

Trab. de CBEB 2008
16 a 20/11/2008
Salvador

CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO CONTENDO SOLUÇÃO DE QUITOSANA A DIFERENTES pHs

A. P. Oliveira*, M. Motisuke**, M. M. Beppu*, C. A. C. Zavaglia**, O. Higa***, A. Rodas***

*Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP, Campinas, Brasil

** Faculdade de Engenharia Mecânica/UNICAMP, Campinas, Brasil

***IPEN, São Paulo, Brasil

(cópia para biblioteca)

e-mail: aline_feq@ig.com.br

Abstract: Calcium phosphate cements have the capability to promote desirable biological properties for a short period of time and then be replaced by osseous tissue. The new bone growing rate depends on age, sex, metabolic healthy, localization, chemical composition, particles size and power/liquid cement relation. This study reports the calcium phosphate cements with chitosan. It was chosen, β -Tricalcium Phosphate to compose the solid phase, and different solutions with chitosan, citric acid and orthophosphoric acid to analyze the impact of different pHs in the final cement formation.

Palavras-chave: Calcium Phosphate, Chitosan, Bioceramic

Introdução

A substituição ou reparação de partes danificadas é uma preocupação dos humanos há muito tempo. Atualmente, a demanda é cada vez maior, uma vez que não são somente acidentes ou doenças que geram males físicos às pessoas, mas também à longevidade da população, cujo corpo não está totalmente adaptado às projeções da vida atual.

Cimentos de ortofosfatos de cálcio são uma ótima técnica de reparo de defeitos ósseos que não exigem uma grande carga mecânica. Esses cimentos possuem uma excelente osteocondutividade, moldabilidade e fácil manipulação, além de perfeita adaptação aos tecidos e capacidade de formação de um novo osso (bioatividade). A sua aplicação se estende desde a odontologia à ortopedia, e diferentes formulações cada vez mais estão em testes para entrada no mercado [1].

No senso mais comum da palavra, o cimento é um elemento de ligação, uma substância moldável que endurece independentemente e pode promover a união de outros materiais [1].

O produto resultante do cimento é de fundamental importância, pois é ele que determina a sua solubilidade e, conseqüentemente, a bioreabsorvidade *in vivo* e suas propriedades reológicas e viscosidade.

O uso de aditivos é uma das maneiras de melhorar as propriedades dos cimentos. O ácido cítrico é um exemplo de aditivo: ele retarda a dissolução-precipitação dos elementos que compõe o cimento, diminuindo a resistência compressiva durante o período inicial de pega, mas aumenta essa mesma resistência nos estágios finais de endurecimento do cimento [2]. A adição de polissacarídeos, gelatinas e ácido poliacrílico são de grande interesse para a biocompatibilidade e boa para as propriedades reológicas. Apenas pequenas quantidades adicionadas são necessárias para aumentar drasticamente a viscosidade das pastas de cimento. A quitosana é um exemplo de biopolímero cujas propriedades a tornam um atrativo em biomateriais, como a promoção de atividades antimicrobianas e cicatrizantes através de seus fragmentos resultantes de sua degradação enzimática.

Em projetos anteriores desse grupo de pesquisa, utilizava-se quitosana dissolvida em soluções de ácido acético. Notou-se que a adição dessa solução para a confecção do cimento ósseo com o intuito de trazer os benefícios da quitosana, provocava uma queda no valor do pH, aumento da viscosidade da solução e, em decorrência, um tempo de manuseio e pega muito curto. Artigos relatam [3] que a adição de íons citrato ou ácido cítrico retardam o tempo de pega, facilitando o manuseio. Uma solução encontrada foi dissolver a quitosana em ácido cítrico, pois minimizaria a adição de soluções ácidas no processo e também auxiliaria no tempo de pega.

Materiais e Métodos

1- Síntese de β -Fosfato Tricálcico

As amostras de β -TCP (β -Fosfato Tricálcico) foram preparadas através de reação no estado sólido a 1100°C de uma mistura de carbonato de cálcio (CaCO₃, Synth, Brasil) e monetita (CaHPO₄, Synth, Brasil) em proporção molar de 1:2 [4].

71 Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica

16-20 Nov.

1/4

CBEB 2008

Salvador, BA

13664

13644

2-Solução de Quitosana

A solução foi preparada adicionando-se 1,67 g de quitosana desacetilada (Sigma-Aldrich) para cada 100 mL de solução de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$, Synth, Brasil) $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$. Deixou-se a solução tampada na geladeira durante 10 dias para dissolução dos flocos de quitosana. Após esse período a solução foi então filtrada no sistema Milipore.

Utilizou-se 50 mL da solução de quitosana descrita para realização do processo de neutralização. Sob agitação mecânica, uma solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi adicionada lentamente. Ao atingir o pH desejado, uma alíquota de 50 mL era retirada. Os pHs e a porcentagem mássica final de quitosana na solução encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Dados referentes à neutralização da solução de quitosana

Solução	pH	Porcentagem mássica de quitosana*
Inicial	2,33	1,67
A	4,07	0,61
B	4,58	0,49
C	5,08	0,41
D	5,70	0,33
E	6,22	0,32

*Adotou-se 1 g.cm^{-3} para a densidade da solução de quitosana 1,67%

A concentração de ácido ortofosfórico (H_3PO_4 , Synth) empregado foi $2,6 \text{ mol.L}^{-1}$ na solução final a ser utilizada na formação da pasta do cimento ósseo. Para cada 50 mL de solução de quitosana são necessários aproximadamente 9 mL de ácido ortofosfórico "puro", o que limita a quantidade de solução de quitosana adicionada. A porcentagem mássica de quitosana no preparo da solução final foi padronizada como 0,256% e empregada para as soluções de quitosana com diferentes pHs.

As soluções finais testadas para integrar a fase líquida do cimento possuem soluções de quitosana com diferentes pHs e concentrações distintas de ácido cítrico, entretanto, com a mesma porcentagem mássica de quitosana e concentração molar de ácido ortofosfórico.

3-Obtenção dos Corpos de Prova dos Cimentos de Fosfato de Cálcio e Quitosana

Os cimentos foram preparados usando-se uma proporção de 0,8 g/mL. Os pós de β -TCP sintetizados por reação no estado sólido foram misturados com as fases líquidas descritas pela Tabela 1. Foram escolhidas as soluções com pH 4,07, 5,08 e 6,22 para integrar as fases líquidas das amostras analisadas por difração de raios-X.

A pasta formada, após mistura do pó de β -TCP e o líquido durante 30 segundos é adicionada em moldes de polímero Teflon® em formato de cilindros (12 mm de altura e 6 mm de diâmetro). Os moldes são deixados em

atmosfera de 100% de umidade por 1 hora e depois devem permanecer em temperatura ambiente por 24 horas para secagem. Após esse período os materiais são desmoldados e deixados em temperatura ambiente.

4-Testes de Citotoxicidade [5]

As amostras utilizadas nesse teste foram trituradas manualmente após a formação dos pinos de cimento. Os pós foram então esterilizados por radiação gama 25 kGy.

O teste de proliferação celular não radioativo é um método colorimétrico para determinação do número de células viáveis em testes proliferativos ou quimiosensitivos.

Para a avaliação da citotoxicidade do cimento ósseo foi seguida a norma ISO - 10993-5. As células utilizadas para realização do teste foram células de ovário de Hamster (CHO-k1), e os reagentes empregados para a avaliação da viabilidade celular foram 3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS) e metassulfato de fenazida (PMS) [4] contidos no kit CellTiter96[®] AQueous Non - Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation).

Manutenção das células CHO-k1 in vitro: as células CHO-k1 foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ e anfotericina 0,025 $\mu\text{g/mL}$), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino em incubadora úmida a 37° C e atmosfera de 5% de CO_2 , até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4.

Preparação dos extratos: os extratos foram preparados na proporção de 0,2g/mL de meio de cultura RPMI 1640. Como controle negativo foi preparado um extrato de alumina. As amostras foram mantidas na incubadora a 37° C, por 48 horas. Como controle positivo, foi preparado uma solução fenol 0,3% v/v de meio de cultura. Os extratos foram diluídos de 100 a 6,25% v/v de meio de cultura RPMI para realização do teste de viabilidade celular, sendo 100% correspondente aos 0,2 g/mL anteriormente descrito.

Viabilidade das células CHO-k1: em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 50 μL da suspensão de células CHO-k1, na concentração final de 3000 células por poço, sobre 50 μL do extrato em suas diluições, em quadruplicata. A placa foi colocada na incubadora úmida com 5% de CO_2 por 72 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 μL de solução de MTS/PMS (20:1) e incubado por mais 2 horas. A placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 495 nm.

O Índice de Citotoxicidade - IC_{50} , concentração do extrato que mata 50% da população de células, foi determinado graficamente.

Outras definições:

Controle positivo: material que, quando testado de acordo com a norma ISO 10993 -5, promove resposta citotóxica.

Controle negativo: material que, quando testado de acordo com a norma ISO 10993-5, não promove resposta citotóxica.

5-Difração de Raios-X

A difração de raios-X foi utilizada na caracterização do pó de β -TCP e dos cimentos formados, verificando a influência do biopolímero na reação do β -TCP com o ácido ortofosfórico.

Foi utilizado o equipamento da marca Rigaku, modelo DMAX 2200, com radiação de $\text{CuK}\alpha$, filtro de Ni, 20kV, 40mA.

Resultados e discussão

1 – Síntese do β -TCP

A caracterização do pó foi realizada e publicada em trabalhos anteriores [6].

2-Testes de Citotoxicidade

A figura a seguir mostra as respostas citotóxicas dos testes realizados in vitro pelo Instituto de Pesquisas Nucleares de São Paulo (IPEN).

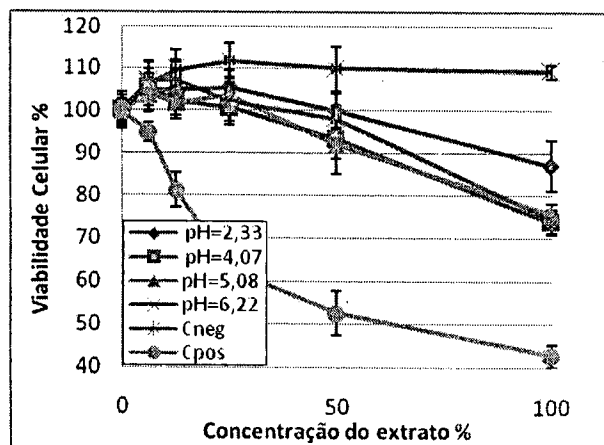


Figura 1: Gráfico da viabilidade celular e concentração do extrato das amostras com solução de quitosana de diferentes pHs.

Todas as amostras apresentam resultados entre as curvas de resposta negativa e positiva à citotoxicidade. Não se pode afirmar que os materiais não são citotóxicos por eles se encontrarem abaixo da curva de controle negativo, todavia os materiais não possuem uma citotoxicidade tão acentuada, visto que o IC_{50} não pode ser determinado, pois a viabilidade celular não foi inferior a 50% em nenhuma concentração do extrato.

Nota-se que para concentrações do extrato até 40% as respostas celulares não são tão distintas, entretanto,

as amostras cujas fases líquidas de quitosana possuem pHs mais baixos apresentam resultados melhores na resposta citotóxica quando a concentração do extrato é mais elevada.

3-Difração de Raios-X

A partir dos difratogramas das figuras a seguir, pôde-se analisar a influência das soluções de quitosana com diferentes pH na composição do cimento final.

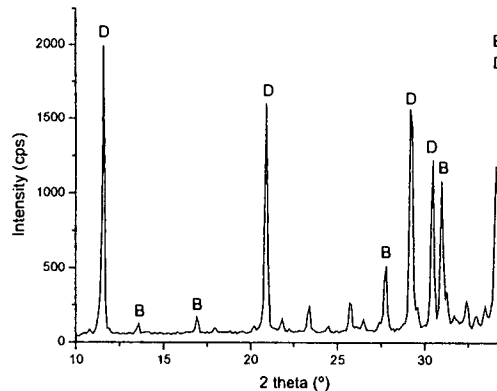


Figura 2: Difratograma do cimento contendo solução de quitosana com pH=4,07.

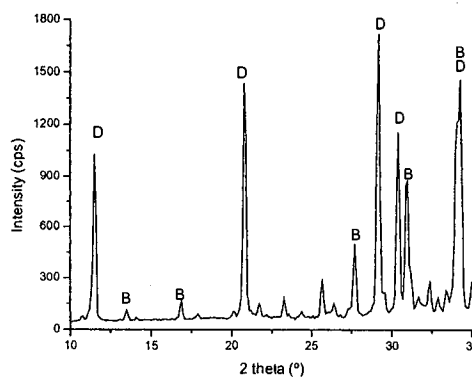


Figura 3: Difratograma do cimento contendo solução de quitosana com pH=5,08.

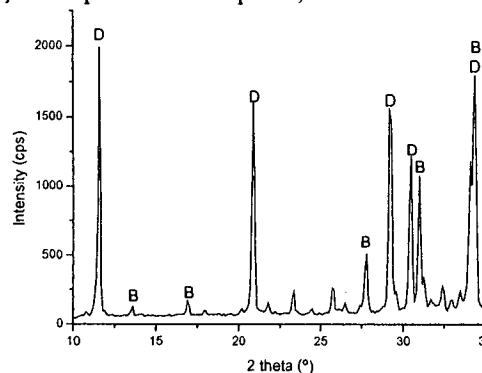


Figura 4: Difratograma do cimento contendo solução de quitosana com pH=6,22.

Em que:

D: DCPD – Fosfato Dicalcio Dihidratado

B: β -TCP - β - Fosfato Tricálcio

O hidrogeno fosfato de cálcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD) é formado após a reação do β -TCP com o ácido ortofosfórico, por isso o interesse de investigar principalmente esses compostos através da difração de raios-X. Todas as fases líquidas empregadas possuem a mesma concentração de ácido ortofosfórico, portanto a formação de DCPD não tem como fator de comparação a quantidade de ácido presente para reação, mas sim o pH e a presença de quitosana na fase líquida do cimento. Comparando as diferentes soluções de quitosana, observa-se que os picos que caracterizam o DCPD possuem intensidades um pouco distintas conforme se varia o pH da solução utilizada, porém, qualitativamente, a reatividade do β -TCP não é afetada pela presença de quitosana na fase líquida do cimento.

Conclusão

A citotoxicidade é afetada pelo pH da solução de quitosana: soluções de pH mais elevado de quitosana possuem viabilidade celular mais baixa quando comparada às soluções em que a adição de hidróxido de sódio foi menor. A quitosana não exerce influência nos efeitos observados, pois as quantidades adicionadas em cada fase líquida foram as mesmas.

Dessa forma, conclui-se que a síntese de β -TCP foi otimizada, mas ainda requer modificações na mistura para garantir a formação do composto desejado. A concentração de ácido ortofosfórico para essa análise foi adequada e a troca de dissolução de ácido acético por ácido cítrico trouxe avanços significantes para o trabalho.

Agradecimentos

À equipe do IPEN pelas análises de citotoxicidade (Profa. Olga Higa e Andrea Rodas).

À doutoranda Mariana Motisuke e por Claudinete Leal, ambas do Departamento de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas no auxílio sobre fosfatos de cálcio. À Cassiano Aimoli pela ajuda na adequação nas soluções de quitosana e dissolução. À Fapesp por compreender a suspensão temporária do suporte financeiro e sua reativação.

Referências

- [1] Dorozhkin, S.V. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal Materials Science*. February 2008, pp. 3028-3057.
- [2] Sarda, S., et al. Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent. *J Biomed Mater Res*. 15 September 2002, pp. 61(4):653-9.
- [3] Bohner, M., et al. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a

calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* 11 . 2000, pp. 111-116.

- [4] Slosarczyk, A., et al. Calcium phosphate materials prepared from precipitates with various calcium phosphorous ratios. *Journal of American ceramic Society*, v. 79. 1996, pp. 2539-2544.
- [5] Cory, A. H., et al. 1991, *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. *Cancer Comm*. 3, pp. 207-212.
- [6] Oliveira, A. P., et al. 2008 *A Comparative Study between β -TCP Prepared by Solid State Reaction*. *Key Engineering Materials*. Vols. 361-363 (2008) pp. 355-358.