

## CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DE SCAFFOLDS A BASE DE CIMENTO DE ALUMINATO DE CÁLCIO PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

I.N.G. Vicuna<sup>1</sup>, K.W. dos Santos<sup>1</sup>, V.C. Pandolfelli<sup>2</sup>, I.R. de Oliveira<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos  
São Carlos – SP  
[ivonero@univap.br](mailto:ivonero@univap.br)

**Resumo.** *Scaffolds de biocerâmicas vêm sendo desenvolvidos para aplicação no reparo de defeitos ósseos, sendo constituídos de estruturas 3-D que promovem o crescimento celular e a formação do tecido interconectado. A análise das propriedades biológicas de um scaffold é fundamental para a análise inicial da sua biocompatibilidade já que pode ser verificada a migração, crescimento e proliferação celular, visando avaliar a confiabilidade do uso do material em aplicações in vivo. O cimento de aluminato de cálcio (CAC) vem sendo estudado como biocerâmica devido a suas propriedades biológicas como sua capacidade de favorecer a diferenciação de células da linhagem osteoblástica que expressam fosfatase alcalina, ou seja, induz o crescimento das células formadoras de osso que permanecem em contato com sua superfície. Dentro deste contexto, blendas a base de CAC, contendo 4% em peso de aditivos (alumina, hidroxiapatita e fosfato tricálcico) foram usadas para a preparação de scaffolds. Tais composições têm mostrado grande potencial como biomaterial melhorando as propriedades do CAC puro. Scaffolds foram produzidos com suspensões aquosas contendo 60%-p de sólidos por meio do método de réplica da esponja polimérica, seguida pelo tratamento térmico para queima da parte orgânica. Os scaffolds foram caracterizados in vitro pela exposição a cultura de osteoblastos determinando-se o conteúdo de proteína total e formação de nódulos mineralizados semelhantes a ossos e quanto à bioatividade quando expostos a fluido corporal simulado (SBF). Todas as blendas estudadas na produção dos scaffolds mostraram adequada viabilidade celular e bioatividade. O grupo de alumina apresentou maior produção de proteína total. Entretanto, maior formação de matriz mineralizada foi exibida para o grupo fosfato tricálcico, indicando esta composição como a mais apropriada para a produção de scaffolds para ser aplicada na engenharia de tecidos.*

**Palavras-chave:** *cimento de aluminato de cálcio, scaffold, in vitro, bioatividade.*

### 1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos vem desenvolvendo novas técnicas para abordar as limitações envolvidas na regeneração óssea, com o objetivo de fornecer implantes que permitam restaurar órgãos e ossos, além de estimular a formação do novo tecido [Fuchs, 2001; Silva, 2004]. Uma das áreas de pesquisa mais importante neste campo é a fabricação de *scaffold* já que 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 [Zohora, 2004]. O *scaffold* ideal deve fornecer uma matriz extracelular sintética para organizar as células em uma arquitetura 3D, que adicionalmente consiga apresentar estímulos que direcionam o crescimento e a formação do tecido desejado [Yang, 2001], além de ser poroso, capaz de promover a troca de nutrientes e oxigênio por meio de uma rede interconectada fornecendo um suporte para a fixação celular e tecidual [Scott, 2005; Woodfield, 2004]. O sucesso do *scaffold* vai depender da migração, crescimento e proliferação celular que consiga ser estimulado [Yang, 2001].

No entanto, ainda os *scaffolds* apresentam limitações envolvidas na compatibilização das propriedades mecânicas com as biológicas, no qual está fortemente relacionado com o tipo de material usado para a fabricação dos mesmos [Zohora, 2004]. Dentro deste contexto, neste trabalho foi avaliada a produção de *scaffolds* a partir de blendas a base de cimento de aluminato de cálcio (CAC). A escolha do CAC como biomaterial se deveu às suas características promissoras de endurecimento, boas propriedades mecânicas e facilidade de processamento [Hermansson, 2011]. Adicionalmente, este material é capaz de formar apatita ou hidroxiapatita carbonatada em sua superfície, verificando assim sua bioatividade e por conseguinte facilitar sua osseointegração com o tecido a ser reparado [Parreira, 2016; Oliveira, 2016].

Por outro lado o uso de blendas à base de cimento de aluminato de cálcio também mostraram grandes contribuições como biomaterial [Parreira, 2016; Oliveira, 2016]. 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 *scaffolds* aumentando sua resistência mecânica [Oliveira, 2016].

Por tal motivo, dentro deste contexto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência das blendas tais como alumina, hidroxiapatita e fosfato tricálcico a base de CAC por meio de ensaios *in vitro* que são necessários para avaliar a influência na bioatividade e atender a eficiência na transferência e migração celular a través da caracterização quanto a formação de apatita e comportamento em cultivo celular, comparado ao CAC.

## 2. 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, hidroxiapatita e fosfato tricálcico.

Essas blendas foram usadas na preparação de suspensões aquosas (60%-p de sólidos) com as quais foram preparadas *scaffolds* ( $10 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ ). Para a fabricação dos *scaffolds*, 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 blendas (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 [Sifontes, 2010].

Os processos de imersão e desobstrução de poros foram repetidos duas vezes para garantir a impregnação, permitindo assim melhorar a resistência do *scaffold* resultante. Depois disso, as esponjas foram mantidas a  $50^\circ\text{C}$  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).

Por outro lado, *scaffolds* (10x5x5 mm<sup>3</sup>) 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 (proteína total e formação de nódulos de mineralizados). Somente para os testes de cultivo celular foram realizadas análises estatísticas.

Para adesão celular as células de osteoblastos foram colocadas na superfície dos *scaffolds* na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por 5 dias. Após este período, cada poço foi lavado com tampão fosfato-salino (PBS) por duas vezes. A seguir, a solução fixadora composta por glutaraldeído; paraformaldeído e PBS foram colocadas nos poços por 15 minutos. A solução fixadora foi removida, uma nova lavagem com PBS foi realizada por duas vezes. Para a análise por microscopia eletrônica de varredura, os *scaffolds* foram desidratados em soluções crescentes de etanol (25, 50, 70, 90, 95, 100%), 10 min em cada concentração. O álcool foi removido e a placa foi deixada em repouso para secar.

Para avaliar o conteúdo de proteína total para verificar a atividade celular foi avaliado após 7 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry [Lowry, 1951]. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados com PBS e preenchidos com lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich), para extração das proteínas. Posteriormente, a solução de cada poço foi misturada com a solução de Lowry (Sigma-Aldrich). A esta mistura foi adicionado o reagente de Folin e Ciocalteu (Sigma-Aldrich). A seguir, a densidade óptica foi medida a 680 nm após 30 minutos num espectrofotômetro UV 1203. O teor total de proteína foi calculado a partir de uma curva padrão determinada a partir da albumina bovina e expressa em µg/ml.

Para determinar a formação dos nódulos de mineralização como osso, após 14 dias de cultura, o meio foi removido e os poços lavados três vezes com solução de Hank (Sigma) a 37°C, e as culturas foram fixadas com etanol a 70% por 1 hora a 4°C. Depois os poços foram lavados duas vezes com PBS e corados com vermelho Alizarina S a 2% (Sigma), pH 4,2. Os *scaffolds* foram lavados três vezes com H<sub>2</sub>O deionizada, secos durante 24 h a 37°C e fotografados em microscopia de contraste de fase (Modelo Axiovert 40C, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemanha). A quantificação da formação mineralizada foi realizada de acordo com o método previamente descrito por Gregory et al. [Gregory, 2004]. Em seguida, 560µL de ácido acético a 10% foram adicionados a cada poço, seguidos de 40 µL de hidróxido de amônia a 10% para neutralizar o ácido. A leitura foi realizada a 405 nm em espectrofotômetro. Os valores foram expressos como densidade óptica.

As comparações dos resultados foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (One-way ANOVA) para amostras independentes, seguido do método de Student-Newman-Keuls, quando apropriado. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Para avaliar a bioatividade, os *scaffolds* 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 *scaffolds* foram lavados com água destilada, secos a 37°C por 24 horas e avaliados por microscopia eletrônica de varredura.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as composições de alumina e hidroxiapatita apresentaram valores elevados no teor de proteína. Porém o grupo alumina foi quem apresentou maior produção, mas não apresentou diferença estatística com os grupos CACH e HA ( $p > 0,05$ ). Assim, estes resultados mostraram que houve influência da composição dos *scaffolds* no crescimento celular (Figura 1, a).

Diferenças significativas foram observadas nos resultados para a formação de nódulos mineralizados semelhantes a ossos. A maior formação de matriz mineralizada foi exibida para o grupo fosfato tricálcico, que apresentou diferença estatística com todos os grupos ( $p < 0,05$ ). Estas descobertas sugerem que o fosfato tricálcico pode ser o material mais apropriado para a engenharia de tecidos (Figura 1, b).

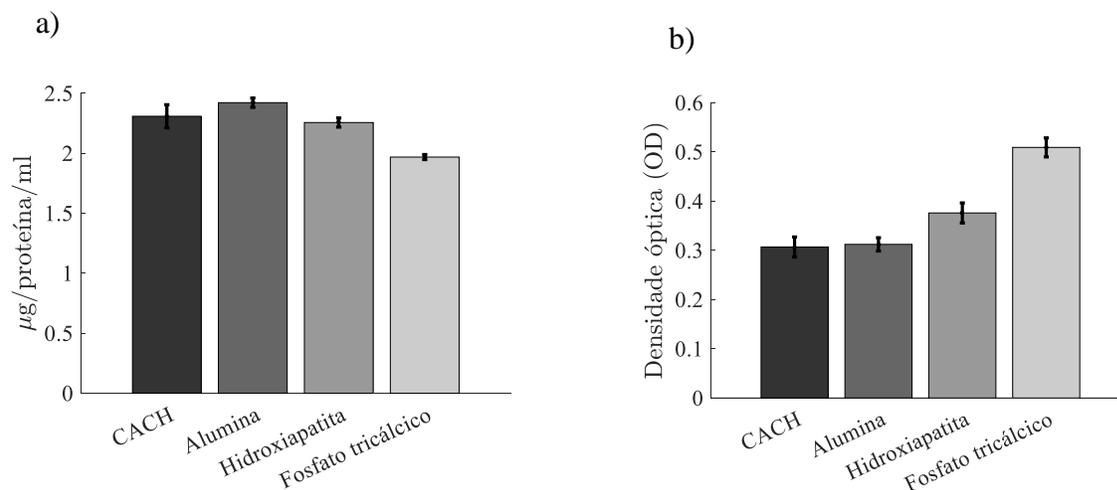


Figura 1: a) Teor de proteína total após 7 dias de exposição dos *scaffolds* à cultura de células osteoblásticas, b) Nódulos de mineralização após 14 dias de exposição dos *scaffolds* à cultura de células osteoblásticas.

Por outro lado, a precipitação *in vitro* de hidroxiapatita na superfície dos materiais imersos em SBF indica sua bioatividade (Figura 3) [Kokubo, 2006]. Solução SBF contém concentração de íons inorgânicos similar à do fluido extracelular humano (plasma humano) visando reproduzir a formação *in vitro* de apatita sobre materiais bioativos [Rigo, 2004; Kokubo, 2006]. SBF é uma solução metaestável e irá alcançar estabilidade termodinâmica por meio da formação de precipitados, incluindo diferentes fases CaP. Hidroxiapatita é a fase mais estável termodinamicamente formada a partir da solução SBF. Essa precipitação de fosfatos de cálcio em SBF ocorre de poucos dias a duas semanas uma vez que o nível de supersaturação na composição SBF comumente não permite taxas de deposição rápidas [Demirtas, 2015].

Nas Figura 3, pode ser observadas as micrografias eletrônicas de varredura sem tratamento (ST) ou com tratamento em SBF (CT). Por outro lado, as análises por MEV (Figura 4) revelaram adesão de células osteoblásticas em todos os *scaffolds* estudados. As

células se espalharam de forma saudável em todos eles, e a morfologia das células não mudou com a exposição às diferentes composições.

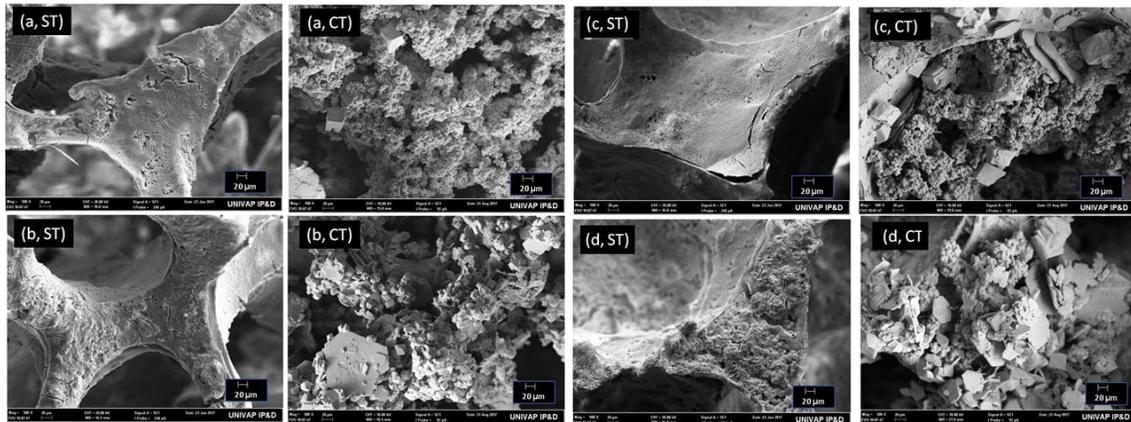


Figura 3: Micrografias eletrônicas de varredura sem tratamento (ST) ou com tratamento em SBF (CT) durante 21 dias a 37 °C de *scaffolds* preparados a partir de suspensões aquosas de (a) CACH ou suas blends contendo 4%-p de (b) alumina, (c) hidroxiapatita ou (d) fosfato tricálcico, pelo método de réplica de esponja polimérica com teor de sólidos de 60%-p, após tratamento térmico a 1300 °C.

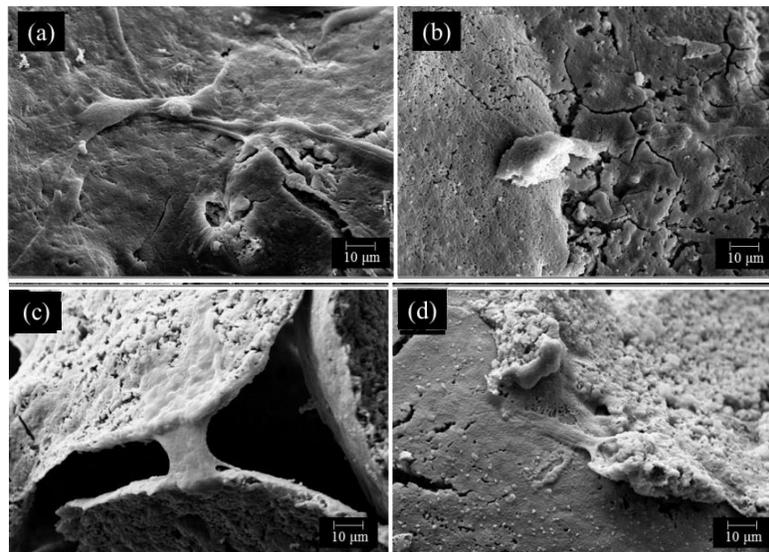


Figura 4: Micrografias eletrônica de varredura dos *scaffolds* após exposição da cultura de osteoblastos por 5 dias aos *scaffolds* preparados a partir de suspensões aquosas de (a) CACH e suas blends contendo 4%-p de ((b) alumina, (c) hidroxiapatita ou (d) fosfato tricálcico, pelo método de réplica de esponja polimérica com teor de sólidos de 60%-p, após tratamento térmico a 1300 °C.

Na Tabela 1, mostrasse o resumo geral dos resultados obtidos na caracterização dos *scaffolds*.

Tabela 1. Resumo de resultados obtidos na caracterização dos *scaffolds* quanto a teor de proteína, nódulos de mineralização e bioatividade nas diferentes composições.

Caracterização	Blendas		
	Alumina	Hidroxiapatita	Fosfato Tricálcico
Teor de Proteína	X	X	-
Nódulos	-	-	X
Bioatividade	X	X	X

Fonte: Autor.

#### 4. CONCLUSÕES

Os *scaffolds* produzidos neste trabalho se mostraram bioativos, independente da sua composição devido à precipitação de fases de apatitas sobre o material quanto tratado em SBF.

Todas as composições estudadas na produção dos *scaffolds* mostraram adequada formação de proteína. No entanto, a blenda de alumina apresentou valores mais elevados. Por outro lado, a maior formação de matriz mineralizada foi exibida para o grupo fosfato tricálcico, indicando esta composição como a mais promissora para estimular a formação e diferenciação celular da linha osteoblásticas.

#### IN VITRO CHARACTERIZATION OF SCAFFOLDS BASED ON CALCIUM ALUMINATE CEMENT FOR BONE REGENERATION

I.N.G. Vicuna<sup>1</sup>, K.W. dos Santos<sup>1</sup>, V.C. Pandolfelli<sup>2</sup>, I.R. de Oliveira<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos  
São Carlos – SP  
[ivonero@univap.br](mailto:ivonero@univap.br)

**Abstract.** *Bioceramic scaffolds have been developed for application in bone defect repair. They are 3-D structures that promote cell growth and interconnected tissue formation. The analysis of the biological properties of a scaffold is fundamental for the initial analysis of its biocompatibility since cell migration, growth and proliferation can be verified. The final objective is to evaluate the reliability of the material to be used in vivo applications. Calcium Aluminate Cement (CAC) has been studied as bioceramic due to its biological properties, as well as, due to its capacity to favor the differentiation of cells of the osteoblastic lineage expressing alkaline phosphatase. The CAC induces the growth of bone-forming cells that remain in contact with its surface. In this research, CAC-based blends containing 4% by weight of additives (alumina, hydroxyapatite and tricalcium phosphate) were used for the preparation of scaffolds via polymer sponge replica. Those compositions have shown great*

*potential as biomaterial improving the properties of pure CAC. Scaffolds were produced from aqueous suspensions containing 60 wt% solids by the polymer sponge replica method, followed by heat treatment to burn the organic part. The scaffolds were characterized in vitro by exposure to osteoblast culture to determine the total protein content, bone-like mineralized nodule formation, and bioactivity when exposed to simulated body fluid (SBF). All the blends studied in the production of scaffolds showed adequate cell viability and bioactivity. The alumina group presented higher total protein production. However, the tricalcium phosphate group exhibited a higher mineralized matrix formation indicating this composition as the most suitable for producing scaffolds to be applied in tissue engineering.*

Keywords: calcium aluminate cement, scaffold, in vitro, bioactivity.

## **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), a Vanderbilt Minerals (EUA) e BASF (Alemanha) por fornecer gentilmente amostras de CAC e aditivos.

## **REFERÊNCIAS**

- Demirtas, T., Kaynak, G., Gümüşderelioğlu, M. Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10xSBF-like solution by microwave irradiation, *Materials science engineering*, v. 49, p. 713-719, 2015.
- Fuchs, J., Boris, A., Vacanti, P. Tissue Engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction. *The society of thoracic surgeons*, v. 72, p. 577-591, 2001.
- Gregory, C., Gunn, W., Peister, A., Prockop, D. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*, v. 329, p. 77-94, 2004.
- Hermansson, L. Nanostructural chemically bonded Ca-aluminate based bioceramics. *Biomaterials-physics and chemistry*, p. 47-74, 2011.
- Kokubo, T.,H. Takadama. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, v. 27, p. 2907-2915, 2006.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, p. 265-275, 1951.
- Scott, J. Porous scaffolds design for tissue engineering. *Nature materials*, v. 4, p. 518-524, 2005.
- Sifontes, A., Urbina, M., Fajardo, F., Melo, L., Garcia, L., Mediavilla, M., Carrión, N., Brito, J., Hernández, P., Solano, R., Mejias, G., Quintero, A. Preparation of  $\gamma$ -alumina foams of high surface area employing the polyurethane sponge replica method. *Latin american applied research*, v. 40, p. 85-191, 2010.
- Silva, E., Mooney, D. Synthetic extracellular matrices for tissue engineering and regeneration. *Current topics in developmental biology*, v. 64, p. 181-205, 2004.
- Oliveira, I., Andrade T., Araujo, K., Luz, A., V. Pandolfelli. Hydroxyapatite synthesis and the benefits of its blend with calcium aluminate cement. *Ceramics international*, v. 42, p. 2545-2549, 2016.

Parreira, R., Andrade, T., Luz, V., Pandolfelli, V., Oliveira, I. Calcium aluminate cement-based compositions for biomaterial applications. *Ceramics international*, v. 42, p. 117-138, 2016.

Rigo, E., Boschi, O., Yoshimoto, M., Allegrini, S., König, B., Carbonari, M. Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Materials science engineering*, v. 24, p. 647-651, 2004.

Woodfield, T., Malda J, Wijn, J., Péters, F., Riesle, J., Van Blitterswijk, C.A. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials*, v. 25, p. 4149-416, 2004.

Yang, S., Leong, K., Du, Z., Chua, C. The design of scaffolds for use in tissue engineering, part I. Traditional factors. *Tissue engineering*, v. 7, p. 679-89, 2001.

Zohora, F. Biomaterials as porous scaffolds for tissue engineering applications: a review. *European scientific journal*, v. 10, p. 186-209, 2004.