

## OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CIMENTO DE QUITOSANA COM FOSFATO DE CÁLCIO PARA PREENCHIMENTO DE FALHAS ÓSSEAS

G. M. M. Van de Graaf\*, A. L. V. Zoppa\*, R. C. Moreira\*, S. C. Maestrelli\*\*, R. F. C. Marques\*\* e M. G. N. Campos\*\*\*

\*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

\*\*Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, Brasil

\*\*\* Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, Brasil  
e-mail: nogueiracamp@gmail.com

**Resumo:** Cimentos à base de quitosana e fosfato de cálcio foram preparados variando-se a temperatura de secagem (38 e 60°C) e caracterizados quanto à morfologia (MEV), porosidade (BET) e propriedades mecânicas. Ambas amostras obtidas, Q38 e Q60, mostraram-se porosas e resistentes ao manuseio após desmolde. O aumento na temperatura de secagem promoveu escurecimento e aumento na porosidade da amostra Q60. Sendo que, o efeito nas propriedades mecânicas foi deletério. A amostra Q38 apresentou características mecânicas desejáveis podendo ser considerada para aplicação como substituto ósseo.

**Palavras-chave:** quitosana, fosfato de cálcio, cimento ósseo, regeneração óssea.

**Abstract:** Chitosan-calcium phosphate based cements were prepared by varying the drying temperature (38 and 60°C) and characterized as morphology (SEM), porosity (BET) and mechanical properties. Both obtained samples, Q38 and Q60, have shown to be porous and resistant to handling. The increase in drying temperature promoted darkening and higher porosity of the sample Q60. Hence, this effect was deleterious for mechanical properties. Q38 sample showed desired mechanical characteristics and may be considered for bone substitute application.

**Keywords:** chitosan, calcium phosphate, bone cement, bone regeneration.

### Introdução

A consolidação de fraturas é um processo fisiológico que resulta na união óssea, contudo [1], cerca de 5 a 10% das fraturas em humanos não consolidam adequadamente, evoluindo para união retardada ou não união óssea, o que pode ser devido a falhas ósseas. Pequenas falhas ósseas podem consolidar normalmente, entretanto defeitos maiores podem resultar em não união óssea pela ausência do contato entre os fragmentos ou ainda defeitos anatômicos. Esses defeitos de consolidação podem ser gerados por uma distribuição desuniforme de carga no foco de fratura, onde áreas com tensão excessiva podem sofrer colapso ou deformação permanente, e a instabilidade pode levar

a reabsorção óssea [2]. Além de infecção e ressecção de tumores os traumas esqueléticos com união tardia ou não união óssea requerem uso de enxertos ósseos [1,3]. O enxerto autólogo é considerado o “padrão ouro” por apresentar matriz osteocondutiva, fatores de crescimento osteoindutivos e células osteogênicas. Entretanto para sua aplicação é necessário outro procedimento cirúrgico com possíveis complicações permanentes, como dor crônica e disfunção, além do aumento do tempo cirúrgico e risco de infecção no local doador. Entre as alternativas a essa técnica estão: enxerto ósseo alógeno, matrizes osteocondutivas *scaffolds*, medula óssea e enxertos compostos por combinação de materiais [4]. Devido as limitações e complicações associadas aos autoenxertos e aloenxertos o interesse em enxertos cerâmicos ou poliméricos vem crescendo como possíveis substitutos ósseos [1]

Nos últimos anos a quitosana, um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina, um componente do exoesqueleto de crustáceos, insetos e alguns fungos, vem recebendo atenção como dispositivo de liberação de fármacos e preenchimento de falha óssea [5]. Devido as suas interessantes propriedades, tais como: biocompatibilidade e biodegradabilidade, a quitosana pode atuar como substituto ósseo que, ao longo do tempo, será substituído por osso neoformado, conforme já foi observado pela neoformação óssea após implantação em lesões periodontais e falhas ósseas experimentais [6], assim como quando osteoblastos de ratos foram cultivados em “*scaffold*” de quitosana com fosfato  $\beta$ -tricálcio com tamanho de poros médio 100  $\mu\text{m}$  e os mesmos proliferaram e aderiram na estrutura esponjosa do “*scaffold*”, com produção de matriz óssea e diferenciação em osteócitos, mostrando que essa associação é compatível com proliferação celular [7].

Esses fatores fazem da quitosana associada ao fosfato  $\beta$ -tricálcio uma possibilidade terapêutica no tratamento de falhas ósseas encontradas nas práticas Odontológica e Ortopédica. Além disso, a caracterização mecânica e morfológica do cimento obtido é necessária para avaliar seu comportamento após implantação, assim como permitir sua comparação com outros substitutos ósseos. Essa caracterização também permite avaliar o comportamento mecânico do

cimento de quitosana com fosfato de cálcio ao ser implantado em um foco de fratura em conjunto com uma técnica de osteossíntese, uma vez que a rigidez e a estabilidade de uma técnica de fixação de fratura é de extrema importância em situações de perda de tecido ósseo ou de tensão extrema, em pacientes muito pesados ou com alta atividade, conforme observado nos tratamentos de fraturas na prática médico-veterinária.

## Materiais e métodos

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

**Preparação do cimento** – Foram testadas várias formulações de cimentos à base de quitosana e fosfato  $\beta$ -tricalcico, afim de se obter um composto com a maior resistência a compressão axial possível. Dentre as formulações analisadas, escolheu-se a com a seguinte proporção em massa de seus componentes: 1: 36,5: 63,65: 60,08: 104,78 (quitosana, água destilada, ácido cítrico, dextrose e fosfato  $\beta$ -tricalcico, respectivamente). A obtenção do cimento seguiu 3 etapas, sendo a primeira o preparo de um hidrogel de quitosana, água e ácido cítrico na proporção de 1: 36,5: 12,5. Na segunda etapa, foram adicionados para cada grama de hidrogel mais 0,125g de quitosana, 1,023g de ácido cítrico e 1,202g de dextrose obtendo-se uma massa pastosa após 5 minutos de homogeneização. Na terceira etapa, foi adicionado 0,65g de fosfato  $\beta$ -tricalcico para cada grama da massa pastosa obtendo-se, após 5 minutos, uma massa de consistência firme que secava rapidamente. Duas temperaturas de secagem foram utilizadas: 38 e 60°C e o tempo de secagem foi fixado em 150 minutos. A amostra seca a 38°C foi denominada Q38, enquanto que a seca a 60°C, Q60.

**Preparo dos corpos de prova** – Um molde de teflon contendo furos cilíndricos de 6 mm de diâmetro por 12 mm de profundidade (ABNT NBR ISO 5833) foi preenchido com a massa de consistência firme e pressionado com discos de teflon, afim de obter corpos de prova uniformes. O molde preenchido foi mantido em estufa por 2 horas e 30 minutos na temperatura desejada. Após este período, os corpos de prova foram retirados do molde e mantidos em estufa na temperatura desejada até o final dos testes mecânicos. Para as demais análises, os corpos de prova foram mantidos em dessecador por pelo menos 24 horas.

**Análise Macroscópica** – Os corpos de prova foram analisados quanto à forma, cor e resistência ao manuseio.

**Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV** – A análise morfológica foi realizada por meio do microscópio eletrônico de varredura, JEOL JSM 7500-F *Field Emission Scanning Electron Microscope*. As amostras foram recobertas, para evitar o acúmulo de cargas negativas nas amostras não condutoras e consequentemente ocasionar uma distorção da imagem, com um filme ouro de espessura de 16 nm no Sputter Coater de marca Bal-Tec modelo SCD 050 por 60 segundos, pressão de operação de  $2 \times 10^{-2}$  Pa e 24°C.

**Análise de Porosidade - BET** – Esta análise baseia-se na adsorção física de moléculas de gás sobre uma superfície sólida. A área superficial específica foi calculada pelo método BET, enquanto que o volume e o diâmetro médio dos poros foram obtidos pelo método BJH. A análise foi realizada no equipamento Micromeritics, modelo ASAP 2010 com gás nitrogênio.

**Ensaio mecânico** – Foram feitos ensaios compressivos em máquina universal de ensaios mecânicos KRATOS modelo KE 3000 MP com célula de carga de 3.000 kgf e faces metálicas paralelas. Foram feitos ensaios nos tempos 3, 24, 48 e 72 horas nas duas formulações e 10 corpos de prova foram utilizados em cada ensaio. A velocidade utilizada foi de 5mm/minuto com deslocamento máximo de 6 mm. A partir dos dados de força e deformação obtidos foi possível determinar os seguintes parâmetros: resistência à compressão, módulo de elasticidade e deformação relativa.

## Resultados

**Análise Macroscópica** – As amostras Q38 e Q60 estão apresentadas na Figura 1. Conforme pode ser observado, a amostra Q60 mostrou-se mais escura comparada a Q38. Além disso, ambas as amostras mantiveram a forma cilíndrica após o desmolde e mostraram-se resistentes ao manuseio.

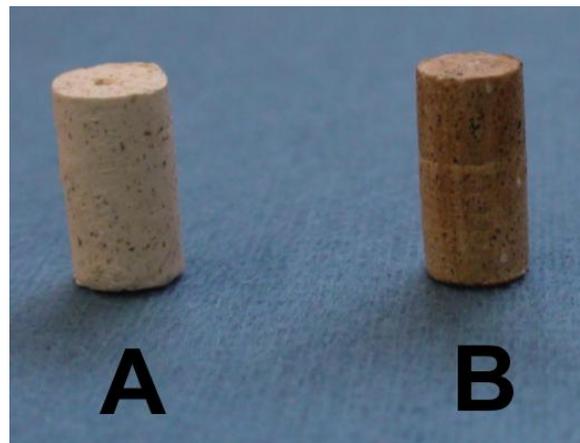


Figura 1: Amostras Q38 (A) e Q60 (B) da esquerda para a direita.

**MEV** – As Figuras 2a e 2b apresentam as micrografias das amostras Q38 e Q60, respectivamente.

**BET** – A área superficial específica, o volume e o diâmetro médio dos poros, calculados pelo método BET para as amostras Q38 e Q60 estão apresentados na Tabela 1.

**Ensaio mecânico** – Os valores de resistência à compressão, de módulo de elasticidade e de deformação relativa das amostras Q38 e Q60 nos tempos 3, 24, 48 e 72 horas estão representados nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente.

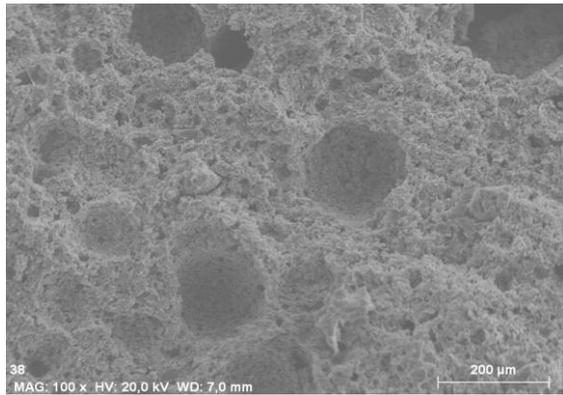


Figura 2a: Micrografia da amostra Q38 com magnitude de 100 vezes, 20,0 kV e distância focal de 7,0 mm.

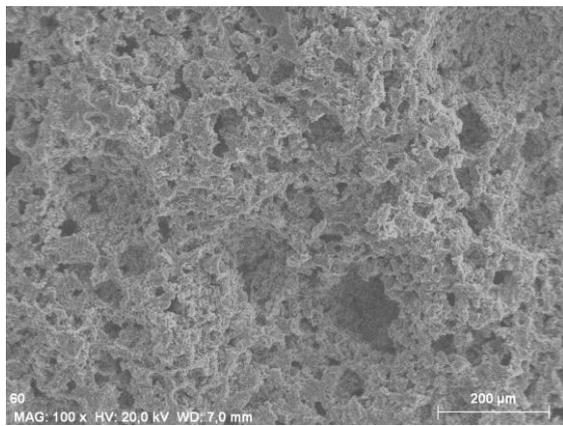


Figura 2b: Micrografia da amostra Q60 com magnitude de 100 vezes, 20,0 kV e distância focal de 7,0 mm.

Tabela 1: Propriedades dos poros das amostras Q38 e Q60.

Amostra	Área Superficial Específica (m <sup>2</sup> /g)	Volume dos poros (cm <sup>3</sup> /g)	Diâmetro Médio dos poros (Å)
Q38	1,0404	0,000118	4,5553
Q60	1,5319	0,000876	22,8842

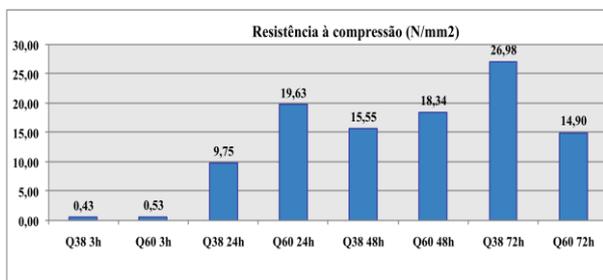


Figura 3: Representação gráfica dos valores de resistência à compressão observados no ensaio biomecânico.

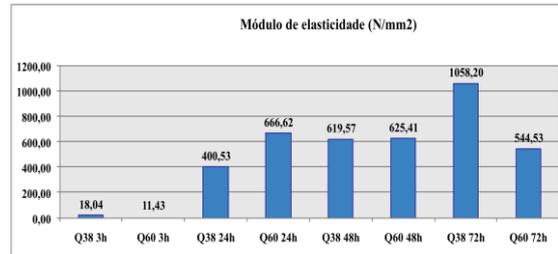


Figura 4: Representação gráfica dos valores de módulo de elasticidade obtidos no ensaio biomecânico.

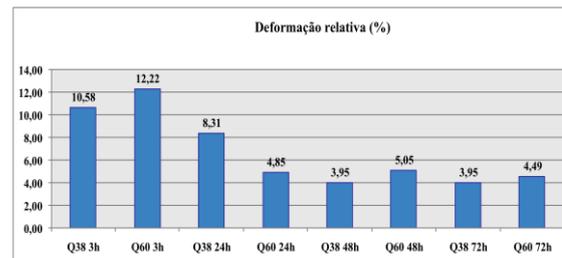


Figura 5: Representação gráfica dos valores de deformação relativa obtidos no ensaio biomecânico.

### Discussão

Os resultados da análise macroscópica das amostras Q38 e Q60 mostraram que a temperatura de secagem interferiu na coloração das mesmas, o que já era previsto devido à presença da dextrose na composição do cimento. Esse monossacarídeo pode sofrer degradação não enzimática através da reação de caramelização, a partir da desidratação que produz compostos instáveis os quais oxidam, provocando o escurecimento; e posterior liberação de compostos voláteis, responsáveis pelo odor característico deste processo. Conforme esperado, o aumento na temperatura de secagem do cimento acelerou o processo de caramelização da dextrose na amostra Q60, provocando alterações não somente na sua cor, mas também no tamanho e na distribuição dos seus poros.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu a observação da superfície das amostras Q38 e Q60, que mostraram porosidade aparentemente com poros interconectados. Também foram observados poros maiores, formados pelas bolhas de ar presentes nas amostras ou de outros componentes gasosos liberados durante a secagem das mesmas em estufa.

Ressalta-se que a presença de poros entre 100 μm e 200 μm permite a osteocondução em enxertos ou implantes porosos. No entanto, o grau de interconectividade entre poros é o fator mais importante neste caso [8]. O tamanho dos poros tem importância na viabilidade e a afinidade celular por influenciar no movimento, união e espalhamento celular, sinalização intracelular e transporte de nutrientes e metabólitos [9]. Além disso, a proliferação de osteoblastos, o crescimento vascular e a formação óssea, são favoráveis em implantes com poros interconectados com tamanho mínimo de 100 μm [10]. Todavia, a geometria, o

tamanho e a distribuição dos poros, assim como a interconectividade apresentam relação direta com as propriedades mecânicas [11] e não devem comprometer o comportamento do implante na região enxertada [12].

De acordo com a Tabela 1, a amostra Q60 apresentou área superficial específica, volume total e diâmetro médio de poros superiores aos obtidos para a amostra Q38. Embora as amostras tenham a mesma composição inicial, a temperatura afetou a composição final das amostras e promoveu um aumento na porosidade da amostra Q60, devido à formação de compostos voláteis durante a caramelização.

Os efeitos da temperatura de secagem e da porosidade das amostras também foram observados nos resultados do ensaio mecânico. Para os valores de resistência à compressão, a amostra Q60 apresentou maior resistência até 48 horas e menor após 72 horas quando comparada à Q38, indicando que o aumento da temperatura afetou negativamente a resistência à compressão do cimento. Ainda, a amostra Q38 apresentou resistência de 26,984 N/mm<sup>2</sup> após 72 horas, o que pode ser comparado ao osso trabecular de terceiro metacarpiano de equino com valores entre 39,43 e 20,45 N/mm<sup>2</sup> [13] ou ainda a outros substitutos ósseos comerciais como o Norian SRS® 25,6 N/mm<sup>2</sup> [3].

Após 72 horas Q38 apresentou módulo de elasticidade superior a Q60, sendo 1058,204 N/mm<sup>2</sup> comparado a 1439,93 e 909,59 N/mm<sup>2</sup> do osso trabecular de terceiro metacarpiano equino [8] e produtos comerciais: Calcibon® (790 N/mm<sup>2</sup>), Norian SRS® (674 N/mm<sup>2</sup>) e MIIG® X3 (665 N/mm<sup>2</sup>) [3].

Em 3 horas, a amostra Q60 apresentou maior deformação relativa, enquanto que com 24 horas, o maior valor foi observado para a amostra Q38. Após esse período, a amostra Q60 apresentou valores superiores de deformação relativa até o final do experimento, mostrando novamente o efeito indesejável do aumento da temperatura na secagem do cimento. Dessa forma, Q38, quando implantado em falha óssea, pode ter características que promoverão maior estabilidade em um foco de fratura por apresentar menor deformação relativa.

## Conclusão

O aumento na temperatura de secagem apresentou um efeito deletério nas propriedades mecânicas dos cimentos, devido ao aumento da porosidade, além de provocar escurecimento. A análise de espectroscopia na região do infravermelho das amostras está sendo conduzida para comprovar a reação de caramelização da dextrose. A presença de poros com tamanho superior a 100 µm, bem como a interconectividade, são fatores importantes para a osteointegração, porém o material a ser implantado deve apresentar propriedades mecânicas semelhantes ao osso, além de capacidade de fixação. Assim, a amostra Q38 apresentou características mecânicas desejáveis para substitutos ósseos e até superiores a produtos já disponíveis no mercado.

Ensaio complementares *in vivo* deverão ser realizados com as formulações obtidas e seus resultados publicados no futuro.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fapesp, CNPq, CAPES e Fapemig e o Laboratório de Biomecânica da FMVZ-USP, no nome do Prof. Dr. Cássio A. Ferrigno.

## Referências

- [1] Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *J. Care Injured*. 2011; 42: 56–63.
- [2] Sumner-Smith G. *Bone in clinical orthopedics*. Dübendorf: AO Publishing, 2002.
- [3] Lieshout EMMV, Kralingen GHV, El-Massoudi Y, Weinans H, Patka P. Microstructure and biomechanical characteristics of bone substitutes for trauma and orthopaedic surgery. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2011; 12 (34): 1-14.
- [4] Olivier V, Faucheux N, Hardouin P. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *DDT*. 2004; 9(18).
- [5] Zhang Y, Zhang M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002; 61(1):1-8.
- [6] Spin-Neto R, Pavone C, Freitas RM, Marcantonio RAC, Marcantonio-Júnior E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2008; 37(2): 155-161.
- [7] Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, Klokkevold PR, Chung CP. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *Journal of Periodontology*. 2000; 71(3): 410 – 417.
- [8] KUHNE et al. Bone formation in corali hidroxiapatite: effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthopaedic*. V. 65. 1994.
- [9] OH, S.H. et al. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, Amsterdam, 2007.
- [10] HENCH, LL. *Biomaterials: a forecast for the future*. Biomaterials, Amsterdam, 1998.
- [11] YANG, S. et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. *Tissue Engineering*. New Rochelle. 2002.
- [12] KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, v. 26, p. 5474–5491, 2005.
- [13] Moreira RC, Pereira CAM, Frazão PJR, Selim MB, Silva LCLC, Zoppa ALV. Evaluation of bone biomechanical properties in different regions of the equine third metacarpus. *Journal of Musculoskeletal Research*. 2012; 15(3): 1250017-1 – 1250017-10.