

Hidroxiapatita porosa produzida através do gelcasting de espumas visando aplicações biomédicas

(Porous hydroxyapatite prepared by gelcasting of foams for biomedical applications)

*P. Sepúlveda*¹, V. C. Pandolfelli¹,
S. O. Rogero², O. Z. Higa², J. C. Bressiani²*

*¹Departamento de Engenharia de Materiais
Universidade Federal de S. Carlos*

Via Washington Luiz, km 235, S. Carlos, SP, 13565-905

*²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Travessa R, 400, Cidade Universitária
S. Paulo, SP, 05508-900*

Resumo

Hidroxiapatita porosa foi produzida por meio de uma nova técnica de processamento, visando aplicações na área de implantes ósseos. A produção do material poroso é feita através da produção de espumas pela agitação de suspensões cerâmicas aquosas contendo tensoativos adequados. A solidificação que segue é obtida pela adição de reagentes iniciadores da polimerização in situ de monômeros orgânicos, inicialmente incluídos nas composições, formando um gel. Este método permite a produção de corpos com formatos de alta complexidade e elevada resistência mecânica com níveis de porosidade próximos de 90%vol, que suportam corte e torneamento no estado a verde. Os aditivos orgânicos são eliminados a 300 °C e sinterização a 1350 °C é efetuada para consolidação da matriz. A otimização da resistência mecânica decorre da combinação entre uma matriz cerâmica de alta densidade a uma estrutura de poros esféricos com diâmetros que variam de 20-1000 µm possuindo inter-conexões de aproximadamente 10-100 µm, dependendo da densidade. O material sinterizado foi avaliado quanto a sua citotoxicidade, utilizando-se o método quantitativo de formação de colônias que calcula o índice de citotoxicidade IC_{50(%)} após contato do extrato do material com células de mamíferos. Os resultados mostraram que o processo de fabricação e os reagentes utilizados não afetaram os baixos níveis de toxicidade do pó de hidroxiapatita que era originalmente de pureza biomédica.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, gelcasting, processamento, cerâmicas porosas.

Abstract

A novel technique has been applied to manufacture porous hydroxyapatite for implant applications. The process involved generation of foam from an aqueous suspension of the powder followed by in situ polymerisation of organic monomers, which had been previously added to the compositions. This method produces strong gelled and complex-shaped bodies with up to 90% porosity that can withstand machining in the green state. The organic additives are eliminated at temperatures above 300 °C and sintering is carried out for consolidation of the ceramic matrix. An optimized mechanical strength results from a highly densified matrix combined with spherical interconnected cells of diameter ranging from 20 to 1000 µm and channels of 10-100 µm, depending on the specimen density. Cytotoxicity test was conducted with sintered HA extracts in contact with mammalian cells, based on a quantitative method of colonies formation suppression. The in vitro test revealed that the original purity of the biomedical-grade hydroxyapatite powder was neither affected through processing nor by the employed reagents.

Keywords: Hydroxyapatite, gelcasting, processing, porous ceramics.

INTRODUÇÃO

Métodos para Obtenção de Cerâmicas Porosas

O desenvolvimento de cerâmicas porosas tem sido de grande importância no avanço de processos industriais e em áreas

tecnológicas nos últimos anos. Isso se deve às inúmeras propriedades que estes materiais oferecem uma vez que combinam características intrínsecas das cerâmicas, tal como refratariedade e inércia química, à alta permeabilidade, alta área superficial, isolamento térmico e baixa massa que decorrem da porosidade incorporada. Exemplos de aplicações para cerâmicas porosas incluem sistemas para purificação de gases quentes, filtros para metal fundido, suporte

*Atualmente no Imperial College of Science Technology and Medicine, Department of Materials, Prince Consort Road, SW7 2BP, London, U.K. - e-mail: p-psi@iris.ufscar.br

para enzimas ou para catalisadores, sensores, isolantes térmicos, entre outros [1].

Dentre as características que determinam a área de aplicação dos materiais porosos encontra-se primeiramente a composição química da cerâmica, seguida de fatores ligados à estrutura porosa formada, tal como a fração de poros, sua forma, tamanho e distribuição. A resistência mecânica do componente é também muito importante, visto que a inclusão de porosidade se dá em detrimento da resistência mecânica e restrições à utilização como material estrutural podem ocorrer.

Inúmeros processos são atualmente utilizados para produzir cerâmicas porosas [1, 2]. As técnicas mais simples se baseiam na incorporação de uma segunda fase orgânica na composição do material cerâmico, em proporções e tamanho controlados, que após sua eliminação deixam vazios de mesmo tamanho. A sinterização de compactos a temperaturas mais baixas do que a necessária para densificação da matriz possibilita a obtenção de poros micrométricos, geralmente menores que 0,5 μm . Outros métodos mais elaborados envolvem a produção de sistemas aerogel, hidrogel ou sol-gel, que geram uma estrutura com poros de tamanho nanométrico. Cerâmicas contendo poros maiores, da ordem de 100 μm - 5 mm, podem ser obtidas a partir da imersão de esponjas poliméricas em suspensões cerâmicas e a seguinte eliminação do substrato orgânico durante a queima. Da mesma maneira, macroporosidade pode ser produzida a partir da incorporação de bolhas de ar em suspensões cerâmicas formando-se espumas, seguida de solidificação [1].

Os métodos para solidificação de espumas fluidas se derivaram diretamente de processos de consolidação de sistemas cerâmicos inicialmente desenvolvidos para a produção de materiais densos. No entanto, a inerente fragilidade do reticulado poroso requer mecanismos de solidificação muito mais eficientes e resistentes do que no caso de materiais densos. Também, de modo a evitar a deterioração da espuma, a solidificação deve ocorrer dentro de um espaço limitado de tempo. A consolidação das espumas pode ser obtida pela simples secagem do solvente, por liofilização, incorporação de ligantes (derivados de celulose, agarose, amido, cimentos), sistemas sol-gel, entre outros. O maior problema destes métodos está relacionado à baixa resistência a verde resultante, que é na maioria dos casos insuficiente para reter a estrutura de bolhas sem que esta seja danificada, dificultando o manuseio do material e produzindo corpos sinterizados de baixa resistência mecânica.

Um método recentemente desenvolvido pelo Oak Ridge National Laboratory [3, 4], o processo *gelcasting*, tem demonstrado uma grande superioridade na produção de materiais cerâmicos com elevada resistência a verde. Este processo foi inicialmente aplicado a produção de materiais de alta densidade e se baseia na introdução de monômeros orgânicos a uma suspensão aquosa do pó cerâmico, que através da polimerização *in situ* produzem um reticulado tridimensional que consolida a matriz cerâmica. A produção de cerâmicas porosas pelo *gelcasting* aplicado a espumas fluidas foi inicialmente realizada por R. Smith [5] e tem revelado inúmeras vantagens comparadas a outras técnicas de solidificação de espumas. Materiais porosos contendo até 90% de porosidade possuem elevada resistência a verde e podem suportar corte e torneamento. Também, dentre os métodos atualmente utilizados para a produção de cerâmicas porosas, o *gelcasting* de espumas tem-se mostrado o mais efetivo em elevar a resistência mecânica dos corpos sinterizados. Para estudos realizados com alumina, mostrou-se que o *gelcasting*

em espumas propicia resistência a flexão de 26 MPa para materiais com 30% da densidade teórica, enquanto que métodos alternativos resultam em resistência mecânica geralmente menor que 2-3 MPa [1, 6].

Cerâmicas Porosas para Implantes Ósseos

Uma das aplicações para cerâmicas porosas que tem grande destaque atualmente se encontra no campo de biomateriais, tal como na reconstrução, reparos e preenchimento de cavidades ósseas decorrentes de processos inflamatórios, acidentes ou osteoporose [7-10]. Para tal, utilizam-se matérias-primas de elevada pureza química e que não produzam reações tóxicas quando colocadas em contato com tecidos vivos. Cerâmicas porosas à base de hidroxiapatita, por exemplo, possuem grande potencial de aplicação na área de implantes ósseos. Isto se deve primeiramente à alta compatibilidade do material, cuja constituição química é similar à do osso. Também, no caso do material poroso, a alta área superficial permite maior área de contato entre o implante e o tecido hospedeiro, o que aumenta a resistência da interface e evita mobilidade do implante, diminuindo assim as chances de respostas inflamatórias. A presença de macroporosidade interconectada provê um reticulado permeável que permite a incorporação e crescimento de tecido ósseo em seu interior [9, 10].

Tentativas de reproduzir a estrutura porosa do tecido ósseo natural encontram-se ainda limitadas pelo fato da resistência mecânica dos materiais fabricados artificialmente ser muito baixa. Desta maneira, a otimização das propriedades do material poroso pelo processo de *gelcasting* em espumas oferece maior possibilidade para viabilizar a implementação destes materiais na área de implantes.

Inúmeros fatores devem ser examinados antes que um material possa ser utilizado como implante. Uma das primeiras etapas de avaliação do material biomédico é a avaliação biológica *in vitro* e um dos primeiros testes é o da citotoxicidade, onde o biomaterial é colocado em contato com células de mamíferos de uma maneira direta ou indireta. Observa-se o nível de letalidade das células que define se o material é ou não citotóxico. A seguir, testes *in vivo* se fazem necessários, para a avaliação do material em termos de biocompatibilidade, definida como a resposta do meio fisiológico ao corpo implantado. Uma etapa posterior verifica a adequação do material em exercer a função pré-estabelecida à qual o implante foi destinado, determinando sua biofuncionalidade. Testes mais prolongados podem ainda revelar se há chances de respostas carcinogênicas ao longo dos anos [9].

Neste trabalho o método de *gelcasting* aplicado à espumas foi realizada para a produção de hidroxiapatita para implantes. Por ser um teste básico e eliminatório para identificar se o material possui efeitos tóxicos em aplicações biomédicas, ênfase aqui é dada a avaliação da citotoxicidade do material poroso, efetuada afim de verificar se a manipulação do pó e reagentes influenciaram a elevada pureza do pó de hidroxiapatita originalmente utilizado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação dos Corpos Porosos

A preparação da hidroxiapatita porosa se deu conforme as etapas mostradas no fluxograma da Fig. 1 [6].

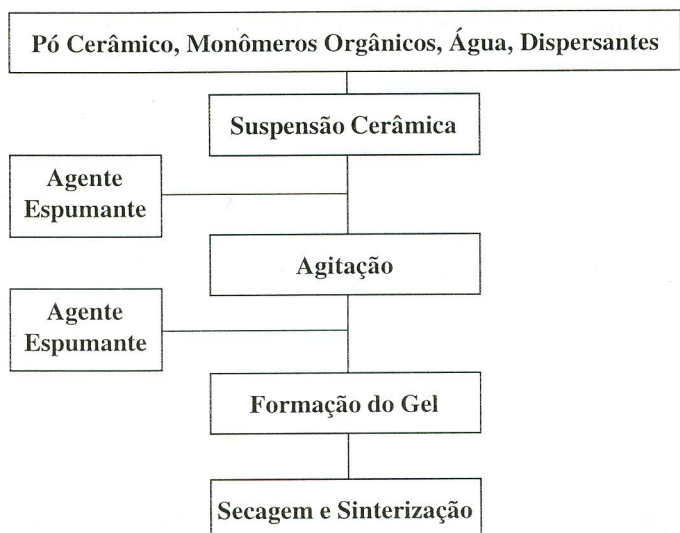


Figura 1: Esquema das etapas para a produção de cerâmicas porosas pelo método gelcasting de espumas.

HA CAPITAL-R da Plasma Biotal (U.K.) de pureza biomédica foi utilizada como matéria-prima. Observação do pó foi efetuada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Suspensões aquosas contendo aproximadamente 58%-peso de hidroxiapatita foram preparadas, utilizando ácido poliacrílico como dispersante em quantidade ótima obtida a partir de curvas de defloculação. Monômeros acrílicos contendo agente reticulante foram incorporados à suspensão para promover a posterior formação do gel, conforme descrito na referência [6].

O processo foi realizado em uma câmara selada com luvas, em atmosfera de nitrogênio. Este procedimento se faz necessário para evitar a presença de oxigênio que inibe a reação de polimerização.

Espumas de volumes variados foram produzidas pela agitação de 100 g de suspensão e pela adição de agente espumante (à base de polietileno glicol éter) em diferentes concentrações, afim de se produzir corpos de diferentes densidades. A formação do gel foi efetuada pela adição do agente iniciador persulfato de amônio (APS) e catalisador, uma diamina terciária. As amostras foram secas a 100 °C por 24 h em estufa, procedeu-se a queima a 300 °C para a eliminação da matéria orgânica seguida de sinterização a 1350 °C por 2 horas para a densificação da matriz cerâmica.

A caracterização física dos corpos sinterizados envolveu medidas de densidade geométrica e observação microestrutural por MEV utilizando amostras recobertas com ouro. A resistência a compressão de corpos cilíndricos com aproximadamente 11-13 mm de diâmetro foi avaliada utilizando uma máquina universal MTS.

Teste de Citotoxicidade

Avaliação citotóxica de HA porosa sinterizada foi realizada com o objetivo de detectar mudanças na toxicidade do material durante o processamento. O teste foi realizado com a diluição de extratos de amostras de HA porosa moída em contato com cultura de células de mamíferos, baseando-se em método quantitativo de formação de colônias. Alumina foi utilizada como controle negativo (não citotóxico), enquanto solução de fenol 0,02%-vol foi utilizada como controle positivo (citotóxico) [11, 12].

Amostras de 6 gramas da HA porosa e de alumina foram esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 minutos. A cada uma das amostras foram adicionados 60 mL do meio de cultura RPMI-FCS (RPMI 1640 contendo 10%-vol de soro fetal bovino e 1%-vol de solução de penicilina e estreptomicina). Estas foram incubadas por 48 h em estufa a 37 °C. Após este período os sobrenadantes foram filtrados e os extratos e a solução de fenol 0,02%-vol foram diluídos com RPMI-FCS resultando em concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25%-vol.

Enquanto isso, células de ovário de hamster chinês CHO (Chinese Hamster Ovary k1 da American Type Culture Collection) foram cultivadas em garrafa de plástico, em meio de cultura RPMI-FCS a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, até a obtenção de monocamada de células com crescimento confluyente. Foi utilizada solução de tripsina para o desprendimento das células da garrafa. A suspensão de células foi acertada para 100 células/mL e 2 mL desta suspensão foram distribuídos em cada placa de petri, que foram encubadas por 5 h a 37 °C. Após a adesão das células nessas placas, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 5 mL de cada diluição dos extratos, em triplicata. Decorrido sete dias de incubação das placas a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% CO₂, o meio de cultura foi removido e as colônias formadas foram fixadas com solução de formol 10%-vol em salina 0,9%-vol e coradas com corante Giemsa.

A quantidade de colônias visíveis em cada placa foi contada com um Contador Digital de Colônias e comparadas com os resultados obtidos da contagem de células CHO da placa de controle. O nível de inibição da formação de colônias foi utilizado como medida de citotoxicidade do biomaterial, expresso como índice de citotoxicidade IC_{50(%)}, que representa a concentração de extrato inibe 50% da formação de colônias, comparativamente ao controle de células CHO.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas dificuldades foram encontradas na dispersão do pó de hidroxiapatita devido ao reduzido tamanho e formato acicular das partículas, como mostra a Fig. 2. Por isso manteve-se a concentração de sólidos na suspensão em níveis baixos de 58%-peso.

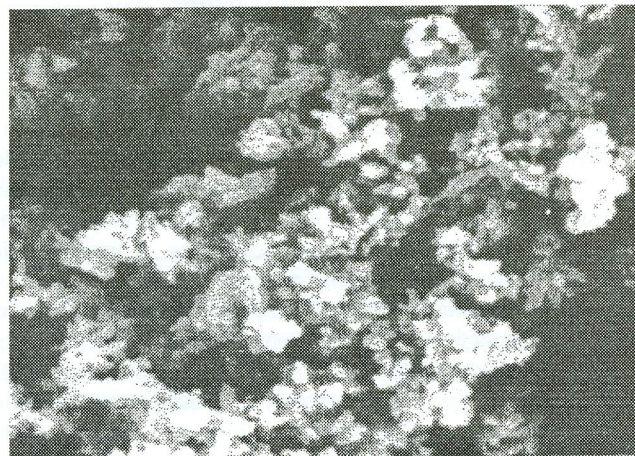


Figura 2: Pó de HA (CATAL R, Plasma Biotal, U.K.), como fornecido, observado através de MEV.

O volume máximo de espuma para as concentrações de agente espumante utilizadas foi obtido após aproximadamente 4-5 minutos de agitação contínua. Maiores concentrações de agente espumante produziram proporcionalmente maiores volumes de espuma, ou seja, maior porosidade.

A formação de gel ocorre através de reações exotérmicas em taxas que dependem de inúmeros fatores, tal como a concentração dos reagentes iniciadores, a temperatura inicial, nível de oxigênio na atmosfera. As concentrações dos reagentes foram ajustadas de modo a produzir polimerização em 1-3 minutos. Após este período a espuma pode sofrer alterações que deterioram sua estrutura, devido a mecanismos de drenagem por gravidade dos filmes líquidos ou crescimento e coalescência das bolhas.

Normalmente o processo de gelcasting para a produção de materiais densos tem sido associado a problemas de trincas e empenamento durante a etapa de queima devido a eliminação da matéria orgânica, que compõe aproximadamente 5-7% em peso do material [3]. No caso dos materiais porosos, a alta permeabilidade e alta área superficial dos poros permite a eliminação dos orgânicos sem problemas.

A Fig. 3 mostra a micrografia de uma amostra de HA porosa após a sinterização. A porosidade se encontra distribuída na forma de poros esféricos conectados através de janelas que se formam do contato entre as bolhas e fornecem a propriedade de permeabilidade. Esta característica é necessária no caso de implantes, uma vez que as interconexões proporcionam canais para o crescimento de tecido ósseo em seu interior e a posterior passagem de nutrientes para a manutenção e renovação dos tecidos.

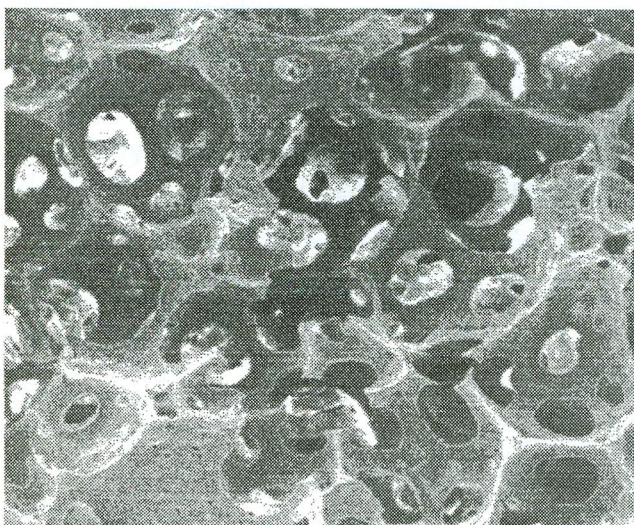


Figura 3: Observação microestrutural de HA porosa obtida pelo gelcasting em espumas.

Amostras de densidade a verde variando de 0,22 g/cm³ até 0,45 g/cm³ foram obtidas neste trabalho, que após a sinterização apresentaram uma densidade de 0,44 a 0,75 g/cm³. Quando relacionadas à densidade teórica do material, 3,156 g/cm³, estes valores correspondem à níveis de porosidade de aproximadamente 76,2 a 89,6%-vol.

A resistência a compressão de amostras de hidroxiapatita porosa revelou valores variando de 4,4 MPa a 7,4 MPa, para amostras com densidade na faixa de 0,61 a 0,74 g/cm³,

respectivamente. Portanto, estes corpos contendo entre 76-80%-vol de porosidade resultam em uma resistência mecânica bastante elevada, comparativamente a outros métodos descritos na literatura. Por exemplo, Liu [13] produziu amostras de HA porosa contendo 70% de porosidade com resistência a compressão de 2,5 MPa.

A alta porosidade, boa resistência mecânica e a microestrutura aberta dos poros das cerâmicas porosas produzidas através da técnica descrita são algumas das características que tornam estes materiais atraentes para aplicações como a de implantes ósseos. Estudos mais detalhados das propriedades físicas destes materiais altamente porosos, incluindo hidroxiapatita e alumina, entre outros, é objeto de outros trabalhos e podem ser encontrados nas referências [6, 14].

Testes de Citotoxicidade

A Tabela I mostra a média dos resultados obtidos nas diferentes concentrações do extrato utilizadas. A Tabela lista o valor percentual do número de colônias visíveis nas placas de Petri em relação à placa controle das células CHO.

O potencial citotóxico pode ser estimado quantitativamente a partir de uma projeção dos dados em gráfico como verificado na

Tabela I - Percentual do número de colônias visíveis nas placas de petri, em relação à placa controle, nas diferentes concentrações dos extratos. Os dados se referem a média das triplicatas.

Concentração do extrato (%)	% do Número de Colônias		
	Controle negativo	Controle positivo	HA
6,25	90	94	94
12,5	91	80	89
25	95	72	86
50	91	51	81
100	83	3	73

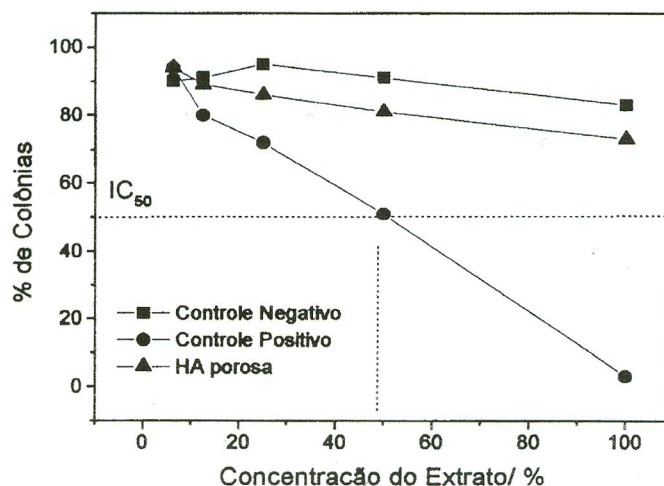


Figura 4: Curva de supressão de colônias no teste de citotoxicidade da HA.

Fig. 4, que mostra a porcentagem relativa do número de colônias visíveis, formadas a diferentes concentrações de extrato. $IC_{50(\%)}$ representa a concentração de extrato que inibe a capacidade de 50% da população de crescer e se multiplicar para formar colônias, como conseqüência da toxicidade do material. Como esperado, a alumina utilizada como controle negativo, causou uma resposta não citotóxica, apresentando $IC_{50(\%)} > 100$, enquanto que o controle positivo (solução fenol 0,02%-vol) apresentou $IC_{50(\%)}$ de aproximadamente 50, indicando que a solução de fenol numa diluição de 50% da inicial, reduziu a metade a capacidade de sobrevivência da população celular no teste. A amostra de hidroxiapatita porosa revelou valor $IC_{50} > 100\%$, indicando portanto ausência de citotoxicidade.

Estes resultados provam que, após o processo para fabricação de uma estrutura porosa, o pó de HA de elevada pureza química originalmente utilizado não teve seus níveis de toxicidade comprometidos. Isto se deve principalmente aos cuidados tomados durante o processamento escolhendo-se reagentes de alta pureza, como é o caso dos dispersantes, monômeros, agentes espumantes que são efetivamente eliminados durante a queima e evitando-se contaminação.

CONCLUSÕES

A produção de corpos porosos de hidroxiapatita com densidades variadas é possível por meio do método de formação de espumas seguido de solidificação pelo método *gelcasting*. A estrutura se caracteriza por um arranjo de poros interconectados, de tamanho que varia de acordo com a densidade. No teste (*in vitro*) de citotoxicidade, os corpos sinterizados apresentaram um índice de citotoxicidade $IC_{50} > 100\%$, indicando que o material processado além do alto grau de pureza é não citotóxico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, Dytech Corporation Ltd., FAPESP, CNPq e à estudante Marta Ribeiro Spinola no teste de citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- [1] P. Sepulveda, "Gelcasting Foams for Porous Ceramics", Am. Ceram. Soc. Bull. **76**, 10 (1997) 61.
- [2] M. Liu, "Porous Ceramics", Key Eng. Mat., 115, Trans Tech Publications, Switzerland (1996).
- [3] M. A. Janney, O. O. Omatete, "Method for Moulding Ceramic Powders Using Water-Based Gel Casting", US Patent 5028362 (1991).
- [4] A. C. Young, O. O. Omatete, M. A. Janney, P. A. Menchhofer, "Gelcasting of Alumina", J. Am. Ceram. Soc. **74**, 3 (1991) 612.
- [5] R. Smith, "Engineering Porous Ceramics", Tese de PhD, University of Nottingham (1994).
- [6] P. Sepulveda, J. G. P. Binner, "Processing of Cellular Ceramics By Foaming and in situ Polymerisation of Organic Monomers", J. Eur. Ceram. Soc. **19**, 12 (1999) 2059.
- [7] D. M. Liu, "Porous Hydroxyapatite Bioceramics", Key Eng. Mat. 115, Ed. D. M. Liu, Trans Tech Publications, Switzerland (1996) 209.
- [8] M. Fabri, G. C. Celotti, A. Ravaglioli, "Hydroxyapatite-Based Porous Aggregates: Physico-Chemical Nature, Structure, Texture and Architecture", Biomaterials **16** (1995) 225.
- [9] A. Ravaglioli and A. Krajewski, "Bioceramics- Materials, Properties, Applications", Chapman & Hall (1992).
- [10] L. L. Hench, "Bioceramics", J. Am. Ceram. Soc. **81**, 7 (1998) 1705.
- [11] International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10 993-5 (1993).
- [12] S. O. Rogero, M. C. Valente, A. H. A. Bressiani, O. Z. Higa, "Avaliação Citotóxica de Hidroxiapatita obtida por Precipitação Aquosa", 12º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Águas de Lindóia, São Paulo, **1** (1996) 125.
- [13] D. M. Liu, "Influence of Porosity and Pore Size on the Compressive Strength of Porous Hydroxyapatite Ceramic", Ceram. Int. **23** (1997) 135.
- [14] P. Sepulveda, M. D. M. Innocentini, V. C. Pandolfelli, "Propriedades de Hidroxiapatita Porosa para Aplicações Biomédicas", 43º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Florianópolis, S.C., Junho (1999).
(Rec. 22/12/98, Rev. 16/10/99, Ac. 04/11/99)