50% em massa e Duramax D-3005 (poliacrilato de amônia, Rohm and Haas Co., EUA) como dispersante, na concentração de 4% em massa. As suspensões foram homogeneizadas durante 24 horas, em moinho de bolas utilizando esferas de alumina como elementos de moagem. Após o preparo das suspensões adicionou-se 2%, em massa, de carboximetilcelulose (CMC, Synth, Brasil) de maneira a favorecer a adesão

das suspensões nas matrizes utilizadas. A reologia foi avaliada utilizando-se um reômetro (Haake RS600, Thermo, Alemanha) operando no modo de velocidade controlada (*Control Rate* - CR). Utilizou-se como sensor um rotor duplo cone o qual é protegido por dispositivo tampa-placa para minimizar problemas de evaporação, correspondendo a um sistema de medição do tipo Searle.

O comportamento reológico das suspensões foi determinado pelas curvas de fluxo executadas no modo de velocidade controlada (CR), elevando-se a velocidade de cisalhamento de 0 a 1000 s^{-1} em 300 segundos, mantendo-se a 1000 s^{-1} por 120 segundos e retornando a 0 s^{-1} em 300 segundos. A temperatura foi mantida constante a 25°C durante todos os experimentos. Todos os parâmetros reológicos, como os valores de tixotropia e os ajustes dos modelos matemáticos adequados, foram extraídos a partir das curvas de fluxo das suspensões produzidas utilizando-se o software Haake RheoWin 3.61.0004.

As suspensões preparadas e ensaiadas, adicionadas de CMC, foram conformadas pela técnica de réplica utilizando matrizes hidrofílicas de fio de algodão e Nylon na forma de redes. As amostras conformadas foram secas por 48 horas em temperatura ambiente.

2.3. Calcinação e sinterização

As redes impregnadas foram submetidas à calcinação para eliminação da matéria orgânica até a temperatura de 500°C , com taxa de aquecimento de $1^\circ\text{C}/\text{min}$, e patamares de 6 horas à cada 10°C entre 200°C e 300°C .

A sinterização foi realizada sobre uma base de alumina em forno tipo mufla com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até 1100°C , com permanência de 2 horas, seguida de resfriamento natural no forno.

2.4. Caracterização dos compósitos

Os compósitos foram caracterizados utilizando-se as técnicas de difração de raios-X (DRX) para amostras pulverizadas (Bruker AXS D8 Advance, USA). As medidas do espectro infravermelho na transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas utilizando-se amostras pulverizadas (Thermo Nicolet - Nexus 870 *FT-IR spectrometer*). A microscopia eletrônica de varredura foi realizada utilizando-se o equipamento Hitachi T3000. Os compósitos também foram submetido ao teste de fluidos corporais simulados (SBF - *Simulated Body Fluid*) durante 72 horas à 38°C .

3. Resultados e discussão

Os difratogramas do compósito HA/biovidro das amostras a verde e sinterizada são mostrados na Fig.01. Nestes difratogramas é possível observar picos característicos de materiais cristalinos, os quais indicam que a temperatura e tempo de sinterização ($1100^\circ\text{C}/1\text{h}$) foram suficientes para a evolução de fases cristalinas. Tais fases cristalinas observadas após o tratamento térmico indicam que houve a decomposição da hidroxiapatita com a formação de β -TCP, e também um possível início de devitrificação do biovidro. Tal fato é de interesse, pois o β -TCP vem adquirindo destaque entre os biomateriais devido ao seu comportamento reabsorvível quando implantado. O uso de β -TCP combinado com HA tem sido uma alternativa viável para acelerar a assimilação de implantes⁽⁴⁾.

Os espectros obtidos pela técnica de FTIR do compósito HA/biovidro das amostras a verde e sinterizada são mostrados na Fig.02. As mudanças estruturais verificadas na difração de raios-X não puderam ser comprovadas por esta técnica, a

qual, aparentemente não indica rearranjos estruturais com o tratamento térmico, com exceção da eliminação da água estrutural.

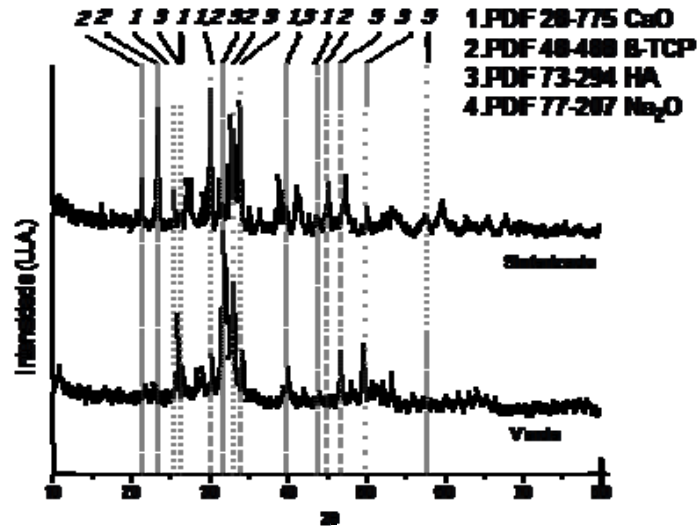


Figura 01 - Difratomogramas do composto HA/biovidro a verde e após sinterização.

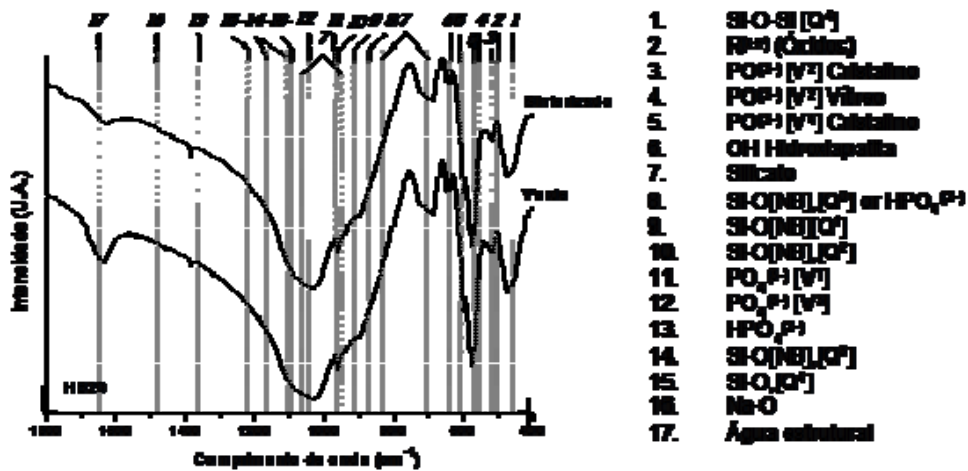


Figura 02 - Espectros obtidos pela técnica FTIR do composto HA/biovidro a verde e após sinterização.

Na Fig.03 são apresentadas as curvas de fluxo das suspensões da mistura de hidroxiapatita e biovidro e da mesma suspensão adicionada do CMC. Nestas curvas podemos observar um comportamento marcadamente linear da suspensão sem o CMC, sem significativas diferenças entre as curvas de subida e descida, ou seja, com tixotropia praticamente desprezível, por outro lado a curva obtida para a suspensão contendo CMC, apresenta uma grande diferença entre as curvas de subida e descida. Esta curva pôde ser ajustada pelo modelo de Cross, que fornece informações importantes em diversas condições de processamento desde o repouso até alto cisalhamento (7, 8). Neste caso, os parâmetros importantes extraídos foram: $\eta_0=1962,0$ mPa.s e $\eta_\infty=85,2$ mPa.s, ou seja, as viscosidades próximas ao repouso e em alto cisalhamento (limite), respectivamente.

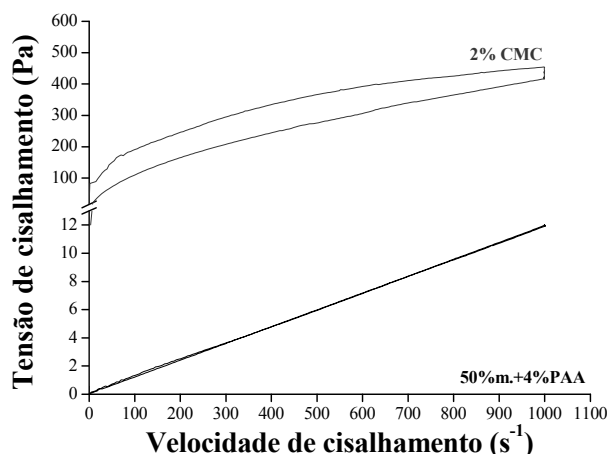


Figura 03 - Curvas de fluxo para suspensões da mistura a verde HA/biovidro com e sem CMC, obtidas no modo CR.

Observando-se a curva contendo CMC é possível observar uma grande diferença na resistência ao fluxo em relação à suspensão sem CMC. Este comportamento é fruto da propriedade espessante do aditivo, o qual também contribui para a inserção de um ponto de fluidez (ou limite de escoamento), ou seja, para que a suspensão inicie a fluir, é necessário superar determinado valor de tensão, neste caso ~ 50 Pa, observado diretamente na curva obtida. A curva contendo CMC pôde ser ajustada de acordo com o modelo Windhab cujos parâmetros importantes extraídos foram: $\tau_0=74,3$ Pa e $\eta_\infty=154,0$ mPa.s, respectivamente ponto de fluidez e viscosidade limite. O ponto de fluidez, apresentou um diferença do observado na curva, pois trata-se de um ajuste matemático, porém em nada interfere no processo. Neste caso confirma-se sua existência.

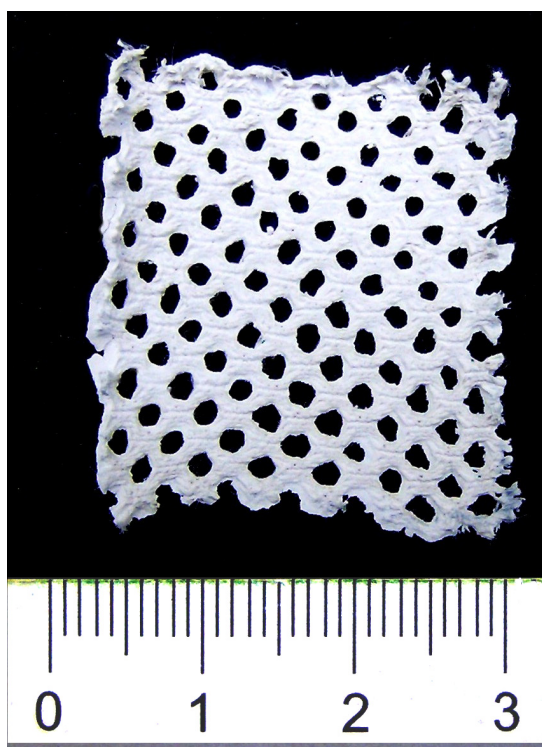


Figura 04 - Matriz impregnada com a solução HA/Biovidro/CMC

O valor da tixotropia encontrado na suspensão contendo CMC ($80.320 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$), associado com a compatibilidade superficial entre suspensão e matriz, é adequado à conformação de réplicas, uma vez que permite uma boa retenção da camada depositada (9). Desta maneira, as suspensões foram impregnadas nas matrizes e secas (Fig.04).

Durante a sinterização ocorreu forte contração da matriz com a eliminação da matéria orgânica, notadamente entre 350 e 400°C , o que provocou a fragmentação da peça original. Contudo os fragmentos após sinterização apresentaram interessante porosidade para o uso como "scaffold" para enxertia óssea (Fig.05). Este resultado indica a necessidade do uso de um aditivo que forme fase líquida neste intervalo de temperatura e assim mantenha a coerência da fase cerâmica. Tal aditivo pode ser eventualmente uma modificação de biovidro.

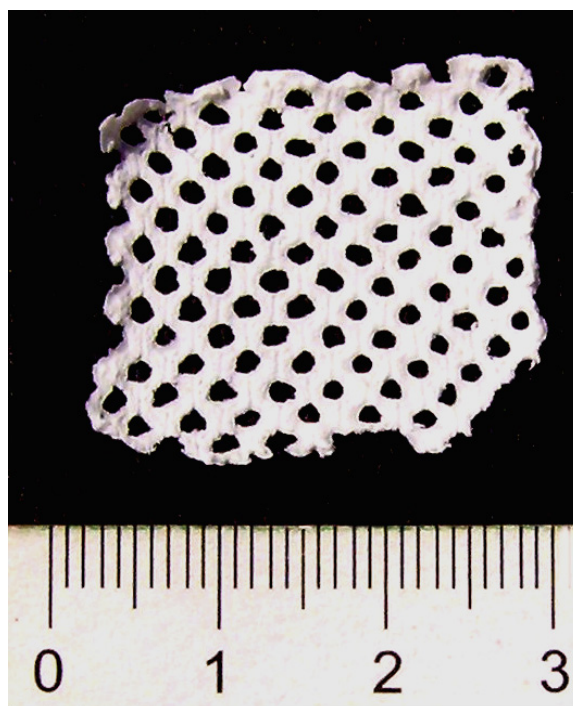


Figura 05 - Matriz impregnada com a solução HA/Biovidro/CMC após a sinterização

Os compósitos sinterizados foram submetidos à imersão em SBF durante 72 horas à 38°C . Findado este período o material foi seco e observado por meio de microscopia eletrônica de varredura. Foi observada a formação nítida de recobrimento de cristais na superfície do material em forma de agulhas (Fig.06).

O crescimento destes cristais orientados perpendicularmente semelhante a agulhas está associado à formação da fase fosfato octacálcico (OCP) ⁽¹⁰⁾, uma importante fase precursora da HA. A utilização de OCP como biomaterial vem crescendo acentuadamente, pois estudos ⁽¹¹⁾ revelam que este composto apresenta as propriedades de facilitador da proliferação celular e osteocondutividade mais acentuadas que da HA. Tais resultados comprovam a pronta bioatividade do material proposto.

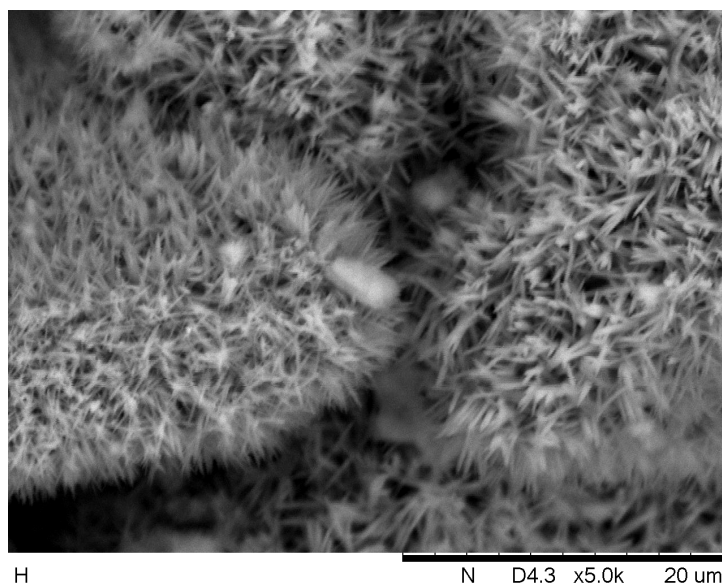


Figura 06 - Formação cristalina na superfície do material sinterizado após imersão em SBF (72h/38°C), possivelmente indicando bioatividade do mesmo.

4. Conclusões

Foi demonstrada a possibilidade de produção de "Scaffolds" para uso em enxertia óssea constituídos de compósitos de hidroxiapatita e biovidro modificado (44/60 % em massa respectivamente) pelo método de réplica à partir de suspensões deste material. A produção de réplicas a partir de suspensões combinadas de hidroxiapatita e biovidro é possível adicionando-se carboximetilcelulose na composição. A degradação da hidroxiapatita durante a sinterização e formação de uma fase desejável constituída por β -TCP (reabsorvível) foi indicada pelas análises por difração de raios-X, contudo conseqüentes alterações na estrutura do material não lograram ser observadas pela espectrometria no infra-vermelho. A fragmentação de peças durante a sinterização demonstra demanda aperfeiçoamento do processo de queima e uso de aditivo. Os ensaios em fluido corporal simulado indicaram a formação de fosfato octacálcico (OCP) (XXX), uma importante fase promotora da proliferação celular e osteocondutividade na superfície dos "Scaffolds" obtidos são também potencialmente reabsorvíveis após implante cirúrgico, levando à combinação das propriedades osteoindutiva e osteocondutiva de cada material empregado no compósito (hidroxiapatita e biovidro).

Agradecimentos

Os autores agradecem às bolsas e ao suporte financeiro da Capes/Finep projeto PNPd/FINEP n.º 2462095 e à Fapesp, projeto: 96/09604-9, 99/01924-2 & 0002483-9.

Referências

1. HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. **J. Am. Ceram. Soc.** v.74, p.1,487 1991.
2. HENCH, L.L. WILSON, J. An introduction to bioceramics, in: Advanced Series in Ceramics, vol I, World Scientific, London, 1993.
3. HENCH, L.L. CAO, W. Bioactive Materials, **J. Ceram. Int.** v.22, p. 493,1996.
4. GUASTALDI, A.C. APARECIDA, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico:

importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v.33, p. 1352, 2010.

5. LI, D. YANG, M.X. MURALIDHA, WUB, C. YANG, F. Local surface damage and material dissolution in 45S5 bioactive glass: Effect of the contact deformation **J. Non-Cryst. Solids**, v.355, p. 874, 2009.

6. SILVA, A. C., et al - dispersed hydroxyapatite and modified bioglass 45S5 composites: sintering behavior of glass matrix ranging from 42 to 53 wt% in silica investigation – anais de congresso – 7º COLAB – Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – 22 a 25 de Agosto de 2012 – Natal – Brasil.

7. MORENO, R. **Reología de Suspensiones Cerámicas**. 1ª ed. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2005.

8. SETZ, L.F.G., MELLO-CASTANHO, S.R.H. **Processamento Coloidal de Cromito de Lantânio**. in *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*. (Tese). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009.

9. SANTOS, S.C. **Processamento coloidal de componentes cerâmicos para queimadores de gás**. in *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*. (Dissertação) São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.

10. DEKKER, R. J. et al. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. **Biomaterials**, n. 26, p. 5231-5239, Sept. 2005.

10. IMAIZUMI, H. et al. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. **Calcified Tissue International**, v. 78, p. 45-54, Jan. 2006.

DISPERSED HYDROXYAPATITE IN MODIFIED 45S5 BIOGLASS COMPOSITES: SCAFOLDS PREPARATION

Abstract

Tissue engineering is a newly emerging biomedical technology where it is indispensable to provide a local environment that enhances cells proliferation and differentiation for cell-based tissue. Biomaterial technology plays an important role in the creation of this cell environment. In this issue bioactive scaffolds plays very interesting role. The hydroxyapatite (HA) bioceramics are reference materials to employment as a bone substitute, however, their slow rate of degradation and its low rate of bioactivity (Ib) are presented as limiting factors for application as bone graft. In contrast, the bioglass (BG) is a resorbable and osteoinductive material and can act as fluxing in HA/BG composites. The present work objective the development of HA/BG (30/70 wt%) composites scaffolds, seeking to obtain a biomaterial with properties suitable for application as bone grafts. The scaffolds are obtained by replica method, after suspensions rheological studies and sinterized at 1100°C by 1h. The composites scaffolds characterization was made employing scanning electron microscopy, Infra-Red Spectrometry and X-ray diffraction. The test results indicate the potential use of the materials developed for applications such as bone graft and cells proliferation.

Key words: Scaffold; Composite biomaterial; Hydroxyapatite; Bioglass.