

Propriedades de arcabouços de blendas a base de cimento de aluminato de cálcio para regeneração óssea (Properties of scaffolds based on calcium aluminate blends for bone regeneration)

I.N.G. Vicuna¹, K.W. dos Santos¹, V.C. Pandolfelli², I.R. de Oliveira¹

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba
São José dos Campos - SP

²Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos
São Carlos – SP
ivonero@univap.br

Resumo

O arcabouço é uma estrutura 3D que fornece um suporte para o tecido recém-formado, permitindo a transferência de nutrientes, migração, crescimento e proliferação celular. Entretanto, a compatibilização das propriedades mecânicas com as biológicas de um arcabouço, a qual é dependente do tipo de material empregado ainda não foi alcançada plenamente. Dentro deste contexto, blendas a base de CAC (cimento de aluminato de cálcio) contendo 4% em peso de aditivos (alumina, zircônia e óxido de zinco) foram usadas para preparação de arcabouços via réplica de esponja polimérica, uma vez que tais composições têm mostrado grande potencial como biomaterial. Arcabouços foram produzidos com suspensões aquosas contendo 60%-p de sólidos e caracterizados quanto à resistência mecânica à compressão, bioatividade e comportamento em cultivo celular. Os arcabouços produzidos neste trabalho mostram-se adequados para substituir o osso trabecular uma vez que apresentaram resistência a compressão próximo de 4 MPa e também se mostraram bioativos. Maior viabilidade celular e maiores valores de atividade de ALP foram observadas nas blendas de zircônia e óxido de zinco.

Palavras-chave: cimento de aluminato de cálcio, arcabouço, biocerâmicas, réplica polimérica.

Abstract

The scaffold is a 3D structure that provides support for newly formed tissue, allowing for nutrient transfer, migration, growth and cell proliferation. However, the compatibilization of its mechanical and biological properties, which is dependent on the type of material employed, has not yet been fully achieved. Within this context, CAC (calcium aluminate cement) -based blends containing 4 wt% of additives (alumina, zirconia and zinc oxide) were used for the preparation of scaffolds via polymer sponge replica, since such compositions have showed great potential as biomaterial. Scaffolds were produced from aqueous suspensions containing 60 wt% solids and characterized for mechanical resistance to compression, bioactivity and behavior in cell culture. The scaffolds produced in this work are suitable to replace the trabecular bone since they presented compressive strength close to 4 MPa and also proved to be bioactive. Higher cell viability and higher ALP activity values were observed in zirconia and zinc oxide blends.

Keywords: calcium aluminate cement, scaffold, bioceramics, polymer replica.

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos (E.T.) é a responsável de desenvolver novas técnicas para abordar as diferentes necessidades na regeneração óssea, com o objetivo de fornecer implantes que permitam restaurar órgãos e estimular a formação do novo tecido [1]. Devido às limitações do uso de enxertos e materiais sintéticos, no início dos anos 90, a E.T. sugeriu novas técnicas que permita transplantar células, genes e/ou proteínas dentro de um material poroso conhecido como arcabouço [2, 3].

O arcabouço é uma estrutura tridimensional (3D), porosa, capaz de promover a troca de nutrientes e oxigênio por meio de uma rede porosa interconectada. Esta estrutura deve fornecer uma matriz extracelular para organizar as células em uma arquitetura 3D, apresentar estímulos que direcionam o crescimento e a formação do tecido desejado [4], além de proporcionar o suporte para a fixação celular e tecidual [2, 5]. Dessa forma, o arcabouço consegue desempenhar um papel significativo na regeneração de tecidos, especificamente no tecido ósseo, preservando o volume do tecido danificado e proporcionando uma função mecânica temporária [3].

Um arcabouço ideal deve guiar a regeneração óssea, com características mecânicas, biológicas e morfológicas que permitam uma transição sequencial na qual o tecido regenerado assumira a função do arcabouço [2]. Especificamente, o arcabouço deve possuir propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos locais onde será implantado, proporcionar um suporte temporário a aplicação de cargas *in vivo* durante o processo de regeneração, possuir características biológicas específicas para provocar adesão, proliferação e diferenciação celular; ser processado facilmente com variedades de formas e tamanhos e ser altamente poroso [3, 6].

A produção de arcabouços foi realizada a partir de blendas a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC) usando a técnica de réplica da esponja polimérica. Esta técnica consiste na impregnação de esponjas poliméricas com suspensão cerâmica contendo um ligante, seguida pelo tratamento térmico [7]. Trata-se de um método simples e versátil, pois pode ser aplicado a uma grande variedade de composições cerâmicas desde que o material possa ser disperso em uma suspensão. Este método tem recebido atenção particular por produzir arcabouços com alta porosidade e com poros interconectados [8].

A escolha do CAC se deveu às suas características únicas de endurecimento, biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e facilidade de processamento [9]. Este

material é capaz de formar apatita ou hidroxiapatita carbonatada em sua superfície (verificando sua bioatividade) melhorando assim sua osseointegração [10, 11]. Ele desenvolve uma resistência mecânica apreciável à temperatura ambiente, em contraste com outras biocerâmicas que dependem necessariamente da sinterização a altas temperaturas. Quando adicionado a outros materiais, o CAC aumenta significativamente a resistência do biomaterial, que é um requisito indispensável para os arcabouços [11].

Composições à base de cimento de aluminato de cálcio também mostraram grande potencial como biomaterial [12, 13]. A presença de duas ou mais matérias-primas em uma mistura à base de cimento pode afetar as propriedades reológicas e o empacotamento de partículas do sistema. Os pós-finos tendem a preencher os vazios entre as partículas grandes diminuindo a porosidade das paredes do arcabouço aumentando sua resistência mecânica [13].

Um estudo mostrou que as composições produzidas com a adição de apenas 4% em peso de partículas finas de fosfato tricálcico, hidroxiapatita, zircônia, alumina e principalmente óxido de zinco aumentaram a resistência mecânica do CAC [12]. Essas composições também resultaram em amostras com baixos níveis de porosidade e menores tamanhos de poros após contato com solução de fluido corporal simulado (SBF). Esse comportamento foi associado à formação de apatita na superfície do material, indicando sua bioatividade, pois os fosfatos precipitados na superfície podem preencher os poros [14].

Dentro deste contexto o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização de arcabouços de blendas de CAC (alumina, zircônia e óxido de zinco) quanto à resistência mecânica à compressão, bioatividade e comportamento em cultivo celular, comparado ao CAC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foram misturados a seco o cimento de aluminato de cálcio com o dispersante Castament FS60 (Bayer, 0,6%-p) e o plastificante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Labsynth, 2,8%-p) em moinho de bolas durante 1 hora produzindo a amostra CAC. A seguir diferentes compostos foram adicionados e homogeneizados durante 1 hora com auxílio de moinho de bolas produzindo-se as seguintes blendas: 4%-p de alumina, zircônia e óxido de zinco.

Para a fabricação dos arcabouços, foram usadas esponjas comerciais com número de poros por polegada linear (PPI) de 49. As esponjas foram inicialmente impregnadas com

solução de álcool polivinílico (0,11 g/ml de água) e deixadas sob fluxo de ar frio durante 5 minutos para desobstrução dos poros, visando gerar uma camada aderente na esponja. Logo após, as esponjas foram imersas nas suspensões de CAC ou suas blends (60%-p de sólidos) e comprimidas enquanto submersas, para preencher completamente os poros. As esponjas impregnadas foram então retiradas da suspensão, pressionadas contra uma peneira para retirar o excesso de suspensão e deixadas novamente sob fluxo de ar frio por 5 minutos para desobstruir os poros [15]. Os processos de imersão e desobstrução de poros foram repetidos duas vezes para garantir a impregnação, permitindo assim melhorar a resistência do arcabouço resultante. Depois disso, as esponjas foram mantidas a 50°C por 24h em um ambiente saturado e secas a 110°C por 24 horas. A queima para remover toda a esponja polimérica foi realizada a 700°C por 4 horas com posterior tratamento térmico a 1300°C por 2 horas (5°C/min).

Os arcabouços foram caracterizados quanto à resistência mecânica a compressão usando uma máquina universal de ensaios, modelo DL-10000, marca EMIC, com capacidade máxima de carga de 100 kN e adaptada com a célula de carga, com capacidade de carga de 5 kN numa velocidade de 0,5 mm/min. As superfícies dos corpos de prova foram apoiadas em papel cartolina de forma a deixar ambas as superfícies as mais paralelas possíveis, com o objetivo de minimizar o efeito das arestas. Arcabouços foram produzidos a partir de esponjas cortadas no formato quadrado (15×15×15 mm³) seguindo as especificações e condições da literatura [16].

Por outro lado, arcabouços (10x5x5 mm³) foram esterilizados a seco a 110°C durante 24 horas, seguidos de exposição a uma lâmpada germicida ultravioleta durante 30 minutos e caracterizados por meio de testes de bioatividade e cultivo celular (citotoxicidade e atividade da fosfatase alcalina -ALP). Somente para os testes de cultivo celular foram realizadas análises estatísticas.

Para avaliar a bioatividade, os arcabouços foram colocados em frascos plásticos contendo solução de fluido corporal simulado (SBF) e mantidos sob agitação usando um shake a 37°C. Após 21 dias, os arcabouços foram lavados com água destilada, secos a 37°C por 24 horas e avaliados por microscopia eletrônica de varredura.

A viabilidade celular ou citotoxicidade foi determinada pelo ensaio do MTT (capacidade das células viáveis reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio com a formação de cristais de formazan de cor púrpura). As células de osteoblastos (mesenquimais de fêmur de ratos) foram colocadas na superfície dos arcabouços

na densidade de $2,5 \times 10^4$ células e mantidas em estufa de CO_2 por 7 dias. Após esse período, alíquotas de MTT em PBS foram preparadas, adicionadas ao meio de cultura celular com o objetivo de verificar a quantidade de células viáveis, procedendo-se em seguida à incubação das culturas em atmosfera úmida a 37°C por 4h para formação de cristais de formazan. Posteriormente, a solução de MTT foi removida, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado ácido isopropanol (0.04 N HCL em isopropanol). A seguir, a placa foi colocada sob agitação para solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços (Greiner) para medida de densidade óptica a 570 nm em espectrofotômetro EL808IU (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA). O valor de MTT para cada grupo foi expresso como porcentagem do controle (CAC) que foi estabelecido em 100%.

A atividade de fosfatase alcalina para verificar a diferenciação em célula óssea foi determinada após 7 dias de cultura celular, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica). A densidade óptica foi medida a 590 nm após 30 minutos em um espectrofotômetro UV 1203. A atividade relativa de ALP foi calculada para cada grupo e os resultados foram expressos em μmol de timolftaleína/hora/mg proteína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com respeito à resistência a compressão são apresentados na Figura 1. Os arcabouços apresentaram resultados dentro da faixa citada na literatura correspondente ao osso trabecular (2-12 MPa) [18]. Em relação às composições, não foram observadas diferenças significativas entre elas.

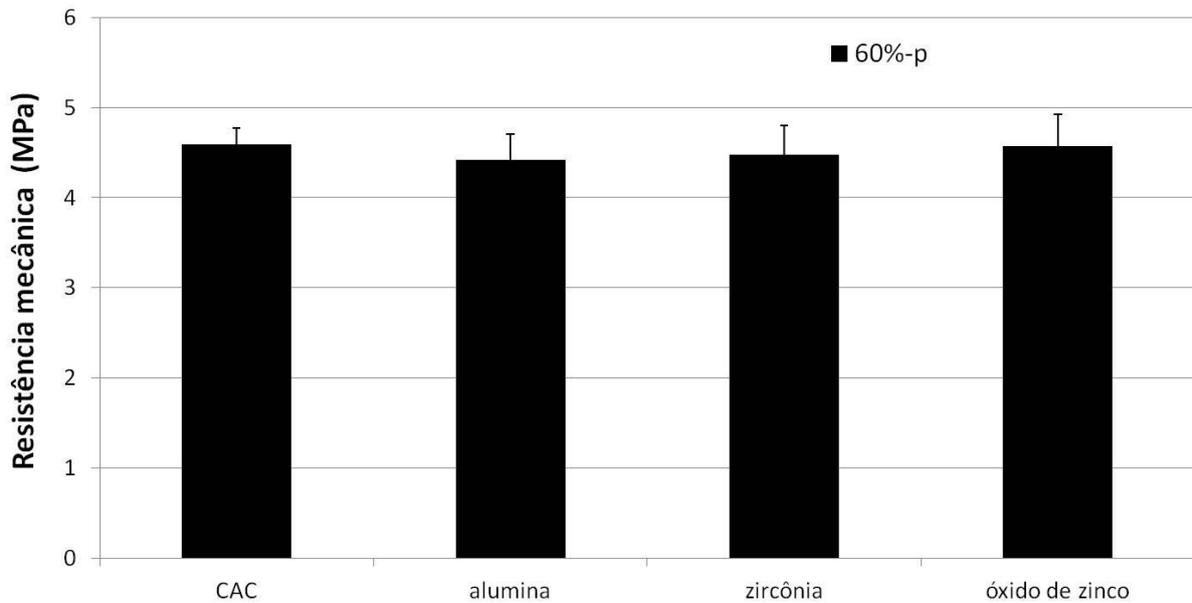


Figura 1: Resistência à compressão (MPa) para arcabouços preparados a partir de suspensões aquosas de CAC ou suas blendas contendo 4%-p de alumina, zircônia ou óxido de zinco, pelo método de réplica de esponja polimérica com teor de sólidos de 60%, após tratamento térmico a 1300°C.

As micrografias dos arcabouços após tratamento em SBF por 21 dias são apresentadas na Figura 2. Observa-se que com o tratamento com SBF ocorreram precipitações recobrando suas paredes. Esse comportamento pode ser justificado pela bioatividade das amostras quando expostas a um meio simulador do fluido corporal (SBF). A bioatividade é definida como a capacidade de um material em formar em sua superfície uma camada de hidroxiapatita carbonatada que promove uma interface de ligação forte com os tecidos vivos [19]. A fase de hidroxiapatita carbonatada que se forma na superfície do material bioativo é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso desse modo é esta equivalência que é responsável pela ligação interfacial, permitindo uma ligação química ao osso [19].

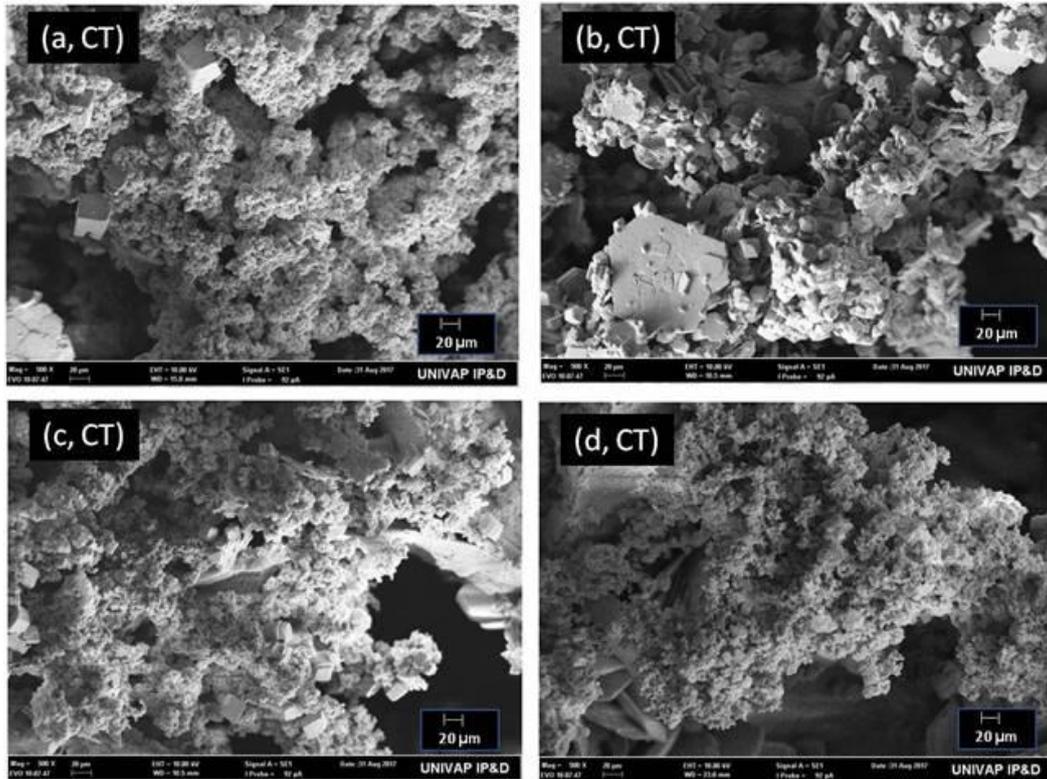


Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura com tratamento em SBF (CT) durante 21 dias a 37 °C de arcabouços preparados a partir de suspensões aquosas de (a) CAC ou suas blendas contendo 4%-p de (b) alumina, (c) zircônia ou (d) óxido de zinco, pelo método de réplica de esponja polimérica com teor de sólidos de 60%-p, após tratamento térmico a 1300°C.

Testes de viabilidade celular ou atividade metabólica celular foram avaliados pelo uso de MTT, o qual é reduzido a um produto insolúvel quando em contato com células vivas [20]. Este precipitado pode ser solubilizado resultando em uma solução colorida cuja absorvância pode ser quantificada. Ao mesmo tempo, essas células têm a capacidade de sintetizar e a medida do teor de proteína total sintetizada pode ser considerada um parâmetro importante para a avaliação da osteogênese *in vitro* [20].

Os resultados do teste (MTT) e atividade de ALP após 7 dias de exposição dos arcabouços à cultura de células mesenquimais são apresentados na Figura 3.

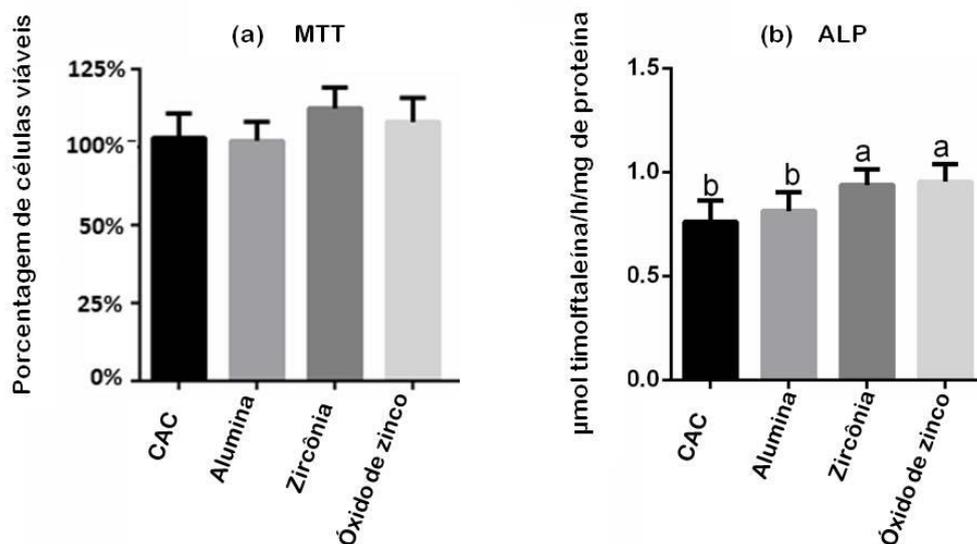


Figura 3: (a) Teste de viabilidade celular (MTT) e (b) atividade da fosfatase alcalina (ALP) após 7 dias de exposição dos arcabouços à cultura de células osteoblásticas.

Os resultados mostraram adequada viabilidade celular para todas as blendas estudadas, pois apresentaram valores superiores a 70%, e nenhum grupo apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) com o grupo CAC (controle). No entanto, as amostras das blendas zircônia e óxido de zinco demonstraram maior número de células viáveis. Assim, estes resultados mostraram que houve influência da composição do arcabouço no crescimento celular.

Neste estudo, os grupos zircônia e óxido de zinco apresentaram os maiores valores de atividade da fosfatase alcalina (ALP), os quais apresentaram diferença estatística com os demais grupos ($p < 0,05$). A atividade ALP de uma composição específica pode indicar a sua capacidade de induzir a mineralização [21].

CONCLUSÕES

Os arcabouços produzidos neste trabalho mostram-se adequados para substituir o osso trabecular uma vez que apresentaram resistência na faixa de 2-12 MPa, independente da sua composição. Os arcabouços também se mostraram bioativos, independente da sua composição devido à precipitação de fases de apatitas sobre o material quando tratado em SBF.

Todas as composições estudadas na produção dos arcabouços mostraram adequada viabilidade celular, pois apresentaram valores superiores a 70% no teste de MTT. No entanto, as blendas zircônia e óxido de zinco mostraram-se mais promissoras resultando em maior número de células viáveis. Os grupos zircônia e óxido de zinco também apresentaram os

maiores valores de atividade da fosfatase alcalina (ALP), indicando a sua capacidade de induzir a mineralização (evento final na formação óssea).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fapesp #2016/15032-3 e CNPq #301665/2015-0 pelo apoio a esta pesquisa, bem como a Imerys Aluminates (França) por fornecer gentilmente amostras de CAC.

REFERÊNCIAS

- [1] E. Silva; D. Mooney, Synthetic extracellular matrices for tissue engineering and regeneration. *Current topics in developmental biology*, 64 (2004) 181-205.
- [2] J. Scott, Porous scaffolds design for tissue engineering. *Nature materials*, 4 (2005) 518-524.
- [3] F. Zohora, Biomaterials as porous scaffolds for tissue engineering applications: a review. *European scientific journal*, 10, (2004) 186-209.
- [4] S. Yang, K. Leong, Z. Du, C. Chua, The design of scaffolds for use in tissue engineering, part I. Traditional factors. *Tissue engineering*, 7 (2001) 679-89.
- [5] T.B.F. Woodfield, J. Malda; J. Wijn, F. Péters, J. Riesle, C.A van blitterswijk, Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials*, 25 (2004) 4149-416.
- [6] J.R. Jones, New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *Journal of the european ceramic society*, 29 (2009) 1275-1281.
- [7] H.R. Ramay, M. Zhang, Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials*, 24 (2003) 3293-3302.
- [8] I. Sopyan, J. Kaur, S. Ramesh, M. Hamdi, Bioactive porous ceramics via polymeric sponge method: the effect of preparation conditions on physical properties. *International Conference on smart materials and nanotechnology in engineering*, 6423-64233D-3 (2014).
- [9] L. Hermansson, Nanostructural chemically bonded Ca-aluminate based bioceramics. *Biomaterials-physics and chemistry*, 47-74 (2011).
- [10] I.R. Oliveira, T. L. Andrade, V.C. Pandolfelli, M. Jacobovitz, Bioactivity of calcium aluminate endodontic cement. *Journal endodontics*, 39 (2013) 774-778.
- [11] P. Moraes, I. Marques, F. Basso, H. Rossetto, F. Souza, C. Costa, L. Garcia, Repair of bone defects with chitosan-collagen biomembrane and scaffold containing calcium aluminate cement. *Brazilian dental journal*, 28 (2017) 287-295.
- [12] R. Parreira, T. Andrade, V. Luz, V. Pandolfelli, I. Oliveira, Calcium aluminate cement-based compositions for biomaterial applications. *Ceramics international*, 42 (2016) 117-138.
- [13] I. R. Oliveira, T. Andrade, K. Araujo, A. luz, V. Pandolfelli, Hydroxyapatite synthesis and the benefits of its blend with calcium aluminate cement. *Ceramics international*, 42 (2016) 2545-2549.
- [14] I. R. Oliveira, L. Raniero, V. Leite, L. Castro, P. Oliveira, V. Pandolfelli, In vitro apatite-forming ability of calcium aluminate blends. *Ceramics international*, 43 (2017) 10071-10079.

- [15] A. Sifontes, M. Urbina, F. Fajardo, L. Melo, L. Garcia, M. Mediavilla, m.; N.Carrión, J. Brito, P. Hernández, R. Solano, G. Mejias, A. Quintero, Preparation of γ -alumina foams of high surface area employing the polyurethane sponge replica method. *Latin american applied research*, 40 (2010) 85-191.
- [16] P. Miranda, A. Pajares, Fracture modes under uniaxial compression in hydroxyapatite scaffolds fabricated by robocasting. *International science, journal of biomedical materials research*, 646-655.
- [17] O. Lowry, N. Rosenbrough, A. Farr, R. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, (1951) 265-275.
- [18] J. Henkel, M. Woodruff1, R. Devakara, Bone regeneration based on tissue engineering conceptions. *Bone research*, 3 (2013) 216-248.
- [19] P. Silva, p.; R. Oréfice, Bioactive composites obtained by adding a bioactive glass to poly (methyl methacrylate). *Polímeros: ciência e tecnologia*, 11 (2001) 109-115.
- [20] M. Beloti, A. Rosa, Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuos treatment with dexamethasone. *Brazil dental journal*, 16 (2005)156-161.
- [21] J. Lincks, B. Boyan,C. Blanchard, C. Lohmann, Y. Liu, D. Cochran, Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19 (1998) 2219-2232.