

ESTUDO DA TÉCNICA DE CONSOLIDAÇÃO UTILIZANDO ALBUMINA NA OBTENÇÃO DE CERÂMICAS POROSAS DE β -TCP

C. Ribeiro, J.C. Bressiani, A.H.A. Bressiani

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, Cidade Universitária, 05508-000, São Paulo, SP.

e-mail: cribeiro@ipen.br. IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares,

CCTM - Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais.

RESUMO

A reação previsível e positiva do ambiente biológico em relação às cerâmicas de fosfatos de cálcio, como o β - fosfato tricálcico, tem sido uma observação constante em vários estudos in vitro e in vivo. Uma microestrutura porosa para o crescimento do tecido ósseo pode tornar estas cerâmicas ainda mais atrativas como biomateriais. Com esse intuito foram desenvolvidas cerâmicas porosas de β - TCP, utilizando agente especial de consolidação e gerador de espuma (albumina) que oferece uma grande liberdade de formatos com as mais variadas e complexas geometrias devido às facilidades de moldagem. O processo de obtenção com albumina, é determinado pela necessidade da introdução de calor no sistema para finalizar a etapa de consolidação. Após consolidação, as amostras foram sinterizadas a 1250°C/30min e caracterizadas por DRX, MEV e porosimetria por intrusão de mercúrio. Verificou-se que as espumas obtidas apresentaram poros de geometria esférica e característica interconectada como a recomendada normalmente para implantes.

Palavras-chave: fosfatos de cálcio, porosos, consolidação direta, albumina.

INTRODUÇÃO

A percepção do potencial de contribuição dos biomateriais porosos tem sido freqüente na área médica, farmacêutica e da engenharia, traduzida pelo grande número de artigos publicados ^(1, 2, 3).

Na engenharia, as variadas técnicas de processamento tem contribuído para o avanço nas pesquisas envolvendo biomateriais porosos. Cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio, como o β -TCP, obtidas a partir da consolidação de espumas têm apresentado um perfil adequado para utilização em implantes ósseos e scaffolds ^(2, 3).

Estas cerâmicas, em especial, se tornam bastante interessantes devido ao conjunto de propriedades, como biocompatibilidade, osteocondução e configuração de poros (tamanho, forma e distribuição). É importante salientar que o conceito de material poroso, sob o ponto de vista da biocompatibilidade, se fundamenta em dimensões de poros completamente diferentes do que é usual para a química. Segundo o Sub-comitê para a caracterização de sólidos porosos da IUPAC⁽⁴⁾, materiais macroporosos apresentam poros com dimensões maiores que 50 nm. Contudo, para que um biomaterial seja considerado macroporoso é necessário que ele apresente poros da ordem do diâmetro Harvesiano (50 a 250 μ m) ⁽⁵⁾

A porosidade é tida como uma das principais características capaz de conduzir uma adequada osteointegração entre osso-implante e permitir a proliferação de células em suportes para engenharia de tecido pelo dimensionamento adequado da matriz (tridimensional) e características do material que a constitui ⁽²⁾.

Uma das técnicas que tem se destacado na obtenção de cerâmicas porosas é o processamento coloidal. Este processamento via-úmida oferece grande liberdade de formatos, nas mais variadas e complexas geometrias, devido às facilidades de moldagem ⁽⁶⁾. Uma destas técnicas consiste no preparo de uma suspensão cerâmica obtida a partir de uma solução aquosa, contendo albumina, um agente especial com funcionalidade dupla: gelificante e gerador de espuma ⁽⁷⁾. No caso, das espumas obtidas por outras técnicas, como o tradicional gelcasting de espumas, a natureza neurotóxica dos monômeros tem sido um fator limitante ⁽⁶⁾, por isso esta outra metodologia pode ser muito promissora na obtenção de biomateriais porosos, já que não há riscos quanto ao manuseio de seus aditivos e necessidade de atmosfera controlada para consolidação da espuma. Outra característica promissora diz respeito à esfericidade dos poros e resistência a verde, características típicas do gelcasting que também são preservadas por esta nova alternativa ⁽⁷⁾.

Este processo inovador de consolidação na presença da albumina é determinado pela necessidade da introdução de calor no sistema, que desencadeia um processo natural de gelificação. Na obtenção dessas cerâmicas porosas é

conveniente realizar um estudo paralelo entre as características do material utilizado para que sejam estabelecidas as melhores condições da técnica de preparo. O tratamento integrado das propriedades do material, adequadas à esta metodologia permite um melhor controle e reprodutibilidade na obtenção das amostras.

Neste trabalho é apresentado um estudo do processo de obtenção de espumas cerâmicas de β - fosfato tricálcico pela técnica de consolidação direta a partir de uma proteína conhecida como ovalbumina, ou seja, albumina procedente da clara do ovo de origem Nutracêutica.

MATERIAIS E MÉTODOS

No preparo das suspensões contendo 69% (massa) de sólidos foi utilizado β - TCP (Fluka) e ovalbumina (Schettert). A obtenção das espumas envolveu a dispersão de uma suspensão aquosa de β -TCP na presença de 0,6 mg/m² do dispersante Dispex A40 (Ciba) e adição do surfactante Genaminox, um óxido amino dimetil alquil (Clariant) a 0,08% (massa). Adicionou-se albumina em concentrações de 5 -7 % (massa) nas suspensões cerâmicas para promover a gelificação e estabilidade da espuma. É importante salientar que a albumina participa como teor de sólido nesta metodologia, competindo com a cerâmica na etapa de dispersão e gerando suspensões pseudoplásticas.

Para o estudo de gelificação foram realizados ensaios oscilatórios no modo de operação com controle de tensão, com frequência e tensão constantes de 1 Hz e 1 Pa, respectivamente e um tempo de ajuste de 30s para as medidas. Foi utilizado o sistema de medidas placa-placa na obtenção das variáveis: G' (módulo de armazenamento ou elástico) e G'' (módulo de perda ou viscoso), em função da temperatura, no intervalo de 35-80°C para suspensões aquosas contendo diferentes concentrações (5, 6 e 7 % em massa) de albumina.

As espumas depois de produzidas foram mantidas em estufa a 60°C/12h para completa gelificação e conseqüentemente tratadas termicamente a 600 °C/2h com taxa de aquecimento de 3 °C/min para degradação completa dos orgânicos. As amostras foram sinterizadas a 1250°C/30 min em atmosfera oxidante, usando taxa de aquecimento de 5°C/min. O material de partida e a constituição das espumas foi analisada por difração de raios X em difratômetro Bruker- AXS modelo D8 Advance e a distribuição de poros por porosimetria de intrusão de mercúrio (Micromeritics-

Autopore III). A microestrutura e geometria dos poros foi investigada por microscopia eletrônica de varredura em equipamento Philips–XL 30.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes do processo de obtenção da espuma é extremamente importante a avaliação do comportamento do agente de consolidação. A etapa de consolidação pode ser melhor interpretada, avaliando as características reológicas, que assumem um papel primordial durante a modificação da suspensão fluida, para um estado rígido. Considerando que a gelificação é essencialmente, uma transição do estado líquido para sólido, o estudo das alterações das propriedades físicas da suspensão durante a gelificação é do maior interesse.

A transição da suspensão ainda na forma de sol para gel pode ser monitorada medindo-se os módulos de armazenamento ou elástico (G'), que indica quanto da tensão aplicada pode ser temporariamente armazenada e instantaneamente recuperada, e de perda ou viscoso (G''), associado à energia utilizada para iniciar o fluxo viscoso, irreversivelmente transformada em calor, a certa frequência em função do tempo e/ou temperatura ⁽⁸⁾. Neste trabalho, como a temperatura é a principal responsável pela solidificação da suspensão, sendo uma variável que contribui diretamente para formação do gel de albumina e na sensibilidade das proteínas, as leituras foram realizadas em função desta grandeza – $T(^{\circ}\text{C})$.

Os reogramas das Figuras (1 – 3) apresentam o comportamento das respostas viscosa e elástica das suspensões de albumina em diferentes concentrações (5-7% massa) em função da temperatura. Nos gráficos podem ser observados os pontos de gelificação para as diferentes amostras (pontos de interseção entre as curvas G' e G'').

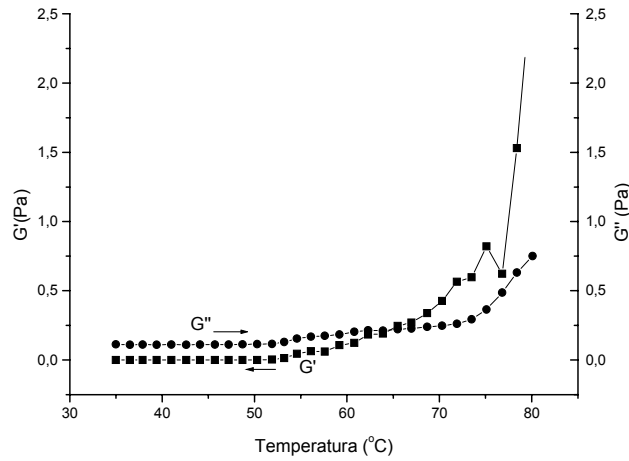


Figura 1 – Reograma representativo da variação das componentes: (G') e (G'') em função da temperatura, para suspensão (5%) de albumina.

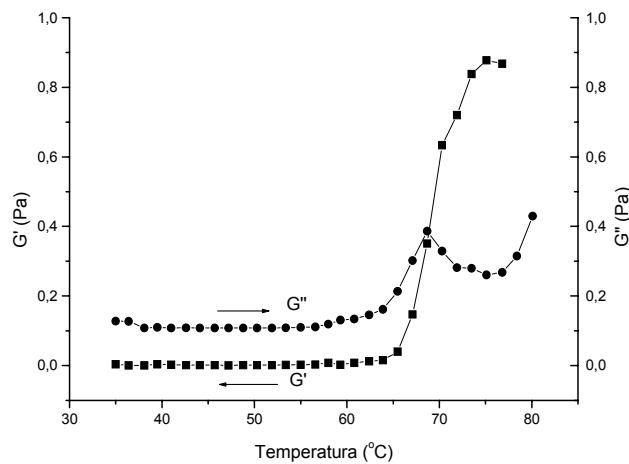


Figura 2 – Reograma representativo da variação das componentes: (G') e (G'') em função da temperatura, para suspensão 6% albumina.

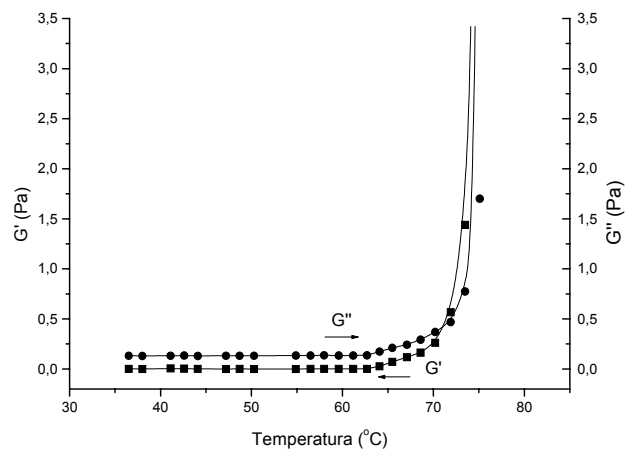


Figura 3 – Reograma representativo da variação das componentes: (G') e (G'') em função da temperatura, para suspensão 7% de albumina.

O início do processo de gelificação das suspensões é caracterizado por um módulo de perda (G'') maior que o módulo de armazenamento (G'), definindo um comportamento viscoso para estes sistemas. Fisicamente, a suspensão se torna mais elástica ao mesmo tempo em que aumenta sua capacidade de dissipar energia quando deformada, porém, o módulo de perda cresce em taxas menores com o aumento da temperatura, atingindo valores de intensidade menores que o módulo de armazenamento. O aumento mais acentuado de G' após a interseção entre os dois (G' e G'') pode ser resultante da formação rápida de zonas de junção entre cadeias que formam a rede do gel⁽⁹⁾

Um dos critérios adotados na literatura para determinar a reação de gelificação, prevê que o ponto de gel é alcançado quando as curvas de G' e G'' se interceptam, ou seja, o tempo necessário para que G' e G'' se igualem ⁽¹⁰⁾. Na verdade, a igualdade destas variáveis não deve ser considerada como propriedade universal do ponto de gel, pois o tempo necessário para que a interseção de G' com G'' ocorra pode ser muito próximo, mas não é idêntico ao tempo necessário para a transição sol-gel. Porém esse critério vem sendo utilizado por diversos autores ^(10, 11).

As suspensões contendo: 5, 6 e 7% de albumina apresentaram ponto de gel a uma temperatura equivalente a 65, 69 e 75 °C, respectivamente. Observa-se que com o aumento da concentração de albumina há um aumento da temperatura necessária para a reação de gelificação.

A nível molecular, a temperatura ótima de gelificação corresponde a um máximo da cooperação das interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Ligações secundárias sofrem diferentemente o efeito da temperatura; enquanto pontes de hidrogênio são estabilizadas pela diminuição da temperatura, as ligações hidrofóbicas são formadas a temperaturas mais elevadas ⁽¹¹⁾. Para condições de temperaturas mais elevadas, normalmente o ponto de gel é caracterizado por uma rede tridimensional mais fraca, devido a menor contribuição das pontes de hidrogênio e se forma mais rapidamente devido à contribuição predominante de ligações hidrofóbicas ⁽¹¹⁾, por isso a etapa de consolidação da espuma é realizada a temperatura de 60°C para assegurar uma secagem lenta na garantia de estruturas mais fortes obtidas preferencialmente pela cooperação entre pontes de hidrogênio e poucas interações hidrofóbicas, tendo como consequência um sólido mais resistente.

Para a suspensão 6% de albumina é observado um valor constante de G' , próximo de 0,86 Pa em torno de 78°C, indicando provavelmente o fim da reação de gelificação. Em temperatura próxima a 80°C foi observado uma queda para os valores de G'' , estas oscilações de comportamento podem ser atribuídas a desestruturação do material, que provavelmente nestas temperaturas estava sendo solicitado fora de seu regime elástico ou devido a existência de uma estrutura resultante de alguma pré-agregação das partículas protéicas ⁽¹¹⁾.

Durante etapa de consolidação a partir da albumina observa-se que o papel da temperatura é fundamental. Neste sistema, a formação de uma estrutura gelificada ocorre naturalmente, comandada pela absorção de calor de uma fonte externa; ocorre o aquecimento da suspensão no sentido superfície-volume, por isso é notada uma variação de porosidade entre o interior do material e as interfaces de contato (sólido/ar, sólido/parede do molde).

O aumento da temperatura pode levar ao rompimento prematuro das bolhas. Este efeito pode ser compensado pela presença da albumina que acaba tornando a película mais estável pelo acréscimo na elasticidade das bolhas. Este comportamento compensa o gradiente de pressão de Laplace, retardando o efeito da maturação de Ostwald, que pode melhorar a estabilidade da espuma, impedindo o processo de difusão entre bolhas ⁽⁷⁾. Foi observado que houve uma persistência da espuma, mesmo na superfície de contato da suspensão com as paredes do molde, quando a mesma era mantida em estufa durante etapa de consolidação.

Durante este processo não há inconvenientes quanto à presença de oxigênio ou necessidade de atmosfera controlada para inibir a consolidação da espuma, uma condição extremamente delicada quando a metodologia tradicional do gelcasting de espumas é adotada ⁽⁶⁾.

Na Figura 4 são apresentados os perfis de difração de raios-X das amostras em diferentes condições: do material de partida e posteriormente das amostras sinterizadas, ou seja, somente da cerâmica e a espuma de TCP obtida com a concentração mais alta de albumina (7% massa).

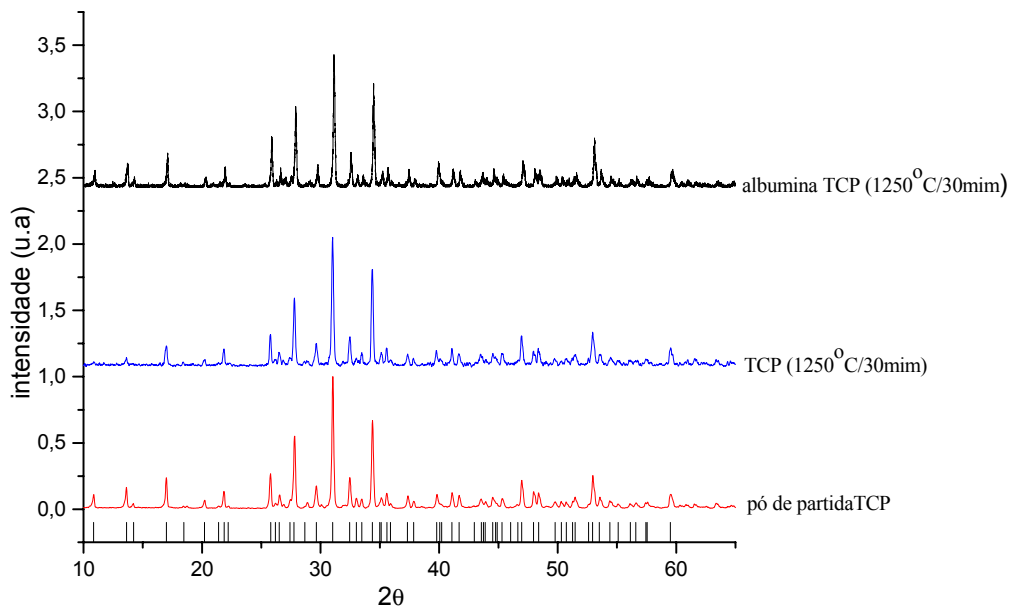


Figura 4 – Difratogramas de raios- X das diferentes amostras.

Não foram observados picos referentes a fases secundárias no material de partida ou formação de outras fases para as amostras de TCP após sinterização. A presença da albumina na constituição da espuma não provocou o aparecimento de novas fases, apresentando difratograma idêntico ao da amostra sinterizada sem albumina.

Os resultados de porosidade determinados pelo método de intrusão de mercúrio foram expressos em volume de mercúrio intrudido em função do diâmetro de poro, Figura 5.

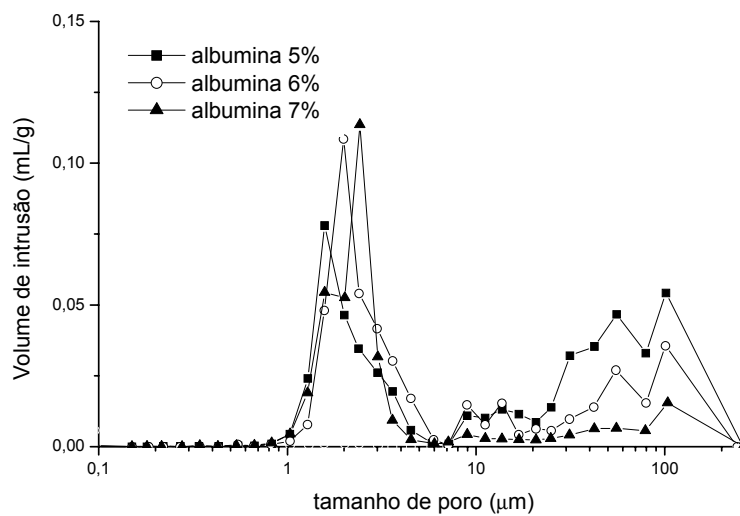


Figura 5 – Curvas da freqüência de distribuição de tamanho de poros em função do volume de mercúrio intrudido.

Observa-se uma relação direta entre a quantidade de albumina e a dimensão dos poros nas amostras. O aumento na concentração de albumina na suspensão resulta em uma frequência maior de poros de menor tamanho. Este efeito está relacionado ao aumento exponencial da viscosidade na presença da albumina, devido sua tendência em absorver água. Esta característica confere à suspensão uma maior resistência à formação da espuma, resultando em uma porosidade mais baixa, Tabela 1.

As amostras obtidas apresentaram uma estreita distribuição de poros que se estendeu de 1,0 – 5,0 (μm) e uma distribuição mais larga de poros no intervalo de 30 - 200 (μm). Mesmo variando-se a concentração da albumina foi mantida a mesma tendência de distribuição para as demais amostras. A fração de poros pequenos detectada na amostra e observada nas micrografias, Figura 6, contribui diretamente para formação de interconectividade entre os poros. A interconectividade é a característica principal da porosidade que tem se confirmado ao longo de vários estudos, como sendo responsável pela manutenção e crescimento do tecido ósseo, pelo transporte de nutrientes e drenagem de líquidos intersticiais ^(1, 2, 3). Poros com dimensões próximas de 5 μm , ainda podem facilitar a migração iônica que ocorre inicialmente entre a superfície do implante e o plasma sanguíneo, influenciando de maneira positiva a dinâmica de adsorção celular e; na capilaridade e permeabilidade dos fluidos corpóreos, que pode contribuir na dissolução desta cerâmica ^(1,3).

Observa-se pelas micrografias apresentadas na Figura 6 que a técnica é reproduzível na característica interconectada dos poros. As diferenças entre as espumas são notadas em termos de volume de porosidade total, Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de porosidade total das espumas obtidos pela técnica de intrusão de mercúrio.

amostras	Porosidade total (volume)
TCP 5	58 %
TCP 6	54,5 %
TCP 7	51 %

Não foram observadas diferenças topográficas significativas entre as superfícies de fratura das amostras, Fig. 6. A literatura relata que a composição química e a topografia da superfície do implante influenciam a resposta celular

osteogênica ⁽²⁾. Os microporos observados podem apresentar um papel importante no processo de ativação celular da superfície. Este tipo particular de porosidade é morfologicamente funcional por contribuir com a rugosidade da superfície. A característica rugosa induz uma formação óssea em maior volume quando comparadas às superfícies lisas devido a grande tendência de ancoragem de células com fenótipo osteoblástico neste tipo de superfície ^(1, 2).

A macroporosidade presente nas amostras pode promover caminhos acessíveis para o crescimento do tecido ósseo, que facilmente penetra pelos poros, estabelecendo o processo de osteocondução. O preenchimento dos poros pelo novo tecido ósseo promove um forte entrelaçamento osso-implante, conferindo um aumento da resistência mecânica do implante.

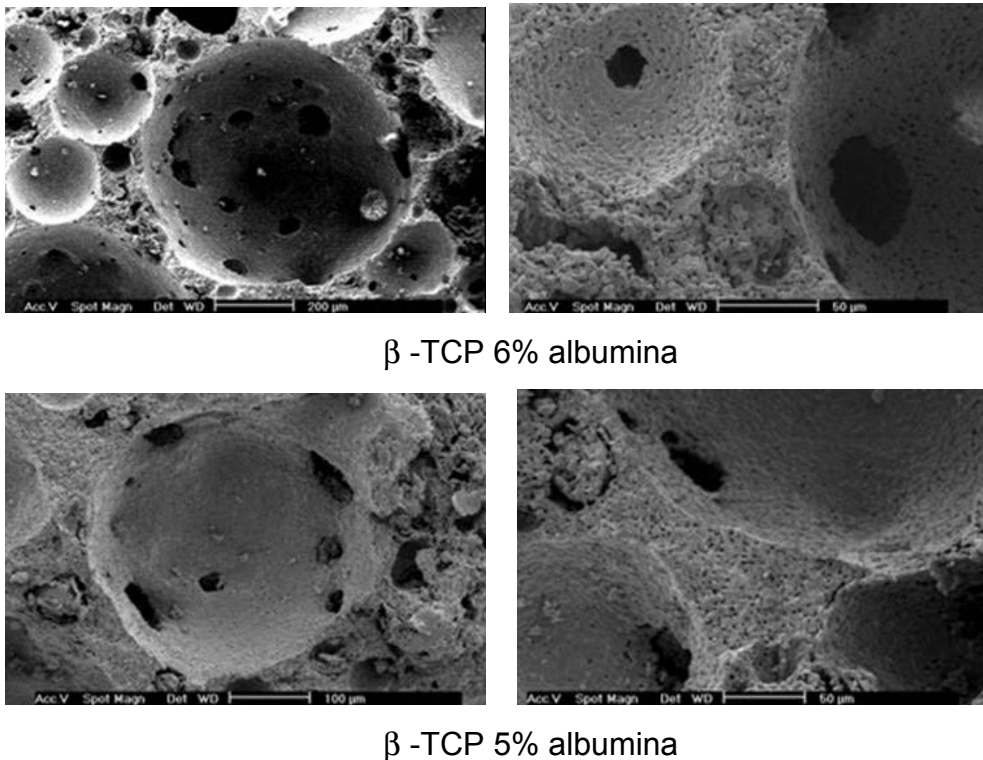


Figura 6 – Micrografias das superfícies da fratura de amostras obtidas pelo processo de consolidação direta utilizando albumina.

CONCLUSÕES

A ação espumante e de consolidação simultâneas oferecida pela metodologia da albumina tornou-se seu diferencial maior, impactando na melhoria do processamento de cerâmicas porosas.

As suspensões obtidas apresentaram uma estabilidade adequada para solidificação da espuma, devido a lenta drenagem ocasionada pela alta viscosidade superficial.

As diferentes suspensões de albumina analisadas apresentaram ponto de gel entre 60-70°C. Nos três sistemas estudados foi observado um aumento do módulo de armazenamento (G') após início da gelificação.

A presença da albumina não alterou a fase cristalina das espumas cerâmicas e proporcionou a geração de micro e macroporosidade com características: tamanho, esfericidade e interconectividade dos poros, interessantes para aplicação como biomateriais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a Fapesp pelo apoio financeiro e a Schettert Nutracêutica, pela albumina cedida na utilização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science, An introduction to materials in medicine**; Academic press,2002.
2. LIEBSCHNER, M.A.K.; WETTERGREEN, M.A. **Topics in tissue Engineering**; Ashammakhi & Ferretti, USA, 2003.
3. YASZEMSKI, MJ, PAYNE, RG, HAYES, WC, LANGER, R, AND MIKOS, AG. Evolution of bone transplantation: Molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. **Biomaterials**, 17, p.175-85, 1996.
4. Lastoskie, C.; Gubbins, K. E. J.; Quirkett, N. Pore Size Distribution Analysis of Microporous Carbons: A Density Functional Theory Approach. **J. Phys. Chem.**, 97 p. 4786-4796, 1993.
5. KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím. Nova**, São Paulo, v.23, n.4, p. July/Aug. 2000.
6. ORTEGA, F.S.; VALENZUELA, F.A.O.; PANDOLFELLI, V.C. Alternative gelling agents for the gelcasting foams. **Mater. Sci. Forum**, 416,p. 512-518, 2003.
7. DHARA, S.; BHARGAVA, P. Egg white as an environmentally friendly low-cost binder for gelcasting of ceramics. **J. Am. Ceram. Soc.** 84, 12, p.3048-3050, 2001.
8. ANJOS, R.D., SALOMÃO, R., PANDOLFELLI, V.C. Novas técnicas de reometria aplicadas a suspensões cerâmicas. **Cerâmica**, 51,p. 173-179, 2005.

9. WEIJERS, M., SAGIS, L.M.C., VEERMAN, C., SPERBER, B., VAN DER LINDEN, E. Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. **Food Hydrocolloids**, v.16, p. 269-276, 2002.
10. J. M. LAZA, C. A. JULIAN, E. LARRAURI, M. RODRIGUEZ, L. M. LEON. Thermal scanning rheometer analysis of curing kinetic of an epoxy resin: an amine curing agent, **Polymer** V.40 , 35, 1998.
11. WEIJERS, M., VAN DE VELDE, FRED., STIJNMAN, A., VISSCHERS, R. W. Structure and rheological properties of acid-induced egg white protein gels. **Food Hydrocolloids**, v.20, p. 146-159, 2006.

STUDY OF THE CONSOLIDATION METHOD USING ALBUMIN IN THE OBTENTION OF β -TCP POROUS CERAMICS

ABSTRACT

The previsible and positive reaction of the biological environment in relation to the calcium phosphate ceramics, as the β - tricalcium phosphate, has been a constant observation in several *in vitro* and *in vivo* studies. A porous microstructure for the growth of the bone tissue can turn these ceramic still more attractive as biomaterials. With that intention β - TCP porous ceramic were developed, using special consolidation and foam generator agent (albumin) that offers a great possibility of formats with the most varied and complex geometries due to the molding facility. The obtaining process with albumin, is certain for the need of the introduction of heat in the system for the consolidation stage to conclude. After consolidation, the samples were sintering at 1250°C/30min and characterized by DRX, MEV and mercury intrusion porosimetry. The foams presented a varied distribution of pores with spherical geometry and interconnected characteristic as regarded usually for implants.

Key-words: calcium phosphate, porous, direct consolidation, albumin.