



Universidade da Beira Interior
Covilhã | Portugal

Universidade da Beira Interior

Faculdade das Ciências da Saúde



Desenvolvimento e caracterização de cimentos ósseos inovadores

Arsénio César Amoreira Ramalho

Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas

Cascais

2009/2010



Universidade da Beira Interior

Faculdade das Ciências da Saúde



Universidade da Beira Interior
Covilhã | Portugal

Desenvolvimento e caracterização de cimentos ósseos inovadores

Development and characterization of new bone cements

Orientador:

Eng. Cláudia Ranito (M. Sc)

Medbone – Medical Devices Lda.

Co-Orientador:

Prof. Dr. Ilídio Correia

Universidade da Beira Interior

Termo de responsabilidade

O conteúdo do presente trabalho é da exclusiva responsabilidade do autor(a):

Agradecimentos

A concretização de um trabalho de investigação resulta sempre no esforço e do trabalho de um grupo de pessoas que directa ou indirectamente contribuem para a sua realização.

À minha orientadora, Eng^a Cláudia Ranito, manifesto o meu reconhecimento pela oportunidade e orientação desta dissertação, onde, paralelamente ao apoio científico, me transmitiu o exemplo de perseverança, responsabilidade, inconformismo, competência, e sentido humanista. Agradeço ainda os seus conselhos, orientações, sugestões e críticas que serviram como incentivo para o prosseguimento desta área, os biomateriais.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ilídio Correia, manifesto o meu agradecimento pelo contacto disponibilizado da empresa, bem como da sua disponibilidade sempre pronta para ajudar. Agradeço ainda pela formação prestada nesta área, que me levou a seguir este caminho.

Ao Prof. Dr. Abílio Sousa, manifesto o meu agradecimento pelo apoio manifestado durante a realização dos ensaios mecânicos e pelos conselhos dados. Agradeço ainda a simpatia com que me recebeu.

À Mestre Patrícia Baptista e ao Mestre Miguel Rodrigues manifesto o meu agradecimento pela ajuda prestada na realização dos ensaios da citotoxicidade.

Ao Sr. João Cruz manifesto o meu obrigado pela realização da difracção de raios x em todas amostras.

À minha namorada, agradeço todo o apoio, toda a força, motivação e paciência prestados em alturas menos fáceis.

À minha família, pais e irmã, que me apoiaram desde sempre, agradeço todos os esforços que fizeram por mim.

Aos meus amigos pelas palavras de incentivo.

Obrigado

RESUMO

A prática comum dos profissionais da saúde em situações de regeneração de defeitos ósseos contidas ou fixação de próteses, consistem em recorrer aos cimentos designados por acrílicos. Os referidos cimentos possuem inúmeras limitações, para o doente e para a equipa médica, porém não existem cimentos alternativos com capacidades de preenchimento e de fixação simultânea. O objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de cimentos ósseos com propriedades semelhantes aos cimentos acrílicos porém ultrapassando as limitações que existem para os mesmos. Com isto, foram desenvolvidas três tipos de cimentos ósseos, os cimentos à base de brushite, os cimentos com uma composição bifásica de brushite e β -fosfato tricálcico e cimentos de sulfato de cálcio. Os cimentos ósseos à base de brushite tradicionais são bastante limitados no que diz respeito à aplicação clínica, uma vez que possuem tempos de cura muito curtos e são fracamente injectáveis. Com o intuito de melhorar este tipo de cimentos e tendo sempre o foco a aplicação clínica, foram desenvolvidos quatro tipos cimentos de fosfato de cálcio à base de brushite. No primeiro caso, foi produzido um cimento de brushite; no segundo caso, foi produzido um cimento de brushite com aditivo de sulfato de cálcio; no terceiro caso, o cimento tinha uma composição bifásica de brushite e β -fosfato tricálcico; no quarto caso o cimento tinha a mesma composição bifásica porém com a adição de um aditivo de sulfato de cálcio. Os últimos cimentos estudados tinham na sua composição sulfato de cálcio, um com aditivo de β -fosfato tricálcico e outra composição sem o referido aditivo. Os cimentos à base de brushite foram preparados através da mistura de dois rácios diferentes de β -fosfato tricálcico e fosfato de monocálcio monohidratado juntamente com uma solução de citrato de trisódio a diferentes concentrações, usado como retardador do *setting time*. Os cimentos à base de sulfato de cálcio foram preparados com sulfato de cálcio hemidratado e água. Todos os cimentos foram caracterizados relativamente ao *setting time*, injectabilidade, resistência mecânica, bem como à sua citocompatibilidade em ambiente biológico. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os cimentos apresentam bons tempos de cura e alguns têm uma excelente injectabilidade, o que viabiliza a sua utilização no preenchimento de defeitos ósseos. Já na resistência à compressão, os cimentos desenvolvidos possuem valores de resistência à compressão que estão de acordo com os valores do osso trabecular, no entanto, serão realizados mais estudos de modo a avaliar a biocompatibilidade e o seu papel na fixação de próteses destes cimentos.

Palavras-chave: cimentos de fosfato de cálcio, brushite, cimentos de sulfato de cálcio, β -fosfato tricálcico, *setting time*, injectabilidade, resistência mecânica, testes *in vitro*.

ABSTRACT

Nowadays, acrylic ciments are used by health professionals in the repair of bone defects or prosthesis fixation. These cements have countless limitations for the patient and for the medical team, but there are no alternative cements with simultaneous filling and fixation capabilities. The aim of this work was to develop new bone cements with properties similar to acrylic cements but that overcome their limitations. During this research project, three kinds of bone cement were developed, the cement-based brushite, cements with a biphasic composition of brushite/ β -tricalcium phosphate and calcium sulfate cements. The bone cements based on traditional brushite are quite limited for clinical application, since they have very short settings times and they are weakly injectable. Aiming to improve this type of cement and always keeping the focus on clinical application, we developed four types of calcium phosphate cements. The first type by brushite; in the second case was composed by brushite-based additive with calcium sulfate; in the third case, a biphasic composition of brushite and β -tricalcium phosphate was studied; in the fourth, the same biphasic composition but with the addition of an additive of calcium sulfate was studied. Finally, we studied the calcium sulfate cements, with additive β -tricalcium phosphate and other composition without this additive. Cements based on brushite were prepared by mixing different ratios of two β -tricalcium phosphate and monocalcium phosphate monohydrate with a solution of trisodium citrate, at different concentrations, used as the setting time retarder. Cements based on calcium sulfate were prepared with calcium sulfate and water hemi-hydrated. The setting times, injectability, mechanical strength, the cytotoxic profiles were determined for all cements. The results of this study showed that the developed cements have good setting times and excellent injectability, which is fundamental for its use in filling bone defects. Regarding the compressive strength, the cements possess values of compression resistance that are similar to that of the trabecular bone. Further studies need to be performed in order to evaluate the biocompatibility and fixation of prostheses capacities of the developed cements.

Keywords: calcium phosphate cement, brushite, calcium sulphate cement, β -tricalcium phosphate, setting time, injectability, mechanical strength, in vitro assays

Lista de abreviaturas

- ABC** – Cimento ósseos acrílicos
- ACP** – Fosfato de cálcio amorfo
- BCP** – Fosfatos de cálcio bifásico
- BPO** – Peróxido benzoílo
- CAP** – Carbonato-apatite
- CaP** – Fosfatos de cálcio
- CDHA** – Hidroxiapatite deficiente em cálcio
- CFC** – Clorofluorocarboneto
- CICs** – Cimentos compostos
- CPBC** – Cimento ósseo de fosfato de cálcio
- CPBCs** – Cimentos ósseos de fosfato de cálcio
- CPC** – Cimento de fosfato de cálcio
- CSC** – Cimento de sulfato de cálcio
- CSD** – Sulfato de cálcio dihidratado
- CSH** – Sulfato de cálcio hemihidratado
- DCP** – Fosfato de dicálcio
- DCPA** – Fosfato de dicálcio anidro (Monetite)
- DCPD** – Fosfato de dicálcio dihidratado (brushite)
- DCPD-CPCs** – Cimentos de brushite
- DMT** – N,N-dimetil-p-toluidina
- DRX** – Difraccção de Raios X
- EtO** – Óxido de etileno
- FST** – *Setting time* final

HA – Hidroxiapatite

HA-CPCs – Cimentos de apatite

IST – *Setting time* inicial

MCMP – Fosfato de monocalcio monohidratado

MCPA – Fosfato de monocálcio anidro

MCPM – Fosfato de monocálcio monohidratado

MMA – Metilmetacrilato

OCP – Fosfato de octacálcio

P(MMA/MA) – metilmetacrilato/ copolímero metacrilato

P(MMA/sty) – metilmetacrilato/copolímero estireno

PMMA – polimetilmetacrilato

PTFE – Politetrafluoretileno

S/N – Sinal-ruído

SAL – Nivel de segurança de esterilização

TTCP – Fosfato de tetracálcio

α -TCP – Fosfato Tricálcio α

β -TCP – Fosfato Tricálcio β

Lista de figuras

Figura 1 Esquema ilustrativo da estrutura de um osso longo.	4
Figura 2 Esquema que ilustra a inserção da prótese com o cimento.....	9
Figura 3 Equipamento tipo das agulhas de Gilmore para medir o <i>setting time</i>	24
Figura 4 Diagrama dos tempos do <i>setting</i> tendo em conta aplicação clínica.....	26
Figura 5 Injecção do cimento ósseo numa quifoplastia/vertebroplastia.	27
Figura 6 Seringa tipo usada para testar a injectabilidade dos CPCs	28
Figura 7 Esquema ilustrativo do decaimento do ⁶⁰ Co.....	41
Figura 8 Representação esquemática do procedimento usado para medir a injectabilidade dos cimentos.	54
Figura 9 Embalamento das amostras antes da esterilização.....	55
Figura 10 Espectros de difracção de raios X com diferentes rácios de β -TCP, MCMP e água.	62
Figura 11 Espectros de difracção de raios X com diferentes rácios de β -TCP, MCMP e água.	63
Figura 12 Espectros de difracção de raios X com amostras de CSD sujeitas a diferentes tratamentos térmicos.....	64
Figura 13 <i>Setting times</i> inicial (IST) e final (FST) dos cimentos desenvolvidos (cimentos 1 – 4 rácio L/S=0.4ml/g e cimentos 5 e 6 rácio L/S=0.6ml/g)	65
Figura 14 Injectabilidade dos diferentes cimentos após 2 minutos do inicio da mistura.	67
Figura 15 Resistência à compressão dos cimentos produzidos após 24h da mistura.	68
Figura 16 Espectro de DRX dos cimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com uma dose de 25 KGy.	71
Figura 17 Espectro de DRX dos cimentos 1, 2, 4, 4, 5 e 6 com uma dose de 40 KGy.	72

Figura 18 Proliferação das células estaminais isoladas de medula óssea de rato na presença dos cimentos produzidos após 24h de incubação. 73

Figura 19 Imagens obtidos ao microscópio óptico invertido dos poços que continham células em contacto com os cimentos esterilizados nas diferentes gamas de radiação gama. 74

Figura 20 Imagens obtidos ao microscópio óptico invertido do poço que continham as células em contacto com o cimento 3 de 25 KGy após 24h de incubação 75

Figura 21 Acção dos feixes de raios X sobre os planos da rede cristalina. 86

Lista de tabelas

Tabela 1 Composição de alguns cimentos ósseos acrílicos disponíveis no mercado.	10
Tabela 2 Fosfatos de cálcio mais relevantes no desenvolvimento de cimentos ósseos.	13
Tabela 3 Lista de algumas formulações de cimentos de fosfato de cálcio disponíveis no mercado.....	17
Tabela 4 Lista de algumas formulações de cimentos de sulfato de cálcio disponíveis no mercado.....	23
Tabela 5 Principais vantagens e desvantagens dos cimentos cerâmicos.	35
Tabela 6 Desenho de experiências utilizando uma matriz L9 com base no método de Taguchi.....	44
Tabela 7 Tabela de factores e respectivos níveis utilizados para realizar as experiências com base no método de Taguchi.	50
Tabela 8 Constituição dos diferentes cimentos desenvolvidos.	52
Tabela 9 Desenho de experiências de Taguchi com os respectivos resultados do <i>setting time</i> obtida das experiência.	58
Tabela 10 Tabela ANOVA para os índices de S/N obtido dos resultados do <i>setting time</i> das experiência.....	59
Tabela 11 Combinação óptima de níveis de acordo com o desenho de experiências utilizando uma matriz L9.....	60
Tabela 12 Experiência de confirmação com base os resultados do obtido pelo método de Taguchi.....	60
Tabela 13 Resposta óptima e intervalo de confiança dos resultados obtidos pelo método de Taguchi.	61
Tabela 14 Valores de pH dos cimentos medidos após 2 minutos do inicio da mistura.	75

Índice

I. Introdução	1
1. O osso.....	3
2. Cimentos Ósseos.....	8
2.1 Cimentos Ósseos Acrílicos.....	8
2.2 Cimentos ósseos cerâmicos.....	12
2.2.1 Cimentos de Fosfato de Cálcio	12
2.2.1.1 Tipos principais de cimentos de fosfato de cálcio	19
2.2.1.1.1 Cimentos de Apatite	19
2.2.1.1.2 Cimentos de Brushite	20
2.2.2 Cimentos de Sulfato de Cálcio	22
2.2.3 Propriedades dos cimentos de fosfato de cálcio e de sulfato de cálcio.....	23
2.2.3.1 Setting time	24
2.2.3.2 Injectabilidade	27
2.2.3.3 Comportamento mecânico	29
2.2.3.4 Biocompatibilidade e biodegradabilidade.....	30
2.2.4 Factores que influenciam as propriedades dos cimentos cerâmicos ..	32
2.2.4.1 Rácio líquido/sólido	32
2.2.4.2 Processo de mistura.....	32
2.2.4.3 Aditivos que são adicionados aos cimentos	33
2.2.5 Vantagens e desvantagens dos cimentos cerâmicos	34
2.2.6 Aplicações clínicas dos cimentos de fosfato de cálcio e sulfato de cálcio.....	36
3. Esterilização.....	38
3.1 Métodos de esterilização.....	38
3.1.1 Autoclave ou esterilização por vapor.....	39
3.1.2 Esterilização por óxido de etileno.....	39
3.1.3 Esterilização por radiação	40

3.1.3.1	Esterilização com ⁶⁰ Co	40
3.1.3.2	Esterilização por feixe de electrões	42
3.1.4	Outros processos de esterilização	43
3.1.4.1	Métodos tradicionais	43
3.1.4.2	Novas tecnologias	43
4.	Método de Taguchi	44
II.	Materiais e Métodos	49
1.	Optimização dos cimentos	49
1.1	Optimização dos cimentos de brushite.....	49
1.2	Optimização dos cimentos de sulfato de cálcio	51
2.	Produção dos cimentos.....	51
3.	Caracterização dos cimentos	53
3.1	Setting Time.....	53
3.2	Injectabilidade	53
3.3	Ensaio de resistência à compressão	54
3.4	Esterilização por Raios Gama.....	54
3.4.1	Caracterização por Difracção raios X.....	56
3.4.2	Ensaio de citotoxicidade in vitro	56
3.4.3	Medição do pH dos cimentos	57
III.	Resultados	58
1.	Optimização dos cimentos	58
1.1	Optimização dos cimentos de brushite.....	58
1.2	Optimização dos cimentos de sulfato de cálcio	63
2.	Caracterização dos cimentos	65
2.1	Setting time	65
2.2	Injectabilidade	66
2.1	Resistência mecânica de compressão dos cimentos	68
2.2	Caracterização por Difracção de raios X.....	69
2.3	Avaliação da citotoxicidade dos cimentos através de ensaios <i>in vitro</i>	73

2.4	Observação por microscopia óptica da proliferação das células em contacto com os cimentos produzidos.....	74
2.5	Medição do pH dos cimentos	75
IV.	Discussão	77
V.	Conclusão e Perspectivas futuras	81
VI.	Referências bibliográficas	83
VII.	Anexos	86
1.	Difracção de Raios X (DRX).....	86

I. INTRODUÇÃO

Durante o último século, novos materiais e novas técnicas cirúrgicas têm mudado drasticamente a vida de milhões de pacientes. Os biomateriais têm uma importante contribuição nos cuidados de saúde modernos, nomeadamente nas doenças músculo-esqueléticas, tais como a osteoporose ou até mesmo fracturas débeis, associadas ao envelhecimento da população. Os biomateriais são muito utilizados na cirurgia de reconstrução óssea. A seguir ao sangue, o osso é o segundo tecido mais transplantado [1]. Enxertos ósseos não só são usados na ortopedia, mas também nas cirurgias dentária e maxilofacial.

O osso retirado do próprio paciente (auto-enxerto) é o mais preferido para o tratamento de defeitos ósseos. O auto-transplante é referido como o *gold standard*, mas também possui desvantagens, pois expõe o paciente a uma segunda cirurgia para recolher o tecido ósseo. O allo-enxerto, osso retirado de outra pessoa que não seja o próprio receptor, pode ser outra alternativa, mas tem como desvantagem poder desencadear um mecanismo de imuno rejeição, e a possibilidade de transmissão de patologias do dador para o receptor [2].

Para resolver este problema, os substitutos ósseos sintéticos são uma opção viável. Estes podem ser desenhados para se adequarem a uma vasta gama de critérios que possam beneficiar tanto o cirurgião como o paciente. Para além de serem facilmente armazenados nos hospitais, estes têm um controlo de qualidade e podem ser desenhados para ter óptimas propriedades mecânicas e biológicas adequadas para uma determinada aplicação específica [1].

A desvantagem dos substitutos ósseos sintéticos passa pelo facto de terem uma geometria tridimensional pré-definida, o que limita por vezes o preenchimento de defeitos ósseos de pequena dimensão ou até mesmo a sua aplicação no tratamento de alguns tipos de fracturas. O desenvolvimento dos cimentos ósseos veio combater esta lacuna dos substitutos ósseos, visto que os cimentos são pastas facilmente moldados ou injectados na cavidade pretendida. Podem ainda ser usados com

técnicas minimamente invasivas, que diminuem o tempo de cirurgia, e reduzem as complicações, tais como as infecções e a dor. Para além da aplicação do cimento ósseo em zonas contidas, os cimentos ósseos são também muito utilizados para a fixação de próteses.

Nos anos 80, os investigadores descobriram os cimentos de fosfato de cálcio (CPCs) com propriedades bioactivas e biodegradáveis, constituídas por uma componente em pó e outra componente líquida. A mistura dos dois componentes origina uma pasta viscosa que depois de ser colocada, endurece no local de implantação. A descoberta destes cimentos abriu uma nova era nas aplicações médicas [3].

No entanto, as formulações comerciais disponíveis no mercado actual ainda apresentam algumas desvantagens relacionadas com a resistência à compressão verificada nos cimentos de fosfato de cálcio ou até mesmo as elevadas temperaturas a que ocorre o processo de cura dos cimentos acrílicos, o que justifica uma contínua investigação e desenvolvimento dos cimentos ósseos.

1. O OSSO

O osso é um tecido especializado que é característico dos vertebrados. Do ponto de vista zoológico, o tecido ósseo tende a apresentar características específicas que advêm da sua diferenciação nos vários animais, de acordo com parâmetros que incluem o meio ambiente onde vivem e o tipo de forças a que o osso é submetido.

O osso é um tecido conectivo (ou conjuntivo) complexo, altamente organizado e especializado que desempenha diferentes funções. É caracterizado fisicamente pelo facto de ser um tecido duro, rígido e forte. A análise microscópica revela a presença de algumas células e bastante substância intercelular formada por fibras de colagénio e por substância endurecida [4]. O osso é constituído por células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e matriz extracelular, diferenciando-se dos outros tecidos conjuntivos pelo facto dessa matriz ser mineralizada. Na sua composição incluem-se 33% de matriz orgânica e 67% de compostos inorgânicos [4]. Os iões mais abundantes neste tecido são o cálcio e o fósforo, que formam o constituinte mineral mais importante, a hidroxiapatite, que tem como fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Todos os ossos têm funções mecânicas e estão ligados a vários grupos de músculos. Além disso, em algumas partes do corpo, os ossos fornecem função protectora a estruturas vitais – crânio (cérebro), costelas, pulmões, coração, bacia, bexiga e vísceras pélvicas. Alguns ossos mantêm a sua função hematopoiética em adultos – vértebras, crista íliaca, partes proximais do fémur e do úmero. Todos os ossos servem como reservatório de cálcio e participam activamente na homeostasia de cálcio no organismo.

O osso é composto por dois tipos de tecido ósseo: osso cortical (compacto) e osso trabecular (esponjoso). O osso cortical forma o córtex, ou a parte exterior do osso e possui uma estrutura densa. Este tecido é o componente primário dos ossos longos dos braços e pernas e de outros ossos, onde a sua grande força e rigidez são necessárias. O osso trabecular ocupa tipicamente a região interior do osso e consiste numa série de placas interconectadas de osso – a trabécula. Cada trabécula óssea contém fibras de colagénio arranjadas em lamelas paralelas. O osso trabecular é altamente vascular e contém frequentemente medula óssea vermelha onde ocorrer a hematopoiese (a produção de células sanguíneas) [4].

O osso pode ser classificado como longo (fémur, tíbia, úmero, rádio), pequeno (carpo, tarso), achatado (costelas, esterno, crânio e omoplata), irregular (vértebra) e sesamóide (patela e pequenos ossos). Cada osso longo pode ser dividido em três regiões, chamadas de epífise, metáfise e diáfise [4-5]. Na figura 1 pode se ver a estrutura de um osso longo.

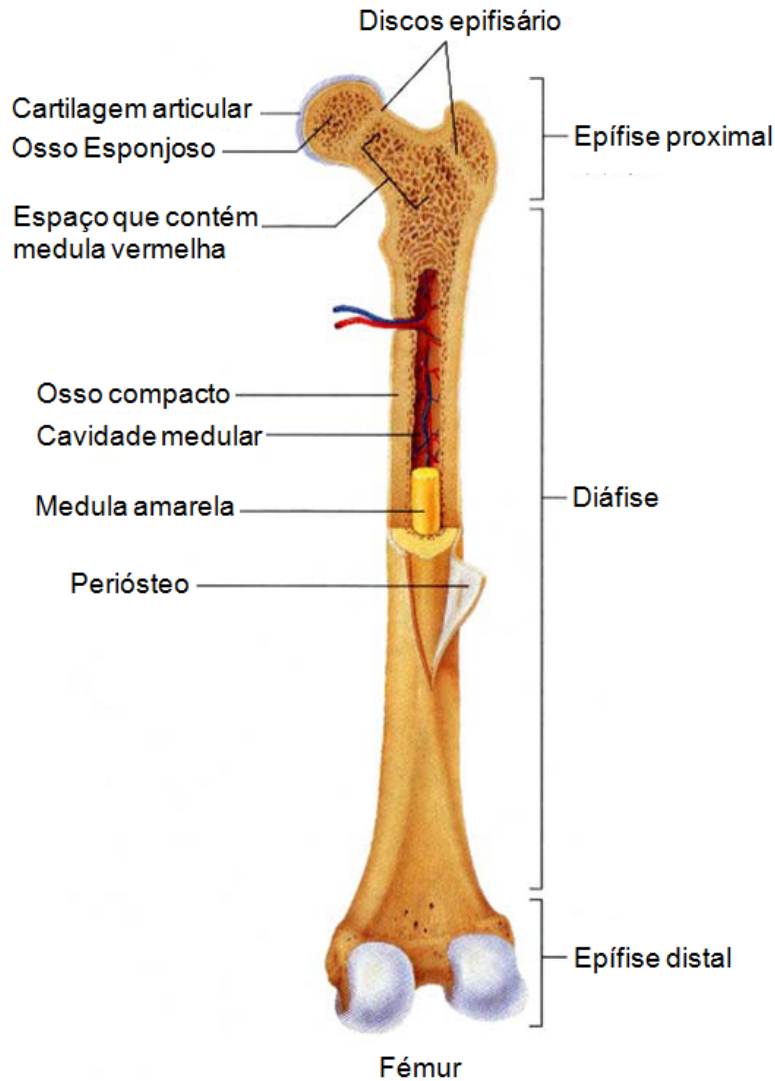


Figura 1 Esquema ilustrativo da estrutura de um osso longo (adaptado de [5]).

A epífise é a extremidade arredondada do osso. A metáfise é a parte adjacente à epífise em adultos (a placa de crescimento fechada). A diáfise é a parte cilíndrica situada no meio das duas extremidades do osso, também conhecida como corpo.

A superfície do osso é coberto pelo perióstio e o endóstio com tecido conectivo. O perióstio reveste a superfície exterior do osso, excepto as ligações em que são protegidas pela cartilagem articular e consiste numa camada fibrosa externa composta por fibras de colagénio, fibroblastos e uma camada interna composta de células

achatadas – as células osteoprogenitoras com a capacidade para se dividirem através de mitose e se diferenciarem em osteoblastos. O endóstio está ligado à superfície interna do osso, nomeadamente à superfície da cavidade medular dos ossos longos. Este é composto por células osteoprogenitoras e por uma pequena quantidade de tecido conectivo. Ambas as superfícies, o perióstio e o endóstio, fornecem um contínuo reforço de células osteoprogenitoras ou de novos osteoblastos para reparação ou crescimento do osso [4].

Uma característica comum a todos os tipos de osso é possuírem uma camada externa, densa, de osso compacto e uma cavidade medular central. A cavidade medular está ocupada, nos ossos vivos, por medula óssea e tecido gordo.

Ao nível dos componentes celulares, a matriz celular do tecido ósseo é constituído por três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

- Os osteoblastos são células mononucleadas que sintetizam proteínas colagénicas ou não colagénicas e são responsáveis pelo processo de mineralização do tecido osteóide. Têm como principal função a produção da matriz óssea, durante o desenvolvimento ou a reparação do tecido ósseo, ou seja, são responsáveis pela formação do osso. Quando activos, estes mostram alta actividade da fosfatase alcalina.
- Os osteócitos são células achatadas e fusiformes que suportam o osso e estão localizadas no interior das lamelas do osso esponjoso e compacto. Estas células estão completamente envolvidas por matriz extracelular, formando um espaço denominado de lacunas. A quantidade de osteócito existente por unidade de volume ósseo está directamente dependente da rapidez do processo de formação deste tecido. Quanto maior for a rapidez de formação óssea maior será a quantidade de osteoblastos aprisionados que se transformarão, posteriormente, em osteócitos. Assim, a sua função inclui a formação de osso, manutenção da matriz e homeostasia do cálcio.
- Os osteoclastos são células que se distinguem das outras por apresentarem um volume maior e múltiplos núcleos. Estas células desempenham um papel fundamental no processo de remoção e reabsorção do osso (remodelam o osso para reduzir o seu volume através de ataques químicos directos ou enzimáticos) que é destruído, libertando cálcio ou, em conjugação com o processo de deposição óssea, levando à remodelação deste tecido em consequência de exigências funcionais. Para além das funções osteolíticas, os osteoclastos desempenham um papel importante no desenvolvimento e

crescimento ósseo, através da libertação de factores de crescimento de tipo polipeptídico, a partir da matriz extracelular mineralizada.

Ao nível molecular, o osso é composto por uma matriz óssea de osso lamelar ou não lamelar. A matriz óssea é onde as células estão instaladas. Esta é composta por matérias orgânicas e inorgânicas. A porção inorgânica ou mineral (aproximadamente 70%) é constituída principalmente por pequenos cristais de hidroxiapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A fase orgânica é composta por fibras de colagénio tipo I embutido numa substância homogénea contendo proteoglicanos e glicoproteínas [4].

O osso lamelar é constituído por lâminas finas, as lamelas, de tamanhos compreendidos entre os 4 e 7 μm . No interior de cada lamela, as fibras de colagénio orientam-se de forma paralela entre si, mas a sua orientação geral é diferente da das lamelas adjacentes. Este tipo de tecido é observado nos ossos longos e na cortical do osso alveolar [4-5].

O osso fibroso ou fascicular, não lamelar, é constituído por fibrilas de colagénio espessas, com organização paralela entre si. É observado, geralmente, nos locais de inserção dos ligamentos, permitindo uma união forte entre o tecido ósseo e este tipo de fibras [4].

Os ossos adultos, tanto os compactos como os esponjosos, possuem características histológicas semelhantes. São constituídos por camadas microscópicas de tecido, as lamelas ósseas, que no osso compacto se apresentam mais comprimidas.

Podem identificar-se três tipos diferentes de lamelas: circunferenciais, concêntricas e intersticiais.

- As lamelas circunferenciais envolvem a parede externa do osso adulto, formando uma camada superficial.
- As lamelas concêntricas preenchem grande parte do osso compacto formando uma unidade metabólica básica denominada de ósteon. Os ósteon são cilindros de tecido ósseo, com orientação paralela ao eixo principal do osso. No centro de cada ósteon existe o canal de Havers que está recoberto por uma camada única de osteoblastos e aloja um capilar. Os canais de Havers estão interligados através dos canais de Volkman, que também possuem capilares no seu interior. Esta rede vascular permite o aporte de fluidos orgânicos às partes mais profundas do tecido.

- As lamelas intersticiais preenchem os espaços existentes entre as lamelas concêntricas e não são mais do que fragmentos das lamelas concêntricas que adoptam uma grande diversidade de formas.

2. CIMENTOS ÓSSEOS

Os cimentos ósseos são biomateriais sintéticos compostos por duas partes, uma componente em pó e outra componente líquida, usados com muito sucesso em diversas aplicações médicas, tal com na cirurgia ortopédica e na dentária, etc. Estes dão origem a uma massa viscosa que se altera ao longo do tempo e que tende a endurecer após a mistura das duas partes [6].

Os cimentos ósseos possuem inúmeras aplicações, sendo principalmente conhecidos por permitirem fixar próteses (próteses do joelho, da anca, do ombro e do cotovelo). Estes preenchem o espaço livre entre a prótese e o osso, fixando a prótese (ver figura 2).

Os cimentos além de cimentarem próteses, também podem preencher cavidades e pequenos defeitos ósseos, sendo nesses casos usado como material de enxerto ósseo, em que se pretende que o cimento seja reabsorvido pelo organismo e substituído por novo tecido ósseo [7].

Existem 4 classes de cimentos ósseos conhecidos actualmente: cimentos ósseos acrílicos (ABCs), cimentos de fosfato de cálcio (CPCs), cimentos de sulfato de cálcio (CSCs) e os cimentos compostos (CICs) [8].

Os mais utilizados nos dias de hoje, numa grande variedade de aplicações são os cimentos acrílicos.

2.1 CIMENTOS ÓSSEOS ACRÍLICOS

Os cimentos ósseos são compostos acrílicos de solidificação espontânea, auto-polimerizáveis, utilizados no posicionamento e fixação de próteses ao osso vivo [6, 9], devido principalmente ao esforço pioneiro do investigador Charnley [10]. Estes são compostos por uma fracção em pó (constituída por um polímero de metacrilato de metilo com um iniciador de polimerização – o peróxido de benzoílo (BPO)) e uma fracção líquida (constituída por monómero de metilmetacrilato (MMA) activado com N,N-dimetil-p-toluidina (DMT)) [6, 9]. A química do processo de cura dos cimentos acrílicos é baseada na polimerização de radicais livres do monómero de MMA. A reacção é iniciada pelos radicais livres produzidos como resultado da decomposição

do iniciador, o BPO, na presença de moléculas de amina, normalmente N-N dimetil p-toluidina [11].

O polimetacrilato de metilo (PMMA) é um dos principais constituintes dos cimentos ósseos acrílicos devido ao facto de este possuir uma boa resistência mecânica e por ter uma boa biocompatibilidade.

Os cimentos ósseos não têm propriedades adesivas, mas dependem de uma interconexão mecânica íntima entre a superfície irregular do osso e a prótese, permitindo uma boa fixação da prótese ao osso.

A altura da aplicação do cimento e da inserção da prótese é determinada pelo cirurgião e dependerá da técnica cirúrgica utilizada. A prótese é inserida e mantida firmemente em posição até o cimento estar solidificado. O processo de endurecimento (*setting time*) leva aproximadamente cerca de 15 minutos desde o início da mistura até à solidificação. O excesso de cimento ósseo deve ser removido antes de endurecer na totalidade [10]. A figura 2 mostra um esquema onde se pode verificar a inserção de uma prótese com o cimento [10].

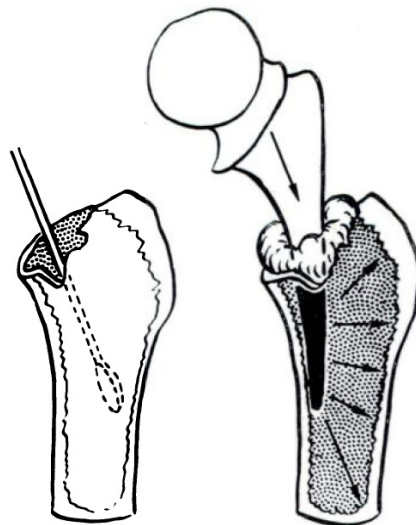


Figura 2 Esquema que ilustra a inserção da prótese com o cimento [10].

Actualmente são comercializadas diversas marcas de cimento ósseo como se pode observar na tabela 1. Embora todos os cimentos ósseos disponíveis no mercado sejam constituídos essencialmente por um homopolímero de PMMA ou por um copolímero de MMA com um monómero de MMA, a sua formulação química é distinta, resultando em cimentos com diferentes propriedades de manuseamento e diferentes

propriedades mecânicas [9]. Um estudo desenvolvido mostra que os cimentos ósseos comerciais têm significativas nas propriedades de fadiga [9].

Tabela 1 Composição de alguns cimentos ósseos acrílicos disponíveis no mercado.

Cimento ósseo comercial	Composição de pó	Composição do monómero/líquido	Referencia Bibliográfica
Palacos®R	P(MMA/MA) (84.25wt. %) + ZrO ₂ (15wt. %) + BPO (0.75wt. %)	MMA + DMT (2.0wt. %)	[9] e [6]
Simplex®P	P(MMA/sty) (75wt. %) + PMMA (15wt. %) + BaSO ₄ (10wt. %) + BPO (1.19wt. %)	MMA + DMT (2.6vol. %)	
CMW® 1	PMMA (88.85wt. %) + BaSO ₄ (9.10wt. %) + BPO (2.05wt. %)	MMA + DMT (0.816wt. %)	
CMW® 3	PMMA (88wt. %) + BaSO ₄ (10wt. %) + BPO (2.00wt. %)	MMA + DMT (2.487wt. %)	
Zimmer Regular ®	PMMA (89.25wt. %) + BaSO ₄ (10wt. %) + BPO (10.75wt. %)	MMA + DMT (2.75wt. %)	
Zimmer LVC ®	PMMA (89.25wt. %) + BaSO ₄ (10wt. %) + BPO (10.75wt. %)	MMA + DMT (2.73wt. %)	
Endurance	PMMA (67.05wt. %) + P(MMA/sty) (21.10wt. %) + BaSO ₄ (10wt. %) + BPO (1.85wt. %)	MMA + DMT (2.00wt. %)	[9]

As principais diferenças entre estas formulações encontram-se no peso molecular e quantidades relativas de copolímero de MMA, do homopolímero de PMMA e outros constituintes no material usado como radiopacificador (ZrO_2 no caso do PALACOS®R e $BaSO_4$ em todos os outros). Para além disso, a composição dos cimentos pode ser diferente consoante tenham ou não aditivos especiais (como por exemplo, a clorofila II no cimento PALACOS®R).

Devido às variações nas formulações, as características de manuseamento dos vários cimentos diferem de marca para marca produzindo cimentos que são adequados para os diferentes requisitos clínicos e técnicas cirúrgicas.

É reconhecido no entanto que os cimentos acrílicos apresentam algumas desvantagens na sua utilização [6]. Entre elas destacam-se:

- A necrose térmica é um problema que envolve o osso devido as altas temperaturas criadas durante a polimerização do cimento, que leva a formação de um local com uma circulação sanguínea defeituosa e a formação de uma membrana na interface entre cimento – osso. Estas temperaturas situam-se entre os 67 °C e 124 °C dependendo da formulação do cimento;
- A necrose química do osso devido aos monómeros que não reagiram e que são então libertados, isto é, devido aos monómeros que são libertados depois da polimerização do cimento no local do implante ósseo, muito relacionada com a toxicidade do monómero;
- O terceiro problema é a contracção volúmica do cimento durante a polimerização, a chamada contracção do manto do cimento;
- A elevada resistência mecânica do cimento face à resistência mecânica do osso poderá provocar tensões induzidas do próprio osso;
- Outra desvantagem está relacionada com o manto do cimento, onde a interface implante – cimento e a interface cimento - osso constitui zonas de ligação fracas na estrutura da fixação;
- Por fim, outra desvantagem está ligada ao facto de uma pequena porção do cimento formado poder interagir com os tecidos envolventes, provocando uma resposta inflamatória o que poderá originar destruição óssea.

Apesar destas desvantagens, a probabilidade de sobrevivência de uma prótese cimentada, especialmente a prótese do joelho e anca de pacientes com idades superiores a 50 anos, é em média de 90% durante 15 anos. Claro que outros factores

contribuem para este sucesso, nomeadamente as técnicas sofisticadas de cimentar e métodos de implementação [6].

Em alternativa aos cimentos acrílicos, surgem os cimentos à base de fosfato de cálcio, que se apresentam bastante promissores num futuro bem próximo.

2.2 CIMENTOS ÓSSEOS CERÂMICOS

2.2.1 CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

O termo “cimentos de fosfato de cálcio” (CPCs) foi introduzido por Gruninger *et al* [12] em 1984. Estes cimentos são materiais ótimos para reparar e regenerar o osso. Devido a este facto são também chamados de cimentos ósseos de fosfato de cálcio (CPBCs) [13].

Os CPCs são materiais constituídos por uma parte líquida (água ou uma solução aquosa) e uma parte sólida/pó que pode conter um ou mais componentes sólidos de sais de cálcio e/ou fosfato. Quando o líquido e o pó são misturados num rácio apropriado, estes formam uma pasta que endurece num período de tempo restrito (por exemplo, 15 min), à temperatura ambiente ou à temperatura corporal através da precipitação de um ou mais outros compostos sólido, em que pelo menos um é o fosfato de cálcio (CaP) [12, 14-15]. Durante a mistura, os CaPs dissolvem-se e precipitam num CaP menos solúvel. Durante a reacção de precipitação, os cristais de CaP crescem e ficam condensados, e assim fornecem rigidez mecânica ao cimento [16].

Os CPCs não só são biocompatíveis, mas também osteotransductivo, isto é, depois da colocação no local da lesão óssea, estes apresentam uma rápida osteointegração. Estes compostos são reabsorvidos lentamente e simultaneamente transformados num novo tecido ósseo [13]. A utilização dos CPCs tem vindo a crescer em processos de acréscimo ósseo devido à sua semelhança com o osso humano, obtendo boa biocompatibilidade e osteocondutividade [17]. Além disso, os CPCs têm baixa taxa de calor libertado durante a sua reacção de endurecimento, quando comparado com os cimentos ósseos acrílicos, prevenindo o risco de necrose óssea devido ao calor [17].

Como os CaPs são encontrados abundantemente na crosta terrestre, estes podem ser facilmente obtidos para produzir os CPCs, uma vez que os CaPs são compostos químicos de especial interesse para o ser humano devido à sua similaridade com a

parte inorgânica da maioria dos tecidos calcificado normal (osso e dentes) e patológico [5]. Os CaPs possuem uma excelente biocompatibilidade, osteocondutividade e biodegradabilidade. Os CaPs mais relevantes estão apresentados na tabela 2 e descritos mais à frente.

Tabela 2 Fosfatos de cálcio mais relevantes no desenvolvimento de cimentos ósseos [3, 5].

Rácio molar Ca/P	Fosfatos de cálcio	Fórmula
0.5	Fosfato de monocálcio monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.5	Fosfato de monocálcio anidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1.0	Fosfato de dicálcio dihidratado (DCPD)	$\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1.0	Fosfato de dicálcio anidro (DCPA)	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)$
1.33	Fosfato de octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1.2 - 2.2	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3 - 4.5$
1.5 – 1.67	Hidroxiapatite deficiente em cálcio (CDHA)	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$
1.5	Fosfato Tricálcio α (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.5	Fosfato Tricálcio β (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1.67	Hidroxiapatite (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
2.0	Fosfato de tetracálcio (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Existe uma grande variedade de CaPs que são usados na produção dos cimentos ósseos, dos quais destacam-se os seguintes:

- Fosfato monocálcio monohidratado (MCPM) é o CaP mais ácido e também o CaP mais solúvel para quase todos os valores de pH. Devido à sua acidez e solubilidade, o MCMP não é biocompatível e assim não pode ser usado sozinho em aplicações médicas. No entanto, este pode ser usado combinado com compostos de CaP básicos, tal como α -TCP (Norian SRS) ou o β -TCP

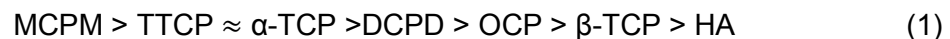
(cimentos de brushite) [16]. A temperaturas acima dos 100 °C, o MCMP liberta a molécula de água e transforma-se no MCPA [5].

- Fosfato dicálcio dihidratado (DCPD, ou o mineral Brushite) pode ser facilmente cristalizado de soluções aquosas. DCPD tem sido encontrado em calcificações patológicas (cálculo dental e pedras dos rins) [5, 16]. Este tem sido proposto como um intermediário da mineralização do osso e dissolução do esmalte em ácidos (erosão dental) [5]. Na medicina, o DCPD é usado como um CPC e como um intermediário para a remineralização dos dentes, pois este é biocompatível, biodegradável e osteocondutivo, e é facilmente convertido a HA *in vivo* [5, 16]. O DCPD transforma-se em DCPA (o mineral monetite) a temperaturas acima de 80 °C [5].
- Fosfato tricálcio β (β -TCP) é a fase de alta temperatura do CaP, em que apenas pode ser obtido através da sua decomposição termal a temperaturas acima de 800 °C [5]. β -TCP é biodegradável e tem sido extensivamente usado como substituto ósseo, tanto como em grânulos ou blocos [5, 16] ou mesmo com cimento ósseo de CaP. A degradação ocorre através da actividade osteoclástica [16]. Quando combinação com a HA, β -TCP forma o CaP bifásico (BCP), sendo ambos bastante usados com substitutos ósseos biocerâmicos [5].
- Fosfato tricálcio α (α -TCP) é usualmente preparado da fase do β -TCP através de tratamento térmico acima dos 1125 °C [5]. As fases α e β -TCP têm exactamente a mesma composição química mas diferente estrutura cristalografica e solubilidade [5, 16]. O α -TCP é biocompatível e mais biodegradável e solúvel [16] do que o β -TCP. No entanto é menos estável do que o β -TCP [5]. Por essa razão, o α -TCP é mais reactivo em sistemas aquosos, tem uma alta energia específica e este pode ser hidrolisado para se misturar com outros CaPs [5].
- Hidroxiapatite (HA) é o CaP mais estável em solução aquosa e biocompatível [16]. A HA pode ser preparada usando métodos húmidos, tal como a precipitação, hidrotermal, e hidrólises de outros CaPs. A HA pode ainda ser obtida por reacções de estado sólido de outros CaPs (por exemplo, MCMP, DCPA, DCPD, OCP) com CaO, Ca(OH)₂ ou CaCO₃, acima de 1200 °C, numa atmosfera de com partes iguais de água e nitrogénio [5]. HA pura não se encontra nos sistemas biológicos, mas no entanto, devido à sua similaridade

química com o mineral ósseo e dental, a HA é muito usada como revestimento de próteses ortopédicas e dentárias. Mais ainda, os cimentos de fosfato de cálcio com HA também têm sido desenvolvidos [5].

- Fosfato tetracálcio (TTCP) é o CaP mais básico e também o CaP mais solúvel abaixo de pH de 5 [16]. Este pode ser obtido através de reacções de estado sólido a altas temperaturas (tipicamente a 1300 °C), usualmente quantidades equimolares de fosfato dicálcio (DCP) e CaCO_3 [5, 16]. TTCP não é muito estável em soluções aquosas, hidrolisando-se a HA e a Ca(OH)_2 [5]. O TTCP é biocompatível, mas apesar de ter alta solubilidade, é pouco biodegradável [16]. Na medicina, o TTCP é muito usado na preparação de vários cimentos de CaP de *self-setting* [5].

A propriedade mais importante dos CaPs é provavelmente a sua solubilidade em água devido ao facto do comportamento *in vivo* dos CaPs poder ser previsto pela sua solubilidade. Assim, de acordo com a solubilidade, os CaPs pode ser classificados por ordem decrescente de taxa de degradação *in situ* (a pH 7.0) [16]:



Sendo os CaPs bastante abundantes na crosta terrestre e importantes no desenvolvimento dos cimentos, o primeiro CPCs surgiu em meados dos anos 80 (1980's) pelos investigadores Brown e Chow, ao descobrirem um cimento obtido de uma mistura de pós de CaP e água que endurece com o tempo à temperatura ambiente. Esta descoberta abriu novas perspectivas para o uso dos CaPs no tratamento de defeitos ósseos [16].

Desde então, muitos cimentos com diferentes composições têm sido propostas, mas dependendo do valor de pH da pasta, todos os CPCs podem ser classificados, de acordo com o seu produto final da reacção de *setting*, em cimentos de apatite (HA-CPCs) e cimentos de brushite (DCPD-CPCs) [16, 18], em que este último tem vindo a ganhar algum interesse nos últimos tempos, devido a que os DCPD-CPCs são reabsorvidos muito mais rapidamente do que os HA-CPCs, isto porque a brushite é um composto metaestável, quando usado em condições fisiológicas [18]. Os cimentos de apatite são formados acima de pH 4,2, enquanto os cimentos de brushite são preferencialmente formados a pH < 4,2 [3, 19], embora este possa subir um pouco mais para pH 6,5, devido a razões cinéticas [19].

Os CPCs são reabsorvíveis, osteocondutivos, não tóxicos e tem composição química muito similar aos do osso [3]. O facto de os CPCs terem um rápido *setting time*,

excelente capacidade para ser moldado e injectado [3], torna os CPCs são mais versáteis em características de manuseamento que os grânulos ou blocos de CaP pré-fabricados.

Como nos cerâmicos tridimensionais de fosfato de cálcio, o mesmo modo de decomposição é proposto para os CPCs, embora o tipo de células envolvido no colapso varia de acordo com o tipo de cimento. Os CPCs que são reabsorvidos rapidamente (DCPD-CPCs) são decompostos por macrófagos e células gigantes, já os CPCs que são reabsorvidos lentamente (HA-CPCs), de meses a anos, são através da acção osteoclástica [18].

Existe um grande número de CPCs disponíveis no mercado, sendo que alguns deles estão resumidos na tabela 3.

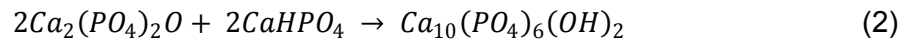
Tabela 3 Lista de algumas formulações de cimentos de fosfato de cálcio disponíveis no mercado [15-16].

Empresa	Produto	Composição	Produto final	Reabsorvido
ETEX	α -BSM®	Pó: ACP (50%), DCPD (50%) Solução: H ₂ O	Apatite (HA)	Sim
Stryker	BoneSource™	Pó: TTCP (73%), DCP (27%) Solução: H ₂ O, mistura de Na ₂ HPO ₄ e Na ₂ H ₂ PO ₄	Apatite (HA)	Sim
	HydroSet™	Pó: DCPD, TTCP, Citrato de Tri-sódio Solução: H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ , polivinilpirolidone	Apatite (HA)	d.i.
Biomet	Calcibon®	Pó: α -TCP (61%), DCP (26%), CaCO ₃ (10%), HA (3%)	Apatite (CAP)	d.i.
Synthes	Norian SRS®	Pó: α -TCP (85%), CaCO ₃ (12%), MCMP (3%) Solução: H ₂ O e Na ₂ HPO ₄	Apatite (CAP)	Sim
	CharonOS Inject®	Pó: β -TCP (73%), MCMP (21%), MgHPO ₄ ·3H ₂ O (5%), MgSO ₄ (< 1%), Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇ (< 1%) Solução: H ₂ O, Hialuronato de sódio	Brushite	Sim
Vitalos	PD VitalOs	Componente 1: β -TCP (1.34 g), Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇ (0.025 g), H ₂ O, sais (Solução PBS 0.05M pH 7.4) Componente 2: MCMP (0.78 g), CaSO ₄ ·2H ₂ O (0.39 g), H ₂ O, H ₃ PO ₄ (0.05M)	Brushite	d.i.

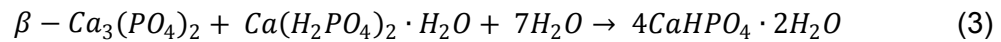
d.i. = dado indisponível
CAP = carbonato-apatite

As reacções químicas que ocorrem durante o *setting* dos CPCs dependem muito da sua composição química. No entanto, as reacções *setting* podem ser classificadas em dois tipos. No primeiro tipo tem-se reacções de ácido-base, em a uma quantidade CaP ácido reage com uma outra quantidade de CaP básico para produzir um composto de CaP neutro. Um exemplo típico, é o primeiro cimento de Brown e Chow (equação 2),

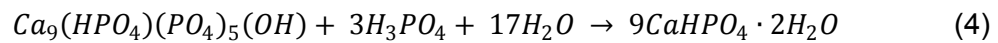
onde o TTCP (básico) reage com DCPA (levemente ácido) numa suspensão aquosa para formar um precipitado pouco cristalizado de HA (levemente básico) [3, 16]:



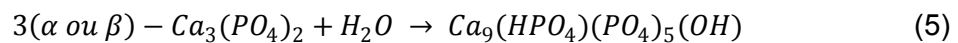
Outro exemplo de interacções de ácido-base, é o cimento de Lemaitre (equação 3), onde β -TCP (quase neutro) reage com o MCMP (ácido) para formar o DCPD (levemente ácido) [3, 16]:



Na equação 3, o MCMP pode ser substituído por ácido fosfórico e MCPA, enquanto o β -TCP pode ser trocado pelo α -TCP ou pelo CDHA [3]. Um exemplo por ser visto na equação 4:



O segundo tipo de reacções *setting* pode ser definido como a hidrólise de CaP metaestáveis em meio aquoso, quando os CaPs inicial e final tiverem o mesmo rácio molar de Ca/P [3, 16]. Exemplos são os cimentos formados de α -TCP, β -TCP, ACP, TTCP, com uma solução aquosa, onde estes são novamente re-cristalizados a CDHA quando em contacto com a água [3]. Um exemplo pode ser visto na equação 5 [3]:



Ao contrário dos cimentos de PMMA, os CPCs não endurecem através de reacções de polimerização e assim uma pequena quantidade de calor é libertada durante a reacção *setting* [16]. O processo de hidratação dos CPCs é uma reacção exotérmica lenta (o que é bastante vantajoso para aplicações médicas) e durante o qual o cimento não encolhe [3], isto é, o volume do cimento permanece quase constante durante a reacção *setting* [16].

2.2.1.1 TIPOS PRINCIPAIS DE CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

2.2.1.1.1 CIMENTOS DE APATITE

Tipicamente, as formulações dos cimentos de apatite têm um precipitado pouco cristalino de HA e/ou CDHA como produto final da reacção *setting* [3, 16] (ver equações 2 e 5). Algumas formulações comerciais de cimentos de apatite estão apresentadas na tabela 3.

Devido à presença inicial de carbonatos, alguns cimentos de apatite como por exemplo o Norian SRS®, formam carbonato-apatite como produto final (tabela 3). Tanto o CDHA como a carbonato-apatite são formados em ambientes aquosos, têm baixa cristalinidade e mostram-se muito semelhantes à apatite biológica dos ossos e dos dentes. Pensa-se que estas propriedades sejam as responsáveis pelas excelentes características de absorção *in vivo* [3].

Todos os cimentos de apatite têm um *setting time* intrínseco longo, o que pode levar a algumas complicações. Para contornar esta situação, a tendência é de reduzir quantidade de líquido ao mínimo. Portanto, todos os cimentos de apatite são viscosos e fáceis de se moldar, mas tendem a ser difíceis de se injectar [3, 16]. O *setting time* pode ainda ser reduzido usando aditivos na porção líquida, tais como, ácido fosfórico, MCMP, iões fosfato (por exemplo, Na_2HPO_4 ou $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) e partículas de HA [3, 16]. Estes aditivos promovem a dissolução dos sólidos ao baixar o pH da solução. Nestes casos, a gama de *setting time* que se pode obter é de 10 – 15 min [3].

As propriedades mecânicas dos cimentos de apatite podem variar muito consoante a sua composição. A razão entre a quantidade de pó do cimento e a quantidade de líquido de mistura determina essas propriedades. Quando este rácio (pó/líquido) é alto, a porosidade do CPC é baixa. Sendo que as propriedades mecânicas diminuem exponencialmente com o aumento da porosidade [16]. As empresas que produzem os CPCs nunca documentam as propriedades mecânicas, e assim torna difícil comparar os diferentes CPCs de apatite.

A biocompatibilidade dos cimentos de apatite é normalmente excelente. Por vezes algumas reacções inflamatórias podem aparentemente ocorrer quando o CPC não endurece (*set*) [16].

A biodegradabilidade destes cimentos é superior quando comparados com a HA, mas ainda assim um pouco lenta. A porosidade é então, de facto, um factor importante para na biodegradabilidade dos CPCs [16].

2.2.1.1.2 CIMENTOS DE BRUSHITE

Os cimentos de brushite foram introduzidos em 1987 por Mirtchi e Lemaitre, onde o DCPD é o principal produto final da reacção *setting* (equação 3). Outras formulações têm sido propostas, tal como, β -TCP conjugado com H_3PO_4 e TTCP conjugado com MCMP mais o CaO. É importante notar que a formulação de β -TCP + H_3PO_4 tem algumas vantagens em relação à formulação β -TCP + MCMP, tais como: (i) preparação rápida e fácil, (ii) melhor controlo da composição química e da reactividade, e (iii) melhora as propriedades físico-químicas – maior *setting time* e maior força de tensão devido à maior homogeneidade. No entanto, o uso do H_3PO_4 pode levar a uma diminuição da biocompatibilidade da formulação do cimento, devido aos valores baixos de pH durante o *setting* [3, 16].

Todos os cimentos de brushite são obtidos através de reacções de ácido base, isto é, são ácidos durante o *setting*, uma vez que o DCPD apenas consegue precipitar em soluções com $pH < 6$. Por exemplo, durante o *setting* do cimento de β -TCP + MCMP, o pH do cimento varia de ácido, $pH \sim 2.5$, para quase neutro, $pH \sim 6$ [3].

O *setting time* dos cimentos de brushite depende muito da solubilidade da fase básica: quanto maior for a solubilidade da fase básica, mais rápido será o *setting time*. Portanto, o *setting time* dos CPCs produzidos como MCMP + os básicos fosfatos de cálcio aumenta na seguinte ordem: HA > β -TCP > α -TCP. Por exemplo, a mistura de HA + MCMP tem *setting time* de alguns minutos. A mistura de β -TCP + MCMP tem *setting time* de 30 a 60 segundos. A mistura de α -TCP + MCMP tem *setting time* de poucos segundos [3, 16]. Apesar da grande reactividade inicial, a reacção de endurecimento dos cimentos de brushite tem duração um dia [3].

Aditivos que inibem o crescimento dos cristais do DCPD têm sido utilizados com muito sucesso para aumentar o *setting time* das misturas de β -TCP + MCMP. Ao contrário dos cimentos de apatite, os cimentos de brushite podem ser inicialmente bastante líquidos e mesmo assim endurecer dentro de um pequeno período de tempo [3].

Os cimentos de brushite são um pouco fracos quando comparados com os cimentos de apatite. De acordo com dados publicados na literatura os cimentos de brushite apresentam resistência à compressão compreendidas entre 1 – 24 MPa [16, 19]. *In vivo*, a diferença entre cimentos de apatite e brushite aumenta: as propriedades mecânicas dos cimentos de apatite aumentam, enquanto as do cimento de brushite diminuem. Este fenómeno é devido à alta solubilidade do DCPD quando comparado

com a HA e/ou CDHA. Após algumas semanas da implantação, as propriedades mecânicas dos cimentos de brushite aumentam devido ao crescimento ósseo [16].

Apesar de tudo, os cimentos de brushite têm ganho interesse devido ao facto de estes serem muito mais reabsorvidos *in vivo* do que os cimentos de apatite. Embora os cimentos de apatite mostrem ter uma resistência mecânica maior, estes têm uma taxa de reabsorção *in vivo* lenta, que pode interferir com o processo de regeneração óssea. Mais ainda, a brushite é metaestável em condições fisiológicas e os cimentos à base de brushite possuem uma reacção de *setting* rápido [3].

Porém, o pequeno *setting time*, a baixa resistência mecânica, e a limitada injectabilidade impedem os cimentos de brushite de terem uma vasta aplicação clínica. Assim, o uso de citrato de sódio ou do ácido cítrico como retardantes do *setting* é uma das opções para conseguir como que os cimentos de brushite possam ser mais moldáveis e menos viscosos para facilitarem a sua injectabilidade [3]. Efeito semelhante pode ser obtido através da adição de sulfato de condroitina e ácido glicólico [3].

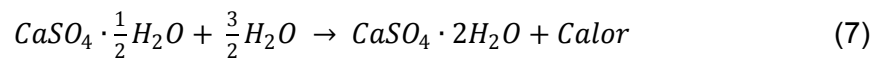
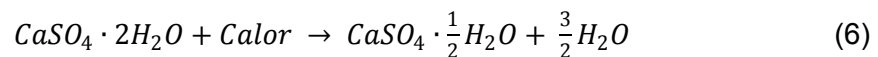
Os cimentos de brushite são bastante biocompatíveis e bioreabsorvíveis [18]. No entanto, reacções inflamatórias têm sido descritas nas primeiras semanas, quando uma grande quantidade de cimento de brushite é usado [3, 16]. Esta inflamação pode ser devida à transformação parcial do DCPD a HA e/ou CDHA com libertação de ácido fosfórico [3, 16]. Esta transformação de DCPD a HA e/ou CDHA pode ser retardada através da adição de iões magnésio ao cimento [3].

Portanto, os cimentos de brushite não só podem ser reabsorvidos pela actividade osteoclástica, como nos cimentos de apatite, mas também por dissoluções simples. Assim, resulta que os cimentos de brushite se degradem mais rapidamente que os cimentos de apatite. A taxa de degradação linear dos cimentos de brushite é de 0.25 mm/semana como já foi descrita anteriormente na literatura [3, 16]. Esta taxa de degradação rápida pode levar à formação de osso imaturo. A adição de grânulos de β -TCP ao cimento pode resolver este problema porque o β -TCP irá actuar como âncoras e encorajar a formação de osso maduro [3].

2.2.2 CIMENTOS DE SULFATO DE CÁLCIO

O sulfato de cálcio tem uma longa história clínica como substituto ósseo em vários locais do esqueleto. A sua utilização foi inicialmente proposto por Dreesmann em 1892 e aperfeiçoado por Peltier em 1961 [8].

O sulfato de cálcio existe naturalmente na forma dihidratada ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CSD). A desidratação do CSD é feita através do calor (eq. 6), produzindo a forma hemihidratada ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$; CSH), que sofre um processo de endurecimento quando misturado com água [1, 8].



A hidratação do CSH a dihidratado (eq.7) começa com a dissolução do hemidratado, que forma uma solução supersaturada com Ca^{2+} e SO_4^{2-} . O núcleo dihidratado inicia um processo de precipitação na solução, onde ocorre crescimento de cristais e conseqüentemente a recristalização contínua do material. O produto final consiste numa rede compacta de cristais de CSD [1].

O endurecimento do cimento obtido pela mistura do pó CSH com o líquido são influenciados por muitos factores, tais como, o tamanho das partículas, aditivos e o razão líquido/pó [1]:

- Pequenas partículas fornecem um rápido *setting* devido a uma maior área de superfície específica em contacto com a água, levando a uma rápida dissolução do pó;
- Os aditivos podem ser usados tanto como aceleradores ou retardadores da reacção de *setting*. Os aceleradores actuam através do aumento da solubilidade ou na formação do núcleo, enquanto os retardadores reduzem a velocidade da dissolução ou do crescimento dos cristais dihidratados;
- O rácio líquido/sólido é importante tanto para o *setting* como para a resistência mecânica do produto final. O excesso de líquido não influencia o processo de hidratação, mas leva a um menor crescimento dos cristais. Estes cristais têm de crescer o suficiente para se integrarem, o que aumenta o *setting time*. Maior quantidade de água leva também ao enfraquecimento do cimento, isto é, obtém-se um cimento mais fraco devido ao excesso de água que cria poros na estrutura dos cristais.

Dependendo do volume e da localização, os cimentos de sulfato de cálcio são reabsorvidos *in vivo* principalmente por dissolução, o que geralmente ocorre ao longo de um período de 2 meses [8].

Tabela 4 Lista de algumas formulações de cimentos de sulfato de cálcio disponíveis no mercado [8].

Empresa	Produto	Composição	Produto final	Reabsorvido
Biomet	BonePlast™	Pó: $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ Líquido: d.i.	CSD	Sim
Wright Medical Technology	MIIG® X3	Pó: $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ Líquido: água	CSD	Sim

d.i. = dado indisponível

Um cimento comercial muito utilizado é o MIIG® X3 (tabela 5). Este cimento tem por base o sulfato de cálcio hemihidratado, e quando misturado com água forma uma pasta dura após aproximadamente de 5 min [8].

O sulfato de cálcio é fácil de misturar e origina uma pasta injectável que, quando aplicada, endurece. As grandes vantagens do uso do sulfato de cálcio são a sua grande biocompatibilidade e a taxa de dissolução que o tornam um bom candidato para libertação de fármacos. Já as desvantagens são o facto de ter uma rápida reabsorção e uma baixa resistência mecânica, que o tornam o seu uso bastante restrito [1].

2.2.3 PROPRIEDADES DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO E DE SULFATO DE CÁLCIO

O desenvolvimento de cimentos ósseos que endurecem *in situ* implicam a sua caracterização química e física, para assim saber as suas propriedades. Neste sentido, do ponto de vista clínico, as propriedades desejadas e mais relevantes dos cimentos à base de fosfato de cálcio e à base de sulfato de cálcio são pequenos tempos de *setting time*, fácil injectabilidade, propriedades mecânicas que sejam

comparáveis às do osso trabecular e uma taxa de reabsorção que não pode ser nem muito rápida nem muito lenta.

2.2.3.1 SETTING TIME

O *setting* dos cimentos ósseos é um processo contínuo que envolve três partes, inicialmente ocorre a dissolução dos reagentes, seguida da nucleação de novos cristais e por último o crescimento dos cristais. Após destes processos, existe um encruzilhamento de cristais novos e o cimento perde as suas propriedades viscoelásticas e transforma-se num corpo sólido [20]. Geralmente, o cimento deve endurecer lentamente para o cirurgião tenha tempo suficiente para realizar a colocação do mesmo no local pretendido facilmente (cimento moldado e colocado manualmente ou simplesmente injectado) e também deve endurecer rapidamente para prevenir atrasos na cirurgia, permitindo ao cirurgião fechar o defeito imediatamente após a colocação do cimento (figura 4). Idealmente, as propriedades mecânicas devem ser obtidas dentro de minutos depois do *setting* inicial [3].

O processo de endurecimento dos CPCs bem como dos CSCs podem ser determinados através de dois métodos tradicionais padronizados: método da agulha Vicat (ASTM C191-92) e método das agulhas Gilmore (ASTM C266-89) [1, 3]. Basicamente, ambos os métodos consistem na inspeção visual das superfícies dos cimentos, quando a amostra a testar é pressionada com agulhas, e estas não deixam qualquer marca na superfície dos cimentos. Enquanto o método de Vicat apenas usa uma agulha para determinar o *setting time* final (FST), já o método de Gilmore usa duas agulhas diferentes para medir o *setting time* inicial (IST) e FST dos cimentos (figura 3) [3].

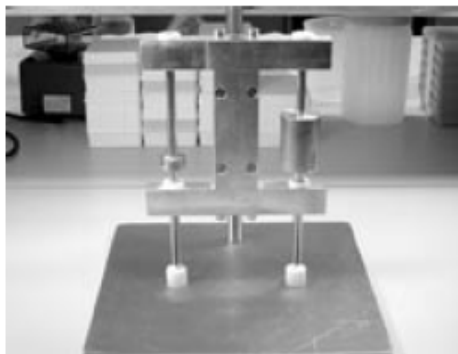


Figura 3 Equipamento tipo das agulhas de Gilmore para medir o *setting time* [1].

O IST é medido com uma agulha leve e grossa – 113 ± 0.5 g, diâmetro do bico de 2.12 ± 0.05 mm e fornecendo uma pressão estática de 0.3 MPa, enquanto o FST é medido com uma agulha pesada e fina – 453.6 ± 0.5 g, diâmetro do bico de 1.06 ± 0.05 mm [1, 12]. O significado prático do IST é que este define o tempo a partir do qual o material não deve ser manipulado para evitar graves danos na estrutura do cimento, ou seja, para evitar que estruturas sólidas, que se formam durante o *setting*, sejam destruídas [1, 3, 12, 14]. Já o significado prático do FST define o tempo quando o material se encontra duro, mas a máxima força para alguns materiais pode ainda não ter sido alcançada [1, 3, 12, 14]. Ambos os *setting times* são expressos em minutos, medidos deste o tempo que o líquido atinge o pó, no início da mistura.

Mais ainda, o processo *setting* pode ser monitorizado em tempo real através de métodos não destrutivos (e mais recentes), como por exemplo, técnicas de ultra-som pulso-eco, calorimetria isoterma, espectroscopia de impedância AC. Os métodos de espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier e difração de raios x também podem ser aplicados, mas embora estas duas técnicas se mostrem com grande potencial, estas apresentam algumas limitações, como seja o tempo requerido para cada medição [3].

Tendo em conta a aplicação clínica, o cimento deve ser colocados antes do IST e a gama desejada de *setting times* (em minutos) deveria ser [3, 14]:

$$3 \leq IST < 8 \quad (8)$$

$$FST \leq 15 \quad (9)$$

$$IST - CT \gg 1 \quad (10)$$

O requisito (10) significa que o tempo de coesão (CT – que é o tempo a partir do qual não ocorrerá mais a desintegração quando em contacto com algum fluido) deve ser pelo menos 1 minuto antes do IST, isto é, em termos clínicos o cirurgião tem pelo menos 1 minuto para aplicar e moldar o material [3, 14]. Como a mistura no copo é aproximadamente 1 minuto, o tempo de coesão mais baixo que pode ser permitido é aproximadamente 2 minutos. Assim, o cirurgião tem pelo menos 1 minuto para recolher a pasta do copo e colocá-la com o auxílio da espátula no local da ferida ou colocá-la numa seringa para ser transferida para o local da ferida depois do CT e antes do IST [3, 14], como se pode ver melhor pelo diagrama da figura 4.

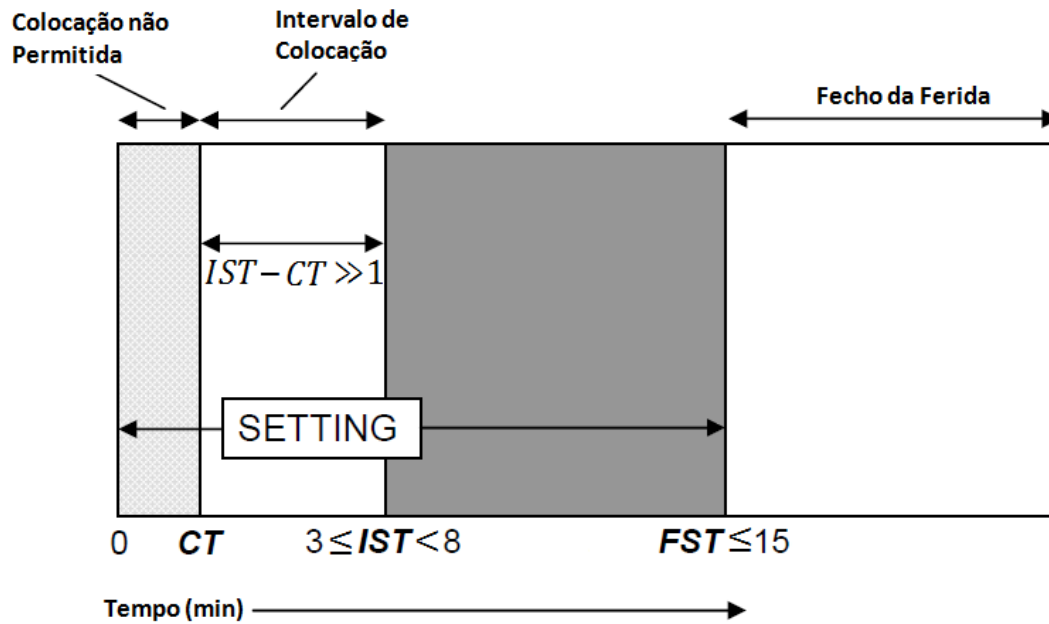


Figura 4 Diagrama dos tempos do *setting* tendo em conta aplicação clínica [3].

No entanto, ainda não há um consenso de qual o valor ideal para o IST e para o FST. De acordo com Khairoun *et al.* sugere que para aplicações dentárias, o IST deve estar próximo dos 3 minutos, enquanto para aplicações ortopédicas deve estar perto de 8 minutos [14]. Já para o FST diz que não deve ser mais do que 15 minutos seja para qualquer caso que for. Por outro lado, Driessens *et al.* [12] diz que as formulações são só adequadas para cirurgia ou dentária quando o IST > 5 minutos. Já Huan *et al.* diz que o cimento deve ser aplicado antes do IST e deve ser possível de ser injectado [21].

O *setting time* é um parâmetro muito importante e como tal deve ser bem controlado. Vários factores que podem alterar o *setting time* estão descritos na literatura, tais como [15]:

- Alteração do tamanho do pó (pequeno tamanho implica um *setting time* curto);
- Alteração da quantidade de líquido na mistura (pequenas quantidades tem-se *setting times* curtos);
- Através da adição rápida de iões de cálcio e/ou iões de fosfato, também chamados de aceleradores da reacção (por um lado pré-dissolvidos na parte líquida da mistura ou com um sal solúvel livre, em que uma grande concentração de sal leva a uma redução do *setting time*);

- Através da adição de inibidores de crescimento dos cristais (quanto maior a quantidade de inibidor, maior será o *setting time*).

2.2.3.2 INJECTABILIDADE

A injectabilidade dos cimentos é bastante importante em situações clínicas. No caso de defeitos/ferimentos com acessibilidade limitada ou em cavidades estreitas existe necessidade de colocação da pasta de forma precisa conforme a área afectada (como por exemplo na reparação do osso peridontal). Outras situações em que a injectabilidade é importante são quando se usam técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, com por exemplo a quifoplastia/vertebroplastia (figura 5) [7, 22-23].



Figura 5 Injecção do cimento ósseo numa quifoplastia/vertebroplastia.

Fonte:

<http://www.agingspinecenter.com/PDF/Kyphoplasty.pdf>
(10/05/2010)

Não existe nenhum procedimento internacional padrão para avaliar a propriedade da injectabilidade, mas existe na literatura métodos de teste que foram implementados noutros cimentos [13, 21, 23-24].

Portanto, a injectabilidade é descrita como a percentagem de peso da pasta que pode ser expelida de uma seringa padrão, através de um pequeno orifício de uma longa agulha (habitualmente de diâmetro de 2 mm e 10 cm de comprimento), pressionando o êmbolo manualmente ou aplicando uma força externa equivalente (aproximadamente 100 N) (figura 6) [3, 13, 21].

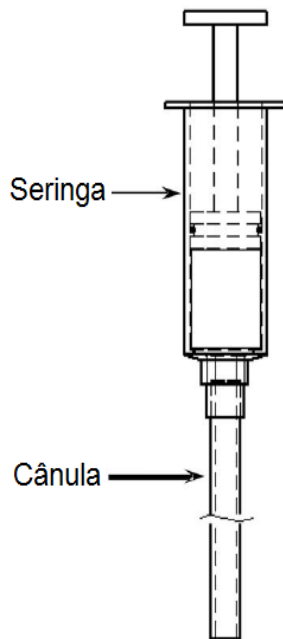


Figura 6 Seringa tipo usada para testar a injectabilidade dos CPCs [25].

Assim, o peso da pasta expelida da seringa é usado para o cálculo da injectabilidade, usando a equação [21]:

$$\text{Inj}\% = \frac{\text{Peso da pasta explida da seringa}}{\text{Peso total de pasta antes de ser injectada}} \times 100 \quad (11)$$

Bohner e Baround [25]descreveram que as pastas dos cimentos mostram uma separação da fase líquida (também chamada de efeito de *filter-pressing* [15]) provocado pela pressão aplicada à pasta após aplicação uma certa quantidade de pressão de injeção ou depois de certo tempo de injeção: o líquido sai da seringa sem as partículas [17, 25]. Este fenómeno é caracterizado pelo grande rácio líquido/pó da pasta expelida quando comparada com a pasta inicialmente [17].

Devido ao processo de endurecimento, as propriedades reológicas dos cimentos são transitórias e em constante alteração [25]. O dilema passa um pouco quando as pastas que possuem *setting times* reduzidos de poderem começar o endurecimento na seringa, e portanto aumentar a dureza da pasta e reduzindo a injectabilidade. Já longos tempos de *setting* podem causar problemas relacionados com a inability do cimento para suportar forças/tensões dentro deste período de tempo [23]. De facto, algumas repostas inflamatórias que ocorreram *in vivo* foram obtidas quando ocorreram fracassos no *setting* e os cimentos desintegraram [23].

Habitualmente, a injectabilidade dos cimentos varia inversamente com a sua viscosidade, o rácio entre pó e líquido, bem como o tempo decorrido depois da mistura do pó com o líquido [3].

Existem diferentes maneiras de melhorar a injectabilidade e a coesão dos cimentos. Entre eles temos a utilização de outros dispositivos de injeção, por exemplo, cânula pequenas e grossas favorecem a injectabilidade, aumento do rácio de líquido/sólido, utilização de partículas com um tamanho reduzido e com forma esférica, utilização de aditivos na mistura líquida (tal como, adição de iões citrato que actuam como retardantes do *setting*) e adição de polímeros para aumentar a viscosidade e prevenir o *filter-pressing* [23-24].

2.2.3.3 COMPORTAMENTO MECÂNICO

O comportamento mecânico do cimento é um parâmetro também importante, uma vez que na maioria das aplicações clínicas dos cimentos, estes são aplicados em contacto directo com o osso trabecular humano, sendo assim de esperar que a resistência mecânica requerida para os cimentos deva ser pelo menos tão forte como a do osso trabecular [3, 14]. A resistência à compressão do osso trabecular varia com a sua densidade, mas alguns autores descrevem valores entre 5 – 10MPa [2-3] e outros autores reportam valores de aproximadamente 30 MPa [14].

Não existe uma norma padrão para testar o comportamento mecânico de cimentos à base de fosfato de cálcio, sendo muitas vezes utilizado o método aplicado aos cimentos ósseos acrílicos [1].

Infelizmente, os CPCs são fortes o suficiente apenas à compressão. Na prática, depois do *setting*, a força dos cimento é baixa quando comparada com os osso, dentes ou até mesmo os biocerâmicos de fosfato de cálcio [3]. Assim, o produto obtido após o endurecimento de todos os CPCs são frágeis, pois têm uma baixa resistência de impacto, enquanto a resistência à compressão varia entre 10 – 100 MPa [3]. A propriedade mecânica fraca reduz a aplicabilidade clínica dos CPCs, bem como dos CSCs, que apresenta uma resistência à compressão ainda mais reduzida que os CPCs.

Existem alguns factores que podem induzir alterações na resistência mecânica medida, factores associados à preparação da amostra e também no processo de medição. Variando a cristalinidade [15] ou o tamanho das partículas dos materiais

usados na fase sólida pode-se alterar a resistência à compressão. O rácio líquido/sólido, a pressão aplicada durante a preparação das amostras, as condições de armazenamento da amostra, podem produzir um grande efeito nos valores medidos da força [26]. Por exemplo, se for diminuída a quantidade de líquido na mistura, leva a uma diminuição da porosidade do cimento [15]. Como é sabido as propriedades mecânicas dos cimentos cerâmicos diminuem exponencialmente com o aumento da porosidade [7, 15], uma vez que a presença de poros na estrutura do cimento é responsável pela nucleação e propagação da fractura [27].

Mas por outro lado, a falta de poros diminui a absorvidade do cimento, devido ao facto de o crescimento de novo osso ser inibido pela ausência de poros, o tecido ósseo apenas pode crescer à medida que o cimento se degrada. Assim, a porosidade apresenta-se como um factor importante na degradabilidade do cimento [3].

A grande desvantagem dos cimentos cerâmicos é de estes terem uma resistência mecânica relativamente baixa, limitando o seu uso apenas para aplicações ortopédicas onde não haja grandes tensões/forças. Mas na literatura estão descritos trabalhos onde foram desenvolvidos CPCs que resistem a elevadas forças mecânicas. Dois agentes reforçantes, o biopolímero de quitosano e redes absorventes foram usados juntamente para fortalecer o CPC [27].

Para aumentar as propriedades mecânicas dos CPCs tem-se procedido à incorporação de vários tipos de fibras biocompatíveis/biodegradáveis [15] e redes tem sido reportada na literatura [7] Xu *et al.* descreveu que tanto a incorporação de redes de Vicryl, bem como de quitosano no CPC aumentam a sua resistência mecânica [7].

Os CPCs dopados com partículas de SiO_2 e TiO_2 mostram um aumento significativo da resistência à compressão ($\sim 80 - 100$ MPa). Mais ainda, os CPCs podem ser reforçados com sucesso através da adição de silicatos de cálcio, co-polímeros de polipeptidos e colagénio [3].

2.2.3.4 BIOCAMPATIBILIDADE E BIODEGRADABILIDADE

A biocompatibilidade, a osteocondutividade e a biodegradabilidade são características muito importantes de todos os cimentos ósseos, que os tornam candidatos atractivos para substitutos ósseos.

A biocompatibilidade expressa a habilidade do material de não causar dano, reacções tóxicas ou imunológicas aos tecidos vivos. A biocompatibilidade e a habilidade do material criar ligação ao osso podem ser avaliadas através de teste *in vitro* e *in vivo*. Diferentes estudos foram publicados sobre a bioreabsorção do cimento e do progresso da formação óssea ao redor do cimento de fosfato de cálcio, em que apresentaram propriedades osteoconductoras¹ e osteoindutoras² [3].

As propriedades de reabsorção dos biocerâmicos estão geralmente relacionadas com as solubilidades dos seus constituintes. Assim, os fosfatos de cálcio podem ser reabsorvidos por dois mecanismos possíveis: reabsorção activa, mediada pela actividade celular dos macrófagos, osteoclastos e a reabsorção passiva que ocorre através da dissolução química ou hidrólise química (cimentos de brushite apenas) nos fluidos do organismo [3]. Sendo, os macrófagos e as células gigantes que decompõem os CPCs que são rapidamente reabsorvidos (nomeadamente os cimentos de brushite). Já os cimentos de apatite, que são reabsorvidos lentamente (de meses a anos), são decompostos por células osteoclástica. Assim, os cimentos de brushite são muito mais bioreabsorvíveis do que os cimentos de apatite, pois os cimentos de brushite decompõem-se através dos dois processo, tanto o passivo como o activo [3]. Já os sulfatos de cálcio são reabsorvidos muito rapidamente devido ao facto da sua reabsorção ocorrer através de dissolução química ou hidrólise química.

Para concluir esta parte, os cimentos ósseos fornecem as propriedades biológicas desejadas e então são substituídos por novo osso. A taxa de crescimento do novo osso formado depende de muitos factores, sendo que a composição do tipo de cimento (apatite, brushite ou sulfato de cálcio) é dos factores mais importante.

¹ Materiais Osteoconductoros podem apenas guiar a formação óssea na sua superfície quando implantados em ambiente ósseo.

² Materiais Osteoinductoros têm a habilidade de induzir a formação óssea quando implantados em tecidos não ósseos.

2.2.4 FACTORES QUE INFLUENCIAM AS PROPRIEDADES DOS CIMENTOS CERÂMICOS

As propriedades dos cimentos ósseos são influenciadas por uma vasta gama de factores, tais como, o rácio de líquido/sólido, o método de mistura usado para misturar o pó com o líquido dos cimentos, bem como a presença de aditivos.

2.2.4.1 RÁCIO LÍQUIDO/SÓLIDO

As propriedades dos cimentos são influenciadas pelo rácio líquido/sólido, pois quanto maior for a quantidade de líquido na mistura, maior será também o IST e o FST, e menor serão as propriedades mecânicas (pois existe um aumento da porosidade) [15].

Já a injectabilidade aumenta bastante quando se aumenta o rácio líquido/sólido, portanto com a diminuição da viscosidade [13].

2.2.4.2 PROCESSO DE MISTURA

O processo de mistura é um factor que afecta as propriedades dos cimentos, pois, antes de o cirurgião colocar o cimento ósseo, este precisa de misturar a parte sólida com a líquida correctamente, no tempo prescrito e num ambiente esterilizado. Portanto, o processo de mistura é muito importante e tem de ser tomada em consideração. Idealmente, este processo deveria ser feito sem que bolhas de ar penetrem no cimento.

Os métodos de mistura dos cimentos podem ser categorizados como mistura manual, centrifugação, mistura a vácuo, e mistura combinada com parte mecânica [6].

Na mistura manual ou feita à mão o componente em pó é adicionado ao líquido (em que este pode ser ou não arrefecido a temperaturas habituais entre -15 e 6 °C) numa taça polimérica (usualmente polipropileno). Depois estes componentes são mexidos com uma espátula de polipropileno a 1 a 2 Hz num período de tempo entre 45 a 120 s. Para ser injectado, a pasta deve ser transferida para dentro de uma seringa [6].

No método da mistura através da centrifugação, a massa misturada manualmente é imediatamente colocada dentro de uma seringa em que de seguida é colocada numa centrífuga a uma velocidade entre 2300 e 4000 rpm num período de 30 a 180 s [6].

A mistura mecânica é uma abordagem moderna, pois esta permite a mistura da pasta dentro de 60 – 80 s e permite a colocação da pasta rapidamente dentro da seringa [3].

Mais ainda, o pó e a solução podem ser colocados dentro da seringa e misturados dentro da mesma até produzir um cimento consistente com desejada viscosidade para ser injectado [3].

2.2.4.3 ADITIVOS QUE SÃO ADICIONADOS AOS CIMENTOS

O principal requisito dos aditivos é serem não tóxicos, assim como não inibirem a reacção de *setting* dos cimentos. O uso dos aditivos melhora as propriedades dos cimentos (*setting time*, injectabilidade, resistência à compressão).

Os aditivos descritos na literatura são fluidificantes, agentes responsáveis pela criação de porosidades, agentes facilitadores do manuseamento, agentes de reforço, antibióticos e controladores do *setting time* [3, 8]. Mais ainda, radiopacificadores podem ser também usados para fornecer uma melhor visualização durante a injeção, particularmente na vertebroplastia [15].

A função principal dos fluidificantes é de reduzir o tempo de mistura do cimento. Um exemplo, é o ácido cítrico, que retarda a reacção de precipitação-dissolução dos CPCs, diminuindo a resistência à compressão durante o *setting* inicial do cimento, mas aumenta a sua resistência à compressão na saturação [3, 8]. Mais ainda, o ácido cítrico actua como estimulador do *setting* e melhora as propriedades mecânicas do cimento endurecido [3].

Os agentes porogénicos sólidos são normalmente usados para induzir macroporosidade nos CPCs, sem afectar o seu processo normal de endurecimento. Por exemplo, os cristais de manitol foram testados como agentes porogénicos sólidos, no entanto, estes apresentam duas desvantagens: perda de facilidade de manuseamento do cimento durante a mistura do cimento e grave depreciação das propriedades mecânicas [3].

Os agentes porogénicos que induzem porosidade nos CPCs são também por exemplo, peróxido de oxigénio e sulfato de cálcio [3].

O CSD é um aditivo que também pode melhorar o *setting time*, funcionado como acelerador nos cimentos de sulfato de cálcio e como retardador nos cimentos de brushite. Mirtchi melhorou o *setting time* dos cimentos de brushite através da mistura

de CSD, CSH e pirofosfato de cálcio, de 1 minuto para 10 minutos [12]. Munting e Ohura descreveram que este cimento é rapidamente absorvido e substituído por um novo tecido ósseo [28].

Dois exemplos de agentes facilitadores do manuseamento, que são adicionados ao pó do cimento, são os polissacarídeos e a gelatina. Estes tipos de agentes aumentam significativamente a injectabilidade, bem como os tempos do *setting* devido à redução da porosidade total [3, 8].

Os agentes de reforço podem ser adicionados para aumentar as propriedades mecânicas dos CPCs, tem-se o exemplo do uso das fibras de nylon [8].

Já os antibióticos têm um papel importante na redução de infecções que podem ocorrer no organismo, mas no entanto a sua presença pode afectar as propriedades do cimento [8].

Os controladores do *setting time* (aceleradores ou retardantes) no caso dos CPCs podem ser o hidrogeno pirofosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), o sulfato de magnésio, iões citrato, sulfato e pirofosfato. Por exemplo, o aumento da concentração da solução de citrato de sódio resulta num aumento do *setting* inicial. Existe uma extensa lista de compostos descritos na literatura, que podem adequar com aceleradores, retardantes, aditivos ou reagentes nas formulações dos CPCs [3]. Já nos cimentos de sulfato de cálcio, os controladores do *setting time* são usualmente ácidos orgânicos e seus sais, bem como soluções orgânicas, tal como as proteínas. Mais ainda, a adição de CSD pode funcionar como acelerador da reacção de *setting time* dos cimentos de sulfato de cálcio [1].

2.2.5 VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS CIMENTOS CERÂMICOS

Os cimentos à base de fosfato de cálcio e de sulfato de cálcio representam um grupo fascinante de materiais recentes na reconstrução e reparação de osso. Existe um intenso trabalho de pesquisa para melhorar as suas propriedades, nas quais as características ideais (tabela 5) podem ser alcançadas através da manipulação da composição química, bem como usando vários aditivos, etc.

Tabela 5 Principais vantagens e desvantagens dos cimentos cerâmicos (adaptado de [3]).

Vantagens	Desvantagens
1 – Habilidade de <i>self-setting in vivo</i> .	1 – Fraqueza mecânica: uso limitado devido ao colapso do material, acompanhado pela formação de tecido liso no lugar da formação de osso. Até que cimentos com força de corte adequada estejam disponíveis, a maioria das fracturas complexas que possam ser reparadas com cimento também irá requerer suporte metálico.
2 – Boa injectabilidade que permite a implementação do cimento através de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, que causam menos danos quando comparado com as técnicas cirúrgicas tradicionais.	2 – Pode ter que ser removido do local do defeito se houver excesso de sangue.
3 – Boa osteoconductividade.	3 – Falta de macroporosidade interconectada, impede o crescimento ósseo interno e faz com que o cimento se degrade, camada por camada, da parte externa para a parte interna apenas.
4 – Moldável: a perfeita adequação ao local de implante, o que leva a um bom contacto entre material e osso, mesmo em defeitos com geometrias complexas.	
5 – Excelente biocompatibilidade.	
7 – Baixo custo.	
8 – Fácil de preparação e manipulação.	
9 – <i>Setting</i> à temperatura corporal.	
10 – Forma ligações químicas com o osso hospedeiro.	
11 – Podem ser usados para entrega de antibióticos, agentes anti-inflamatórios, factores de crescimento, etc., permitindo a estimulação de certas respostas biológicas.	

A falta de macroporosidade é uma desvantagem substancial de muitas formulações de cimentos de fosfatos de cálcio. Como resultado, a biodegradação toma lugar camada por camada na superfície do cimento, da parte mais externa para a parte mais interna. Para resolver este problema, partículas solúveis podem ser incorporadas no cimento, tais como, manitol, NaCl e calcita ou fibras reabsorvíveis [3]. Depois do cimento ser colocado, as partículas são dissolvidas, deixando poros na matriz do cimento, no entanto, estes poros nem sempre estão interligados.

Infelizmente, o material de excerto perfeito não existe. Assim, os CPCs bem com os CSCs não são uma excepção. Estes possuem excelentes propriedades biológicas de osteocondução, adequado *setting time*, excelente moldabilidade. Mais ainda, os cimentos cerâmicos mostram-se com um enorme potencial em muitas aplicações, pois este pode ser injectado em ossos com osteoporose como reforço ósseo [3].

2.2.6 APLICAÇÕES CLÍNICAS DOS CIMENTOS DE FOSFATO DE CÁLCIO E SULFATO DE CÁLCIO

Existe uma grande diferença entre o interesse dos engenheiros ou dos investigadores dos cimentos e a necessidade dos clínicos. Enquanto o primeiro grupo está mais interessado no melhoramento da performance através da compreensão da química e da física dos cimentos, o segundo grupo (os clínicos) está mais interessado em saber se os cimentos realmente “funcionam”, sem levar em consideração a composição dos cimentos. Neste sentido, um cimento que “funcione” deve ter algumas características, tais como, baixo preço, mistura, distribuição fácil, fiável, boa visualização durante a injeção (por exemplo na vertebroplastia) e permitir uma rápida recolocação de novo osso [15].

Os cimentos cerâmicos são materiais não tóxicos e reabsorvidos, com excelente biocompatibilidade, osteocondução, o seu endurecimento ocorre através de reacções exotérmicas que ocorrem a baixas temperaturas, mas possuem fracas propriedades mecânicas limitando a sua aplicação clínica. A principal finalidade dos cimentos cerâmicos é preencher pequenos defeitos ósseos ou de aumentar o volume no osso, reduzindo assim a necessidade de enxerto ósseo [3, 16].

A combinação de várias propriedades, tais como, moldabilidade, *self-setting*, biocompatibilidade e um grande potencial para ser repostado por osso, torna estes materiais bastante promissores em aplicações clínicas. Estes materiais podem ser

facilmente usados pelas células que remodelam o osso para reconstrução da parte óssea danificada.

Os cimentos cerâmicos têm sido usados com sucesso no tratamento de fracturas distais do rádio [16]. Em adição, outras tentativas do uso dos cimentos cerâmicos têm tido sucesso, por exemplo, em fracturas do calcânhar, fracturas da anca, reconstrução dos corpos vertebrais osteoporóticos, fracturas da tíbia, entre outros [3].

O uso dos cimentos cerâmicos em cirurgias craniofacial e maxilofacial tem sido outra mais valia, pois a habilidade de moldar o material no local é uma grande vantagem do ponto de vista cosmético. Em adição, excelentes resultados em mais de 100 pacientes foram descritos quando o cimento cerâmico foi usado em defeitos ósseos no crânio [3].

Mais ainda, os cimentos cerâmicos têm sido empregues também em aplicações dentárias. Estes materiais foram experimentados como materiais de preenchimento no tratamento na raiz do dente e no revestimento da polpa dentária [3].

Devido às propriedades formidáveis dos cimentos cerâmicos (injectabilidade, biodegradabilidade, *setting* à temperatura ambiente, grande área de superfície, e pH quase neutro), tornam os cimentos cerâmicos uns candidatos atractivos para serem usados como sistemas de entrega nomeadamente de antibióticos, de drogas contra o cancro ou anti-inflamatórios. Em princípio, as drogas podem ser incorporadas tanto no líquido como no pó dos cimentos. Esta possibilidade oferece uma solução eficiente e atractiva no tratamento de várias doenças ósseas, como por exemplo, tumores, osteoporose, osteomielite, que normalmente requerem longas e dolorosas terapias [3].

Vertebroplastia e quifoplastia são dois processos cirúrgicos recentemente introduzidos na medicina para obter sucesso na cura de fracturas vertebrais induzidas pela osteoporose. Ambos os processos envolvem a injeção de cimentos que *self-setting* dentro do corpo vertebral fracturado – técnica minimamente invasivas e que resulta numa cura mais rápida [3, 29].

3. ESTERILIZAÇÃO

Todos os materiais destinados a aplicações clínicas (humano ou animal) devem ser esterilizados para evitar subsequente infecção que pode levar ao aparecimento de determinadas patologias ou até mesmo à morte do paciente [30].

“Estéril” é definido como a ausência de todo e qualquer organismo vivo. Está incluído especialmente o mundo dos microrganismos, tal como as bactérias, germes, bolor e vírus. A esterilização não deve ser confundida com limpeza. Por exemplo, uma superfície brilhante de um aço inoxidável pode facilmente ser não estéril (pode estar contaminado com inúmeros microrganismos invisíveis), enquanto um parafuso enferrujado será estéril após exposição a um método de esterilização apropriado [30].

3.1 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Devido ao elevado número de materiais existentes para aplicações médicas, houve uma grande necessidade de se desenvolverem diferentes métodos de esterilização. O método de esterilização aplicado não deve por em causa as características finais dos materiais.

A escolha do método de esterilização envolve duas questões importantes: compatibilidade do implante/embalagem e a capacidade para alcançar o desejado nível de segurança de esterilidade (SAL). SAL é a probabilidade de um determinado implante ficar não estéril após a exposição a um determinado processo de esterilização. O mínimo SAL, geralmente aceite para implantes, é de 10^{-6} [30].

Quando se escolhe um método de esterilização, é necessária realizar um estudo de compatibilidade com o próprio dispositivo médico para garantir a integridade do conjunto estéril composto pelo produto e a sua embalagem, antes da entrega para aplicação cirúrgica [30].

Além disso, estudos de validação da esterilização devem também ser realizados para documentar o SAL do processo proposto [30].

3.1.1 AUTOCLAVE OU ESTERILIZAÇÃO POR VAPOR

O primeiro método de esterilização a ser aplicado aos dispositivos médicos foi o autoclave ou a esterilização por vapor. Este método envolve a exposição do implante a vapor saturado a 121 °C. O uso do vapor a esta temperatura requer uma câmara de esterilização pressurizada. O design do implante deve assegurar que todas as superfícies estarão em contacto com o vapor e a embalagem deve permitir que o vapor penetre livremente. O processo de esterilização por vapor típico está compreendido entre os 15 a 30 minutos, depois de todas as superfícies do implante atingirem a temperatura de pelo menos 121 °C [30].

A esterilização por vapor mata microrganismos através da destruição de componentes estruturais e metabólicos essenciais à replicação dos microrganismos. A desnaturação de enzimas essenciais e a disrupção da estrutura de proteínas e lípidos complexos são os principais eventos letais [30].

Actualmente, a principal utilização deste método em dispositivos médicos ocorre em hospitais, nomeadamente nos dispositivos metálicos como é o caso dos instrumentais.

As vantagens deste método são a eficácia, a rapidez, simplicidade do processo e a ausência de resíduos tóxicos. Devido à temperatura relativamente alta do processo e à pressão, a maioria dos implantes não metálicos e materiais embalados não podem ser esterilizado por este método [30]. Esta limitação levou ao desenvolvimento e ao uso de outros métodos de esterilização que são apresentados de seguida.

3.1.2 ESTERILIZAÇÃO POR ÓXIDO DE ETILENO

A esterilização por óxido de etileno (EtO) tem sido bastante explorada como um processo de baixa temperatura e que é compatível com uma vasta gama de implantes e materiais já embalados.

Abaixo do ponto de evaporação de 11 °C, EtO é um líquido limpo e incolor. Este é tóxico pensa-se que actua como carcinogénio no homem, pelo que deve evitar contacto com a pele, olhos e também a inalação de vapores. EtO é usado na forma pura ou misturado com N₂, CO₂, ou outros componentes à base de clorofluorocarboneto (CFC). EtO puro e misturado é inflamável e potencialmente explosivo. Devido ao efeito negativo dos componentes CFC sobre a camada de ozono terrestre, têm sido desenvolvidos compostos alternativos inertes [30].

No uso comercial, os implantes contidos numa embalagem permeável a gás são colocados dentro de vasos de esterilização. Um ciclo típico de esterilização por EtO pode ir de 2 horas a 48 horas de duração, dependendo do tempo requerido para o arejamento do implante. O efeito letal do EtO nos microrganismos é devido essencialmente à alquilação dos grupos amina dos ácidos nucleicos [30].

EtO é usado para esterilizar uma vasta gama de implantes médicos, incluindo suturas cirúrgicas, lentes intra-oculares, ligamentos, dispositivos de reparação de tendões, redes absorventes e não absorventes, dispositivos usado em neurocirurgia, válvulas cardíacas e excertos vasculares [30].

Devido ao facto de serem tóxicos e potencialmente carcinogénicos, o EtO residual e os seus derivados (a cloridrina de etileno e o glicol etileno), levantam algumas duvidas quando utilizados em conjuntos estéreis compostos pelo dispositivo e a embalagem. Mais ainda, o lançamento de EtO no seio do meio ambiente é uma grande preocupação devido ao seu potencial tóxico [30].

As vantagens do EtO são a sua eficácia (mesmo a baixas temperaturas), elevada capacidade de penetração e a compatibilidade com uma vasta gama de materiais. A principal desvantagem centra-se nos resíduos de EtO tanto relacionados com o implante como pelo facto de se proceder à sua libertação no ambiente [30].

3.1.3 ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO

Este método de esterilização utiliza radiação ionizante, que abrange a radiação gama criada pelo isótopo de cobalto-60 (^{60}Co) ou uma máquina geradora de electrões acelerados [30]. Neste método, se uma dose de radiação suficiente for empregue a todas as superfícies do implante, este pode tornar-se estéril.

3.1.3.1 ESTERILIZAÇÃO COM ^{60}Co

A exposição a raios gama de ^{60}Co é de longe o método mais popular e comum. Os raios gama têm uma grande capacidade de penetração e as doses requeridas para alcançar a esterilização são facilmente entregues e medidas [30].

Os materiais a serem esterilizados são movidos ao redor da fonte de forma livre através de um sistema condutor para assegurar de que a dose desejada é

uniformemente distribuída. Dispositivos de medição de radiação, os dosímetros, são colocados juntamente com o material a ser esterilizado para documentar de que a dose mínima requerida para a esterilização foi entregue e para que a dose máxima que o material é capaz de suportar não seja superada. A dose mais comum e validada para esterilizada dispositivos médicos é 25 KGy [8, 30].

No que diz respeito aos CPCs a radiação gama pode produzir uma diminuição da viscosidade do cimento sendo relacionado com a diminuição do seu peso molecular devido a cortes das cadeias moleculares [8]. Além disso, o aumento da dose de radiação pode provocar um aumento do *setting time*. Na prática clínica, a esterilização do pó é realizada através de radiação gama (tipicamente irradiados com 25 KGy). Sendo ainda pouco claro se esta é a dose óptima, no que diz respeito ao impacto nas propriedades dos cimentos (em particular, nas propriedades mecânicas e no seu manuseamento [8].

O funcionamento deste tipo de radiação tem com base o decaimento radioactivo do isótopo ^{60}Co (possui 5.3 anos de tempo de meia vida) origina um decaimento β^- (como se pode ver pela equação 12).



Deste decaimento, resulta na formação do nuclídeo de ^{60}Ni num estado excitado, na expulsão de electrões (e^-) e antineutrinos (ν^-). O nuclídeo de ^{60}Ni por sua vez, emitem instantaneamente duas radiações gama (figura 7) [30].

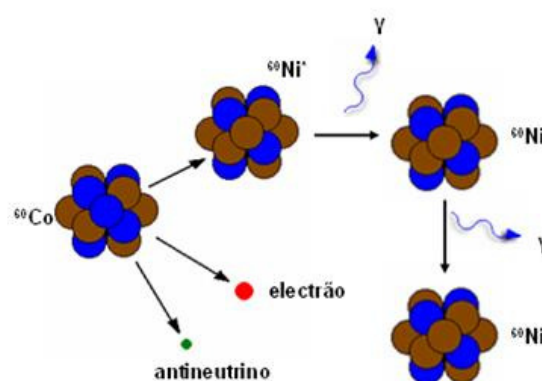


Figura 7 Esquema ilustrativo do decaimento do ^{60}Co .

Fonte:

http://nautilus.fis.uc.pt/cec/teses/lucia/qnes/dados/hipertextos/01/Decaimento%20gama_files/image003.jpg
(22/03/2010)

A radiação gama causa ionização de componentes celulares importantes especialmente de ácidos nucleicos, que resulta na morte dos microrganismos. Os electrões que foram projectados não têm energia suficiente e portanto não participam no processo de esterilização [30].

A esterilização por radiação com ^{60}Co apresenta muitas vantagens e por isso é muito utilizada em dispositivos médicos, como por exemplo em suturas cirúrgicas, implantes ósseos metálicos, próteses do joelho e da anca, seringas e dispositivos usado em neurocirurgia. Uma vasta gama de materiais são compatíveis com este método de esterilização, incluindo o polietileno, poliésteres, poliestireno, polisulfona e policarbonatos. Já o politetrafluoretileno (PTFE) não é compatível com este método de esterilização devido à sua elevada sensibilidade radioactiva [30].

Desta forma, o método de esterilização por radiação gama por ^{60}Co tem sido o método mais usado para esterilizar, devido à sua simplicidade, rapidez, eficácia e monitorização através de métodos de dosimetria directos [30].

As principais desvantagens são o seu elevado custo económico associado às operações de esterilização do estabelecimento e a incompatibilidade de alguns materiais com este método. Outra desvantagem é o contínuo decaimento do isótopo (mesmo quando o irradiador não está a funcionar), o que resulta em processos com tempos longos e na carência periódica no caso da necessidade de um isótopo adicional [30].

3.1.3.2 ESTERILIZAÇÃO POR FEIXE DE ELECTRÕES

Os implantes médicos também podem ser esterilizados através de uma máquina geradora de electrões acelerados. Neste método, isótopos radioactivos não estão envolvidos, devido ao facto de que o feixe de electrões ser gerado por um acelerador. O acelerador está localizado dentro de um compartimento, sendo que, quando o acelerador está desligado, nenhuma radiação está presente [30].

Assim sendo, os objectos a ser esterilizados passam sob um feixe de electrões durante um intervalo de tempo necessário para acumular a dose desejada (habitualmente 25 KGy). Como na radiação gama, a mortalidade deste processo está relacionada com a ionização de componentes celulares, mas em contrapartida os electrões acelerados têm consideravelmente menos capacidade de penetração,

tornando este método impróprio para produtos com embalagens espessas e densas [30].

Este método de esterilização tem a mesma gama potencial de aplicação e as mesmas características de compatibilidade para uma vasta gama de materiais como no processo do ^{60}Co . No entanto, devido à sua distância de penetração, a sua utilização é limitada [30].

3.1.4 OUTROS PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO

3.1.4.1 MÉTODOS TRADICIONAIS

A esterilização por calor seco é raramente ou mesmo nunca usada em implantes médicos devido às temperaturas extremas envolvidas ($> 140\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ocasionalmente, os implantes são esterilizados nos hospitais através da imersão em solução aquosa de glutaraldeído. Este processo é usado apenas em circunstâncias especiais quando o implante é sensível ao calor e também quando o tempo de arejamento após a esterilização por EtO não for aceitável [30].

3.1.4.2 NOVAS TECNOLOGIAS

Novas tecnologias estão a ser desenvolvidas para que possam ser usadas na esterilização de dispositivos médicos. Assim, estão incluídos o dióxido de cloro gasoso, o plasma de baixa temperatura, o ozono gasoso, o peróxido de hidrogénio na fase vapor e uma máquina geradora de raios X. Os primeiros quatro métodos estão a ser examinados como potenciais alternativas para o EtO. A máquina geradora de raios X tem a vantagem de ser uma fonte não isotópica onde o poder de penetração é similar ao dos raios gama [30].

4. MÉTODO DE TAGUCHI

O método de Taguchi é um método muito importante no que diz respeito à optimização de experiências, uma vez que permite reduzir o número de experiências, bem como redução de custo e de tempo, e fornece informações úteis, por exemplo quais os factores que mais influenciam qualquer tipo de experiência [31].

Para um estudo, em que se utilizam quatro factores a três níveis, selecciona-se uma matriz ortogonal, L_9 , de acordo com a tabela 6, capaz de acomodar os factores e respectivos níveis seleccionados. A matriz ortogonal L_9 possui quatro colunas, tendo os quatro factores sido atribuídos, na matriz, de uma forma aleatória. Os níveis correspondentes de cada factor para cada uma das experiências foram os indicados na tabela 6. Neste caso, o trabalho experimental resume-se à necessidade de realizar nove experiências independentes de acordo com as condições definidas na tabela 6. As experiências foram efectuadas de modo aleatório procurando minimizar eventuais alterações das condições experimentais não controláveis. As repetições e os ensaios de confirmação foram, também, efectuados de forma aleatória.

Tabela 6 Desenho de experiências utilizando uma matriz L_9 com base no método de Taguchi [31].

	Factores			
Experiência	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Na fase do desenho, as experiências são tratadas e a resposta do produto/processo para cada experiência é indicada numa tabela. Estas repostas são, então, convertidas num índice designado por sinal-ruído (S/N) [31]. Dependendo do nosso objectivo, o índice de sinal ruído poderá ser do tipo [31]:

- “nominal é melhor” pelo que o referido índice é calculado a partir da equação 13:

$$S/N = -10\text{Log}_{10}(MSD) \quad (13)$$

em que o desvio-médio quadrático, MSD, é expresso pela equação 1:

$$MSD = \left((Y_1 - Y_o)^2 + (Y_2 - Y_o)^2 + \dots + (Y_n - Y_o)^2 \right) / N \quad (14)$$

onde Y, são os valores experimentais determinados, Y_o o valor nominal e N o número total de experiências.

- “quanto menor melhor” pelo que o índice é calculado a partir da equação 13 e o seu desvio-médio quadrático, MSD, é expresso pela equação 15:

$$MSD = (Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots) / N \quad (15)$$

onde Y, são os valores experimentais determinados, e N o número total de experiências.

- “quanto maior melhor” pelo que o índice é calculado novamente a partir da equação 13 e o seu desvio-médio quadrático, MSD, é expresso pela equação 16:

$$MSD = \left(\frac{1}{Y_1^2} + \frac{1}{Y_2^2} + \frac{1}{Y_3^2} + \dots \right) / N \quad (16)$$

onde Y, são os valores experimentais determinados, Y_o o valor nominal e N o número total de experiências.

Depois de se colocarem os resultados experimentais na tabela, os dados são analisados de modo a determinar o efeito relativo dos vários factores. Para o efeito, efectua-se uma análise de variância (ANOVA) [31].

Os principais passos na construção da ANOVA são [31]:

1. Determinar os valores de S/N, de acordo com a equação 13 para cada uma das nove experiências;
2. Determinar o número de graus de liberdade (f) para cada um dos factores de controlo em estudo que é dado por n-1, onde n é o número de níveis;
3. Determinar o valor de S (soma dos quadrados) somando separadamente todos os quadrados dos valores de S/N de cada factor que se encontram no mesmo nível,

dividindo-se pelo número de níveis e subtraindo o valor de C.F. (factor de correcção). A título de exemplo, para o caso do factor A, o valor de S_A é dado pela equação 17:

$$S_A = \frac{\sum (A_1)^2}{3} + \frac{\sum (A_2)^2}{3} + \frac{\sum (A_3)^2}{3} - C.F. \quad (17)$$

onde A_1 refere-se a todas as experiências onde o factor A se encontra no nível 1; A_2 refere-se a todas as experiências onde o factor A se encontra no nível 2; A_3 refere-se a todas as experiências onde o factor A se encontra no nível 3; sendo o factor de correcção (C.F.) determinado pela equação 18:

$$C.F. = \frac{T^2}{N} \quad (18)$$

onde T é a soma de todas as respostas e N é o número total de respostas.

4. Determinar a variância (V) para cada um dos factores, dada pela seguinte equação:

$$V = \frac{S_{factor}}{f_{factor}} \quad (19)$$

5. Determinar a contribuição (P) de cada um dos factores pela seguinte equação 20:

$$P = \frac{S_{factor}}{S_{total}} \times 100 \quad (20)$$

Uma vez construída a tabela da ANOVA, aconselha-se a eliminação do(s) factor(es) que apresentam menor contribuição, não se devendo, no entanto, eliminar mais de metade dos factores em consideração [31]. Nestas condições, a construção de uma segunda tabela ANOVA consiste em:

1. Passar os valores de S e o número de graus de liberdade dos factores eliminados, para um outro factor que é designado por factor erro;
2. Determinar a variância (V) para cada um dos factores;
3. Determinar o factor S' (soma pura dos quadrados) pela seguinte equação:

$$S' = S_{factor} - (V_{erro} \times f_{factor}) \quad (21)$$

4. Determinar a contribuição (P) de cada um dos factores pela equação 22:

$$P = \frac{S'_{factor}}{S_{total}} \times 100 \quad (22)$$

5. Determinar o factor de Fisher (F), que permite definir o grau de confiança (α) dos dados disponíveis pela seguinte equação 23:

$$F = \frac{V_{factor}}{V_{erro}} \quad (23)$$

Após se ter determinado a contribuição de cada um dos factores, determina-se qual é a combinação óptima de factores (\overline{A}_n ; \overline{B}_n ; \overline{C}_n ; \overline{D}_n) que permite otimizar a característica do produto pretendida, e para tal, somam-se todos os valores de S/N correspondentes a cada factor que se encontram no mesmo nível, dividindo-se de seguida pelo número de níveis [31]. Ou seja o factor A no nível 1, utiliza-se equação 24:

$$\overline{A}_n = (Y_1 + Y_2 + \dots + Y_n) / n \quad (24)$$

Para cada um dos factores, selecciona-se o nível que apresentar o maior valor de combinação óptima dos valores analisados. Para completar a análise, uma vez obtida a combinação óptima, calcula-se o valor da resposta óptima (η), colocando cada um dos factores nos melhores níveis [31], utilizando a equação 25:

$$\eta_{\text{ótimo}} = \overline{S/N} + (A_m - \overline{S/N}) + (B_m - \overline{S/N}) + (C_m - \overline{S/N}) + (D_m - \overline{S/N}) \quad (25)$$

Finalmente, calcula-se o intervalo de confiança através das seguintes equações:

$$C.I. = \sqrt{f_{1,y} \times V_{erro} \times N_e} \quad (26)$$

$$N_e = \frac{\text{Número de observações}}{\text{Nº de } f \text{ dos efeitos significativos}} \quad (27)$$

onde, $f_{1,y}$ é o valor da distribuição de F com 1 e y graus de liberdade.

Exposto todo o tema, o objectivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento e optimização de cimentos ósseos à base de fosfatos de cálcio e sulfato de cálcio. Neste trabalho caracterizou-se os respectivos cimentos, através de diferentes ensaios (*setting time*, injectabilidade, resistência à compressão, difracção de raios x (DRX), pH e citotoxicidade).

Para alcançar este objectivo, o trabalho de investigação exigiu os seguintes passos:

- i. Pesquisa bibliográfica sobre o estado actual dos conhecimentos acerca dos métodos de fabrico dos cimentos ósseos;
- ii. Síntese dos cimentos com diferentes constituintes descritos na literatura;
- iii. Optimização das condições de fabrico do cimento ósseo, em particular estudo da influência das características das matérias-primas e propriedades mecânicas dos materiais obtidos;
- iv. Caracterização das estruturas obtidas recorrendo a técnicas de DRX;
- v. Caracterização do perfil citotóxico dos cimentos ósseos através de ensaios *in vitro*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. OPTIMIZAÇÃO DOS CIMENTOS

Através de uma extensa pesquisa sobre o estado da arte dos cimentos ósseos, foram focados dois tipos de cimentos ósseos: cimentos de fosfato de cálcio à base de brushite e cimentos de sulfato de cálcio. Os pós utilizados para desenvolver estes cimentos foram o Fosfato Tricálcio β - β -TCP (Sigma Aldrich), Fosfato de monocálcio monohidratado - MCPM (Sigma Aldrich), Sulfato de cálcio dihidratado - CSD (Sigma Aldrich) e o citrato de trisódio (Panreac).

Tanto os cimentos de fosfato de cálcio à base de brushite, como os cimentos de sulfato de cálcio apresentam boas propriedades de biocompatibilidade, bem como de injectabilidade, mas são ainda pouco usados no ambiente clínico. Assim, com o intuito de melhorar este tipo de cimentos realizaram-se diferentes ensaios com o intuito de otimizar o seu processo de produção através do estudo dos factores que influenciam o seu *setting time* e a sua injectabilidade.

1.1 OPTIMIZAÇÃO DOS CIMENTOS DE BRUSHITE

Uma das limitações dos cimentos de brushite, é o facto de possuírem tempos de cura muito curtos, sendo necessário recorrer à adição de aditivos de forma a prolongar o seu *setting time*.

No processo de optimização dos cimentos de brushite, estudou-se a influência das variáveis que afectam os cimentos de brushite, tais como, o rácio de β -TCP/ MCMP, a quantidade/concentração de citrato de trisódio na componente líquida, quantidade de líquido e quantidade de aditivo (sulfato de cálcio dihidratado – CSD) a juntar à componente em pó, para a obtenção de um cimento ósseo com um *setting time* inferior a 15 min.

Com base nesta informação foi elaborado um desenho de experiências de Taguchi com base nos 4 factores referidos a 3 níveis com se pode ver pela tabela 7.

Tabela 7 Tabela de factores e respectivos níveis utilizados para realizar as experiências com base no método de Taguchi.

Factores \ Níveis	Nível 1	Nível 2	Nível 3
A – Rácio β -TCP/MCMP	3 : 3	3 : 2,5	3 : 2
B – Quantidade de CSD	9,09%	16,66%	23,08%
C – Volume de Liquido	1,9 ml	2,0 ml	22 ml
D – Concentração da solução de citrato de trisódio.	0.5 M	0.8 M	1.0 M

O método de Taguchi consiste num método de optimização de experiências onde é possível estudar a influência dos 4 factores e dos 3 níveis na obtenção do objectivo pretendido. Os métodos de Taguchi permitem reduzir drasticamente o número de experiências necessárias, diminuindo o tempo dispendido ao realizar os ensaios, assim como permite diminuir os custos associados à realização dos ensaios. Com base na informação obtida, foi possível avaliar a influência dos factores e níveis seleccionados para a obtenção do objectivo pretendido: produzir cimentos ósseos com *setting times* próximos de 15 minutos.

Com base nesta informação, a etapa seguinte consistiu na optimização da composição do cimento. Para obtermos estes cimentos, misturou-se β -TCP com MCMP em diferentes rácios, nomeadamente 3:1,5; 3:2; 3:2,5; 3:2,6 e 3:3 com água, com o intuito de obter os rácios apropriados para um cimento com elevada concentração de brushite e outro cimento com uma fase principal de brushite e uma fase secundária de β -TCP.

Assim, após o desenvolvimento dos cimentos com diferentes rácios, as composições dos cimentos foram caracterizadas por difracção de raios x.

1.2 OPTIMIZAÇÃO DOS CIMENTOS DE SULFATO DE CÁLCIO

Com o objectivo de comparar as propriedades dos cimentos à base de brushite com as propriedades dos cimentos de sulfato de cálcio, optimizou-se dois tipos de cimentos de sulfato de cálcio.

A base dos cimentos de sulfato de cálcio é o sulfato de cálcio hemihidratado (CSH), visto que é através da reacção de hidratação do CSH que se obtém uma pasta injectável que endurece *in situ*, originando um produto final à base de sulfato de cálcio dihidratado (CSD). Deste modo, o sulfato de cálcio dihidratado (CSD) foi sujeito a um tratamento térmico durante 2h, 5h e 8h a 180°C. O produto resultante foi analisado por difracção de raios X de modo a comprovar a desidratação do CSD formando sulfato de cálcio hemihidratado (CSH).

Após a confirmação de CSH através de uma análise de difracção de raios x, foi necessário recorrer à adição de um acelerador à reacção, pois o endurecimento do CSH ocorria muito lentamente. Para tal, juntou-se à mistura uma percentagem de CSD que irá funcionar como acelerador da reacção de hidratação do CSH, fazendo com que a reacção de endurecimento ocorresse de forma mais rápida.

Com base nas informações obtidas, a etapa seguinte consistiu na optimização da composição de dois tipos de cimento: um cimento com elevada concentração de sulfato de cálcio e outro cimento com uma fase principal de sulfato de cálcio e uma fase secundária de β -TCP.

2. PRODUÇÃO DOS CIMENTOS

Após a selecção dos rácios ideais para a realização da experiência – rácio 3:2,5 para ter brushite e rácio 3:1,5 para ter brushite com uma percentagem de β -TCP; os cimentos injectáveis de fosfato de cálcio (CPC), de fosfato/sulfato de cálcio (CSPC) e

os de sulfato de cálcio (CSC) foram desenvolvidos de acordo com a informação contida na tabela 8.

A quantidade de pó em cada cimento foi de 5g, e a de líquido foi de 2 ml (rácio de 0,4 ml/g), excepto nos cimentos de sulfato de cálcio em que a quantidade de líquido foi de 3 ml, obtendo assim um rácio de 0,6 ml/g.

O rácio de líquido/sólido de 0,4 ml/g nos cimentos de fosfato de cálcio e fosfato/sulfato de cálcio foi escolhido, uma vez que este rácio apresenta um cimento possível de injectar e moldar. Já o rácio de 0,6 ml/g dos cimentos de sulfato de cálcio foi escolhido devido ao facto de que o rácio de 0,4 ml/g originava uma mistura muito seca, sendo necessário aumentar a componente líquida do cimento.

Tabela 8 Constituição dos diferentes cimentos desenvolvidos.

Cimentos	Pó	Líquido	Rácio L/S
Cimento 1	β -TCP (54,5%) MCMP (45,5%) Rácio de 3 : 2,5	Solução Citrato de trisódio [0,6 M]	0,4 ml/g
Cimento 2	β -TCP (46,4%) MCMP (38,6%) Rácio de 3 : 2,5 CSD 15%	Solução Citrato de trisódio [0,6 M]	0,4 ml/g
Cimento 3	β -TCP (66,7%) MCMP (33,3%) Rácio de 3 : 1,5	Solução Citrato de trisódio [0,5 M]	0,4 ml/g
Cimento 4	β -TCP (56,7%) MCMP (28,3%) Rácio de 3 : 1,5 CSD 15%	Solução Citrato de tri sódio [0,5 M]	0,4 ml/g
Cimento 5	CSH (90%) CSD (10%)	Água	0,6 ml/g
Cimento 6	CSH (70%) CSD (10%) β -TCP (20%)	Água	0,4 ml/g

3. CARACTERIZAÇÃO DOS CIMENTOS

3.1 SETTING TIME

O *setting time* dos cimentos foi avaliado de forma muito semelhante ao método das agulhas de Gilmore [1]. Este método consiste na inspecção visual da superfície do cimento, quando esta suporta uma agulha sem deixar qualquer marca na superfície. O método Gilmore usa duas agulhas diferentes para medir o *setting time* inicial (IST) e o *setting time* final (FST) dos cimentos. Após a mistura do cimento (1 min), este é vertido para moldes e regista-se minuto a minuto os dois tempos até o cimento não ser marcado pelas duas agulhas à temperatura ambiente. Os dois tempos correspondem ao IST e o FST, respectivamente.

Cada ensaio foi repetido 3 vezes para cada cimento e os resultados foram expressos em médias com o respectivo desvio padrão.

3.2 INJECTABILIDADE

A injectabilidade dos cimentos foi avaliada através da expulsão de certas quantidades de pasta através de uma seringa manualmente. A seringa tem a capacidade de 20 ml, e com uma abertura de 2,0 mm de diâmetro (figura. 8).

Cinco gramas de pasta foram preparadas e vertidas para dentro da seringa (peso total da pasta antes de ser injectada) e após 2 minutos, a pasta foi gentilmente expelida da seringa manualmente até não se poder continuar mais. A seguir, o peso da pasta expelida da seringa foi medido e a injectabilidade foi calculada usando a equação 11. Cada ensaio foi repetido 3 vezes para cada cimento e os resultados foram expressos em médias com o respectivo desvio padrão.

$$\text{Inj}\% = \frac{\text{Peso da pasta explida da seringa}}{\text{Peso total de pasta antes de ser injectada}} \times 100 \quad (11)$$

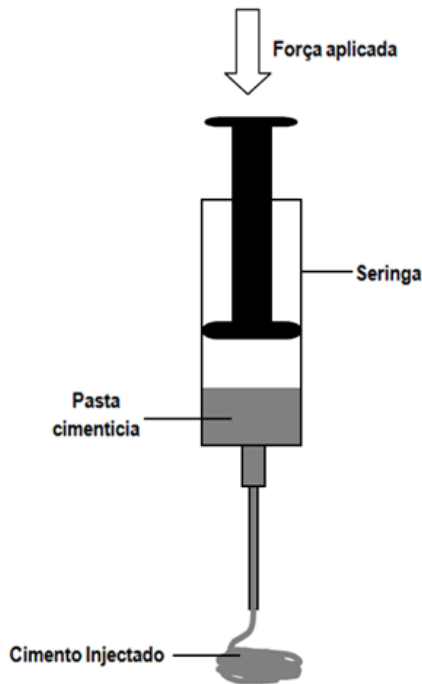


Figura 8 Representação esquemática do procedimento usado para medir a injectabilidade dos cimentos.

3.3 ENSAIO DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO

Para a realização do teste mecânico de resistência à compressão, os cimentos foram preparados e vertidos para um molde cúbico ($10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$). Tentou-se minimizar as bolhas de ar obtidas durante a mistura através da agitação gentil do molde. Após este processo, os cimentos ficam em repouso à temperatura ambiente durante 48h. Passado esse período, as amostras foram retirados dos moldes e a força de compressão foi medida a uma taxa de 0,5 mm/min usando uma máquina de teste universal (Zwick – 1435). Três réplicas foram levadas a cabo para cada cimento e os resultados foram expressos em médias com o respectivo desvio padrão.

3.4 ESTERILIZAÇÃO POR RAIOS GAMA

Os pós e os líquidos que compõem os cimentos foram previamente esterilizados de modo a se poder realizar o ensaio da citotoxicidade de forma asséptica. Esta esterilização foi realizada através de radiação gama numa unidade externa de radiação gama por ^{60}Co .

As amostras foram sujeitas a uma dose de radiação de 25-40kGy, visto ser a dose mais comum para este tipo de materiais. De forma a estudar a influência da re-esterilização, algumas amostras foram sujeitas a uma dose de radiação de 40-80 KGy.

A esterilização das amostras é uma etapa muito importante, uma vez que os cimentos a serem desenvolvidos neste trabalho destinam-se a aplicações médicas. A influência da dose de radiação em diversos materiais é um tema muito interessante, visto que a aplicação do material desenvolvido pode ser posto em causa, caso este não se encontre estéril.

A esterilização por raios gama foi o escolhido por ser o tratamento mais eficaz na penetração do material, factor muito importante na esterilização do recipiente contendo a componente de pó e líquida do cimento.

Com isto, as amostras foram embaladas com um recipiente para a componente do pó, outro para a componente do líquido, uma espátula e o próprio blister, que irá servir de copo misturador, como se pode ver pelas Figuras 9A e 9C. Os referidos componentes foram selados dentro de cada blister e foi colocado um autocolante indicador da presença de raios gama, como se pode ver pelas Figuras 9B e 9D. Este indicador de cor laranja, ao sofrer um processo de radiação gama, altera-se apresentando uma cor vermelha. A presença deste indicador facilita a rápida identificação do produto esterilizado ou não esterilizado.

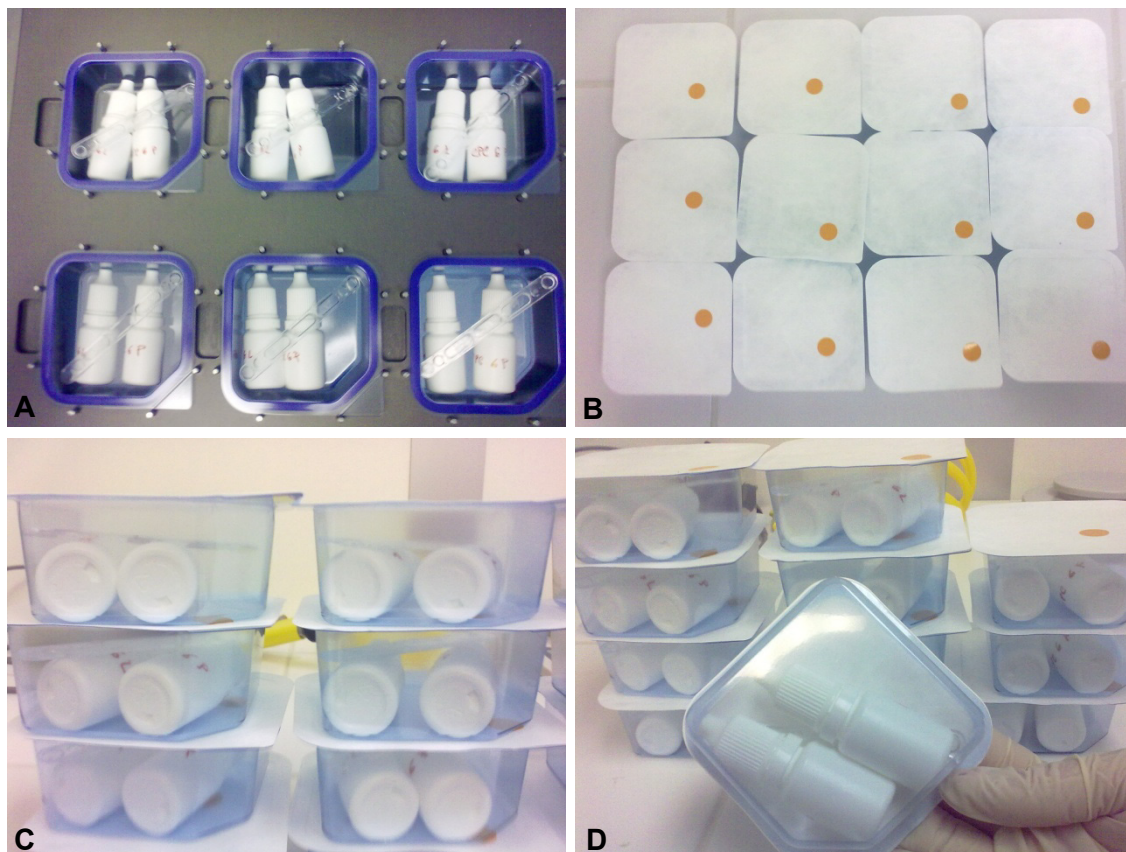


Figura 9 Embalamento das amostras antes da esterilização.

3.4.1 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO RAIOS X

A composição dos cimentos esterilizados (nas duas gamas de radiação) preparados foram caracterizadas por difracção de raios X (DMAX III/C, Rigaku) usando radiação monocromática Cu K α e a gama de 2 θ foi desde 10° a 35° com uma velocidade de varrimento de 10° min⁻¹.

As amostras analisadas tinham sido previamente preparadas e moídas.

3.4.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

O ensaio da proliferação celular foi realizado através do método directo com células estaminais isoladas da medula óssea de rato de acordo com o método da norma ISO 10993-5, sendo o número de células viáveis sobre o cimento quantificado pelo teste do MTT. Este método baseia-se na redução do sal amarelo de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (presente nas células vivas), a formazano, havendo a precipitação deste sob a forma de cristais roxos. A intensidade da cor produzida é portanto directamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. A absorvância da cor observada foi medida num leitor de microplacas Biorad Microplate Reader Benchmark (Tokyo, Japan) a 570 nm.

O crescimento da cultura de células foi realizado em T-flasks com um meio de Dulbecco's Modified Eagle Medium – F12 (DMEM-F12), suplementado com soro fetal bovino (FBS) (10%v/v) inactivado, penicilina G (100 unidades/ml), estreptomina (100 µg/ml) e anfotericina B (0,25 µg/ml), sendo este mudado de 3 em 3 dias. Quando se obteve confluência, as células foram lavadas com PBS/EDTA a 0,025%, e só depois se adicionou tripsina a 0,18% para ressuspender as células.

As células foram depois semeadas com uma densidade de 4x10⁴ células/amostra numa placa de 96 poços com o cimento, onde o mesmo foi previamente colocado (o cimento foi colocado nos poços após dois minutos da mistura). As placas foram colocadas numa incubadora a 37 °C com atmosfera húmida e 5 % de CO₂.

Após 24 h de cultura, os poços foram observados ao microscópio óptico invertido. Depois de observados todos os poços, foi removido o meio de cultura celular e adicionados 50 µl de solução de MTT a cada poço da placa. Após 3 horas, o MTT foi aspirado e em cada poço foi adicionado 50 µl de uma solução de Isopropanol/HCl a

0,04N, com o objectivo de dissolver os cristais de formazano durante uma hora. Finalmente foi lida a absorvância num leitor de microplacas Biorad Microplate Reader Benchmark (Tokyo, Japan) a 570 nm.

Foram ainda realizados dois controlos, um controlo positivo (K+) que é constituído pelo meio de células e adicionado etanol a 96% sem adição do cimento, com intuito de matar todas as células. O outro controlo (controlo negativo (k-)), continha apenas o meio de cultura e as células.

3.4.3 MEDIÇÃO DO PH DOS CIMENTOS

A medição do pH dos cimentos foi efectuada em 5 g de cada cimento produzido em ambiente estéril. Os pH dos cimentos foi determinado através de papel de medição pH universal após 2 minutos do início da mistura.

III. RESULTADOS

1. OPTIMIZAÇÃO DOS CIMENTOS

1.1 OPTIMIZAÇÃO DOS CIMENTOS DE BRUSHITE

Com base nos resultados de *setting time* final, para as nove experiências, calcularam-se os índices designados por sinal-ruído (S/N), que constam da tabela 9. Os dados apresentados são, então, analisados de modo a determinar o efeito relativo dos vários factores. Para o efeito, a tabela da ANOVA foi construída a partir dos valores individuais de S/N no intuito de seleccionar o nível óptimo de cada factor com previsível influência no *setting time*, tendo-se obtido os resultados que se mostram na tabela 9.

Tabela 9 Desenho de experiências de Taguchi com os respectivos resultados do *setting time* obtida das experiências.

Exp	Factores				Setting time		MSD	S/N
	A	B	C	D	Set Time 1	Set Time 2		
1	1	1	1	1	7	6	72,50	-18,60
2	1	2	2	2	25	28	134,50	-21,29
3	1	3	3	3	38	41	602,50	-27,80
4	2	1	2	3	42	43	756,50	-28,79
5	2	2	3	1	8	7	56,50	-17,52
6	2	3	1	2	27	25	122,00	-20,86
7	3	1	3	2	38	40	577,00	-27,61
8	3	2	1	3	35	36	420,50	-26,24
9	3	3	2	1	5	7	82,00	-19,14
TOTAL							2824,00	-207,85
CF							-	4800,18
Média								-23,09

Tempo pretendido
15,00 min

Como se pode verificar pela tabela 9, foram realizadas 9 experiências com duas repetições (set time 1 e set time 2). Como se pode constatar os valores para cada ensaio são muito próximos indicando uma boa reprodutibilidade nos resultados obtidos nas experiências. Com base nos valores de índice sinal ruído (S/N) obtidos da tabela 9, elaborou-se uma tabela ANOVA para os índices de S/N como se pode observar na tabela 10.

Tabela 10 ANOVA para os índices de S/N

	f	S	V	P	f	S	V	S'	P	F	α (%)
A	2,00	6,91	3,45	4,32	-	---	---	---	---	---	-
B	2,00	17,62	8,81	11,02	2,00	17,62	8,81	2,01	1,26	1,13	<90%
C	2,00	8,71	4,35	5,44	-	---	---	---	---	---	-
D	2,00	126,74	63,37	79,22	2,00	126,74	63,37	111,12	69,46	8,12	>95%
Erro	-	-	-	-	4,00	15,61	7,81	-	29,28	-	-
TOTAL	8,00	159,98	-	100,00	8,00	159,98	-	-	100,00	-	-

Os resultados apresentados na tabela 10 mostram que o factor B (quantidade de aditivo - CSD) e o factor D (quantidade/concentração de citrato de trisódio na componente líquida) apresentam uma contribuição significativa de 11,02% e 79,22% (respectivamente). Enquanto os factores A (rácio de β -TCP/ MCMP) e o factor C (quantidade de líquido) apresentam uma contribuição pouco significativa de 4,32% e 5,44% (respectivamente) para a obtenção de um *setting time* próximo de 15 minutos. Desta forma, os factores A e C, podem ser eliminados, o que permite construir uma segunda tabela de ANOVA (cf.tabela 10), em que apenas se considera os factores B e D. Após a eliminação dos factores A e C, o factor B, apresentou uma contribuição de 1,26% e um grau de confiança inferior a 90% ao passo que o factor D apresentou uma contribuição significativa, com uma contribuição de 69,46% e um grau de confiança superior a 95%. Apesar de o grau de confiança associado ao factor B ser baixo, a sua contribuição não poderá ser desprezado. É recomendável, que face a estes resultados, sejam futuramente realizados estudos no sentido de avaliar o efeito da interacção entre o factor B (quantidade de aditivo - CSD) e o factor D (quantidade/concentração de citrato de trisódio na componente líquida) na obtenção de um *setting time* próximo de 15 minutos. Com base nesta informação, podemos concluir que o factor D é aquele que mais contribui para o objectivo pretendido,

seguido do factor B. Os restantes factores, nos respectivos níveis, não influenciam de forma significativa a obtenção de um *setting time* próximo de 15 minutos.

Conhecendo os factores que contribuem de forma mais significativa, foram calculados qual a melhor combinação de níveis para cada factor. Para o efeito, calcularam-se os valores médios de S/N, correspondentes a cada factor num determinado nível conforme se pode observar pela tabela 11.

Tabela 11 Combinação óptima de níveis

FIN	1	2	3
A	-22,56339	-22,39072	-24,32919
B	-25,00108	-21,68179	-22,60044
C	-21,90155	-23,07115	-24,3106
D	-18,42067	-23,25419	-27,60844

Assim sendo, a combinação óptima de níveis para o factor D (quantidade/concentração de citrato de trisódio na componente líquida) é o nível 1 e para o factor B (quantidade de aditivo - CSD) é o nível 2. Visto que a contribuição dos factores A e C nos respectivos níveis apresentam um efeito desprezável, estes podem ser escolhidos com base em critérios económicos. Deste modo, optou-se por considerar o nível 1 para o factor A e o nível 2 para o factor C. Com base nesta informação, a experiência de confirmação foi efectuada utilizando a seguinte combinação de níveis: A1, B2, C2, D1, como se pode verificar pela tabela 12.

Tabela 12 Experiência de confirmação

Experiência de confirmação	r1	r2	MSD	S/N
Conf A1B2C2D1	9,00	10,00	30,50	-14,84

Para completar a análise, calculou-se a resposta óptima, pondo cada um dos factores nos melhores níveis e calculou-se o respectivo intervalo de confiança. Os resultados são apresentados na tabela 13.

Tabela 13 Resposta óptima e intervalo de confiança

	Resposta óptima ± Intervalo de Confiança	Grau de Confiança
S/N	-16,45 ± 8,93	90%

A avaliar pela resposta óptima de sinal/ruído calculada, $\eta = -16,45 \pm 8,93$, podemos concluir que a experiência de confirmação foi um sucesso na medida em que o valor obtido, S/N = -14,84, caí dentro do intervalo de confiança da resposta óptima do índice sinal/ruído, o que sugere que a experiência de confirmação efectuada está correcta.

Com base nos resultados do método de Taguchi, a contribuição do factor rácio β -TCP/MCMP não é significativo, pelo que optou-se por fazer um cimento com elevada concentração de brushite misturando-se β -TCP com MCMP em diferentes rácios, nomeadamente 3:2, 3:2,5; 3:2,6 e 3:3 com água. As amostras correspondentes a cada rácio foram caracterizadas por difracção de raios x com o intuito de determinar o rácio mais indicado para uma composição de brushite.

Os resultados dos espectros das quatro difracções (figura 10) evidenciaram que o rácio de β -TCP e MCMP que forma a brushite, com vestígios de outras fases, foi o rácio 3:2,5. Como se pode ver pela figura 10 o rácio de 3:2,5 apresenta vestígios de β -TCP e monetite. Já no caso do rácio de 3:2,6, este apresenta uma pequena percentagem de monetite. Os rácios de 3:2 e 3:3 são aqueles que mais se afastam do resultado pretendido, pois no rácio 3:2 este apresenta uma percentagem maior de β -TCP, e o rácio 3:3 evidenciam uma percentagem maior de monetite.

O rácio escolhido para desenvolver os cimentos 1 e 2 foi o 3:2,5. Com base nos resultados dos métodos de Taguchi, a presença de CSD é um factor significativo para a obtenção de um setting time de 15min, com uma contribuição de 1,26%. Considerando que este factor não contribui de forma muito significativa, 15% de CSD foi adicionado a cada rácio para estudar a sua influência. Assim sendo, o cimento 1 é constituído por brushite e o cimento 2 é constituído por brushite com aditivo de sulfato de cálcio (15%).

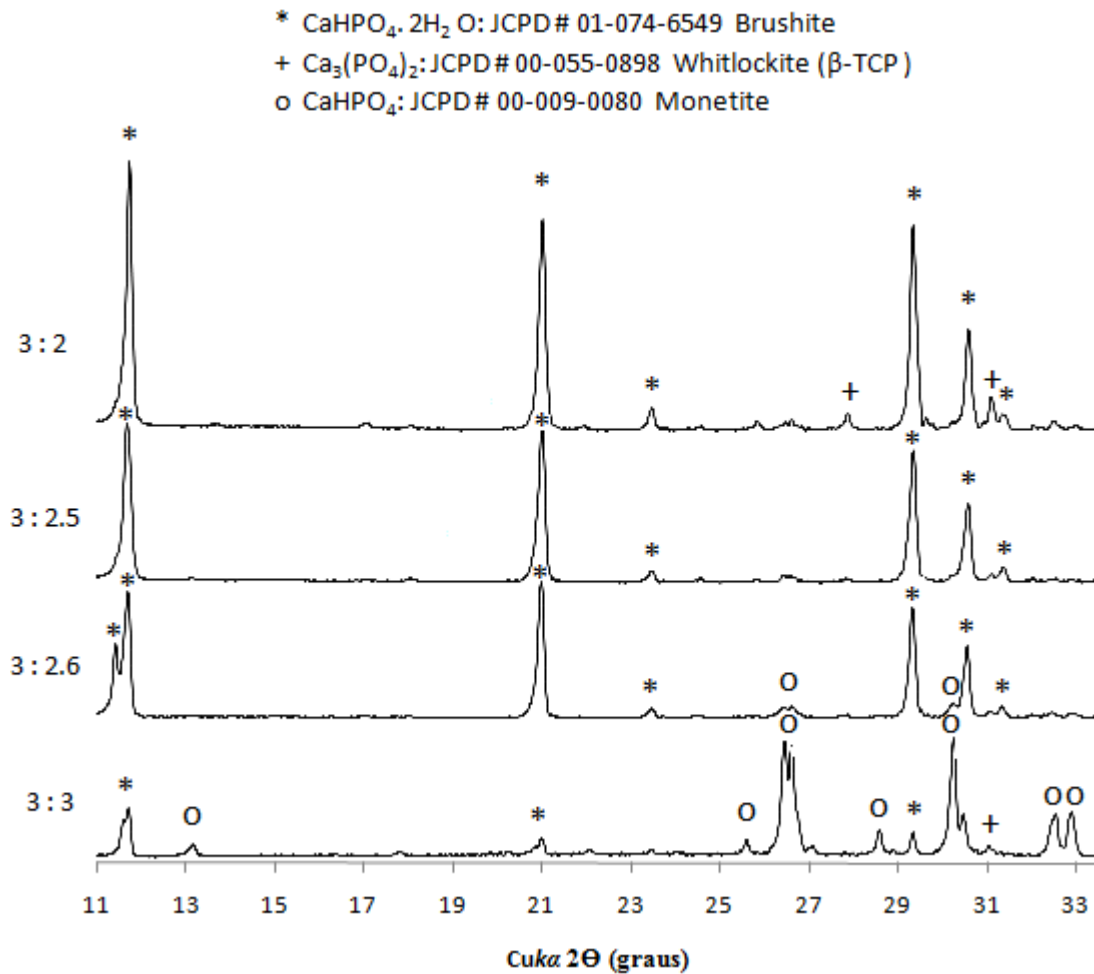


Figura 10 Espectros de difracção de raios X com diferentes rácios de β -TCP, MCMP e água.

Nos cimentos 3 e 4, pretendeu-se desenvolver cimentos idênticos aos cimentos 1 e 2, mas com a diferença de terem uma maior percentagem de β -TCP, visto que o rácio β -TCP/MCMP não contribui significativamente para a obtenção de um setting time próximo de 15 min. Para tal, procedeu-se da mesma forma que o cimento anterior misturando β -TCP e MCMP em diferentes rácios, nomeadamente, rácios de 3:2,5, 3:2, 3:1,5 com o intuito de obter um cimento constituído por uma fase principal de brushite e uma fase secundária de β -TCP.

Os resultados dos espectros das três difracções (figura 11) evidenciaram que o rácio de β -TCP e MCMP que forma a brushite com uma percentagem significativa de β -TCP foi o rácio 3:1,5. Como se pode ver pela figura 11, o rácio de 3:1,5 apresenta uma percentagem significativa de brushite e de β -TCP.

No rácio de 3:2 verifica-se alguma presença de β -TCP, sendo a sua presença mais acentuada no rácio de 3:1,5. O rácio escolhido para desenvolver os cimentos 3 e 4 foi o 3:1,5, onde o cimento 3 é apenas brushite com uma percentagem de β -TCP e o cimento 4 é brushite com uma percentagem de β -TCP e com aditivo de sulfato de cálcio (15%).

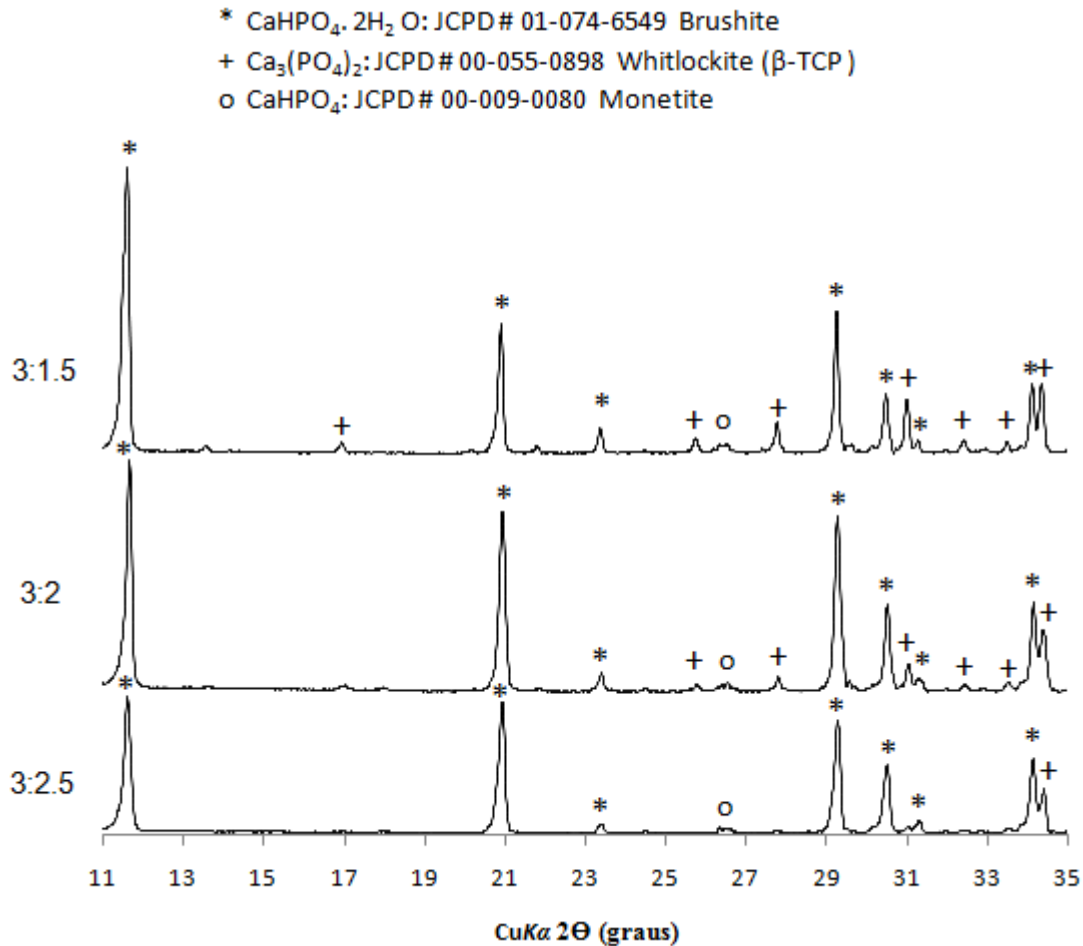


Figura 11 Espectros de difracção de raios X com diferentes rácios de β -TCP, MCMP e água.

1.2 OPTIMIZAÇÃO DOS CIMENTOS DE SULFATO DE CÁLCIO

Com o objectivo de desenvolver um cimento à base de sulfato de cálcio, foi necessário obter o CSH através do tratamento térmico de uma amostra de CSD. As amostras de CSD foram sujeitas a tratamentos térmicos a 180°C durante 2h, 5h e 8h e posteriormente analisados por difracção de raios X.

Como se pode ver pela figura 12, os tratamentos térmicos aplicados permitiram a obtenção do CSH. A transformação do CSD em CSH ocorreu após 2 h de tratamentos térmicos, verificando que os espectros correspondentes aos tratamentos de 2h, 5h e 8h foram iguais. Com base nesta informação, os cimentos 5 e 6 foram produzidos com base no CSH que sofreu um tratamento térmico de 8h, garantindo assim a transformação completa do CSD e uma reprodutibilidade de valores.

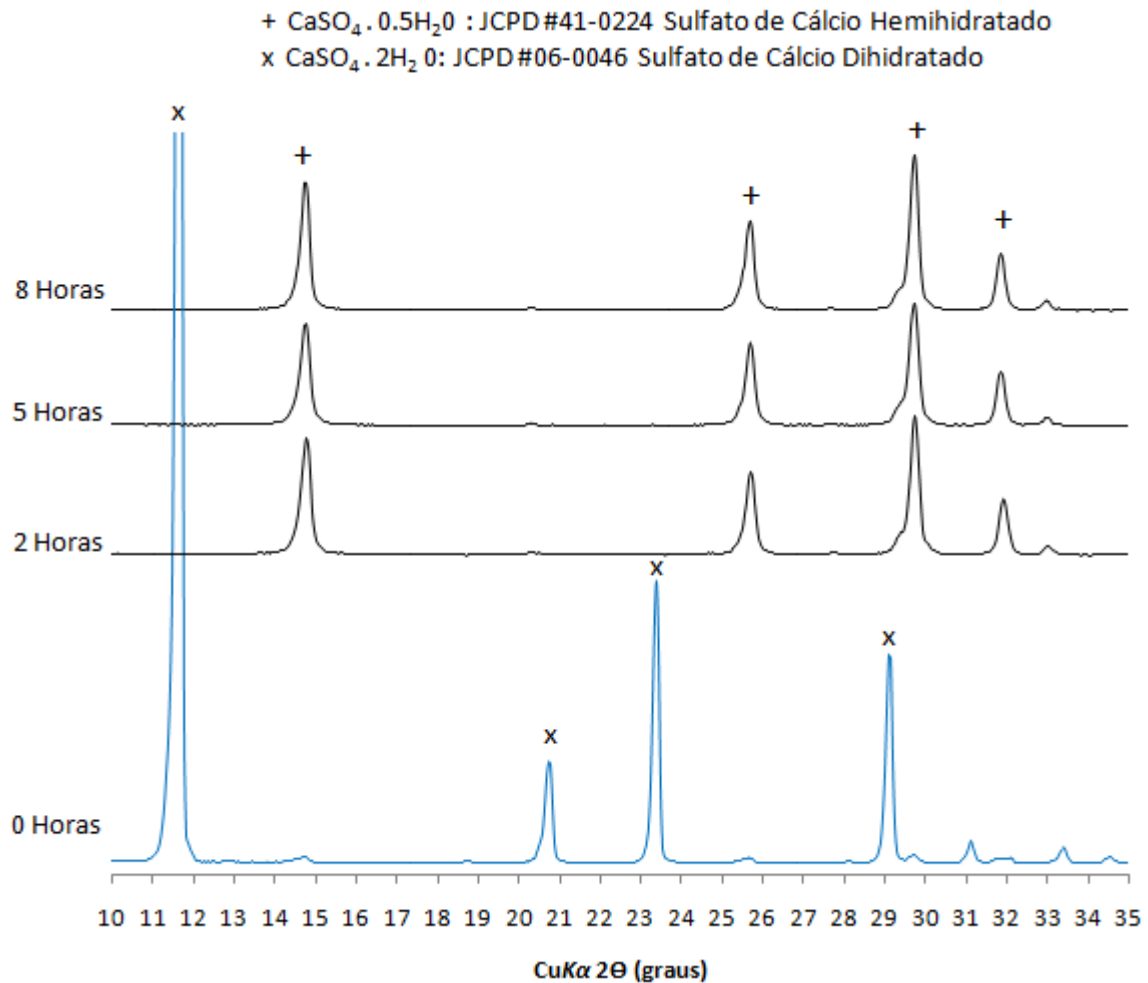


Figura 12 Espectros de difração de raios X com amostras de CSD sujeitas a diferentes tratamentos térmicos.

2. CARACTERIZAÇÃO DOS CIMENTOS

2.1 SETTING TIME

O *setting time* é um dos parâmetro mais importantes no desenvolvimento de um cimento que pretenda ser injectável ou moldável em situações clínicas. Neste sentido, o cimento deve endurecer lentamente para fornecer tempo suficiente para o cirurgião realizar a colocação do mesmo facilmente (cimento moldado e colocado manualmente ou simplesmente injectado) e também deve endurecer rapidamente para prevenir atrasos na cirurgia, permitindo ao cirurgião fechar o defeito ósseo imediatamente após a colocação do cimento. A figura 13 ilustra os tempos obtidos para os diferentes cimentos, sendo que todos eles são superiores aos tempos da brushite tradicional (β -TCP/MCMP e água) que tem um *setting time* final de apenas 1 ou 2 minuto, aproximadamente.

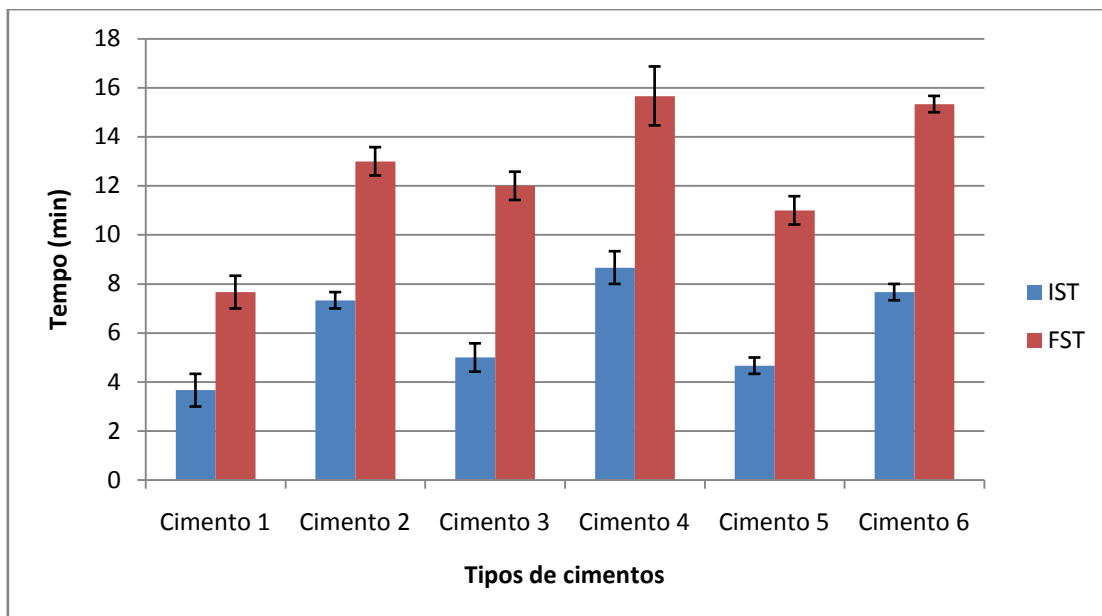


Figura 13 *Setting times* inicial (IST) e final (FST) dos cimentos desenvolvidos (cimentos 1 – 4 rácio L/S=0.4ml/g e cimentos 5 e 6 rácio L/S=0.6ml/g)

Com base na literatura consultada, não existe um consenso de qual o valor ideal para o IST e para o FST, mas vários autores referem que o IST deve estar compreendido entre 3 e 8 minutos aproximadamente e o FST deve ser menor ou igual a 15 minutos

aproximadamente [3, 14]. Todos os cimentos desenvolvidos, neste trabalho, têm valores que estão de acordo com a literatura consultada, pois situam-se dentro (ou muito próximo) das gamas de valores referidos. Assim, os cimentos para os quais se obtiveram o IST/FST mais baixos e mais altos foram os cimentos 1 (IST = 3,6 min; FST = 7,7 min) e 4 (IST = 8,6 min; FST = 15,6 min), respectivamente.

O efeito do retardador do *setting time* está bem evidente em todos os valores obtido nos cimentos de brushite, que passou de poucos minutos - 1 ou 2 minuto, aproximadamente (caso dos cimentos de brushite tradicionais) para alguns minutos, nomeadamente, de 7,7 min para o cimento com valor mais baixo verificado - cimento 1, e de 15,6 min para o cimento com maior valor verificado - cimento 4.

Mais ainda, é possível constatar o efeito do aditivo (CSD) adicionado aos cimentos de brushite na subida dos *setting time*, bem como a subida dos tempos de endurecimento dos cimentos de sulfato de cálcio devido ao efeito do aditivo (β -TCP), que interferiu na reacção de hidratação do CSH a CSD.

2.2 INJECTABILIDADE

Os cimentos de brushite tradicionais (mistura de β -TCP/MCMP e água) são fracamente injectáveis, devido ao facto de estes possuírem um *setting time* muito curto (de apenas 1 ou 2 minuto aproximadamente) [21, 32]. Neste sentido, houve necessidade de se aumentar estes tempos de maneira a ter tempo para permitir que a pasta seja injectada. Com base nos resultados anteriores do *setting time*, esse objectivo foi atingido através do uso de um retardador do *setting time*. A figura 14 mostra a injectabilidade das pastas obtidas após a modificação da brushite tradicional (cimentos 1 a 4) e a das pastas à base de sulfato de cálcio (cimentos 5 e 6).

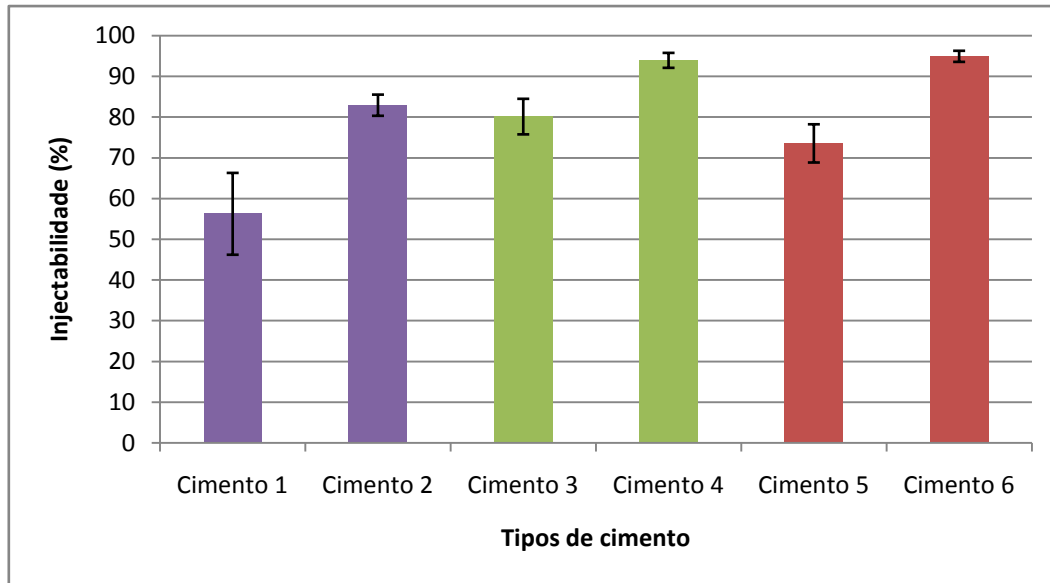


Figura 14 Injectabilidade dos diferentes cimentos após 2 minutos do início da mistura.

O critério de aceitação para a injectabilidade do cimento é de 80%. Esta foi considerada a percentagem mínima a partir da qual um cimento possa ser facilmente injectado, sem correr o risco do cimento endurecer na seringa durante o processo de injeção. Como se pode verificar pela figura 14, os cimentos que apresentam maior injectabilidade são os cimentos 4 e 6 (injectabilidade superior a 90%). Estes valores devem-se ao facto de apresentarem valores de *setting time* inicial de 8,6 min e 7,7 min, respectivamente, apropriados para que sejam facilmente injectados. Os cimentos 2 e 3 possuem uma injectabilidade de 80%, o que é considerado aceitável, com base no critério de aceitação mínima de 80%. Quanto aos cimentos 1 e 5, estes apresentam valores abaixo do critério de selecção uma vez que apresentam valores de 55% e 60% respectivamente. Foi também possível verificar que a adição de CSD aos cimentos de brushite contribuiu para a melhoria na sua injectabilidade (cimentos 2 e 4), devido ao facto deste aditivo funcionar como retardador da reacção de hidratação da formação da brushite. Já nos cimentos à base de sulfato de cálcio, a adição de -TCP como aditivo melhorou a sua injectabilidade (cimento 6), pois verificou-se que este aditivo funcionou como retardador da reacção de hidratação do CSH a CSD.

De referir ainda, que o cimento 1 (cimento constituído apenas de brushite) possui uma injectabilidade melhor quando comparada com o cimento de brushite tradicional. Tal facto deve-se apenas ao uso do retardador (citrato de trisódio) que melhorou os tempos do cimento de brushite tradicional.

2.1 RESISTÊNCIA MECÂNICA DE COMPRESSÃO DOS CIMENTOS

A fim de determinar os valores da resistência à compressão, os cimentos produzidos foram submetidos a um ensaio mecânico de compressão. A figura 15 revela os resultados da resistência à compressão dos cimentos produzidos passados 48h da mistura.

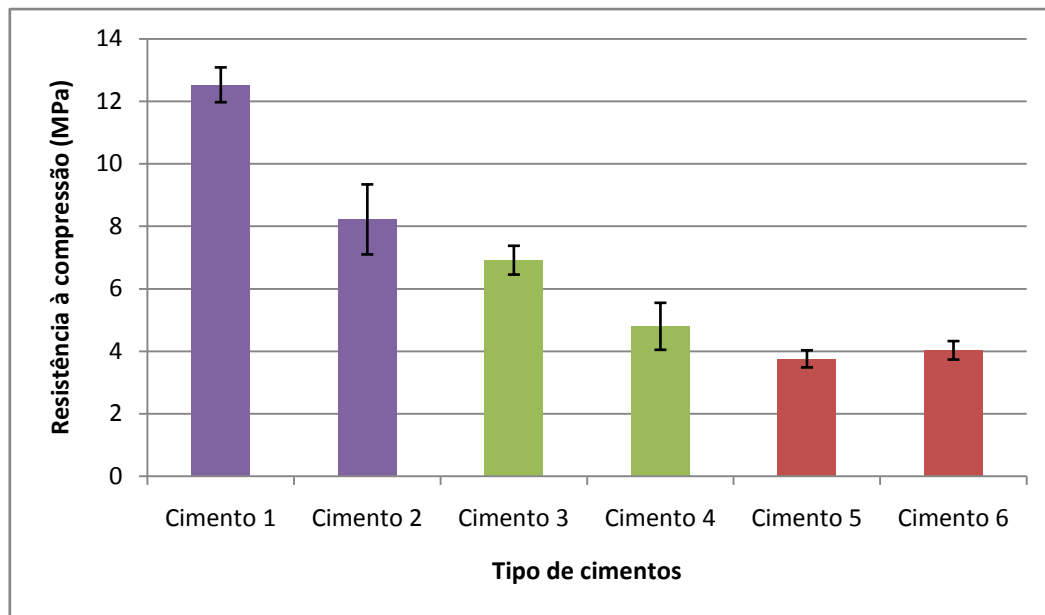


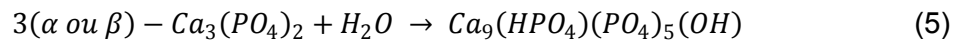
Figura 15 Resistência à compressão dos cimentos produzidos após 24h da mistura.

Como se pode ver pela figura 15, o cimento com maior resistência à compressão é o cimento 1 com um valor de 12,5 MPa. Já o cimento 2, que é em muito semelhante ao cimento 1, possui uma resistência mais baixa (8,20 MPa). Este enfraquecimento deve-se ao aditivo de sulfato de cálcio adicionado.

Mais ainda, os resultados obtidos revelam que os cimentos 1 e 2 (rácio de 3 : 2,5) têm uma resistência à compressão superior quando comparados com os cimentos 3 e 4 que (rácio de 3 : 1,5). Esta fragilidade é devida à composição bifásica de brushite e β -TCP, pois, quanto maior for a quantidade de β -TCP presente no cimento de brushite, verifica-se uma diminuição da resistência à compressão dos cimentos de brushite, como está descrito na literatura [32].

Constata-se ainda que os cimentos de sulfato de cálcio (cimento 5 e 6) são aqueles que apresentam uma menor resistência à compressão, e quando o sulfato de cálcio é adicionado aos outros cimentos, induz um enfraquecimento à compressão do cimento.

A adição de uma percentagem de β -TCP ao cimento de sulfato de cálcio (cimento 6) induz um pequeno acréscimo na resistência à compressão. Isto deve-se ao facto de que o β -TCP irá reagir com água formando CDHA (cf equação 5) e este por sua vez aumenta a resistência do cimento.



Como a quantidade de β -TCP foi muito reduzida, a formação de CDHA foi também muito reduzida, o que induziu nos cimentos de sulfato de cálcio um pequeno acréscimo de resistência à compressão. Tal facto, está descrito na literatura, onde se verifica aumentos mais significativos de resistência à compressão ocorrem quando se adicionam maiores quantidades de α -TCP à mistura de CSH [33].

2.2 CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A fim de determinar a influência da esterilização na composição dos cimentos, os cimentos esterilizados foram caracterizadas por difracção de raios X.

Com base nos difractogramas obtidos, constata-se que o espectro de DRX do cimento 1, (figuras 16 e 17 – 1), mostra que o principal produto resultante da reacção de hidratação foi a brushite, juntamente com uma pequena percentagem de β -TCP e monetite (brushite não hidratada). A adição do citrato de sódio permitiu retardar a reacção de endurecimento do cimento, porém ao retardar a reacção uma pequena percentagem de β -TCP e monetite não reagiram.

O difractograma correspondente ao cimento 2 (figuras 16 e 17 – 2) revela uma fase principal de brushite, e pequenas percentagens de β -TCP, monetite e sulfato de cálcio. Os resultados estão de acordo com o esperado visto que o cimento 2 é idêntico ao cimento 1, porém possui 15% de adição de sulfato de cálcio dihidratado. O difractograma do cimento 2 é muito semelhante ao cimento 1, excepto pelo facto do cimento 2 possuir uma pequena percentagem de sulfato de cálcio dihidratado.

Quando se altera o rácio para 3 : 1,5, o espectro de DRX torna-se bastante diferente quando comparado com os espectro obtido com o rácio 3 : 2,5. O difractograma obtido

do cimento 3 (figuras 16 e 17 – 3), mostra que os produtos resultantes da reacção de hidratação foram a brushite e uma acentuada percentagem de β -TCP e monetite (brushite não hidratada) que não reagiram.

O difractograma obtido do cimento 4 (figuras 16 e 17 - 4) revela uma fase principal de brushite e uma acentuada percentagem de β -TCP e monetite (brushite não hidratada) que não reagiram. É também possível de verificar uma pequena percentagem de CSD.

No que diz respeito aos cimentos à base de sulfato de cálcio, o espectro obtido do cimento 5 (figuras 16 e 17 - 5) revelou que o principal e único componente da reacção de hidratação do CSH foi o CSD.

Já no cimento 6, o espectro obtido (figuras 16 e 17 – 6) é muito semelhante ao espectro obtido para cimento 5, com a única diferença do espectro do cimento 6 possuir uma baixa quantidade β -TCP.

O processo de esterilização aplicado (radiação gama), tanto na gama dos 25 – 40 KGy como na gama 40 – 80 KGy não induziu nenhuma alteração da composição nos cimentos desenvolvidos, como se pode observar nos espectros das figuras 16 e 17.

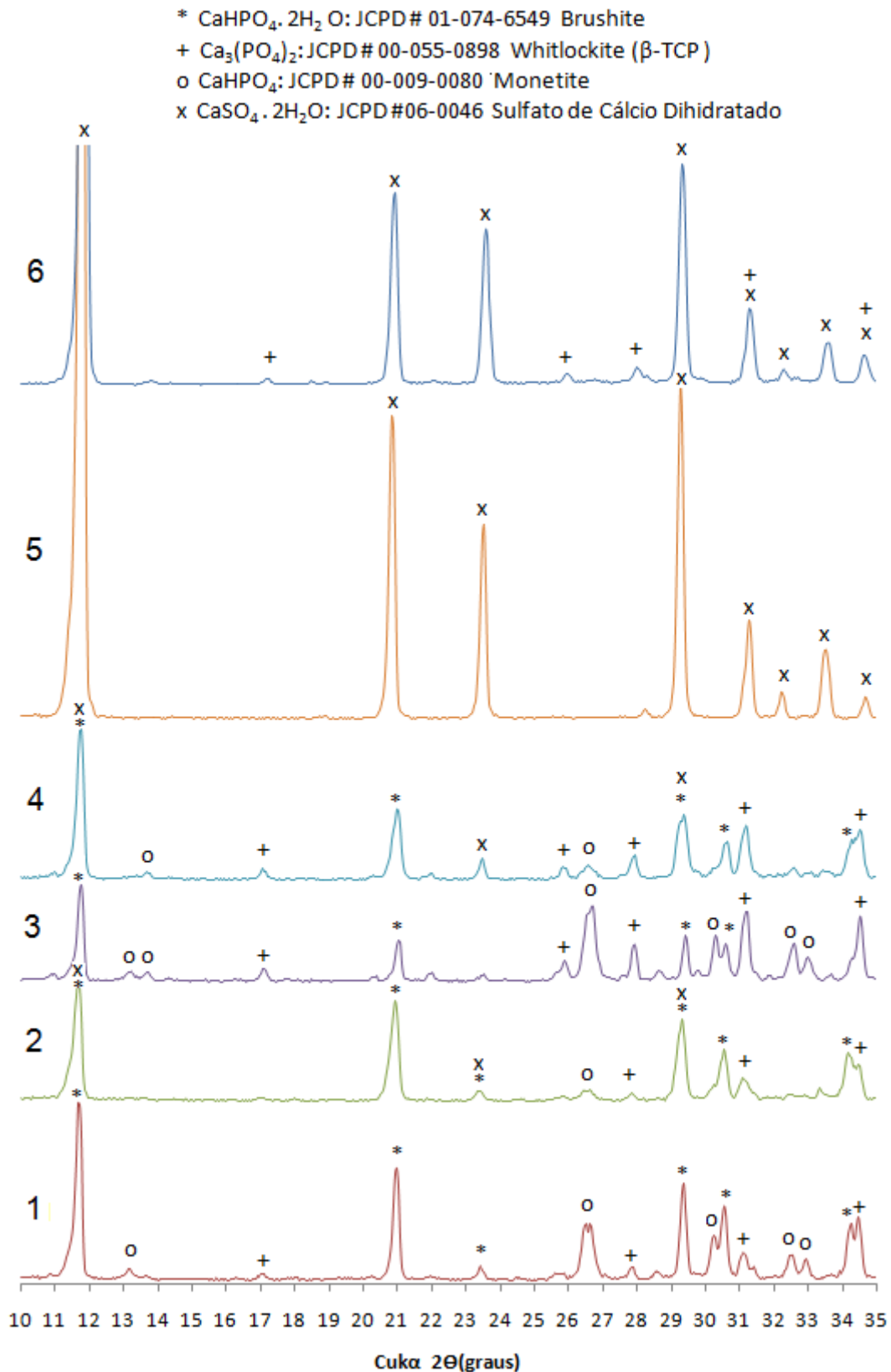


Figura 16 Espectro de DRX dos cimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com uma dose de 25 KGy.

* $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: JCPD# 01-074-6549 Brushite
+ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: JCPD# 00-055-0898 Whitlockite (β -TCP)
o CaHPO_4 : JCPD# 00-009-0080 Monetite
x $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: JCPD#06-0046 Sulfato de Cálcio Dihidratado

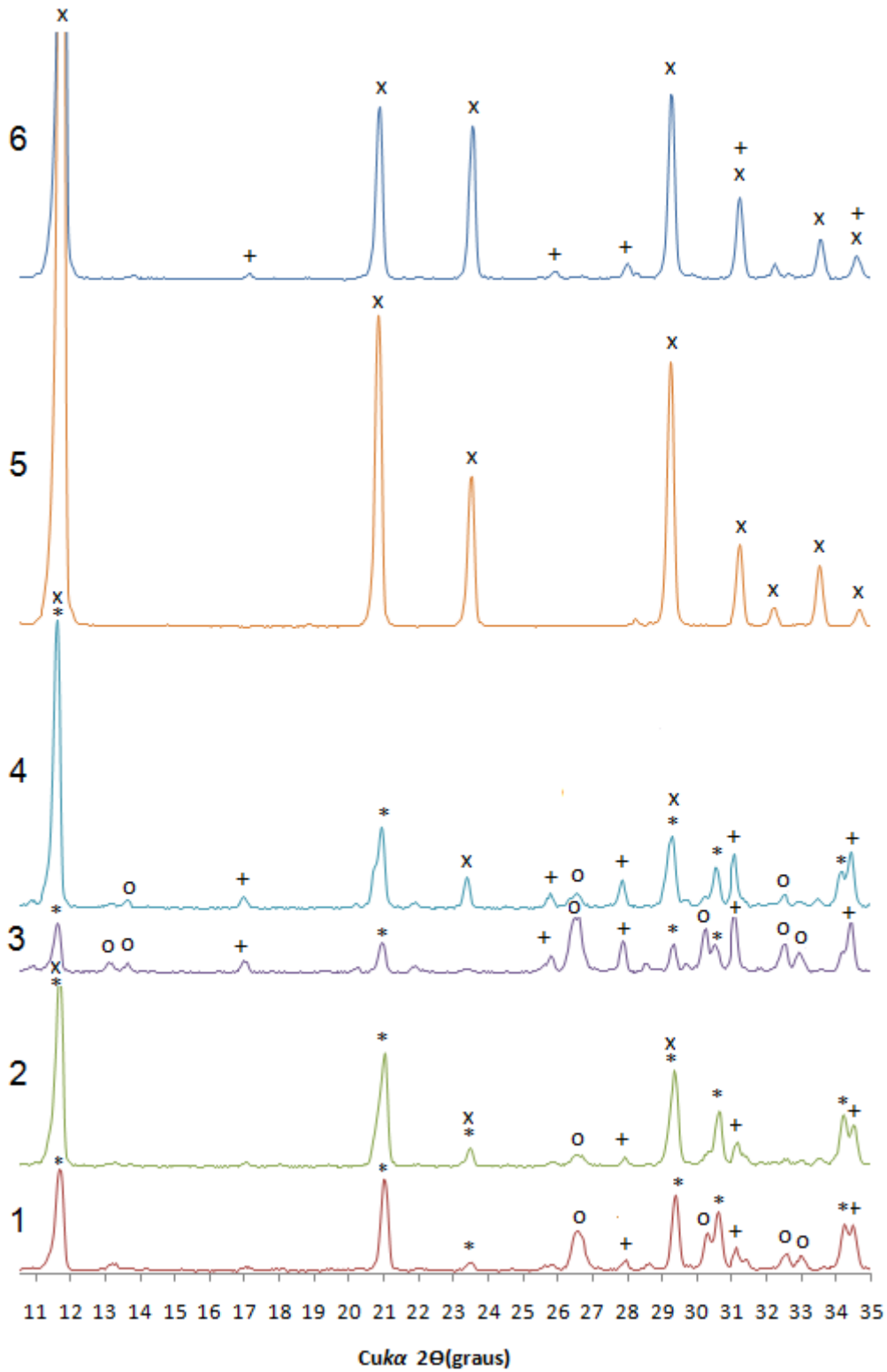


Figura 17 Espectro de DRX dos cimentos 1, 2, 4, 4, 5 e 6 com uma dose de 40 KGy.

2.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS CIMENTOS ATRAVÉS DE ENSAIOS *IN VITRO*

Para avaliar a biocompatibilidade dos cimentos, foram realizados os testes de citotoxicidade pelo método do MTT. As amostras previamente esterilizadas tanto a 25K Gy como a 40K Gy foram colocados em contacto com as células e posteriormente avaliou-se a viabilidade celular pelo método do MTT. A figura 18 mostra os resultados do teste da citotoxicidade de todos os cimentos desenvolvidos neste trabalho em células estaminais isoladas de medula óssea de rato após a incubação de 24 horas.

Por observação da figura 18 verifica-se que os cimento 1 a 4 apresentam alguma toxicidade para as células (exceptuando o cimento 3 irradiado com 25 K Gy), pois a absorvância destes cimentos é inferior à absorvância do controlo negativo (k-). Já os cimentos 1 a 4 de 40K Gy possuem baixos valores de absorvância, tendo o cimento 3 de 40K Gy absorvância muito idêntica ao controlo positivo k+ (possui células mortas devido à adição de etanol a 96%). Através da análise dos resultados obtidos, pode-se afirmar que os cimentos 3 25K Gy, 5 (25k Gy e 40k Gy) e 6 (25 K Gy) não revelam uma citotoxicidade aguda para as células, pois a sua absorvância foi superior à do controlo negativo K-.

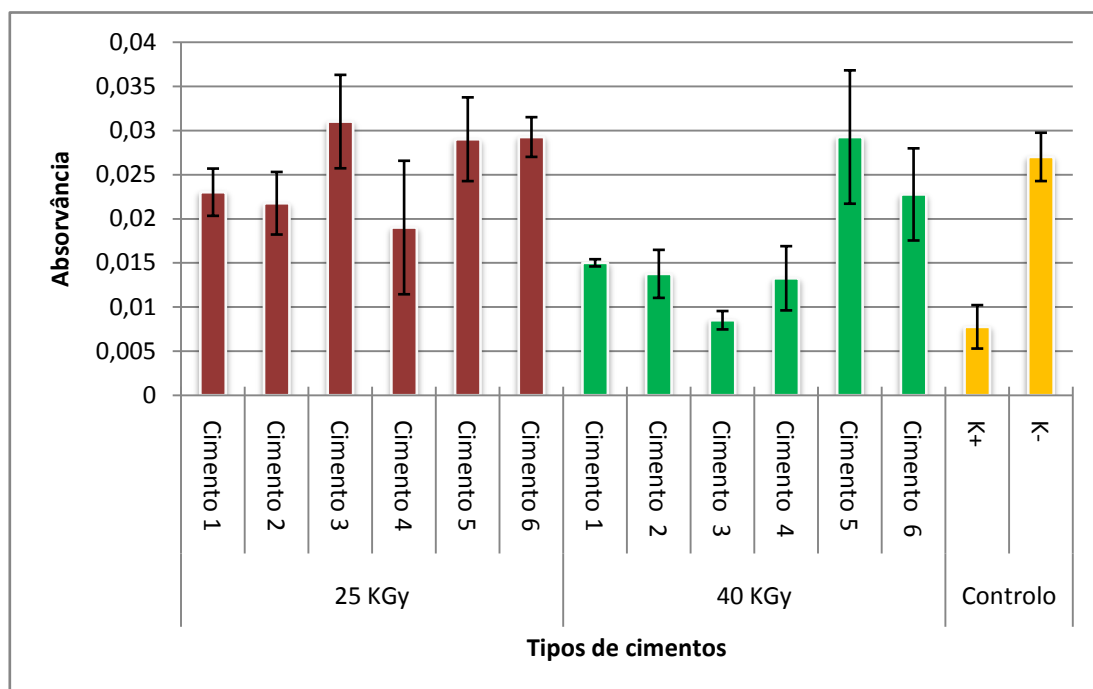


Figura 18 Proliferação das células estaminais isoladas de medula óssea de rato na presença dos cimentos produzidos após 24h de incubação.

2.4 OBSERVAÇÃO POR MICROSCOPIA ÓPTICA DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS EM CONTACTO COM OS CIMENTOS PRODUZIDOS

Os cimentos foram incubados durante 24h no meio de cultura com as células. Após este período, procedeu-se à visualização dos poços a fim de saber se havia células vivas após o contacto com os cimentos. Como se pode ver pelas imagens da figura 19, apenas para os cimentos 5 (25 KGy e 40 KGy) e 6 (25kGy) foi possível observar células vivas, ao contrário do resto dos cimentos, onde apenas se viam as células mortas.

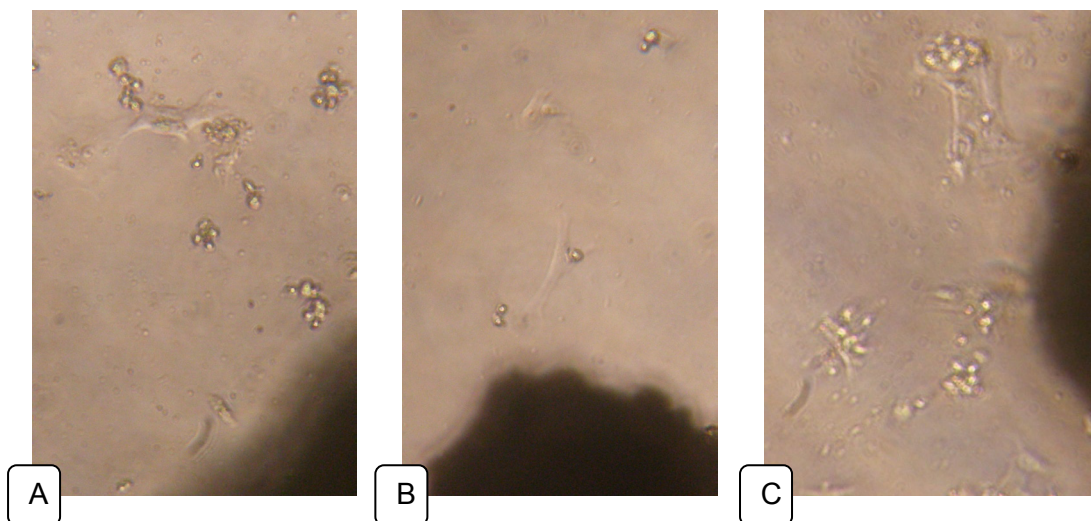


Figura 19 Imagens obtidos ao microscópio óptico invertido dos poços que continham o cimento (zonas escuras) (A) 5 de 25 KGy, (B) 5 de 40 KGy e (C) 6 de 25 KGy com o meio de cultura e as células após 24h de incubação.

Na presença do cimento 3 irradiado com 25 KGy as células morreram (pequenas bolinhas visíveis na figura 20). Por outro lado, na figura 20 vê-se também o cimento espalhado (zonas escuras) pelo meio de cultura, o que mostra que este cimento se decompôs no meio de cultura. Esta decomposição pode ter influenciado os resultados obtidos no ensaio do MTT, induzindo uma absorvância superior ao controlo negativo (k-). Este resultado sugere que no futuro se repitam estes ensaios, de modo a avaliar a se este cimento é ou não tóxico para as células.

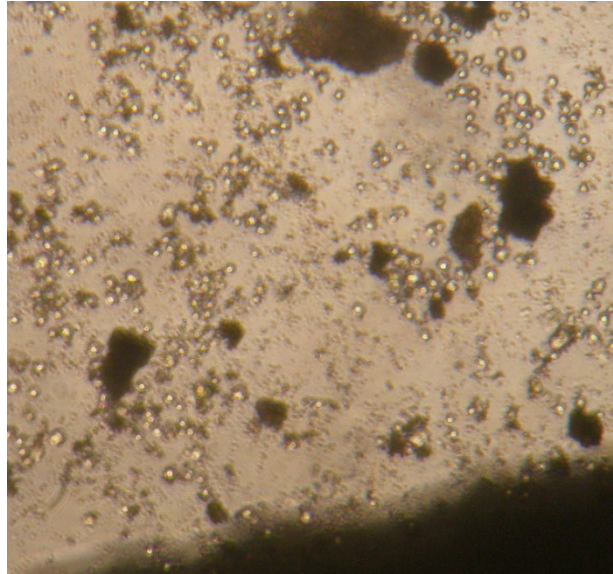


Figura 20 Imagem obtida ao microscópio óptico invertido do poço que continham o cimento 3 irradiado com 25 KGy com o meio de cultura após 24h de incubação (ampliação 100x).

2.5 MEDIÇÃO DO PH DOS CIMENTOS

O pH dos cimentos foi determinado com o auxílio do papel indicador universal e os resultados são apresentados na tabela 14.

Tabela 14 Valores de pH dos cimentos medidos após 2 minutos do início da mistura.

	pH	
	25 KGy	40 KGy
Cimento 1	3	3
Cimento 2	3	3
Cimento 3	3.5	3.5
Cimento 4	3.5	3.5
Cimento 5	7	7
Cimento 6	6.5	6.5

Como se pode ver na tabela 14 os cimentos 1 a 4 apresentam um pH muito baixo compreendido entre 3 e 3.5, ao contrario dos cimentos 5 e 6, que apresentam um pH compreendido entre 6.5 e 7.

O pH obtido nos cimentos de brushite (1 a 4) é um pH baixo, mas esperado, uma vez que a reacção deste tipo de cimentos dá-se a $\text{pH} < 4.2$ [3].

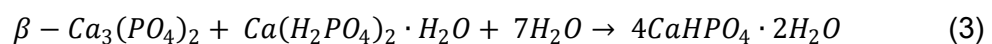
Mais ainda, os resultados de pH dos cimentos de brushite estão em concordância com os ensaios de citotoxicidade, uma vez que o pH muito ácido conduz à morte das células. Pode-se concluir que a citotoxicidade dos cimentos para as células foi devido ao valor de pH dos mesmos quando as células foram colocadas em contacto com estes. Na presença dos cimentos de sulfato de cálcio que possuem pH neutro, as células mantiveram-se mais viáveis, o que foi confirmado pelos ensaios de citotoxicidade e pela visualização de algumas células em contacto com os cimentos através de microscopia óptico.

É de referir que o método utilizado para a determinação do pH não é muito precisa, porém os resultados foram indicativos para confirmar os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade. Futuramente recomenda-se a utilização de métodos de determinação de pH com maior precisão.

IV. DISCUSSÃO

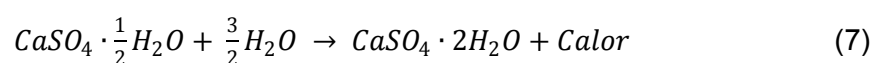
A aplicabilidade de cimentos injectáveis de solidificação espontânea (*self-setting*) é bastante dependente da sua reacção de cura característica, que influencia tanto a injectabilidade, assim como o *setting time*. Uma vez que os cimentos de brushite tradicionais possuem pequenos tempos de cura e fraca injectabilidade, o que limita em muito a aplicação destes na área clínico. Vários ensaios foram realizados para contornar este problema, passando pelo uso de vários aditivos, como o uso de retardantes (por exemplo, sulfatos, citratos ou pirofosfatos) que se verificaram bastante eficazes no sentido, pois contribuíram para alterar o tempo de cura material [15, 32, 34-35].

Os cimentos à base de brushite são cimentos hidráulicos, isto é, a água é um reagente da reacção de *setting* como se pode ver pela equação 3 da reacção:



Sem a introdução de retardantes, os cimentos de brushite endurecem instantaneamente e restringem a sua aplicação em meio clínico. A adição de iões de citrato de concentrações entre 0.25M – 1M a estes cimentos é suficiente para aumentar o IST do cimento para > 5 min, o que é muito vantajoso para aplicações clínicas [32].

Os cimentos de sulfato de cálcio são cimentos muito parecidos aos cimentos de brushite. A reacção de endurecimento só é possível através da água, pois é através de uma reacção de hidratação que ocorre uma recristalização do material e consequentemente o endurecimento do mesmo [1], como se pode ver na equação 7 da reacção:



Através da DRX determinou-se a composição de todos os cimentos, sendo que o principal constituinte dos cimento 1 a 4 foi a brushite o que está de acordo com a

equação 3 que justifica a reacção. Já o principal constituinte dos cimentos 5 e 6 foi o sulfato de cálcio o que está de acordo com a equação 7. Mais ainda, as duas gamas de radiação gama aplicadas às amostras não afectaram a estrutura dos cimentos como se pode verificar pelos espectros de DRX (ver figuras 16 e 17).

Recorrendo aos métodos de Taguchi, foi demonstrado que o parâmetro mais influente na determinação do *setting time* próximo de 15 minutos dos cimentos ósseos desenvolvidos, é a concentração de citrato de trisódio 0,5M. A contribuição da concentração de citrato de trisódio 0,5M foi determinada através da ANOVA como sendo de 69,46%, com um grau de confiança superior a 95%. O factor (B) quantidade de aditivo - CSD afecta ligeiramente o *setting time*, sendo a respectiva contribuição de 1,26% com um grau de confiança inferior a 90%. Os restantes factores, o factor (A) rácio de β -TCP/ MCMP e o factor (C) quantidade de líquido, com base nos respectivos níveis seleccionados previamente, não influenciam significativamente o objectivo pretendido.

Com base na informação obtida pelos métodos de Taguchi, confirma-se que o uso do citrato de trisódio como retardante teve um efeito bastante positivo nos tempos de cura dos cimentos de brushite, pois os iões citrato provocam uma baixa taxa de hidratação e conseqüentemente retardam a formação dos cristais de brushite. Os diferentes cimentos de brushite sem aditivos – cimentos 1 e 3 mostraram um *setting time* final de 7,7 min e 12 min, respectivamente. Já os cimentos de brushite com aditivo de sulfato de cálcio (cimentos 2 e 4) mostram um *setting time* com uma duração de 13 e 15,6 min, respectivamente. O CSD foi introduzido como aditivo nos cimentos de brushite, pois este factor também contribui para a optimização do *setting time* deste [28], e induz macroporosidade nos cimentos de brushite quando colocados *in situ*, pois o CSD tem uma rápida reabsorção [1]. Já os cimentos de sulfato de cálcio (cimento 5 e 6) mostraram um o *setting time* de 11 e 15,3 min, respectivamente. Todos os valores obtidos do *setting time* estão de acordo com as equações 8 e 9 tornado estes cimentos com tempos adequados para aplicações clínicas.

$$3 \leq IST < 8 \quad (8)$$

$$FST \leq 15 \quad (9)$$

O modo de aplicação do cimento é um parâmetro muito importante no mundo clínico, sendo que um cimento com uma elevada percentagem de injectabilidade é uma mais-valia. A injectabilidade varia significativamente com a concentração e a composição do componente líquido e como do rácio líquido/sólido. Os cimentos como maior

percentagem de injectabilidade (ver figura 14) foram os cimentos 4 (~94%), no caso dos cimentos de brushite, e o cimento 6 (~ 95%), no caso dos cimentos de sulfato de cálcio. Já a injectabilidade de cimentos de apatite descrita na literatura está compreendida entre 70% e 95% usando também aditivos na sua composição [32].

Tendo em consideração a aplicabilidade clínica, o cimento deve ser aplicado antes do IST e deve ser capaz de ser injectado durante a operação. Os resultados obtidos para os cimentos 4 (cimento de brushite) e 6 (cimento de sulfato de cálcio) indicam que estes são materiais injectáveis e potencialmente bons para a reparação de defeitos ósseos.

A interacção entre o biomaterial e as células *in vitro* é um critério útil na avaliação do novo biomaterial. É sabido que o MCMP é ácido, e que a colocação da pasta de β -TCP/MCMP pode resultar em pH ácido no ambiente, o que é indesejável clinicamente [21]. Os resultados obtidos revelaram que os cimentos de brushite são citotóxicos, o que não está de acordo com a literatura, onde os cimentos de brushite são descritos como biocompatíveis [18].

A citotoxicidade dos cimentos 1 a 4 pode ser causada pelos baixos valores de pH obtido após 2 minutos do início da mistura, uma vez que não se esperou tempo suficiente para que o pH da pasta subisse para valores que não afectem a viabilidade celular. Estes valores baixos de pH estão de acordo com a literatura, uma vez que a reacção da brushite começa com pH baixo e tende a subir à medida que a reacção de *setting* se prolonga [32, 36]. Já os cimentos 5 e 6 (cimento de sulfato de cálcio) obtiveram uma absorvância superior ao controlo negativo, o que indica que as células se mantiveram viáveis. O que se verificou também a microscópio óptico, na observação de algumas células vivas. O resto dos cimentos produzidos não passaram no teste da citotoxicidade, sendo necessário futuros estudos para documentar melhor os resultados obtidos.

Em aplicações clínicas, os cimentos ósseos são requeridos para fornecer suporte mecânico adequado a curto e a longo prazo no local do defeito, sendo importantes no processo de cura do osso. Assim, os ensaios de resistência à compressão, realizados em provetes de dimensões 10 x10 x 10 mm, foram levados a cabo 48h após a mistura e os valores obtidos para cada cimento são apresentados na figura 15. Os valores para a tensão de rotura à compressão para os cimentos de brushite (cimentos 1 – 4) estão compreendidos numa gama de 4.8 – 12.5 MPa. Já os cimentos de sulfato de cálcio são cimentos com fraca resistência à compressão [1], que obtiveram valores entre 3,8 e 4 MPa (cimentos 5 e 6, respectivamente). Como não existe um consenso geral no que diz respeito ao valor da resistência à compressão do osso trabecular, os

valores encontrados mais frequentemente na literatura para a resistência à compressão do osso trabecular variam entre 5-10 MPa [2] ou de 2 – 12 MPa [37]. Com base nessa informação podemos concluir que os cimentos desenvolvidos possuem valores que estão de acordo com os valores do osso trabecular, mas a aplicabilidade destes cimentos teria de ser acompanhada de estruturas de fixação internas, como parafusos, arames, placas, etc [38], uma vez que os cimentos de brushite são cimentos fracos quando comparados com os cimento de apatite [3, 21].

A resistência à compressão dos cimentos de brushite descrita na literatura é na gama de 1 – 24 MPa [19]. No entanto, deve-se ter em atenção quando se comparam valores de resistência mecânica na literatura, uma vez que existem sempre diferenças no método de teste e nas condições, pois uma forte compactação do cimento induz elevados valores de resistência à compressão [32]. Mais ainda, a resistência à compressão de cimentos feitos com citrato de sódio com concentrações entre 0,25 – 0,5 M está descrita na literatura na gama entre 12 e 13 MPa, além disto, uma aumento da concentração do citrato de sódio resulta numa forte diminuição da resistência à compressão para um valor de 2 MPa no caso de soluções de 1 M. Em contraste, a resistência mecânica dos cimentos formado com ácido cítrico é quase independente da sua concentração, tendo valores aproximadamente de 13 MPa [32].

De referir ainda que a introdução do sulfato de cálcio como aditivo nos cimentos de brushite, leva a uma redução da resistência à compressão. Esta redução está relacionada com a fraqueza dos cimentos de sulfato de cálcio também verificada.

V. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, foram desenvolvidos com sucesso 6 cimentos diferentes – cimentos de brushite formados através do sistema tradicional β -TCP/MCMP com ou sem adição de CSD, e os cimentos sulfato cálcio foram formados através do CSH. Todos os cimentos mostram um *setting time* adequado para aplicações clínicas. No que diz respeito à injectabilidade, os cimentos com maior percentagem foram os cimentos 4 – β -TCP/MCMP/CSD e os cimentos 6 – CSH/CSD, com percentagens superiores a 90%.

Para obter estes resultados, o método de Taguchi foi essencial, pois revelou que os factores que influenciam a obtenção de um *setting time* próximo de 15 minutos foram os factores B (quantidade de aditivo - CSD) e D (quantidade/concentração de citrato de trisódio na componente líquida). Estes factores tiveram uma contribuição significativa de 11,02% e 79,22%, respectivamente.

Os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade *in vitro* para os cimentos de brushite não vão ao encontro dos resultados publicados na literatura para estes tipos de cimentos. É possível que a citotoxicidade obtida nos cimentos se deve ao valor de pH inicial que induziu a morte das células. Novos testes de citotoxicidade devem ser realizados para verificar os resultados obtidos.

Os resultados obtidos nos ensaios de resistência à compressão vão ao encontro com os valores descritos para o osso trabecular. Na literatura, os valores de resistência à compressão de cimentos de brushite são superiores aos obtidos neste estudo. Uma possível razão que justifique uma baixa resistência de compressão em todos os cimentos está relacionada com o rácio líquido/sólido utilizado, pois estão descritos na literatura valores de resistência à compressão bem superior quando usado um rácio líquido/sólido mais baixo [39]. Mas ao se alterar o rácio líquido/sólido pode-se afectar a injectabilidade, sendo que este estudo deverá ser realizado futuramente.

Os resultados obtidos apresentam-se como ponto de partida para futuros melhoramentos dos cimentos produzidos. A principal desvantagem dos cimentos

desenvolvidos está relacionada com propriedades mecânicas apresentadas que são insuficientes para aplicações clínicas que envolvam suporte e fixação de estruturas ao osso. Estudos futuros serão necessários para melhorar estas propriedades dos cimentos.

Futuramente, os estudos complementares que devem ser feitos incluem:

- Estudar o efeito do rácio líquido/sólido no *setting time*, na resistência à compressão e na injectabilidade, com o intuito de se determinar o rácio ideal.
- Implementar vários métodos de mistura do cimento, tais como, mistura a vácuo, centrifugação ou mistura mecânica, no sentido de melhorar a moldabilidade e injectabilidade a baixos rácios L/P.
- Medir o pH das pastas através de métodos com maior precisão e ao longo do tempo.
- Estudar o efeito das doses de radiação no *setting time*, na injectabilidade e na resistência à compressão dos cimentos, com o intuito de conhecer melhor o efeito da esterilização nos cimentos.
- Avaliar a adequação dos cimentos como sistemas de entrega controlada de fármacos, factores de crescimento, etc, que estimulem a reparação de defeitos ósseas.
- Avaliar a biocompatibilidade dos cimentos *in vivo*.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nilsson, M. (2003). *Injectable Calcium sulphate and Calcium Phosphate bone substitutes*. Department of Orthopaedics, Lund University, Faculty of Medicine, Lund, Sweden.
2. Mistry, A.S. and Mikos, A.G. (2005). Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **94**, 1-22.
3. Dorozhkin, S.V. (2008). Calcium orthophosphate cements for biomedical application. *Journal of Materials Science.* **43**(9), 3028-3057.
4. Nather, A. (2005). Bone grafts and bone substitutes : basic science and clinical applications. Vol. XVII, 592 p. Hackensack, N.J.: World Scientific.
5. Dorozhkin, S.V. (2007). Calcium orthophosphates. *Journal of Materials Science.* **42**(4), 1061-1095.
6. Lewis, G. (1997). Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res.* **38**(2), 155-82.
7. Chow, L.C. (2009). Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J.* **28**(1), 1-10.
8. Lewis, G. (2006). Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: State-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials.* **76B**(2), 456-468.
9. Harper, E.J. and Bonfield, W. (2000). Tensile characteristics of ten commercial acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res.* **53**(5), 605-16.
10. Charnley, J. (1960). Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br.* **42-B**, 28-30.
11. Vazquez, B., et al. (2002). Characterization of new acrylic bone cements prepared with oleic acid derivatives. *J Biomed Mater Res.* **63**(2), 88-97.
12. Driessens, F.C.M., et al. (1993). Formulation and Setting Times of Some Calcium Orthophosphate Cements - a Pilot-Study. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine.* **4**(5), 503-508.

13. Khairoun, I., et al. (1998). Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. **9**(8), 425-428.
14. Khairoun, I., et al. (1998). Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. **9**(11), 667-671.
15. Bohner, M., Gbureck, U., and Barralet, J.E. (2005). Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*. **26**(33), 6423-9.
16. Bohner, M. (2000). Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. **31 Suppl 4**, 37-47.
17. Habib, M., et al. (2010). Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste. Part II: particle separation study. *Acta Biomater*. **6**(1), 250-6.
18. Theiss, F., et al. (2005). Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*. **26**(21), 4383-94.
19. Gbureck, U., et al. (2005). Factors influencing calcium phosphate cement shelf-life. *Biomaterials*. **26**(17), 3691-7.
20. Ginebra, M.P., et al. (1997). Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J Dent Res*. **76**(4), 905-12.
21. Huan, Z. and Chang, J. (2009). Novel bioactive composite bone cements based on the beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate monohydrate composite cement system. *Acta Biomater*. **5**(4), 1253-64.
22. Xu, H.H., et al. (2006). Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials*. **27**(24), 4279-87.
23. Burguera, E.F., Xu, H.H.K., and Sun, L.M. (2008). Injectable calcium phosphate cement: Effects of powder-to-liquid ratio and needle size. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. **84B**(2), 493-502.
24. Bohner, M. and Baroud, G. (2005). Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials*. **26**(13), 1553-1563.
25. Habib, M., et al. (2008). Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste. *Acta Biomater*. **4**(5), 1465-71.
26. Chow, L.C., et al. (2000). Diametral tensile strength and compressive strength of a calcium phosphate cement: effect of applied pressure. *J Biomed Mater Res*. **53**(5), 511-7.
27. Zhang, Y. and Xu, H.H. (2005). Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone cement. *J Biomed Mater Res A*. **75**(4), 832-40.

28. Ikenaga, M., et al. (1998). Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res.* **40**(1), 139-44.
29. Heini, P.F. and Berlemann, U. (2001). Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J.* **10 Suppl 2**, S205-13.
30. Ratner, B.D. (1996). Biomaterials science : an introduction to materials in medicine. Vol. XI, 484 p. San Diego: Academic Press.
31. Roy, R.K. (1990). A primer on the Taguchi method. Vol. xiii, 247 p. Dearborn, Mich.: Society of Manufacturing Engineers.
32. Barralet, J.E., Grover, L.M., and Gbureck, U. (2004). Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II: hypodermic injection and strength improvement of brushite cement. *Biomaterials.* **25**(11), 2197-203.
33. Nilsson, M., et al. (2002). Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement. *J Biomed Mater Res.* **61**(4), 600-7.
34. Alkhraisat, M.H., et al. (2008). Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cements. *Acta Biomater.* **4**(3), 664-70.
35. Tamimi-Marino, F., et al. (2007). Increase of the final setting time of brushite cements by using chondroitin 4-sulfate and silica gel. *J Mater Sci Mater Med.* **18**(6), 1195-201.
36. Tamimi, F., et al. (2009). Minimally invasive maxillofacial vertical bone augmentation using brushite based cements. *Biomaterials.* **30**(2), 208-216.
37. Cama, G., et al. (2009). Preparation and properties of macroporous brushite bone cements. *Acta Biomater.* **5**(6), 2161-8.
38. Ryf, C., et al. (2009). A New Injectable Brushite Cement: First Results in Distal Radius and Proximal Tibia Fractures. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery.* **35**(4), 389-396.
39. Pittet, C. and Lemaitre, J. (2000). Mechanical characterization of brushite cements: a Mohr circles' approach. *J Biomed Mater Res.* **53**(6), 769-80.
40. Albers, A.P.F., Melchiades, F. G., Machado, R., Baldo, J. B., Boschi, A. O. (2002). Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. *Cerâmica.* **48**(305), 34-37.
41. Hammond, C. (2009). The basics of crystallography and diffraction. 3rd ed. International Union of Crystallography texts on crystallography. Vol. XIII, 432 p. Oxford ; New York: Oxford University Press.

VII. ANEXOS

1. DIFRACÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Dentre as várias técnicas de caracterização de materiais, a técnica de difracção de raios X é a mais indicada na determinação das fases cristalinas presentes em materiais cerâmicos. Isto é possível porque na maior parte dos sólidos (cristais), os átomos ordenam-se em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X [1, 40].

Ao incidir um feixe de raios X em num cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenómeno de difracção. A difracção de raios x ocorre segundo a Lei de Bragg (Equação A), a qual estabelece a relação entre o ângulo de difracção e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina) [41]:

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (A)$$

onde n – é um número inteiro

λ – o comprimento de onda dos raios x

d – distância interplanar (especifica de cada substância)

θ – ângulo de incidência do feixe

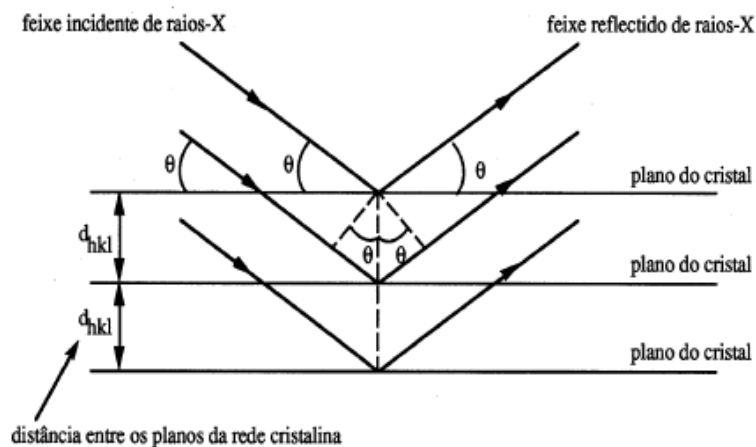


Figura 21 Acção dos feixes de raios X sobre os planos da rede cristalina (adaptado de [41]).

Dado que para dado comprimento de onda do feixe de Raios X, a Lei de Bragg só se verifica para um certo ângulo θ de difracção, resulta da própria Lei que o valor de d (distancia interplanar) fica inequivocamente determinado, ou seja, a reflexão é selectiva e cada valor de d (correspondente a uma família de planos reticulares) corresponde um ângulo θ específico [41].

Então, tal como numa impressão digital, a identificação da espécie cristalográfica é feita por comparação directa com fichas de difracção previamente conhecidas e específicas de cada grupo mineral (publicações do Joint Committee for Powder Diffraction Standards – JCPDS). Existe também um software específico para identificação em computador, com apoio numa base de dados bastante completa. A identificação das espécies cristalinas é feita por comparação sistemática da posição e intensidade de todos os picos de difracção do difractograma da espécie desconhecida com os do difractograma padrão [41].

Dentro as vantagens da técnica de difracção de raios X para a caracterização de fases, destacam-se a simplicidade e rapidez do método, a fidelidade dos resultados obtidos (pois o perfil de difracção obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases [40].

Todavia, a utilidade desta ferramenta de análise é muito limitada em materiais de estrutura amorfa, ou quase amorfa, já que por razões óbvias, as reflexões em planos cristalinos praticamente não se verificam [41].