



ADIÇÃO DE LIGNOSSULFONATO E FIBRAS A CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO

L.A. dos Santos¹, R.G. Carrodegua²; S. O. Rogero³, O. Z. Higa³, A. O. Boschi⁴ e A. C. F. de Arruda⁵

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Materiais . Av. Osvaldo Aranha, 99 – Centro – Porto Alegre – Brasil. E-mail: luis.santos@ufrgs.br

2 Universidad de La Habana - Centro de Biomateriales- La Habana – Cuba.

3 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP

4 Universidade Federal de São Carlos - Departamento de Engenharia de Materiais- São Carlos – SP - Brasil.

5 Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP-FEM – Campinas SP -Brasil.

RESUMO

Os cimentos ósseos de fosfato de cálcio (CFCs) possuem uma série de vantagens de utilização em ortopedia, permitindo o uso como substituto dos tecidos ósseos. Isso ocorre devido à sua biocompatibilidade e bioatividade, que permitem a osteocondução. A principal desvantagem destes cimentos é sua baixa resistência mecânica. CFCs com valores elevados de resistência mecânica poderiam ter aplicações na consolidação de fraturas, fixação de próteses entre outras. No presente trabalho foi estudada a adição de lignossulfonato de sódio e fibras de carbono, polipropileno e náilon a uma composição de CFC baseada no alfa-fosfato tricálcico. A adição de lignossulfonato, apesar de reduzir a quantidade de líquido para preparação do cimento, não produziu melhoria das propriedades mecânicas, sendo apenas observado um maior valor para a composição adicionada de fibras de carbono. A adição de lignossulfonato permitiu a obtenção de pH mais próximo de 7,0, com melhoria da resposta citotóxica in vitro.

Palavras-chaves: Cimento ósseo, cimento de fosfato de cálcio, biocerâmica.

INTRODUÇÃO



Os cimentos de fosfato de cálcio reúnem uma série de vantagens, dentre elas biocompatibilidade e bioatividade, que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo. Um cimento deste tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água, ou com uma solução aquosa, para que se forme uma pasta que possa reagir a temperatura ambiente ou corporea, para dar lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio, dando pega pelo inter cruzamento dos cristais deste precipitado. Além de uma maior manipulação e adaptação, os cimentos de fosfatos de cálcio podem ser empregados como matriz portadora de medicamentos ou drogas, tais como, antibióticos, antitumores, anti-inflamatórios⁽¹⁾, etc.. A principal desvantagem dos cimentos de fosfato de cálcio conhecidos é a sua baixa resistência mecânica, que no melhor dos casos consegue igualar-se ao do osso trabecular, ou um quinto do osso cortical. Composições mais resistentes de cimentos de fosfato de cálcio encontrariam aplicações em ortopedia e neurocirurgia, como alternativa para a consolidação de fraturas múltiplas de ossos longos, fixação de próteses articulares cimentadas e substituição de discos intervertebrais e corpos vertebrais.

Uma fibra inserida em uma matriz qualquer contribui para aumentar a capacidade de suportar esforços do corpo. A carga é transferida através da matriz para a fibra, por deformação de cisalhamento na interface matriz-fibra. A incorporação de fibras em matrizes frágeis de cimento serve para aumentar a tenacidade a fratura do compósito pelo processo de freagem das trincas e conseqüente aumento nas resistências de tração, compressão e flexão do material compósito. A adição de defloculantes a composições de cimento permite a melhoria do acoplamento fibra/matriz, pois sua utilização permite a redução da quantidade de líquido na preparação do cimento, através da dispersão das partículas do cimento e redução da viscosidade, provocando uma redução da porosidade no cimento e assim acarretando uma melhoria das propriedades mecânicas e uma maior área de contato fibra/cimento, melhorando a ligação.

O objetivo do trabalho foi a melhoria das características e propriedades de um cimento de fosfato de cálcio baseado no alfa-fosfato tricálcico pela adição de fibras de carbono, polipropileno e náilon e de defloculante lignossulfonato de sódio.

MATERIAIS E MÉTODOS



Preparou-se α -fosfato tricálcico (α -TCP) conforme descrito na literatura⁽²⁾, através da reação: $\text{CaCO}_3 + \gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \Rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Os reagentes em quantidades equimolares foram misturados em moinho de bolas de zircônia, sendo calcinados a 1300°C por 15 horas⁽³⁾. O produto da reação foi moído em jarro de polietileno com bolas de zircônia em meio alcoólico (etanol anidro). A distribuição de tamanho de partículas foi determinada por distribuição granulométrica por sedimentação (Sedigraph-Micromeritics 5100) utilizando isopropanol como meio dispersante. Com o α -TCP obtido, e utilizando solução 2,5% mol de Na_2HPO_4 (relação líquido/pó=0,32) e outra contendo a mesma concentração de Na_2HPO_4 e 0,3% lignossulfonato de sódio como líquido (relação líquido/pó=0,30), foram adicionadas fibras de carbono, polipropileno e náilon. com diâmetros médios de 7,3 ; 16,3 e 10,7 μm respectivamente . As fibras utilizadas foram cortadas nos comprimentos: 4 mm para fibras de carbono; 6 mm para fibras de náilon e 10 mm para fibras de polipropileno. Os comprimentos foram escolhidos de forma a manter uma relação comprimento/diâmetro de aproximadamente 600. As fibras foram adicionadas ao cimento de fosfato de cálcio em frações volumétricas de 0; 1 e 2%. Os corpos de prova utilizados foram cilindros de 6 mm de diâmetro e 12 mm de altura para os ensaios de compressão, e cilindros de 20 mm de diâmetro por 10 mm de altura para os ensaios de compressão diametral. Após moldagem em molde de aço, os corpos de prova foram acondicionados a 100% de umidade relativa por 1 hora, sendo em seguida colocados em frascos contendo SBF (Simulated Body Fluid) e mantidos a $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 horas, sendo que para análise de difração de raios X também por 7 dias, sendo então ensaiados à compressão e compressão diametral, utilizando-se para cada ensaio 5 corpos de prova. As resistências à compressão foram medidas em máquina universal de ensaios modelo TTDML Instron Corporation Canton, Massachusetts, com velocidade da travessa de 1mm/min.

Alguns pedaços dos corpos de prova ensaiados à compressão foram recobertos com ouro e examinados no Microscópio Eletrônico de Varredura (Carl-Zeiss modelo DSM 940A), assim como para determinação da porosidade e densidade aparente após secagem ao ar, utilizando-se o método de Arquimedes e querosene como fluido. Para as análises qualitativas e quantitativas (método de padrão interno) de difração de raios-x, foram também utilizados restos dos corpos



de prova ensaiados após moagem em almofariz de ágata e passado em peneira malha 200 ABNT.

O teste de citotoxicidade foi realizado colocando-se diluições do extrato do pó do cimento de fosfato de cálcio em contato com cultura de células CHO em placa de petri (15X60mm), sendo utilizados como controle positivo uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo a alumina (Al_2O_3)^(4,5). Para os ensaio de citotoxicidade foram colocados 6 g do pó do cimento de fosfato de cálcio e 6 g de Al_2O_3 , esterilizados por radiação gama (25kGy), em frascos de vidro com capacidade de 100 mL. Foram adicionados 60 mL do meio de cultura MEM-Sfb (Minimum Eagle Medium contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de solução de penicilina e estreptomicina) e incubadas por 48 horas a 37C. Após este tempo os sobrenadantes foram filtrados em membrana Millipore, poros de 0,22 μm e foram feitas diluições seriadas dos extratos do cimento de fosfato de cálcio, Al_2O_3 e da solução de fenol 0,02% (50, 25, 12,5 e 6,25%). A alumina e a solução de fenol foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As células CHO foram cultivadas em garrafas de plástico em meio MEM-Sfb, em estufa a 37C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , até obtenção de uma camada de células. O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato salina sem cálcio e magnésio (PBS-CMF – Phosphate Buffer Saline–Calcium Magnesium Free). Para o desprendimento das células da garrafa foi adicionado uma solução de tripsina 0,2%. Após tripsinização as células foram lavadas duas vezes com PBS-CMF, ressuspensas em MEM-Sfb ajustando-se para uma suspensão contendo 100 células/mL. Dessa suspensão foram distribuídas 2 mL em cada placa de cultura (15x60mm) e incubadas por 5 horas para adesão das células. Após esse período o meio de cultura foi removido e nessas placas foram adicionados 5 mL do extrato puro e de cada diluição seriada. Na placa de controle de células CHO foi adicionado 5 mL do meio fresco. Foram feitas triplicatas de cada concentração dos extratos testados. As placas foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37C por 7 dias. Decorrido este tempo o meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas com solução de formol 10% diluído em solução salina 0,9% e coradas com corante de Giemsa. As colônias visíveis em cada placa foram contadas e comparadas com o número de colônias da placa controle de células CHO. O potencial citotóxico do material avaliado foi expresso em índice de citotoxicidade



(IC₅₀(%)), que é a concentração do extrato que suprime em 50% a formação de colônias de células, em relação ao controle⁽⁴⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O α -TCP obtido pelo método descrito anteriormente produziu um composto contendo impurezas de β -TCP (3%), determinados por difração de raios-x quantitativa. A distribuição granulométrica por sedimentação do material após moagem em meio alcoólico por 5 horas apresentou valores entre 25,0 e 2,0 μ m, com valor médio de 8,0 μ m.

A utilização de lignossulfonato de sódio provocou a redução da quantidade de líquido pega de 0,32 mL/g para 0,30 mL/g, sem alteração da consistência da massa obtida. O lignossulfonato de sódio permitiu que a reação de pega ocorresse sem alteração do tempo de pega (18 minutos) com relação à composição sem adição de defloculante, sendo estas características de pega apropriadas para um cimento destinado a aplicações clínicas⁽⁶⁾. O tempo de pega inicial reportado na literatura para a formulação utilizada é de cerca de 6 minutos. A diferença entre os tempos de pega obtidos e reportados em literatura se deve provavelmente a uma menor reatividade do α -TCP utilizado, o que provocaria uma reação de pega mais lenta.

Tendo-se em vista os resultados obtidos e a potencial melhora das propriedades mecânicas do cimento de fosfato de cálcio, foram preparadas e avaliadas composições de cimento de fosfato de cálcio contendo fibras e adicionadas de lignossulfonato de sódio. Entretanto, devido à inexistência de dados de literatura a respeito do potencial citotóxico do lignossulfonato de sódio, procedeu-se inicialmente à avaliação da citotoxicidade das composições. Lignosulfonatos (polímeros derivados da lignina da madeira), são produtos não tóxicos, solúveis em água e fabricados essencialmente com lixívia derivadas da fabricação de celulose sulfito, onde a madeira utilizada é da variedade *Pinnus Tadea*. Os lignosulfonatos apresentam propriedades tenso-ativas e, dependendo da aplicação, atuam como dispersantes, umectantes ou estabilizantes de emulsão.

Preparou-se composições de cimento de fosfato de cálcio contendo 100% de α -fosfato tricálcico adicionado de solução a 2,5 % em mol de Na₂HPO₄ e 0,3% de lignossulfonato de sódio, com uma relação líquido/pó de 0,30 mL/g. Foram também

preparadas amostras de composição de cimento de fosfato de cálcio contendo 100% de α -fosfato tricálcico adicionado de solução a 2,5 % em mol de Na_2HPO_4 , isenta de lignossulfonato de sódio, com uma relação líquido/pó de 0,32 mL/g, para controle e comparação dos ensaios. As amostras foram conformadas e colocadas em 100% de umidade por 24 horas, sendo então preparadas conforme descrito no item anterior. Os resultados obtidos são apresentados na forma de curvas de supressão de colônias apresentada na Figura 1.

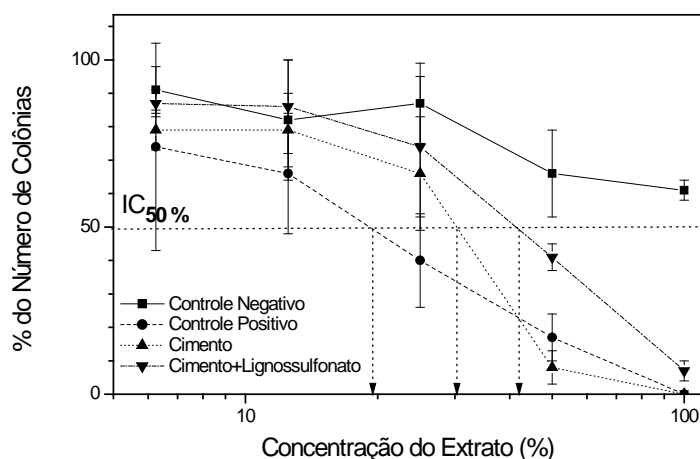


Figura 1. Curvas de supressão de colônias no teste de citotoxicidade.

O potencial citotóxico $\text{IC}_{50}(\%)$, que é uma unidade de bioatividade, é a concentração do extrato do material analisado que inibe a formação de colônias na metade da população celular. O controle negativo quando testado não deve produzir resposta citotóxica, como pode ser observado para a alumina ($\text{IC}_{50} > 100\%$), e o controle positivo deve levar a uma resposta citotóxica positiva, como é o caso da solução de fenol que apresentou $\text{IC}_{50} = 18\%$. A composição de cimento de fosfato de cálcio apresentou um valor de $\text{IC}_{50}(\%) = 30\%$, para o cimento mantido a 100% de umidade relativa. A composição de cimento contendo lignossulfonato e também mantida a 100% de umidade relativa por 24 horas apresentou um valor de $\text{IC}_{50} = 42\%$. Vemos então que a presença do lignossulfonato permitiu uma resposta citotóxica menos acentuada do que a composição de cimento de fosfato de cálcio isento de lignossulfonato. A resposta citotóxica parece estar relacionada ao pH do cimento em água. No caso da composição contendo lignossulfonato, o pH da composição foi de $6,30 \pm 0,02$ após 1 hora de imersão em água destilada, valor este



superior ao do cimento isento de lignossulfonato, $5,98 \pm 0,02$. e abaixo do descrito em literatura como o limite para considerar o material citotóxico em meio biológico (pH=6,5 a 8,5)⁽⁶⁾. Apesar do cimento contendo lignossulfonato ser citotóxico, assim como a composição de cimento sem lignossulfonato, esta resposta menos acentuada de citotoxicidade para a composição mantida a 100% de umidade relativa por 24 horas, permite supor que sua reação biológica após implantação deverá ser similar ou melhor do que o cimento de fosfato de cálcio isento de lignossulfonato.

A variação da resistência mecânica a compressão com a adição das fibras, após imersão da composição por 24 horas em SBF é apresentada na Figura 2.

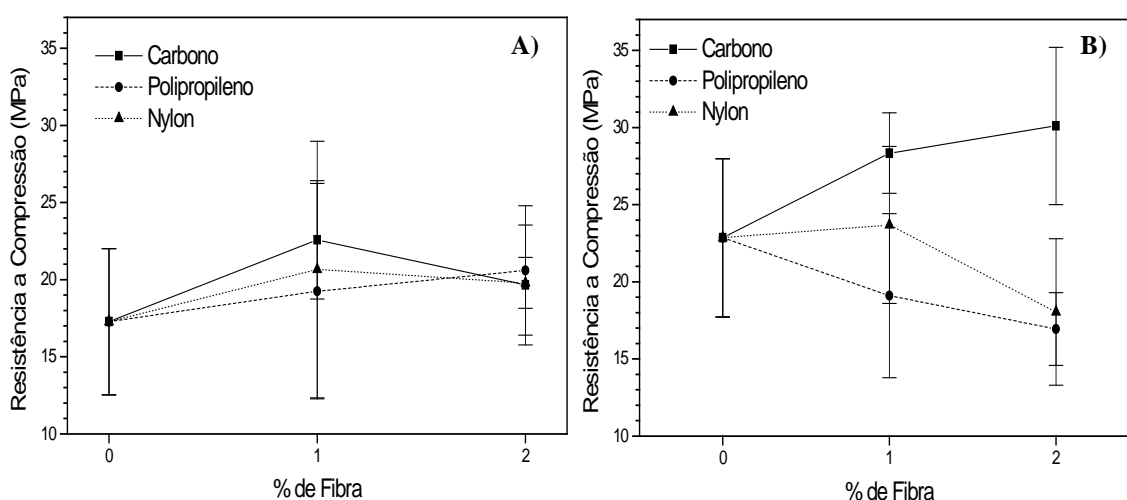


Figura 2. Resistência mecânica a compressão das composições contendo fibras (A) adicionadas de lignossulfonato e (B) sem adição de lignossulfonato de sódio, após 24 horas de imersão em SBF.

A adição de lignossulfonato de sódio à composição de cimento não melhorou as propriedades de resistência mecânica a compressão, havendo na verdade uma redução da resistência mecânica média após 24 horas de imersão em solução de SBF, quando comparadas à composição isenta de fibras e de lignossulfonato. Este menor valor de resistência mecânica pode estar relacionado à menor reatividade da composição contendo lignossulfonato, uma vez que este poderia estar atuando como uma barreira ao líquido de reação. De qualquer maneira, a adição de lignossulfonato permitiu a manutenção dos valores médios de resistência mecânica a compressão para as composições contendo fibras, o que não ocorreu para a composição isenta de lignossulfonato e contendo fibras de polipropileno e náilon, apresentando uma diminuição de valores de resistência mecânica. Tal fato pode

estar ligado à redução da porosidade do cimento através da redução de viscosidade proporcionado pela adição do lignossulfonato, impedindo o ancoramento de bolhas junto à fibras durante o processo de conformação. No caso das fibras de carbono, a adição de lignossulfonato reduziu o efeito de aumento da resistência mecânica a compressão produzido por estas, na composição isenta de defloculante. Isto deve estar ligado à menor reatividade da composição contendo lignossulfonato, e portanto diminuindo a precipitação de hidroxiapatita (CDHA) na superfície das fibras, diminuindo o acoplamento das fibras, impedindo o aumento de resistência mecânica.

Os valores de resistência mecânica a tração (compressão diametral) tanto das composições contendo lignossulfonato quanto às composições isentas de defloculante e imersas em SBF por 24 horas (Fig. 3), mantiveram o mesmo tipo de comportamento, com aumento de resistência mecânica somente para as composições contendo fibras de carbono, valor apenas superior para a composição contendo lignossulfonato e 2% de fibras.

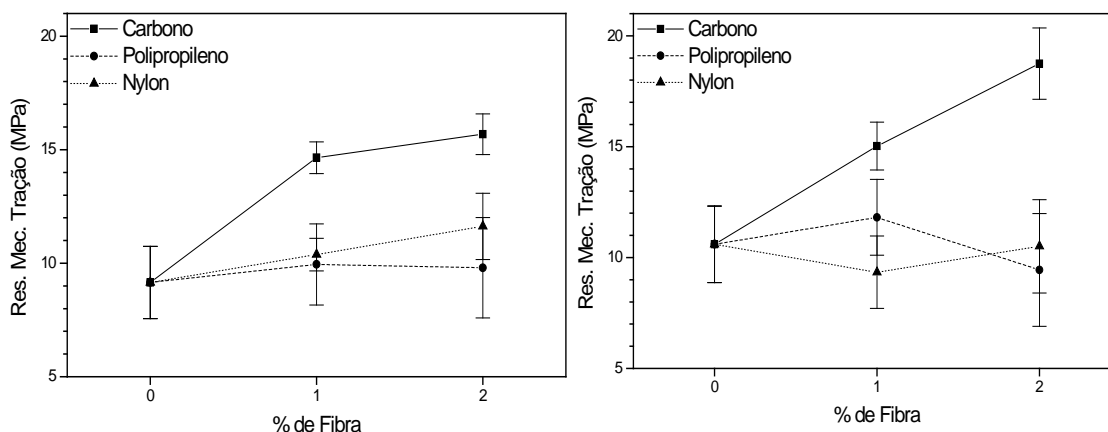
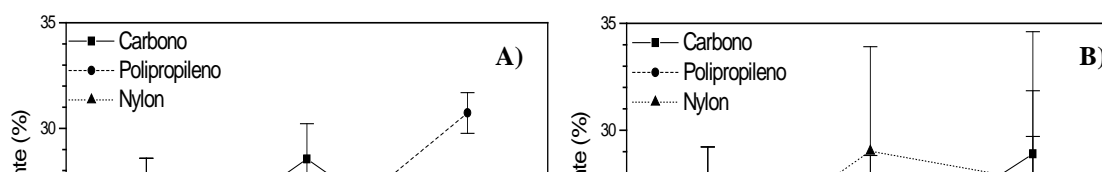


Figura 3. Resistência mecânica a compressão diametral das composições contendo fibras sem lignossulfonato (A) e adicionadas de lignossulfonato de sódio (B) após 24 horas de imersão em SBF.

A adição de lignossulfonato de sódio não permitiu uma redução da porosidade aparente das composições de cimento e imersas em SBF por 24 horas (Fig. 4), como seria de se esperar em função da diminuição da quantidade de líquido utilizado e da diminuição da viscosidade da composição, mantendo-se em valores entre 22 e 30% aproximadamente de porosidade. Obteve-se o mesmo comportamento das composições isentas de lignossulfonato e adicionadas de fibras,



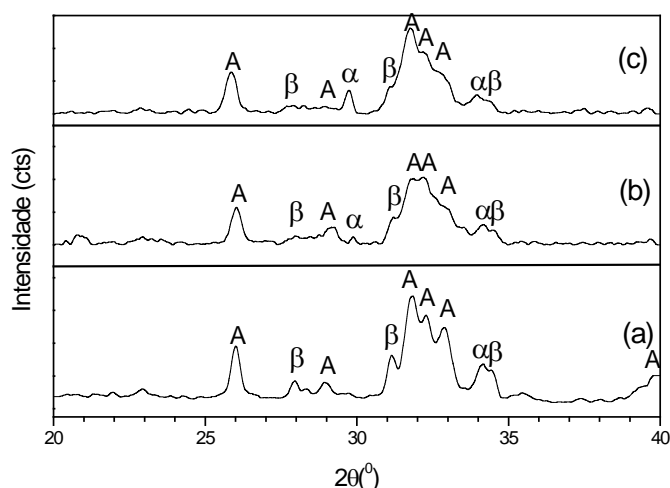


com aumento da porosidade em função da adição de fibras, comportamento este já discutido anteriormente.

Figura 4. Porosidade aparente das composições contendo fibras (A) adicionadas de lignossulfonato e (B) sem adição de lignossulfonato de sódio após 24 horas de imersão em SBF.

Figura 5. Difratomogramas de raios-x das composições de cimentos (a) isento de lignossulfonato e imerso por 7 dias em SBF a 36,5°C; (b) adicionado de lignossulfonato de sódio e mantido a 100% de umidade relativa por 24 horas e (c) adicionado de lignossulfonato de sódio e mantido por 7 dias em SBF a 36,5°C. (α) α -TCP; (β) β -TCP; (A) hidroxiapatita.

A Figura 5 apresenta os difratogramas de raios-x das composições de cimento de fosfato de cálcio isento e adicionado de lignossulfonato de sódio após



diversos períodos e condições de reação. É possível notar que a presença de lignossulfonato parece retardar a reação de pega do cimento, que se faz através da reação: $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$. A presença de picos de difração correspondentes à fase α -TCP ($2\theta = 30,3^\circ$) e a menor intensidade e



ausência do pico de difração correspondente a $2\theta = 39,8^\circ$ da fase hidroxiapatita para as composições contendo lignossulfonato, é indicativo desta menor reatividade da composição. A diminuição da reatividade da composição de cimento contendo lignossulfonato pode ser explicada pela adsorção do lignossulfonato junto à superfície das partículas do pó do cimento, formando uma barreira ao líquido de hidratação e reduzindo a taxa de reação.

As figuras 6 a 8 mostram as superfícies de fratura das composições de cimento contendo fibras e adicionadas de lignossulfonato de sódio. O mesmo tipo de microestrutura da matriz foi obtido para as composições isentas de lignossulfonato. Também obteve-se a precipitação de hidroxiapatita (CDHA) na superfície das fibras da mesma forma que nas composições isentas de lignossulfonato. A observação ao microscópio eletrônico não permitiu determinar um melhor ou pior acoplamento das fibras à matriz. Entretanto para as composições contendo fibras de polipropileno e náilon foram observadas vários locais de arrancamento de fibra contendo trincas em seu interior. Isto sugere que as trincas sofreram deflexão durante a sua propagação, o que pode indicar uma melhoria da tenacidade das composições contendo lignossulfonato. Entretanto, em virtude dos resultados de resistência mecânica serem semelhantes aos obtidos com as composições isentas de lignossulfonato, não foram feitos estudos mais aprofundados a respeito.

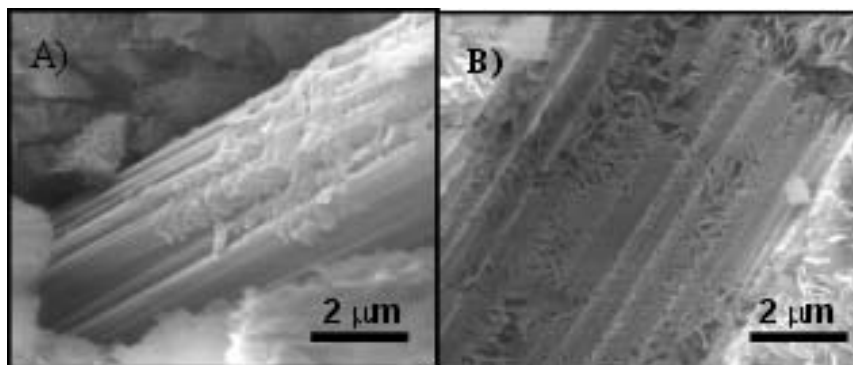


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de composições de cimento adicionadas de lignossulfonato de sódio e contendo 2% em volume de fibras: A) fibra de carbono e B) zona de arrancamento da fibra.

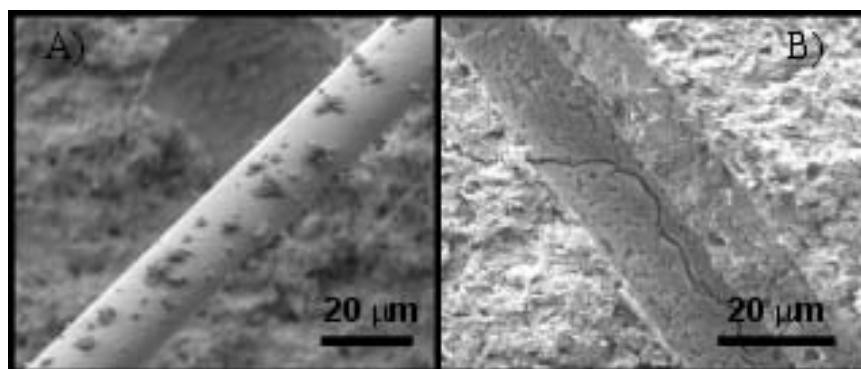


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de composições de cimento adicionadas de lignossulfonato de sódio e contendo 2% em volume de fibras: A) fibra de polipropileno e B) zona de arrancamento da fibra.

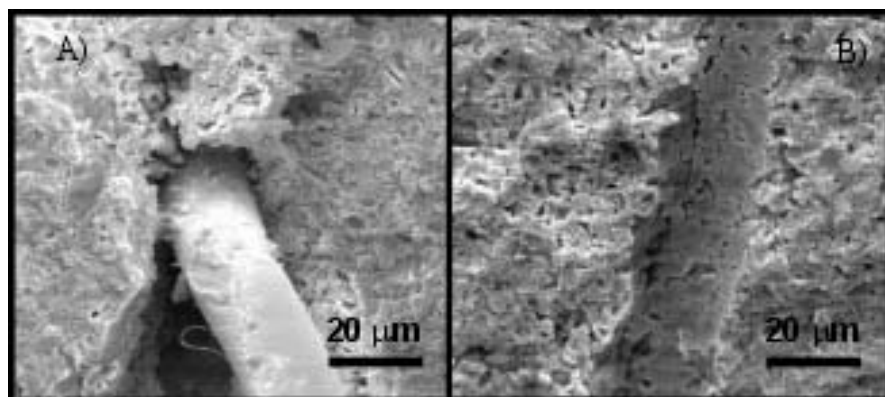


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de composições de cimento adicionadas de lignossulfonato de sódio e contendo 2% em volume de fibras: A) fibra de náilon e B) zona de arrancamento da fibra.

CONCLUSÕES

A adição de lignossulfonato de sódio à composição de cimento de fosfato de cálcio contendo fibras não provocou uma forte melhoria das propriedades



mecânicas do cimento de fosfato de cálcio estudado. Entretanto a principal característica favorecida pelo lignossulfonato de sódio foi o aumento do pH da composição de cimento, que encontra-se em valores relativamente baixos para as composições mantidas a 100% de umidade relativa. Sendo assim, o lignossulfonato poderia ser utilizado como modificador do pH de cimentos de fosfato de cálcio baseados no α -TCP, aumentando o tempo necessário para que o cimento atinja valores de pH reduzidos, principalmente nos estágios iniciais de implantação do material, onde além da resposta inflamatória devido ao pH do material, existe ainda resposta inflamatória devido ao processo cirúrgico, fazendo com que estes fatores associem-se.

AGRADECIMENTO

À FAPESP (Processos. 98/11691-2 e 98/00563-3), ao Third World Academy of Sciences (JRP 18/95) e Fábio S. Fukazawa por sua ajuda laboratorial.

REFERÊNCIAS

- (1) Yu, D., Wong, J., Matsuda, Y., Fox, J.L., Higuchi, W.I. and Otsuka, M.: "Self-setting hydroxyapatite cement: A novel skeletal drug delivery system for antibiotics"; in J. Pharm. Sci. 81(6): 529-31 (1992).
- (2) Driessens, F.C.M.; Fernández, E.; Ginebra, M.P.; Boltong, M.G.; Planell, J.A.: Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. Anal. Quim. Int. Ed. 1997, 93: S38 - S43.
- (3) Monma, H.; Goto, M.; Kohmura, T.: Effect of additives on hydration and hardness of tricalcium phosphate. Gypsum and lime 188: 11-16 (1984).
- (4) International standard: biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5. 1992.
- (5) Nakamura A, Ikarashi Y, Tshuchiya T, Kaniwa M. Radiation vulcanized natural rubber latex is not cytotoxic. In: International Symposium on Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex. Proceedings. Japan Atomic Research Institute JAERI-M 89-228, Takasaki, Japan; 1989; p. 79-87.



(6) Driessens, F.C.M.; Fernández, E.; Ginebra, M.P.; Boltong, M.G.; Planell, J.A.: Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anal. Quim. Int. Ed.* 1997, 93: S38 - S43.

CALCIUM PHOSPHATE CEMENT WITH LIGNOSSULFONATE AND FIBERS ADDITIONS

ABSTRACT

Calcium phosphate bone cements (CFCs) are useful in orthopedics, used mainly as bone substitute. The main advantages of this kind of cement are the biocompatibility and bioactivity, which render bone tissue osteoconductive. The main disadvantage of this type of material is the low mechanical properties. CFCs with high mechanical properties could be used in repair of fractures, prosthesis fixation and others. In this work was studied the influence of sodium lignosulfonate and fibers (carbon, polypropylene and nylon) on the properties of tricalcium phosphate cement. The lignosulfonate additions not improved the cement mechanical properties. Was observed only a improvement of mechanical properties of carbon fibers compositions. The lignosulfonate addition increased the pH values near to 7.0, with consequent improvement of cytotoxicity values.

Key words: Bone cement, calcium phosphate cement , bioceramic.