

EVOLUÇÃO DO pH E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE DOIS CIMENTOS BASEADOS NO SISTEMA [ALFA]-FOSFATO TRICÁLCICO

Hugo A. I. Cardoso^{1,2}, Mariana Motisuke^{1,2}, Andrea C. D. Rodas³, Olga Z. Higa³, Cecilia A. C. Zavaglia^{1,2}

¹LABIOMECC, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), Brasil

²Instituto de Biofabricação – INCT – Biofabris

³Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil
E-mail: hugocardos@fem.unicamp.br

Resumo. *Dentre os biomateriais aplicados como substitutos ósseos, os baseados nos fosfatos de cálcio tem revolucionado tanto a ortopedia quanto a odontologia atuais o reparo de partes danificadas. Um modo de aplicação é na forma de cimentos, que apresentam uma série de atrativos, como excelente biocompatibilidade e bioatividade, além do endurecimento "in situ", adequando-se a pequenas cavidades sem a necessidade de dar formas a elas. Entre os cimentos de fosfato de cálcio, o baseado no sistema alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) tem despertado bastante interesse, devido à sua biorreabsorvibilidade e conversão em hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), material com estrutura muito similar à fase mineral óssea. O objetivo deste trabalho foi analisar a evolução do pH e avaliar a citotoxicidade de dois cimentos de fosfato de cálcio após sete dias de reação: um sem aditivos e outro com Na_2HPO_4 e ácido cítrico como aditivos no líquido. As variações no pH foram medidas em intervalos de 12h durante os sete dias de reação; entretanto, nas primeiras horas de reação o espaçamento entre as medições de pH foi mais curto, chegando a ser de 15 minutos na primeira hora de reação. O teste de citotoxicidade foi realizado segundo a Norma ISO (10993-5, 1992): Biological evaluation of medical devices – Part5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. O cimento sem aditivos apresentou mudanças mais bruscas no pH, chegando próximo a 11, e não estabilizou-se mesmo após 7 dias de reação, enquanto que o cimento com aditivos teve seu pH estabilizado no período avaliado. Quanto à citotoxicidade, o cimento com aditivos não foi citotóxico e o sem aditivos apresentou citotoxicidade com concentração do extrato de 100%. O cimento sem aditivos não apresentou características apropriadas para aplicação como biomaterial*

Palavras-chave: *Biocerâmicas, Cimentos de Fosfato de Cálcio, Citotoxicidade, pH*

1. INTRODUÇÃO

Desde épocas remotas, o homem tem estudado diversas alternativas para o reparo ou substituição de tecidos ósseos no corpo humano. As primeiras tentativas de implantação provavelmente datam de períodos pré-históricos. São várias as evidências de substituição de dentes, em virtude de sua fácil acessibilidade, de sua função nutricional e de seu papel social. Encontram-se vestígios também de tentativas cirúrgicas em esqueletos, principalmente nas civilizações que tinham como tradição mumificar seus mortos (Boch, et al., 2007).

Atualmente, diversos materiais tem sido estudados e/ou desenvolvidos para aplicação como substituto ósseo, desde tecidos ósseos retirados do próprio indivíduo (auto-enxertos) a materiais naturais ou sintéticos desenvolvidos em laboratório que sejam suportados pelo corpo humano durante o período para o qual foi projetado, os biomateriais.

Dentre os biomateriais aplicados como substitutos ósseos, os baseados nos fosfatos de cálcio tem revolucionado tanto a ortopedia quanto a odontologia no reparo das partes danificadas. Podem ser aplicados na forma de blocos, mas uma das principais aplicações dos fosfatos de cálcio se dá na forma de cimentos.

Os cimentos de fosfato de cálcio tem despertado grande interesse em função de sua excelente biocompatibilidade e bioatividade, além de seu endurecimento “in situ”,

adequando-se a pequenas cavidades sem a necessidade de dar forma às mesmas. Eles são materiais bioativos e biodegradáveis aplicáveis como enxerto ósseo através da mistura de uma fase sólida na forma de pó com um líquido. Após misturadas, essas fases formam uma pasta viscosa a ser implantada, que tem sua reação de pega e endurece dentro do corpo na forma de CDHA (hidroxiapatita deficiente em cálcio) ou brushita, podendo ser posteriormente reabsorvidos pelo organismo (Bohner, 2000).

Dos cimentos de fosfato de cálcio, o baseado no sistema alfa-fosfato tricálcico (α -TCP) reúne diversas características interessantes, dentre as quais se destaca a biorreabsorbilidade. O produto final do cimento de α -TCP é a hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), material com estrutura muito similar à fase mineral óssea, utilizado pelo organismo na formação de tecido ósseo. Porém, a dificuldade na obtenção de α -TCP com pureza elevada tem sido reportada em literatura, devido a fatores como a presença de magnésio nos reagentes precursores, conhecido estabilizador da fase de beta-fosfato tricálcico (β -TCP) (Motisuke, et al., 2008; Enderle, et al., 2005; Carrodegua, et al., 2008).

Apesar de várias características atrativas, os cimentos de fosfato de cálcio tem seus usos limitados a aplicações de baixa carga, devido principalmente à sua baixa resistência mecânica, além da cinética lenta da reação de cura. O desenvolvimento de cimentos mais resistentes expandiria o uso desses materiais (Bohner, 2000).

Diversos tem sido os esforços a fim de se melhorar a resistência mecânica e acelerar a cinética desses materiais. Os cimentos de fosfato de cálcio tem sido modificados constantemente na busca de propriedades mais atrativas. Uma das alterações mais comuns que retorna resultados satisfatórios no aumento da resistência mecânica e aceleração da reação de pega é a utilização de aditivos na solução de pega.

Essa metodologia tem se mostrado eficaz na melhoria das propriedades dos cimentos de fosfato de cálcio, pela simplicidade e pelos bons resultados conseguidos. Alguns aditivos tem seu uso mais difundido, como o hidrogeno fosfato de sódio e o ácido cítrico. O hidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4), por exemplo, acelera a hidrólise do α -TCP e a formação da CDHA (Ginebra, et al., 1998), com um contínuo aumento da resistência mecânica durante toda a reação. O ácido cítrico tem efeito fluidificante, diminuindo a relação líquido/pó necessária e aumentando a resistência mecânica final do cimento (Sarda, et al., 2002). Porém, melhorias nas propriedades mecânicas e cinéticas do material não implicam em consequentes melhorias no desempenho biológico.

O objetivo principal deste trabalho é avaliar as alterações no pH e a biocompatibilidade de dois cimentos de fosfato de cálcio: um sem aditivos e o outro com hidrogenofosfato de sódio e ácido cítrico como aditivos no líquido. As alterações no pH serão avaliadas através de medições do pH em intervalos determinados durante 7 dias de reação, enquanto que a biocompatibilidade será avaliada por um método de citotoxicidade *in vitro* indireta dos dois cimentos após os mesmos 7 dias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho baseou-se no desenvolvimento das etapas e atividades descritas na Fig. 1.

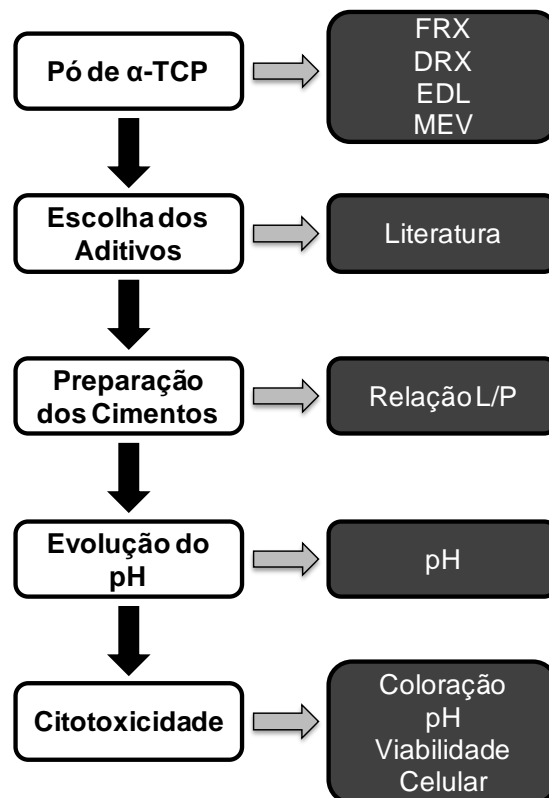
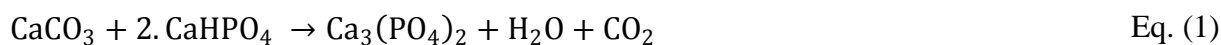


Figura 1: Organograma das atividades desenvolvidas no trabalho.

2.1 Pó de α -TCP

Os reagentes utilizados para a obtenção do α -TCP, tanto a Monetita (Hidrogenofosfato de Cálcio, CaHPO_4) quanto o Carbonato de Cálcio (CaCO_3), foram obtidos de acordo com Motisuke (Motisuke, et al., 2008).

O α -TCP foi obtido através de reação no estado sólido dos reagentes. Os reagentes foram misturados em proporções específicas, de acordo com a Eq. (1). Sendo então aquecidos até 1300°C numa taxa de 5°C por minuto e mantidos nesta temperatura num período de seis horas. Ao final do aquecimento, foram resfriados gradativamente até a temperatura ambiente ainda dentro do forno de sinterização.



Posteriormente, o pó de α -TCP obtido foi moído em moinho de bolas a seco durante dois dias, a fim de se chegar a uma distribuição granulométrica apropriada.

O pó de α -TCP foi caracterizado pelas seguintes técnicas: espalhamento dinâmico de luz (EDL), fluorescência de raios-X (FRX), difração de raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O EDL permite avaliar a distribuição granulométrica do pó. Essa caracterização é importante porque o tamanho das partículas precursoras do cimento influencia diretamente na relação líquido/pó. A FRX foi utilizada para determinar a presença de elementos traços, principalmente do magnésio, e de elementos possivelmente tóxicos no pó de α -TCP. O MEV permite avaliar a morfologia e a homogeneidade do pó. Já a DRX foi utilizada tanto na forma qualitativa como na forma quantitativa.

No método qualitativo, foi feita uma análise comparativa entre o difratograma obtido para o pó de α -TCP e os padrões JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) do α -

TCP (09-0348), do β -TCP (09-0169) e da CDHA, com mesmo padrão da HA, (09-0432). A fim de se verificar a pureza do α -TCP obtido, bem como nenhuma transformação prematura do pó em CDHA antes da preparação do cimento.

No método quantitativo, foi utilizado o método do padrão interno, com a utilização de alumina (Al_2O_3) para quantificação da porcentagem de β -TCP presente como impureza. Foram preparadas amostras com quantidades conhecidas de alumina e β -TCP, através da mistura dos pós em almofariz de ágata. Para cada uma das amostras preparada, foram feitas medidas de difração em picos característicos de β -TCP e CDHA, evitando interferência entre si e com o α -TCP. Para cada uma das difrações, foi feita uma aproximação pelo método de Lorentz e calculada a área de cada um desses picos. Com a relação entre as áreas, através de uma aproximação linear, foi levantada a reta de calibração em função da fração mássica de β -TCP em cada uma das amostras (Fig. 2).

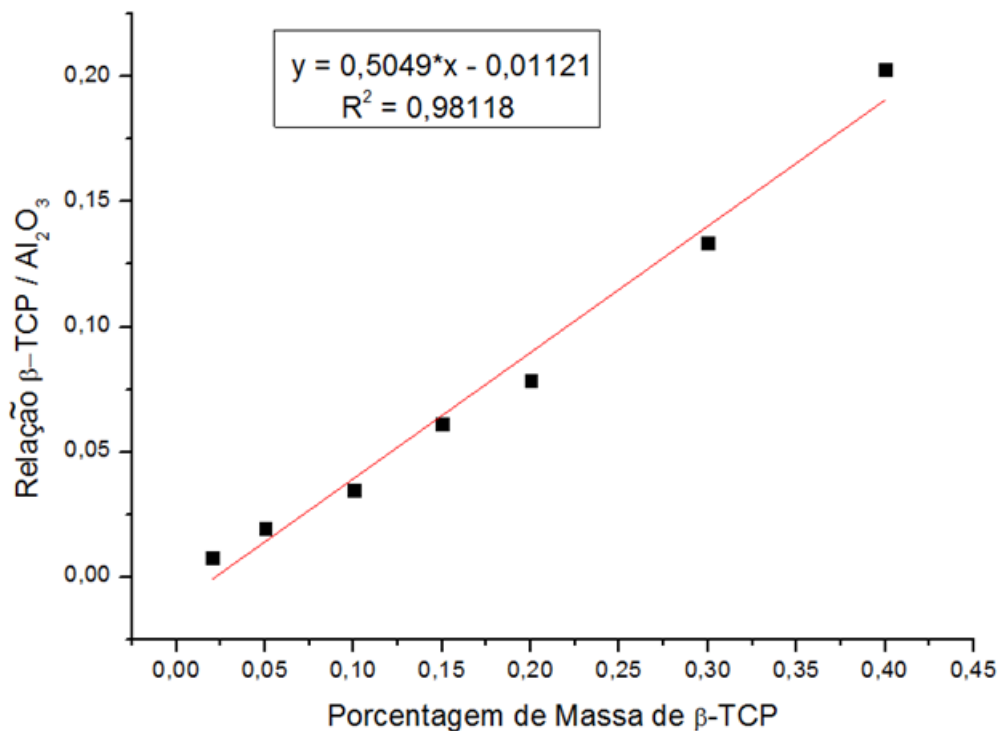


Figura 2: Reta de calibração para a DRX quantitativa.

Após o ajuste da reta, foi preparada uma amostra com quantidades conhecidas de alumina e do pó de α -TCP, sendo então medidos os mesmos picos utilizados no levantamento da reta. Com a relação entre a área dos mesmos, calculou-se a quantidade de β -TCP presente como impureza no pó de α -TCP.

2.2 Escolha dos Aditivos

Os aditivos utilizados neste trabalho foram escolhidos através de uma análise dos aditivos mais empregados na literatura. Decidiu-se pela utilização do Hidrogeno Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4) e do Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$). O Na_2HPO_4 e o ácido cítrico foram utilizados por serem aditivos com características específicas que otimizam as propriedades dos CFCs, como a aceleração da reação de pega e o aumento da resistência mecânica, respectivamente.

As soluções preparadas com as suas respectivas concentrações encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Soluções utilizadas e seus respectivos cimentos.

Solução	Aditivos (% de massa)	Cimento
S1	100% H ₂ O	CS1
S2	2,5% Na ₂ HPO ₄ + 1,5% C ₆ H ₈ O ₇ + 96% H ₂ O	CS2

Foram utilizadas essas soluções, pois muitos autores trabalham com o cimento preparado apenas com água deionizada (S1, sem aditivos) ou com a combinação de Na₂HPO₄ e ácido cítrico.

Os lotes e as marcas de cada aditivo podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2: Lotes e marcas dos aditivos utilizados.

Aditivo	Marca	Lote
Na ₂ HPO ₄	Synth	117366
C ₆ H ₈ O ₇	Synth	101707

2.3 Preparação dos Cimentos

O principal desafio na preparação dos cimentos foi a determinação de uma relação líquido/pó que não comprometesse o comportamento de nenhum dos dois cimentos. Os aditivos podem atuar reduzindo a quantidade de líquido necessária para a obtenção de uma pasta com viscosidade ideal para sua utilização como cimento. Os parâmetros utilizados foram manuais e visuais, procurando-se obter pastas coesas, porém não líquidas, possibilitando a moldagem dos corpos de prova.

A preparação do cimento se deu pela mistura das fases líquida e sólida durante um minuto. Após esse período, as pastas foram moldadas em moldes vazados de Teflon® com o auxílio de uma espátula. Passados 15 minutos (tempo necessário para que as pastas tivessem coesão suficiente para não se dissolverem quando imersas num líquido), os moldes foram imersos em solução de Ringer a 37°C.

Os moldes foram mantidos na horizontal durante todo o tempo de imersão em solução de Ringer, possibilitando que as duas faces dos corpos de prova estivessem em contato com a solução, permitindo um avanço simultâneo da reação pelas duas extremidades dos corpos de prova. Os corpos de prova obtidos foram cilindros de 6mm de diâmetro por 12mm de altura.

A solução de Ringer utilizada foi devidamente esterilizada em autoclave. As pastilhas utilizadas para a obtenção da solução de Ringer são da marca Oxoid, lote 15757201.

2.4 Evolução do pH

Para a análise do pH, 2g de pó de α -TCP foram imersos em 10mL de cada uma das duas soluções (S1 e S2) e armazenados em estufa a 37°C, sendo agitados periodicamente. As variações no pH foram medidas em intervalos de 12h durante os sete dias de reação. Entretanto, como se sabe que as variações mais bruscas no pH dos CFCs se dão nos instantes iniciais, nas primeiras horas de reação o espaçamento entre as medições de pH foi mais curto, chegando a ser de 15 minutos na primeira hora de reação. Além disso, foi medido o pH das quatro soluções utilizadas.

Este método para avaliar a evolução do pH é um método que simula a evolução do pH dentro do corpo humano, entretanto, em uma condição mais acelerada que a habitual, pois em vez de se utilizar o corpo de prova para as medidas, utiliza-se o material na forma de pó. Isso acontece devido à impossibilidade de se medir o pH com os corpos de prova, pois o pHmetro faz medidas em meios líquidos e não em sólidos. Foi utilizada uma relação líquido/pó muito maior do que a comumente empregada na preparação do cimento, a fim de se evitar o

endurecimento do corpo de prova, o que impossibilitaria a medição do pH durante a reação de cura.

No corpo humano, primeiro tem-se uma alteração provocada pela alteração do pH superficial, porém, como existem poros no material e o pó de α -TCP tem uma boa molhabilidade, o líquido penetra continuamente nos poros e através do pó, até que seja atingida uma condição de equilíbrio e a mudança de pH aconteça de uma forma geral devido a todo o material, e não apenas superficial. Enquanto que no teste de evolução do pH, admite-se uma condição de equilíbrio desde o início do teste, não levando em consideração o período inicial da reação onde tem-se, na realidade, o pH superficial.

Logo, a condição adotada simula a transformação de α -TCP em CDHA, porém de maneira mais acelerada, uma vez que a quantidade de água e a área superficial de pó disponível estão presentes em quantidades maiores. Porém, durante a cura in vivo, a quantidade de fluido presente é também maior que a empregada no preparo da amostra.

2.5 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado segundo a Norma ISO (10993-5, 1992): *Biological evaluation of medical devices – Part5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. O teste seguiu as seguintes especificações:

- Foi verificada a citotoxicidade dos cilindros de cimento α -fosfato tricálcico e medido o pH dos extratos após 48 horas de extração, com fita indicadora;
- Linhagem celular: células CHO – k1 (Chinese Ovary Hamster cells), provenientes da ATCC;
- Meio de cultura: meio RPMI 1640, fornecido pela Gibco, número no catálogo: 23400-013;
- Metodologia empregada: CellTiter96[®] AQueous Non – Radioactive Cell Proliferation Assay – Promega Corporation.

O teste de proliferação celular não radioativo é um método colorimétrico para determinação do número de células viáveis em testes proliferativos ou quimiossensíveis. O teste CellTiter96[®] AQueous é composto de soluções de um composto tetrazólico (3-(dimetilazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, sal inerte; MTS) e um reagente acoplador de elétrons (metasulfato de fenazida); PMS). O MTS é bio-reduzido pelas células a produto formazan que é solúvel no meio de cultura tecidual. A absorvância do formazan a 490 nm pode ser medida diretamente de placas de 96 poços sem adição de outros processos. A conversão do MTS em formazan solúvel aquoso, é executada pela enzima desidrogenase encontrada em células metabolicamente ativas. A quantidade do produto de formazan como medida da quantidade de absorvância a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.

As amostras foram embaladas e irradiadas a 25kGy para esterilização. Foi adicionado meio de cultura (RPMI-1640) sem soro na preparação dos extratos para uma concentração final de 1 cm²/mL. Após 48 horas a 37°C, o extrato de meio de cultura foi filtrado em filtro de acetato de celulose para seringa estéril, com poro 0,45 μ m (Corning), preparando-se diluições seriadas de 100% a 6,25% do extrato em meio RPMI estéril.

O controle positivo utilizado foi uma solução fenol a 0,5%. O controle negativo foi o extrato de PEAD (polietileno de alta densidade). O controle positivo é um material que, quando testado de acordo com a norma ISO 10993-5, promove resposta citotóxica. O controle negativo é um material que, quando testado de acordo com a norma ISO 10993-5, não promove resposta citotóxica. A propriedade avaliada foi o Índice de Citotoxicidade 50% (IC_{50(%)}), valor referente à concentração do extrato que mata 50% da população de células viáveis.

Foi avaliada também a alteração do pH do meio de cultivo utilizando-se fitas medidoras de pH, bem como uma análise colorimétrica visual do meio.

2.6 Equipamentos

Para a Difração de Raios-X foi utilizado um equipamento da marca Rigaku, modelo DMAX 2200, com radiação $\text{CuK}\alpha$, filtro de Ni, 20kV, 20mA. Foi utilizado passo de $0,02^\circ$ e tempo de integração de 2s (para as análises qualitativas) ou 5s (para as análises quantitativas).

O equipamento utilizado para as medidas de Fluorescência de Raios-X é da marca Rigaku, modelo RIX-3100. Foram realizadas análises semi-qualitativas.

Para a análise através de imagens o equipamento utilizado foi um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca JEOL, modelo JXA-840A. Os corpos de prova foram previamente metalizados com ouro através do equipamento Sputter Coater, marca BAL-TEC, modelo SCD 050.

As medidas de evolução do pH foram realizadas com um pHmetro microprocessado da marca Micronal, modelo B474.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Pó de α -TCP

A Tabela 3 apresenta o resultado da fluorescência de raios-X para os elementos minoritários presentes no pó de α -TCP. São poucos os elementos minoritários presentes no pó de α -TCP utilizado, e nenhum deles em quantidade superior a 850ppm. E, ainda assim, os elementos em maiores quantidades não são prejudiciais à biocompatibilidade e biofuncionalidade do material.

Tabela 3: Fluorescência de raios-X dos elementos minoritários no pó de α -TCP.

Elemento	% em massa
Si	0,0850
Fe	0,0598
Sr	0,0094

A Fig. 3 apresenta o difratograma de raios-X do α -TCP. Nota-se que o pó utilizado é constituído basicamente de α -TCP como fase principal, apresentando a presença de uma pequena quantidade de β -TCP como fase indesejada, como se pode observar através do pico de β -TCP próximo a $27,5^\circ$. No entanto, não se verifica a presença de nenhuma outra interferência nos picos do difratograma de raios X (sobreposição de picos de β -TCP e de α -TCP), indicando que a quantidade de β -TCP presente é relativamente baixa e não irá influenciar de maneira significativa na reação de cura do cimento. Uma grande quantidade de β -TCP como contaminante não é desejável, uma vez que este não participa da reação de cura (é praticamente insolúvel em água ou solução aquosa) e levando assim a menores valores para a resistência mecânica e a uma cinética da reação possivelmente mais lenta.

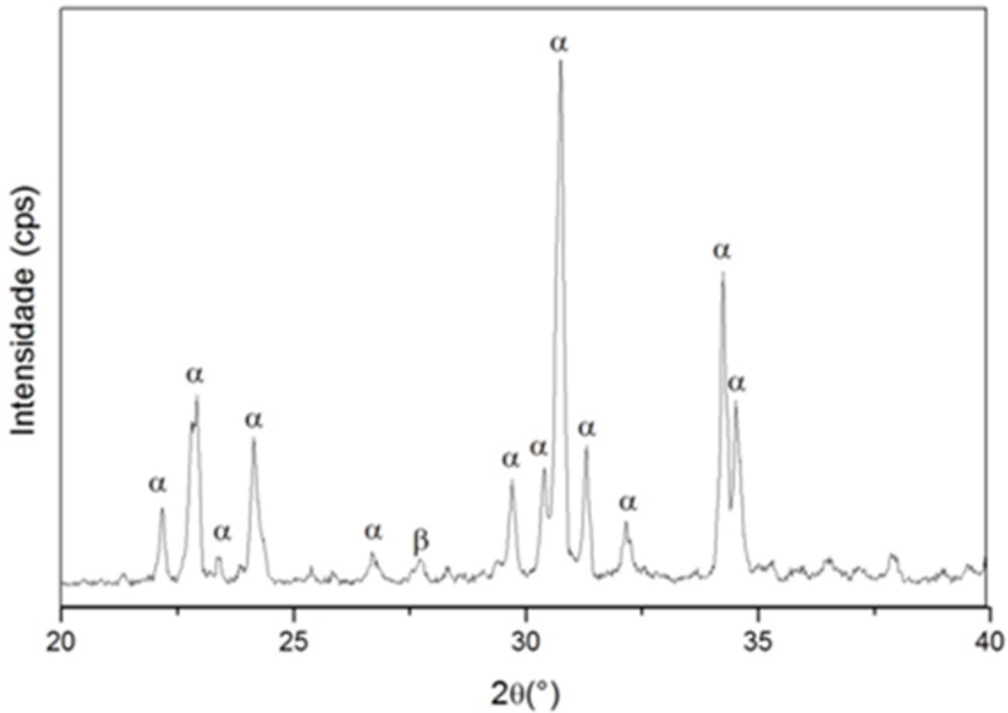


Figura 3: Difratoograma de raios-X do pó de α -TCP.

A análise da difração de raios-X quantitativa, porém, revelou uma quantidade de 11% de β -TCP como impureza no pó de α -TCP, atendendo aos objetivos propostos e adequando-se ao trabalho.

Após dois dias de moagem a seco em moinho de bolas, a distribuição granulométrica obtida está mostrada na Fig. 4. Os valores para tamanho médio e faixa de distribuição podem ser observados na Tabela 4.

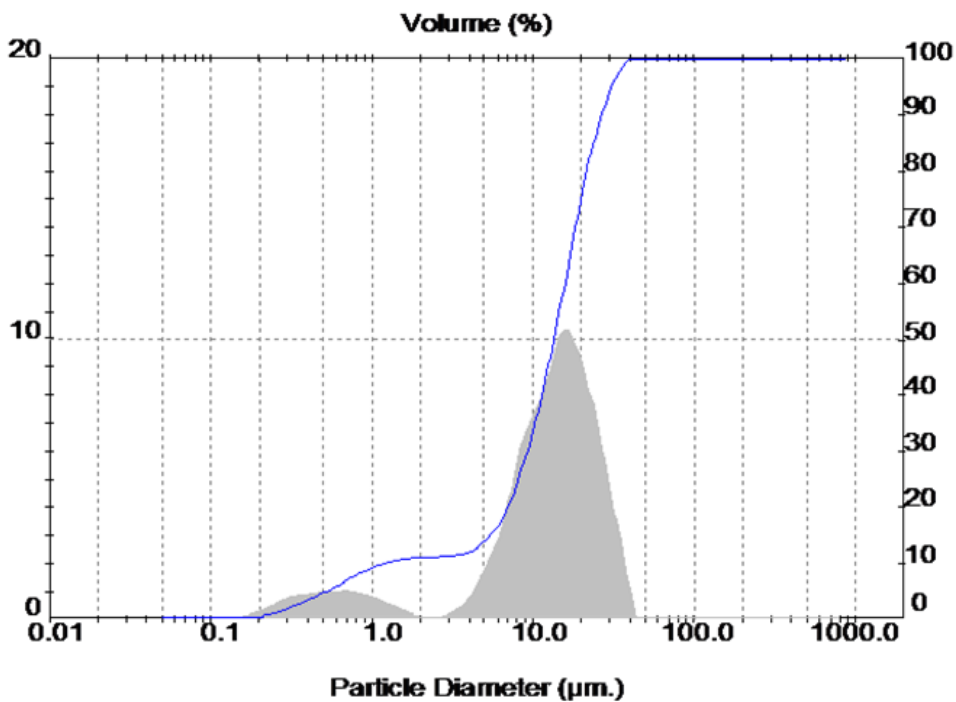


Figura 4: Distribuição granulométrica do pó de α -TCP.

Tabela 4: Parâmetros de tamanho de partícula.

	D(10) μm	D(90) μm	Tamanho médio (μm)
α -TCP	1,19	26,41	14,25

Tanto o tamanho médio de partícula como a faixa de distribuição são maiores que os reportados em literatura (Ginebra, et al., 2004; Santos, 2002), o que pode influenciar diretamente na relação líquido/pó. Pode-se observar uma distribuição bimodal do tamanho de partícula, com dois picos: um menor entre 0,2 μm e 1,1 μm (apenas cerca de 10% do total da amostra) e outro maior entre 1,2 μm e 10,3 μm aproximadamente. Na literatura, a distribuição geralmente é bimodal, porém o primeiro pico é mais expressivo que o segundo.

Na Fig. 5, através da microscopia eletrônica de varredura, pode-se observar o formato das partículas do pó utilizado. As partículas não foram dispersas, a análise foi feita com o pó da forma que o mesmo será utilizado para a preparação do cimento.

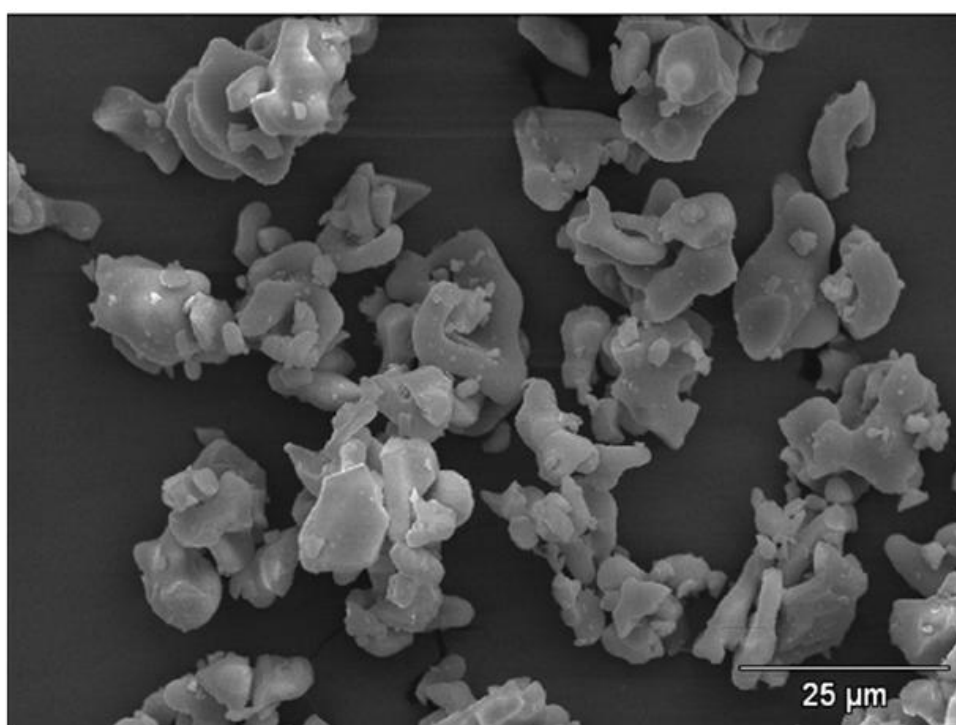


Figura 5: MEV do pó de α -TCP.

Observa-se que o formato das partículas não é homogêneo, como seria o ideal. Pode-se visualizar desde partículas com formato mais arredondado até partículas mais pontiagudas. Isso implica na coexistência de partículas com volumes próximos, porém com diferentes áreas superficiais, levando a uma distribuição ampla da área superficial, fator determinante na cinética da reação de cura dos cimentos, bem como na relação líquido/pó. Nota-se também a aglomeração das partículas.

3.2 Preparação dos Cimentos

Como se trabalhou com dois tipos de solução para a obtenção dos cimentos, foi necessário determinar uma relação líquido/pó que não comprometesse a pega de nenhum dos dois cimentos. Sabe-se que o ácido cítrico atua como agente redutor da quantidade de líquido, logo para trabalhar com o cimento sem aditivos (CS1) seria necessária uma quantidade maior

de líquido, quando comparado com as soluções que apresentavam ácido cítrico na sua composição. Além do mais, a distribuição granulométrica maior que a encontrada em literatura, também pode influenciar no aumento dessa relação. A relação considerada ideal foi de 0,38 mL/g, dentro dos valores encontrados na literatura.

Valores menores que 0,38mL/g não possibilitavam o manuseio adequado do CS1, que ficava com uma consistência não pastosa. Valores maiores deixavam o cimento com aditivos, CS2, com uma consistência muito líquida, o que inviabiliza também seu manuseio.

3.3 Evolução do pH

O pH inicial das soluções pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5 : pH das soluções

Solução	pH
S1	6,2
S2	5,7

Os resultados das medidas da evolução do pH durante a reação nos cimentos podem ser observados na Fig. 6.

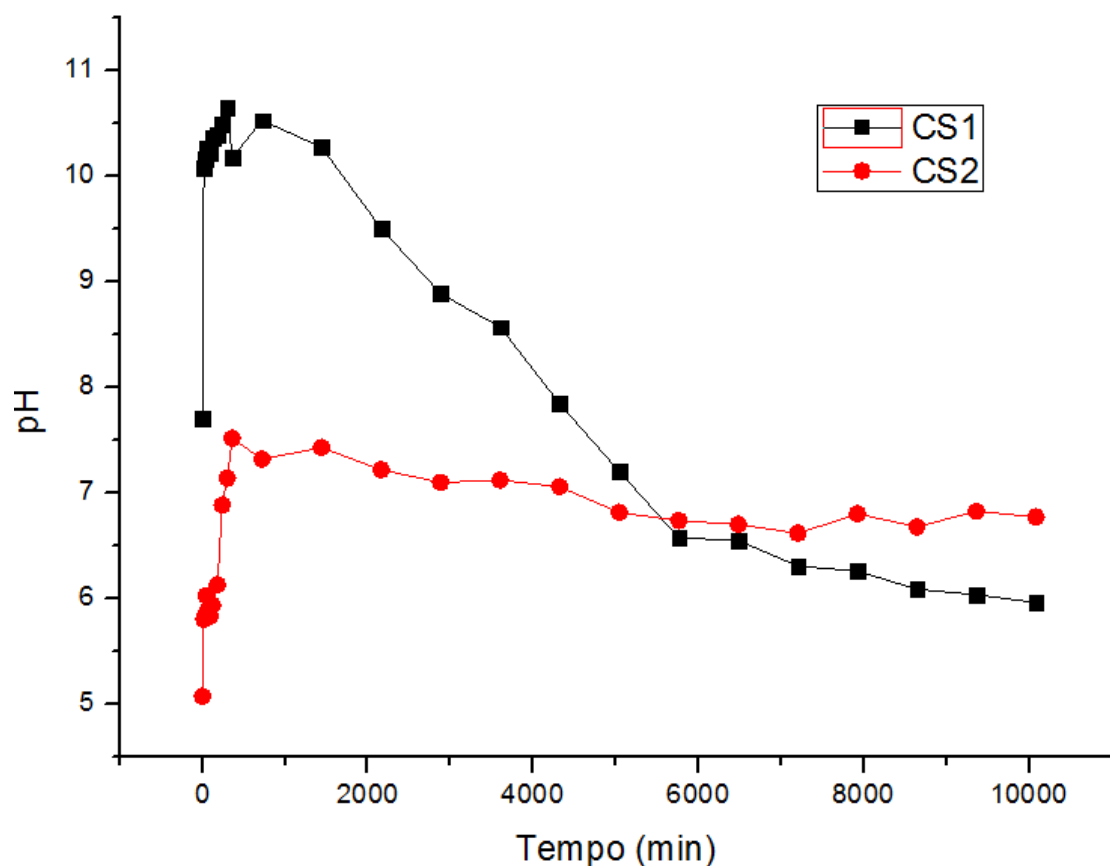


Figura 6: Evolução do pH durante as 168h de reação para os dois cimentos.

Os dois cimentos analisados sofreram variações consideráveis no pH durante o período analisado e tiveram seu pH inicial próximo ao da solução ainda sem o pó. Após seis horas de reação, o pH das soluções não subiram mais, dando início à sua estabilização. Entretanto,

mesmo após os 7 dias de reação, o pH do CS1 continuou a cair. Já o pH do CS2 estabilizou-se em valores próximos a 7, ótimos para a aplicação de um material como biomaterial.

As alterações mais bruscas no pH acontecem nos instantes iniciais da reação, como pode-se observar na Fig. 7.

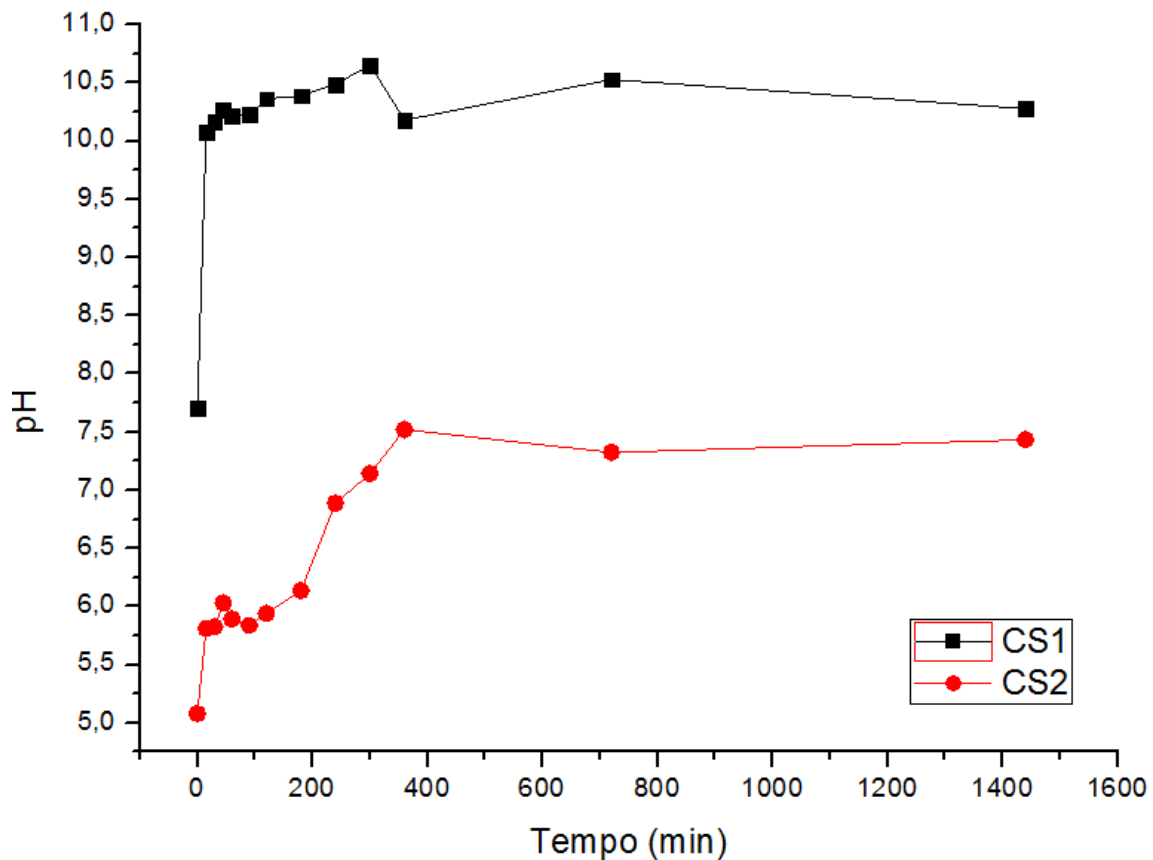


Figura 7: Evolução do pH durante as primeiras 24h de reação.

Utilizam-se aceleradores de reação, como o Na_2HPO_4 , na composição dos cimentos de fosfato de cálcio a fim de diminuir o tempo de pega. Eles atuam na solubilização dos cristais de fosfato de cálcio, permitindo uma saturação mais rápida do meio e conseqüente formação da CDHA. Na ausência de aceleradores, o meio demora a atingir os valores de saturação necessários para a formação da CDHA. Tal constatação, justifica o valor de pH tão elevado assumido pelo CS1, chegando próximo a 11, extremamente tóxico.

Quanto menor a variação do pH, melhor para a aplicação de um material como biomaterial. Variações bruscas no pH podem matar células próximas à aplicação do implante. Porém, a análise feita neste trabalho é feita sem a circulação de fluidos, o que não simula com total veracidade o sítio de implantação dos cimentos.

3.2 Citotoxicidade

A alteração na coloração do meio de cultura após o ensaio de citotoxicidade está mostrado na Fig. 8 com suas respectivas fitas indicadoras de pH.

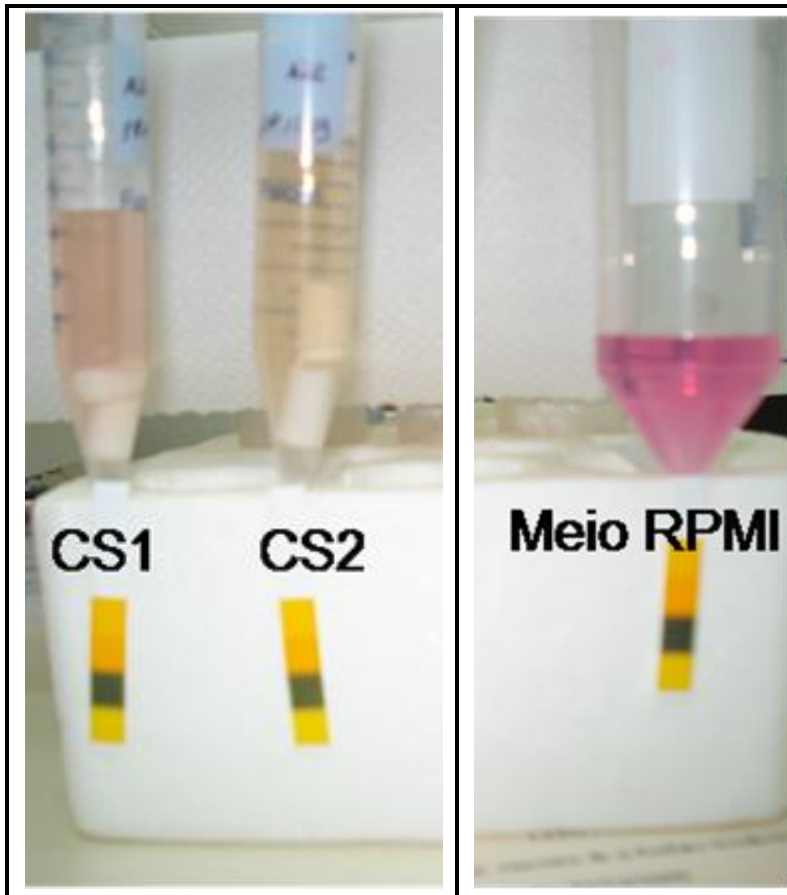


Figura 8: Coloração do meio de cultura após 48h de extração com as respectivas fitas indicadoras de pH.

Os valores de pH indicados pelas fitas de ambos os cimentos foram entre 7 e 8. As amostras de cimento de α -TCP alteraram a coloração do meio de cultura, indicando teoricamente uma mudança de pH do meio. Como mostra a Fig. 8, inicialmente o meio RPMI 1640 (líquido extrator) possui uma coloração vermelho róseo devido ao indicador fenol *red*, ajustado para um pH de 7,4. O esmaecimento da coloração do líquido extrator de todas as amostras indica que o meio ficou mais ácido, neste caso, a fita indicadora de pH teria se mostrado inadequada para a quantificação da variação de pH, já que todas as fitas indicaram um pH entre 7 e 8 após as 48h de extração.

Entretanto, o CS2 retornou valor de pH igual a 7 após 7 dias os 7 dias de imersão em fluido corpóreo simulado, sugerindo que a fita indicadora tenha apresentado valores condizentes.

Na avaliação da viabilidade celular dos extratos e suas diluições, comparou-se os valores do $IC_{50(\%)}$ (Fig. 9).

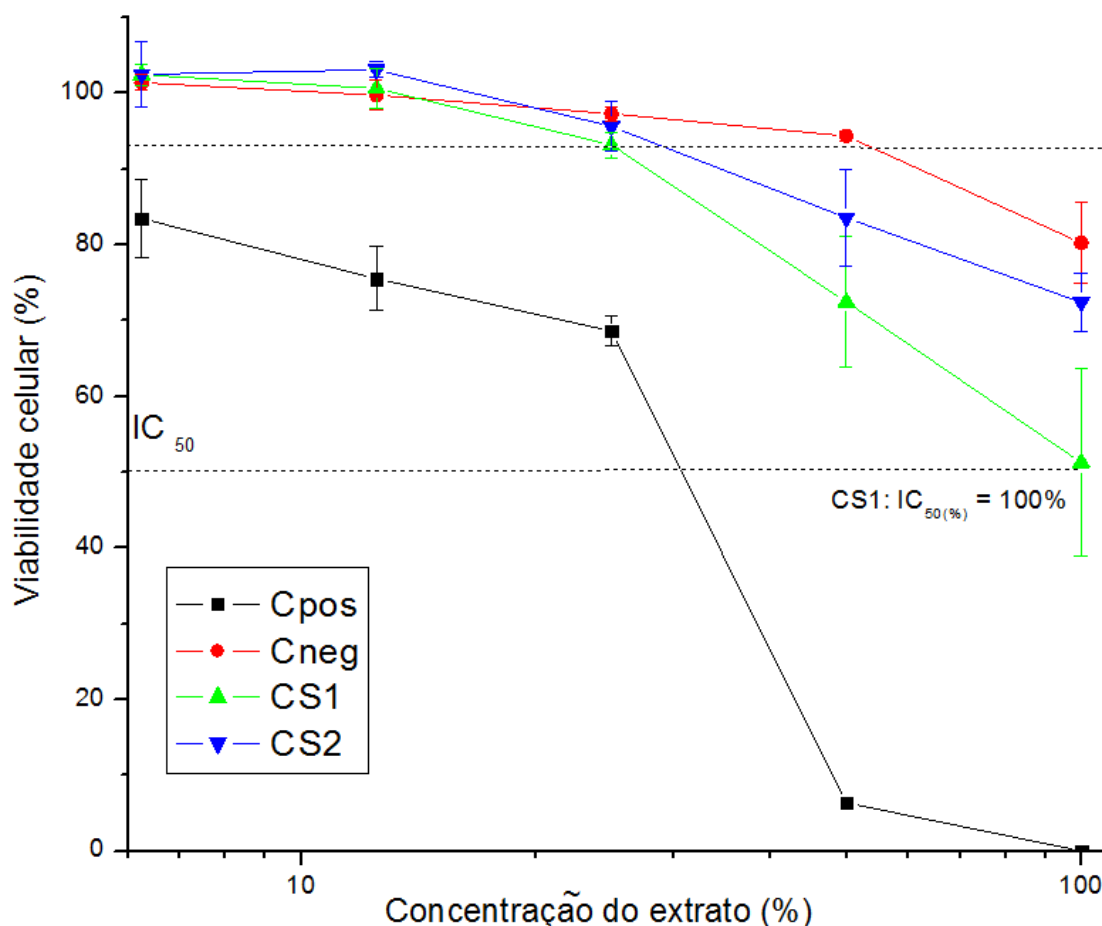


Figura 9: Viabilidade celular dos dois cimentos em diferentes concentrações dos extratos.

Analisando a Fig. 9, observa-se que o CS2 apresentou $IC_{50(\%)} > 100$, assim como o controle negativo, já o CS1 apresentou $IC_{50(\%)}=100$. Pelo resultado do teste de citotoxicidade indireta, apenas o CS2 teve desempenho satisfatório, pois os valores considerados ideais são os que se aproximam do controle negativo, o que não promove resposta citotóxica. Porém, esse teste isoladamente não pode ser considerado conclusivo, uma vez que ele não simula com fidelidade o meio fisiológico humano, onde os fluidos estão em circulação constante.

4. CONCLUSÕES

O pó de α -TCP utilizado para a obtenção do cimento de fosfato de cálcio não apresentou o magnésio como impureza, conhecido estabilizador da fase de β -TCP. O α -TCP obtido apresentou 11% de β -TCP como fase indesejada, alcançando o objetivo da síntese dos reagentes em laboratório. Entretanto, a faixa de tamanho de partícula obtida foi maior do que a reportada na literatura.

Quanto à variação do pH, constatou-se que as principais variações ocorreram nas primeiras horas de reação, sendo que o valor mais básico foi encontrado após 6h de reação. E o cimento sem aditivos permaneceu se acidificando mesmo após os 7 dias de reação observados, enquanto que o cimento com aditivos estabilizou-se.

Já o teste de citotoxicidade *in vitro* indireto indicou que o cimento com aditivos não apresenta citotoxicidade mesmo com concentração de extrato de 100%.

Apenas o cimento com Na_2HPO_4 e ácido cítrico apresentou propriedades de pH e citotóxicas adequadas para aplicação como biomaterial.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores desse trabalho agradecem o apoio financeiro fornecido pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) para a realização desse trabalho. Agradecemos também à rede CYTED-Biofab e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia BIOFABRIS pelo apoio durante o projeto.

6. REFERÊNCIAS

- 10993-5, ISO. 1992. *International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Test for Cytotoxicity: In Vitro Methods*.
- Boch, P. e Nièpce, J. C. 2007. *Ceramic Materials: Processes, properties and Applications*. London : ISTE.
- Bohner, M. 2000. *Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements*. Injury, Int. J. Care. Vol. 31.
- Carrodeguas, R. G., et al. 2008. *New Approach to the [alfa]-[beta] Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications*. Journal of The American Ceramic Society. 4, Vol. 91, pp. 1281-1286.
- Driessens, F. C. M., et al. 1993. *Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study*. Journal of Material Science: materials in Medicine. 1, Vol. 4, pp. 503-508.
- Enderle, R., et al. 2005. *Influence of Magnesium Doping on the Phase Transformation Temperature of [beta]-TCP ceramics examined by Rietveld Refinement*. Biomaterials. Vol. 26, pp. 3379-3384.
- Ginebra, M. P., Driessens, F. C. M. e Planell, J. A. 2004. *Effect of the Particle Size on the Micro and Nanostructural Features of a Calcium Phosphate Cement: a Kinetic Analysis*. Biomaterials. Vol. 25, pp. 3453-3462.
- Ginebra, M. P., et al. 1998. *The Effect of Na₂HPO₄ Addition on the Setting Reaction Kinetics of an [alpha]-TCP Cement*. Biomaterials. 1, Vol. 11.
- Motisque, M., Carrodeguas, R. G. e Zavaglia, C. A. C. 2008. *Mg-Free Precursors for the Synthesis of Pure Phase Si-Doped [alfa]-Ca₃(PO₄)₂*. Key Engineering Materials. Vols. 361-363, pp. 199-202.
- Ratner, B. D. et al. 1996. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego : Academic Press.
- Santos, L. A. 2002. *Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado com Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica*. Tese de Doutorado. Campinas : FEM, UNICAMP.
- Sarda, S., et al. 2002. *Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 4, Vol. 61, pp. 653-659.

pH EVOLUTION AND CYTOTOXICITY EVALUATION OF TWO CEMENTS BASED ON [ALPHA]-TRICALCIUM PHOSPHATE SYSTEM

Hugo A. I. Cardoso^{1,2}, Mariana Motisque^{1,2}, Andrea C. D. Rodas³, Olga Z. Higa³, Cecilia A. C. Zavaglia^{1,2}

¹LABIOMECC, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), Brasil

²Departamento Instituto de Biofabricação – INCT – Biofabris

³Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil

E-mail: hugocardos@fem.unicamp.br

Abstract. Among the biomaterials used as bone substitutes, those based on calcium phosphates have caused a radical change on both orthopedic and dentistry in the repair of damaged parts. An application is as bone cements, which have a number of benefits such as excellent biocompatibility and bioactivity, in addition, those

materials are capable of hardening in situ and the ability to be molded into complex and small cavities. Among the calcium phosphate cements, the system based on alpha-tricalcium phosphate (α -TCP) has attracted considerable interest because of its resorbability and conversion to calcium deficient hydroxyapatite (CDHA), a synthetic calcium phosphate compound which presents a very similar structure to the mineral part of bones and teeth. The aim of this study was to analyze the pH evolution and to evaluate the cytotoxicity of two calcium phosphate cements after seven days of setting reaction: one without additives and the other with Na_2HPO_4 and citric acid as additives in the liquid phase. Variations on the pH were measured at 12h intervals during the seven days of reaction; however, in the early hours of reaction the spacing between the pH measurements was shorter, 15 minutes in the first hour of reaction. Cytotoxicity test was performed according to ISO (10993-5, 1992): Biological evaluation of medical devices - Part5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. The cement without additives exhibited more abrupt changes in pH, close to 11, and did not stabilize even after 7 days of reaction. The cement with additives had the pH stabilized in the same period. With regard to cytotoxicity, the cement with additives was not cytotoxic and the material without additives showed cytotoxicity with the extract concentration of 100%.

Keywords: *Bioceramics, Calcium Phosphate Cements, Cytotoxicity, pH*