



Departamento de Física

Produção de Cimentos ósseos à base de fosfato de cálcio

Patrícia Alexandra de Oliveira Mansos

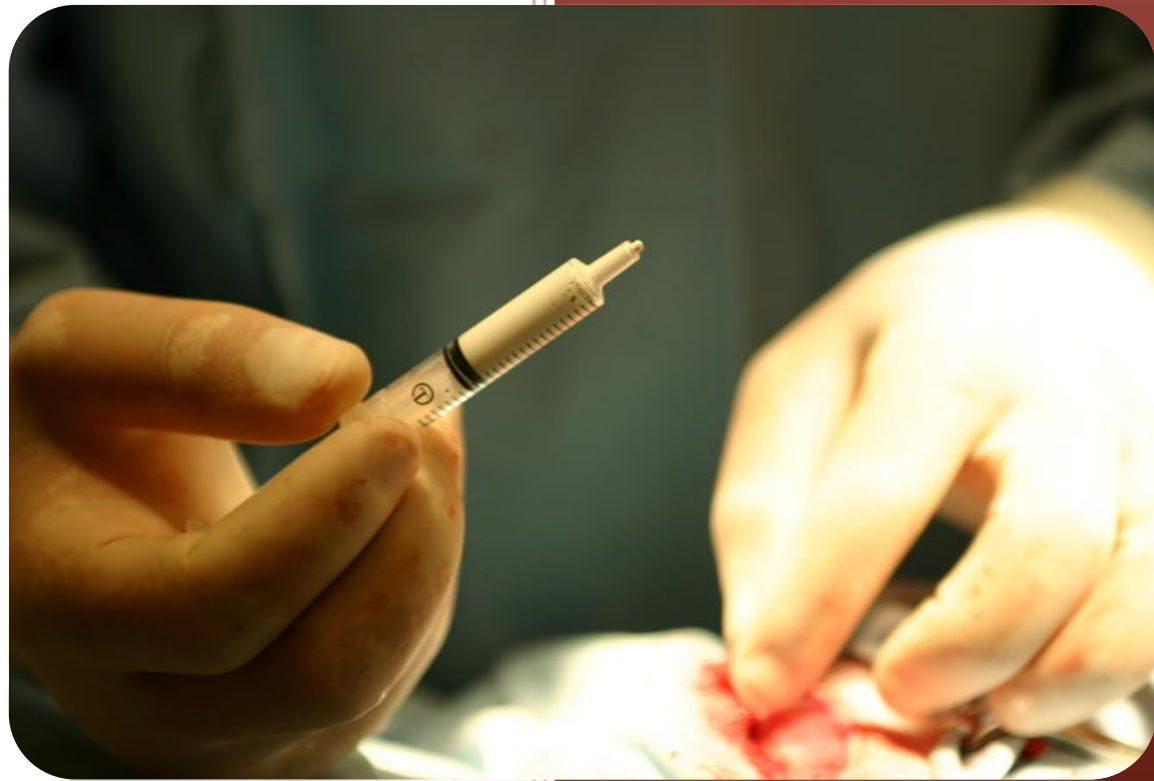
Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadores científicos: Professor Doutor João Paulo Borges
Professor Doutor Eduardo Pires

Lisboa
2008

Patrícia Alexandra de Oliveira Mansos

Produção de cimentos ósseos à base de Fosfato de Cálcio



Lisboa
2008

"No amount of experimentation can ever prove me right; a single experiment can prove me wrong."

- Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram e incentivaram nas várias etapas deste trabalho, em especial:

Aos meus orientadores, Professor Doutor João Paulo Borges e Professor Doutor Eduardo Pires que apesar do muito trabalho e das suas vidas preenchidas estiveram sempre presentes quando mais necessitei.

Ao Hugo Lisboa que iniciou este trabalho comigo e que sempre esteve disponível para ajudar, partilhando todo o seu conhecimento e experiência comigo.

À Sofia Prata, a quem eu também devo muito, principalmente em toda a parte do trabalho que envolveu a experimentação *in vivo*.

Sem querer deixar ninguém de parte, agradeço aos demais presentes na equipa CERAMED, que sempre me trataram com muito carinho, estando sempre prontos a ajudar, dando força, conselhos, partilhando experiências e pelos quais eu tenho uma grande amizade.

Ao Henrique Armés, pois ele tornou possível toda a parte da experimentação *in vivo*, e pelo qual eu tenho um grande apreço.

Ao Nuno Ribeiro, ao professor Gabriel Feio, e ao Professor Vasco Rato por todo o apoio demonstrado e vontade em ajudar.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, pelo constante apoio pois, apesar da distância, sempre me confortaram ajudando a seguir em frente nas etapas mais difíceis, não só neste trabalho como também durante os últimos 5 anos da minha vida.

Por fim, mas não menos importante agradeço ao António Vicente, ao qual eu não poderia pedir mais, tendo sido incansável nestes últimos tempos dando-me todo o seu apoio, carinho e ao qual eu só tenho agradecer por toda a paciência para comigo.

RESUMO

Os cimentos fosfato de cálcio (CPC) têm vindo a despertar cada vez mais interesse por apresentarem vantagens em relação a outros materiais, tais como o cimento acrílico ou os blocos cerâmicos, usualmente utilizados na reparação óssea. Estes são constituídos por um ou mais fosfato de cálcio, e uma solução líquida, originando uma pasta que endurece rapidamente, e que resulta num material cristalino, biocompatível e osteocondutor.

O objectivo deste estudo foi investigar algumas das propriedades de um novo CPC à base de β -Fosfato tricálcico (β -TCP) que se caracteriza por incluir na sua fase líquida, além de um ácido carboxílico, um aditivo polimérico, o hidroxipropilo quitosano (HPCS), cuja síntese foi otimizada por variação dos parâmetros temperatura e duração da reacção.

As propriedades mecânicas e de manuseio, assim como o produto final do CPC foram estudados efectuando-se testes de compressão, flexão, tempo de presa, injectabilidade e difracção de raios-X (DRX). Além disto investigou-se o comportamento *in vitro* e *in vivo* realizando-se testes de citotoxicidade e implantando-se o CPC no fémur de 8 coelhos durante um período de 4 meses.

Verificou-se que o CPC produzido neste trabalho é um cimento de brushite, que endurece em 10 min, conferindo tempo suficiente para a colocação da pasta numa seringa e sua fácil injeção, e que apresenta uma resistência à compressão até 9MPa e flexão até 6MPa, sendo por isso aceitável para aplicações cirúrgicas, em locais não sujeitos a grandes tensões. Por outro lado verificou-se que apesar da sua aparente toxicidade este é bem tolerado *in vivo*, resultando num material biocompatível.

Palavras chave: Cimento fosfato de cálcio, brushite, substitutos ósseos, biocompatível.

ABSTRACT

The discovery of calcium phosphate cements (CPC) has opened up a new era in medical applications by showing advantages to other materials, usually used for bone repair, like acrylic cements or ceramic blocks, also used for bone defects. CPC are constituted by a solid phase, containing one or more calcium phosphate, and a liquid solution. When mixed, a paste is formed which rapidly sets, resulting in a crystalline precipitate similar to the inorganic part of the bone, given rise to a biocompatible and osteoconductive material.

The aim of this study was to investigate some of the properties of a new cement based on β -tricalcium phosphate (β -TCP), that includes in its liquid phase, in addition to the carboxylic acid, a polymer additive called hydroxypropyl chitosan (HPCS), whose synthesis has been optimized by changes in temperature and duration parameters of the reaction.

The mechanical properties and handling of CPC final product has been study by compressive and flexural tests, setting time, injectability and X-ray diffraction (DRX). In addition the in vitro and in vivo behavior was also investigated, through citotoxicity test and the implantation of the CPC in the femur of 8 rabbits during 4 months.

We noted that the CPC produced in this study is a brushite cement, that sets in 10 min, giving enough time for placing the paste in a syringe and its easy injection. It presents a resistance to compression until 9MPa and flexion until 6MPa, therefore acceptable for surgical applications in locations under major tensions, and despite its apparent toxicity it is well tolerated in vivo, resulting in a biocompatible material.

Keywords: calcium phosphate cement, brushite, bone substitute, biocompatible.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α, β -TCP	α, β – fosfato tricálcico	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
ACP	<i>Amorphous calcium phosphate</i> – fosfato de cálcio amorfo	PD	Polidispersão
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>	PEG	Polietileno glicol
Ca/P	Razão Cálcio Fósforo	PHA	<i>Precipitated hydroxyapatite</i> – hidroxiapatite precipitada
CaP	<i>Calcium phosphate</i> – Fosfato de cálcio	PMMA	Polimetacrilato de metilo
CAP	<i>Carbonated apatite</i> – apatite carbonatada; Dahlite	PVA	Álcool polivinílico
CaO	Óxido de Cálcio	rf	Radiofrequência
Ca(OH)	Hidróxido de Cálcio	RMN	Ressonância magnética nuclear
CDHA	<i>Calcium-deficient hydroxyapatite</i> – hidroxiapatite deficiente em cálcio	rpm	Rotações por minuto
CENIMAT	Centro de Investigação de Materiais da FCT	TCP	<i>Tricalcium fosfate</i> – Fosfato tricálcico (α, β)
COOCa	Carboxilato de Cálcio	t_f	Tempo final de presa
CPC	<i>Calcium phosphate cement</i> – Cimento fosfato de cálcio	t_i	Tempo inicial de presa
CS	Quitosano	TTCP	<i>Tetracalcium phosphate</i> – fosfato tetracálcico; Hilgenstockite
CT	Tempo de coesão		
DCP	<i>Dicalcium phosphate</i> – fosfato dicálcico		
DCPA	<i>Dicalcium phosphate anhydrous</i> – fosfato dicálcico anidro; monetite		
DCPD	<i>Dicalcium phosphate dihydrate</i> – fosfato dicálcico dihidratado; brushite		
DO	Densidade óptica		
DS	Grau de substituição		
FA	<i>Fluorapatite</i> – fluoroapatite		
FCT	<i>Faculdade de Ciências e Tecnologia</i>		
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> – Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier		
GPC/SEC	<i>Gel permeation chromatography/Size exclusion chromatography</i> – Cromatografia líquida de exclusão molecular		
H₃PO₄	Ácido fosfórico		
HA	Hidroxiapatite		
HPCS	Hidroxiopropilo quitosano		
Hr	Humidade relativa		
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>		
L/S	Razão líquido sólido		
MMA	Metil metacrilato		
MCPA	<i>Monocalcium phosphate anhydrous</i> – fosfato monocálcico anidro		
MCPM	<i>Monocalcium phosphate monohydrate</i> – fosfato monocálcico monohidratado		
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio		
M_w	Peso molecular médio em peso		
NaH₂PO₄	Dihidrogenofosfato de sódio		
Na₂HPO₄	Hidrogenofosfato dissódico		
NaOH	Hidróxido de Sódio		
Na₂PO₄	Fosfato dissódico		
OCP	Fosfato octacálcio		
OrtoF	Ortofosfato		

UNIDADES

cm	Centímetros
G	Gramas
mm	Milímetro
S	Segundos
Δ	Desvio químico
rpm	Rotações por minuto
cp	Centipoise
MPa	Mega Pascal
kN	kilo-Newtons
N	Newtons

PREÂMBULO

A presente tese de mestrado realiza-se no âmbito do curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL), e foi realizada na empresa de acolhimento CERAMED e em colaboração o Hospital Veterinário de São Bento.

A **CERAMED** (cerâmicos para aplicações médicas) foi criada em janeiro de 2005, surgindo na sequência de um projecto desenvolvido pelo CATIM (Centro de Apoio Tecnológico à Indústria Metalomecânica) em 2003, onde iniciou uma unidade de revestimentos de implantes ortopédicos e dentários – o CATIMedical. Com o sucesso desta unidade de produção, e aumento da dimensão dos negócios, o CATIMedical começava a afastar-se do objectivo do CATIM, enquanto Centro Tecnológico. Daí sentiu-se necessidade de criar uma nova empresa inteiramente dedicada a esta parte comercial – a CERAMED. Desde então, esta desenvolve a sua actividade na área dos biomateriais e tem vindo a crescer. Actualmente é especializada em revestimentos para dispositivos médicos: revestimentos de implantes médicos por APS, revestimentos de instrumentos médicos por PVD e revestimentos orgânicos, anodização e coloração do titânio, possuindo também uma área de investigação e desenvolvimento de novos produtos.

O Hospital Veterinário de São Bento iniciou a sua actividade em 1997 e desde essa data tem pautado a sua evolução por uma progressiva especialização dos seus quadros, com especial enfoque nas diversas vertentes da clínica de animais de companhia.

Com um serviço de atendimento permanente de 24 horas dia, conjuga a superior vocação e qualificação dos seus colaboradores com a dotação actualizada dos mais diversos meios e equipamentos complementares de diagnóstico, visando proporcionar aos seus clientes um serviço de superior qualidade, e sempre orientado por uma prática constante dos bons princípios médico-veterinários.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	IV
PREÂMBULO	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	X
Capítulo 1. Enquadramento do problema e conteúdo da dissertação	1
1.1 Enquadramento do problema	2
1.2 Conteúdo da dissertação	4
Capítulo 2. Introdução	1
2.1 Dos cimentos acrílicos aos cimentos à base de fosfato de cálcio	6
2.2 A química dos cimentos fosfato de cálcio	8
2.2.1 Componentes dos Cimentos Fosfatos de cálcio	8
2.2.2 Solubilidade	10
2.2.3 Produtos Finais	12
2.2.3.1 Apatite	12
2.2.3.2 Brushite.....	15
2.3 Propriedades básicas do cimento.....	18
2.3.1 Preparação do cimento	18
2.3.2 Propriedades mecânicas.....	19
2.3.3 Propriedades de manuseamento	23
2.4 Aplicações médicas.....	28
2.4.1 Campo ortopédico	28
Capítulo 3. Caracterização dos materiais	30
3.1 Ensaio de Compressão	31
3.2 Flexão.....	32
3.3 Injectabilidade	34
3.4 Tempo de presa	35
3.5 Viscosidade	37
3.6 Espectroscopia de infravermelhos	41
3.7 Ressonância magnética nuclear (¹ H-RMN).....	42
3.8 Difracção de raios-x (DRX)	47
3.9 Cromatografia líquida de exclusão molecular (GPC/SEC).....	48
3.10 Citotoxicidade.....	49
3.11 Ensaio <i>In vivo</i>	50

Capítulo 4. Composição do CPC em estudo	51
4.1 Composição da fase sólida	52
4.2 Composição da fase líquida	52
4.2.1 Agente retardador:	52
4.2.2 Agente estruturante:	53
Capítulo 5. Produção e caracterização do HPCS e da fase líquida do CPC	54
5.1 Procedimento Experimental da síntese de HPCS	55
5.2 Caracterização do hidroxipropilo quitosano	55
5.2.1 FTIR	56
5.2.2 GPC	57
5.2.3 H-NMR	58
5.3 Caracterização da fase líquida	59
5.3.1 Viscosidade	59
Capítulo 6. Produção e caracterização do CPC	60
6.1 Procedimento experimental da produção do CPC	61
6.2 Caracterização do CPC	61
6.2.1 Tempo de presa	61
6.2.2 Resistência à compressão	62
6.2.3 Resistência à flexão	64
6.2.4 Injectabilidade	66
6.2.5 DRX	67
6.2.6 Citotoxicidade	68
Capítulo 7. Vertebroplastia	72
7.1 Procedimento:	74
7.2 Resultados	76
Capítulo 8. Testes <i>in vivo</i>	77
8.1 Técnica cirúrgica	79
8.2 Procedimento cirúrgico	80
8.3 Resultados	82
8.4 Análise radiográfica	83
8.5 Resistência mecânica	85
8.6 Inspeção visual do osso	86
8.7 Produto final	89
8.8 Análises histológicas	89
Capítulo 9. Caracterização mecânica <i>in vitro</i>	90
Capítulo 10. Conclusão e Trabalhos Futuros	94
BIBLIOGRAFIA	99
Anexo A. Protocolos de registo experimental	105

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – DIAGRAMA DE SOLUBILIDADE DE VÁRIOS CAP EM ÁGUA. A SOLUBILIDADE É EXPRESSA NA QUANTIDADE TOTAL DE IÕES DE CÁLCIO PRESENTES NA SOLUÇÃO (LOG[CA]) E PH DA SOLUÇÃO. OS DADOS DE SOLUBILIDADE FORAM RETIRADOS POR VEREECKE E LEMAÎTRE [22].....	16
FIGURA 2.2 – ESQUEMA GERAL DE PREPARAÇÃO DE UM CPC [19]	18
FIGURA 2.3 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO <i>SETTING TIME</i> [20]	24
FIGURA 3.1 – EXEMPLO DO ENSAIO DE COMPRESSÃO NUM DOS PROVETES DE CPC.	31
FIGURA 3.2 – CURVA TÍPICA RESULTANTE DO ENSAIO DE COMPRESSÃO DE UM PROVETE	31
FIGURA 3.3 – MAQUINA UNIVERSAL DE ENSAIOS MECÂNICOS.....	31
FIGURA 3.4 – CONSOLA E COMPUTADOR DE APOIO.....	31
FIGURA 3.5 – ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO PARA OS ENSAIOS DE FLEXÃO EM 3 PONTOS	32
FIGURA 3.6 – EXEMPLO DO ENSAIO DE FLEXÃO NUM DOS PROVETES DE CPC.	33
FIGURA 3.7 – CURVA TÍPICA RESULTANTE DO ENSAIO DE FLEXÃO DE UM PROVETE.	33
FIGURA 3.8 – ESQUEMA DO SISTEMA UTILIZADO PARA OS ENSAIOS DE INJECTABILIDADE.	35
FIGURA 3.9 – VISTA DE FRENTE MOSTRANDO A MONTAGEM PARA A DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE FIM DE PRESA [106].	36
FIGURA 3.10 – COTAS DA AGULHA COM ACESSÓRIO PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE FIM DE PRESA [106].	36
FIGURA 3.11 – ACÇÃO DE UMA FORÇA DE CISALHAMENTO APLICADA NUM FLUIDO [107].	37
FIGURA 3.12 – TIPOS DE CURVAS DE FLUXO PARA DIFERENTES TIPOS DE COMPORTAMENTO REOLÓGICO: A) ESCALA ARITMÉTICA, B) ESCALA LOGARITMICA. N, NEUTONIANO; P, PSEUDO-PLÁSTICO; B-P, <i>BINGHAM-PLASTIC</i> (INFINITAMENTE PSEUDOPLÁSTICO); D, DILATANTE [107].	38
FIGURA 3.13 – CURVAS DE VISCOSIDADE CORRESPONDENTES A DIFERENTES COMPORTAMENTOS REOLÓGICOS: N, NEUTONIANO; P, PSEUDO-PLÁSTICO; D, DILATANTE.	39
FIGURA 3.14 – COMPORTAMENTO DOS FLUIDOS DEPENDENTES DO TEMPO [107].....	40
FIGURA 3.15 – VISCOSÍMETRO DE BROOKFIELD	40
FIGURA 3.16 – TIPOS DE VIBRAÇÃO DA MOLÉCULA DE METANAL	41
FIGURA 3.17 – EQUIPAMENTO DE FTIR	42
FIGURA 3.18 – POSSÍVEIS ESTADOS DE ENERGIA DO PROTÃO AO SER COLOCADO SOB UM CAMPO MAGNÉTICO	44
FIGURA 3.19 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE COMO SE OBTÊM OS ESPECTROS CARACTERÍSTICOS DE CADA ELEMENTO	44
FIGURA 3.20 – POSIÇÕES DOS SINAIS CORRESPONDENTES A CADA ESPÉCIE DE PROTÃO EM RELAÇÃO AO TMS	46
FIGURA 3.21 – ESPECTRÓMETRO DE RMN DO CENIMAT	46
FIGURA 3.22 – EQUIPAMENTO DE GPC/SEC	
FIGURA 4.1 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO HPCS ($x > y$; $x+y = 1$).	53
FIGURA 5.1 – COMPARAÇÃO ENTRE O ESPECTRO DE FTIR DO CS E DO HPCS P4.....	57
FIGURA 5.2 – CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE HPCS.....	57
FIGURA 5.3 – ESPECTRO DE H-RMN DO P4 DO HPCS.....	58
FIGURA 5.4 – FIGURA REPRESENTATIVA DE UM HPCS COM DS = 5,2 [115].	58
FIGURA 5.5 – GRÁFICO DE VISCOSIDADE DAS DIFERENTES FASES LÍQUIDAS DO CPC	59
FIGURA 6.1a – VISTA SUPERIOR DO MOLDE.....	62
FIGURA 6.1b – VISTA EM PERSPECTIVA DO MOLDE	62
FIGURA 6.1c – CORTE VERTICAL DO MOLDE	62

FIGURA 6.2 – PROVETES OBTIDOS COM O MOLDE	62
FIGURA 6.3a – VISTA SUPERIOR DO MOLDE.....	64
FIGURA 6.3b – VISTA LATERAL DO MOLDE EM CORTE	64
FIGURA 6.3c – VISTA LATERAL DO MOLDE EM CORTE	64
FIGURA 6.3d – VISTA EM PERSPECTIVA DO MOLDE	64
FIGURA 6.4 – GRÁFICO COMPARATIVO DA INJECTABILIDADE DOS DIFERENTES CPCs COM A RAZÃO L/S R1	67
FIGURA 6.5 – DIFRACTOGRAMA DE RAIOS-X DO CPC3/R2 24 HORAS APÓS A MISTURA, ●- B-TCP, ■-BRUSHITE.....	67
FIGURA 6.6 – DIFRACTOGRAMA DE RAIOS-X DO CPC3/R2 3 SEMANAS APÓS A MISTURA, ●- B-TCP, ■-BRUSHITE	68
FIGURA 6.7 – RESULTADOS DO SEGUNDO TESTE DE CITOTOXICIDADE POR CONTACTO INDIRECTO.....	70
FIGURA 7.1 – COLUNA LOMBAR DE PORCO UTILIZADA E RESPECTIVAS VERTEBRAS JÁ PREPARADAS	74
FIGURA 7.2 – PROCEDIMENTO DE CRIAÇÃO DA PRÉ-LESÃO DE UM DOS CORPOS VERTEBRAIS.....	74
FIGURA 7.3 – REMOÇÃO DO OSSO ESPONJOSO NO INTERIOR DO CORPO VERTEBRAL	75
FIGURA 7.4 – CIMENTAÇÃO DOS CORPOS VERTEBRAIS	75
FIGURA 7.5 – CORPO VERTEBRAL DE CONTROLO COLOCADO NA MÁQUINA DE COMPRESSÃO ANTES E APÓS O ENSAIO.....	76
FIGURA 8.1 – PREPARAÇÃO DA CIRURGIA (ANESTESIA E LIMPEZA ASSÉPTICA DA ÁREA A OPERAR).	80
FIGURA 8.2 – ACESSO CIRÚRGICO À DIÁFISE DO FÉMUR.....	80
FIGURA 8.3 – ABERTURA DOS ORIFÍCIOS E LIMPEZA DA CAVIDADE MEDULAR.	81
FIGURA 8.4 – APLICAÇÃO DO CIMENTO NA CAVIDADE MEDULAR.....	81
FIGURA 8.5 – SUTURA.	81
FIGURA 8.6 – FOTOS DO FÉMUR DO COELHO QUE CONTRAIU A FRACTURA..	82
FIGURA 8.7 – RADIOGRAFIA COELHO 2 NO MOMENTO DA CIRURGIA.....	83
FIGURA 8.8 – RADIOGRAFIA COELHO 2 APÓS 3 MESES.....	83
FIGURA 8.9 – RADIOGRAFIA COELHO 4 NO MOMENTO DA CIRURGIA.....	83
FIGURA 8.10 – RADIOGRAFIA COELHO 4 APÓS 3 MESES.....	83
FIGURA 8.11 – A) IMAGEM DOS FÉMURES NA ALTURA DA RADIOGRAFIA, B) RADIOGRAFIA DOS FÉMURES NA POSIÇÃO FRONTAL, C) RADIOGRAFIA DOS FÉMURES NA POSIÇÃO LATERAL	84
FIGURA 8.12 – RADIOGRAFIAS DOS PRIMEIROS 5 COELHOS RETIRADAS APÓS A CIRURGIA: A) COELHO 1; B) COELHO 2; C) COELHO 3; D) COELHO 4; E) COELHO 5.	85
FIGURA 8.13 – ESQUEMA DA MONTAGEM PARA TESTAR A RESISTÊNCIA DOS FÉMURES.....	86
FIGURA 8.14 – FÉMUR DO COELHO 1, 4 MESES APÓS A IMPLANTAÇÃO O CPC	87
FIGURA 8.15 – FÉMUR DO COELHO 2, 4 MESES APÓS A IMPLANTAÇÃO O CPC	87
FIGURA 8.16 – FÉMUR DO COELHO 3, 4 MESES APÓS A IMPLANTAÇÃO O CPC.	87
FIGURA 8.17 – FÉMUR DO COELHO 4, 4 MESES APÓS A IMPLANTAÇÃO O CPC.	88
FIGURA 8.18 – FÉMUR DO COELHO 5, 4 MESES APÓS A IMPLANTAÇÃO O CPC.	88
FIGURA 8.19 – DIFRACTOGRAMA DE RAIOS-X DO CPC APÓS 4 MESES DE IMPLANTAÇÃO (COELHO 5), ●- B-TCP.	89
FIGURA 9.1 – LIMPEZA E PREENCHIMENTO DO OSSO DO COELHO PARA EXPERIÊNCIA <i>IN VITRO</i>	91
FIGURA 9.2 – APARELHO UTILIZADO NO CORTE DO OSSO COM O CPC APÓS A SUA IMERSÃO EM SORO FISIOLÓGICO.	91
FIGURA 9.3 – CPC IMPLANTADO NO OSSO AO FIM DE UM DIA IMERSO EM SORO FISIOLÓGICO E A 37°C.	91
FIGURA 9.4 – CPC IMPLANTADO NO OSSO AO FIM DE DOIS DIAS IMERSO EM SORO FISIOLÓGICO E A 37°C.	91
FIGURA 9.5 – PROVETES DE CPC3/R2 APÓS 6 DIAS EM	92
FIGURA 9.6 – RESULTADOS DE FTIR DO CPC3/R2 APÓS 6 DIAS EM SORO FISIOLÓGICO.	92

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 – ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO EXISTENTES, MAIS UTILIZADOS NAS FORMULAÇÕES DOS CPC.....	8
TABELA 2.2 – FACTORES QUE AFECTAM AS PROPRIEDADES DAS PASTAS DE CPC	9
TABELA 2.3 – FOSFATOS DE CÁLCIO QUE PODEM SER PRECIPITADOS À TEMPERATURA AMBIENTE OU CORPÓREA [20]	10
TABELA 2.4 – COMPOSIÇÃO E RESPECTIVO PRECIPITADO DE ALGUNS CIMENTOS DE APATITE PRESENTES NO MERCADO [43].	14
TABELA 2.5 – RESUMO DAS PROPRIEDADES QUE PODEM AFECTAR A RESISTÊNCIA DO CPC.....	19
TABELA 5.1 – PARÂMETROS VARIÁVEIS DAS RESPECTIVAS AMOSTRAS DE HPCS	55
TABELA 5.2 – PESOS MOLECULARES E POLIDISPERSÃO OBTIDAS PARA AS AMOSTRAS DE HPCS E QUITOSANO PERCURSOR.....	57
TABELA 6.1 – DESIGNAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE CADA CPC EM ESTUDO.	61
TABELA 6.2 – RESULTADOS DO TEMPO DE PRESA PARA OS VÁRIOS CPC E DIFERENTES RAZÕES L/S	61
TABELA 6.3 – RESULTADOS DO TESTE DE COMPRESSÃO PARA OS VÁRIOS CPC E DIFERENTES RAZÕES L/S.....	63
TABELA 6.4 – RESULTADOS DA RESISTÊNCIA À FLEXÃO DOS ENSAIOS PARA OS VÁRIOS CPC A DIFERENTES RAZÕES L/S E RESPECTIVOS MÓDULOS DE WEIBULL.	65
TABELA 6.5 – RESULTADOS DO MÓDULO DE FLEXÃO DOS ENSAIOS PARA OS VÁRIOS CPC A DIFERENTES RAZÕES L/S E RESPECTIVOS MÓDULOS DE WEIBULL.	65
TABELA 6.6 – RESULTADOS DO TESTE DE INJECTABILIDADE PARA OS VÁRIOS CPC E DIFERENTES RAZÕES L/S.....	66
TABELA 6.7 – RESULTADOS DO TESTE DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT EM EXTRACTO DOS 3 CPC E RESPECTIVAS RAZÕES L/S.....	69
TABELA 6.8 – DESIGNAÇÃO E E CONDIÇÕES A QUE CADA AMOSTRA FOI MANTIDA ANTES DOS TESTES DE CITOTOXICIDADE	69
TABELA 7.1 – DESIGNAÇÃO DAS VÉRTEBRAS E RESPECTIVO CPC UTILIZADO.....	73
TABELA 7.2 – RESULTADOS DO ENSAIO DE COMPRESSÃO EFECTUADO ÀS VÉRTEBRAS.	76
TABELA 8.1 – DESCRIÇÃO DA TÉCNICA CIRÚRGICA [126].....	79
TABELA 8.2 – RESULTADOS DO ENSAIO DE FLEXÃO PARA MEDIR A RESISTÊNCIA ENTRE OS FÉMURES CIMENTADOS E OS SEM CIMENTO.	86
TABELA 9.1 – RESISTÊNCIA MECÂNICA MÉDIA DO CPC3/R2 APÓS 6 DIAS EM SORO FISIOLÓGICO.	92

CAPÍTULO

1

**Enquadramento
do problema e
conteúdo da
dissertação**

1.1 Enquadramento do problema

Actualmente com o aumento da esperança média de vida, também se verifica um aumento das doenças que estão relacionadas com o grupo etário mais avançado. Entre estas, a mais preocupante é a osteoporose, que afecta essencialmente mulheres. Segundo Alberto Quintal, director do serviço de reumatologia do Hospital Central do Funchal, depois dos 50 anos, uma em cada três mulheres sofre de osteoporose, enquanto um em cada 30 homens irá sofrer [1]. A osteoporose é uma doença que se caracteriza pela diminuição de massa óssea, a qual leva a que o osso fique cada vez mais rarefeito, de tal forma que provoca um aumento da sua fragilidade, facilitando a ocorrência de fracturas.

Em Portugal ocorrem cerca de 6.500 fracturas, por ano, só devido à osteoporose. No reino unido este número atinge as 120 mil sendo as mais frequentes fracturas do punho, anca e coluna [1].

As fracturas da coluna vertebral estimam-se em cerca de 100 milhões em todo o mundo e caracterizam-se por uma dor local intensa e limitação de movimentos. Os tratamentos começam com a prevenção, no entanto, quando se verifica a incidência da doença, o tratamento passa pelo uso de medicamentos durante um período que pode ir de um a três meses. Porém se após este período se mantiverem as queixas, os pacientes podem ser submetidos a uma cirurgia – vertebroplastia ou cifoplastia [2]. Em qualquer uma destas cirurgias o médico aplica, no corpo vertebral fracturado, um material líquido, que em poucos minutos fica tão ou mais duro que o osso, no sentido de aumentar a resistência da vértebra fracturada e reconstruí-la. Até agora, o material mais utilizado, não só neste tipo de cirurgias mas também no preenchimento e reconstrução de segmentos ósseos e fixação de próteses, tem sido o cimento acrílico, à base de polimetacrilato de metilo (PMMA), no entanto, este pode causar muitos efeitos secundários. Isto ocorre essencialmente pelo cimento acrílico ser um produto tóxico, e como tal os esforços para encontrar uma alternativa a este cimento têm sido muitos [3].

A ideia mais promissora é a substituição do cimento acrílico por um material composto essencialmente por fosfatos de cálcio, tais como a hidroxiapatite (HA) e o β -TCP que são cerâmicos biocompatíveis, bioactivos e osteocondutores. Propriedades estas que os convertem no biomaterial por excelência para implantação óssea [4].

Os fosfatos de cálcio, essencialmente a HA e o β -TCP têm sido utilizados desde a década de 80 como materiais reparadores dos ossos, disponíveis na forma de grânulos ou blocos [5,6]. Os blocos apresentam tamanhos e formas pré-estabelecidas o que dificulta a sua adaptação ao local de aplicação. Quanto aos grânulos, apesar de se adaptarem mais facilmente à zona de aplicação, há tendência para que ocorra migração de partículas, aumentando a possibilidade de complicações cirúrgicas podendo até levar ao fracasso da cirurgia. Assim, apesar do sucesso relativo à

biocompatibilidade e osteointegração, a sua aplicação está limitada a cada caso em particular, ao estado do paciente e tamanho do defeito ósseo, havendo por vezes dificuldades na conformação exacta do material ao defeito, e até uma indisponibilidade da quantidade de material necessário para restaurar toda a cavidade defeituosa [7,8].

Na década de 80, Brown e Chow, descobriram o primeiro cimento à base de fosfato de cálcio (CPC). Isto é, uma mistura de pós de fosfatos de cálcio e água que forma inicialmente uma pasta e, com o tempo, devido à dissolução dos fosfatos de cálcio constituintes e precipitação de HA, mesmo à temperatura ambiente ou corporal, dá origem a um material com alguma resistência mecânica [9]. Isto veio revolucionar a aplicação de fosfatos de cálcio como substitutos ósseos, pois além da sua excelente biocompatibilidade, e bioactividade, com a aplicação dos CPC não seria necessário dar forma ao preenchimento, verificando-se um óptimo contacto entre o osso e o implante e o total preenchimento de cavidades com uma incisão mínima.

Desde então, a investigação tem sido no sentido de encontrar um CPC com as características ideais, pois apesar de todas as vantagens mencionadas, estes apresentam certos inconvenientes, entre eles uma resistência mecânica relativamente baixa e tempos de endurecimento (*setting times*) inadequados por serem muito longos ou muito curtos. Uma resistência mecânica próxima da que o osso humano apresenta e *setting times* ajustados ao tempo necessário para a sua aplicação cirúrgica, aumentam consideravelmente o campo das potenciais aplicações para estes materiais, cujas principais aplicações se limitam actualmente à área de odontologia, cirurgia maxilofacial, cranioplastia e reparação de fracturas nos membros superiores. A ambição é elevá-lo ao nível dos cimentos acrílicos, que são hoje em dia muito utilizados em fixação de próteses articulares cimentadas e na substituição de discos intervertebrais e preenchimento de corpos vertebrais, usufruindo de todos os benefícios que os fosfatos de cálcio podem trazer a nível de osteointegração, biocompatibilidade, e eventualmente como portadores de antibióticos para prevenir e/ou combater mais eficazmente as infecções que poderão surgir no local do implante.

Tendo por base a premissa exposta, ir-se-á, neste trabalho testar uma nova formulação de um CPC cuja inovação será a utilização de uma matriz polimérica composta por um derivado do quitosano (CS), o hidroxipropilo quitosano (HPCS), em conjunto com um fosfato de cálcio (CaP).

Assim serão avaliadas as propriedades físico-químicas e mecânicas do CPC. Contudo, como o cimento ósseo pode apresentar diferentes propriedades mecânicas, alteradas por factores de formulação, proceder-se-á a algumas variações para a optimização do produto. Estas variações dizem respeito essencialmente a três factores: a optimização do processo de obtenção do agente polimérico, a concentração do mesmo na fase líquida do cimento e a razão entre as duas fases líquida e sólida.

1.2 Conteúdo da dissertação

A primeira parte desta tese, capítulo 2, corresponde ao enquadramento teórico, composto por várias secções.

A segunda parte da tese inclui os restantes capítulos, do 3 ao 10, os quais correspondem ao estudo propriamente dito.

No capítulo 3 resume-se a metodologia dos testes efectuados, nomeadamente ensaios de compressão e flexão, injectabilidade, tempo de presa, viscosidade, FTIR, H-RMN, DRX, GPC/SEC, citotoxicidade e ensaios *in vivo*.

No capítulo 4 apresenta-se a composição do CPC, fazendo uma breve descrição dos seus constituintes.

Os capítulos 5 e 6 correspondem à produção e caracterização do HPCS e do CPC respectivamente e, como tal, nestes são apresentados os resultados obtidos e efectuada a análise dos mesmos.

O capítulo 7 corresponde à descrição de uma experiência na qual se simula uma vertebroplastia contendo não só o procedimento utilizado, como também os resultados obtidos.

No capítulo 8 resume-se a técnica e o procedimento cirúrgico dos testes *in vivo*, assim como se apresentam alguns dos resultados obtidos até ao momento.

O capítulo 9, vem complementar uns resultados obtidos no capítulo 8 e visa averiguar a resistência e composição do cimento após a sua imersão em soro fisiológico durante alguns dias.

O último capítulo (10) apresenta as conclusões retiradas da análise de resultados, assim como perspectivas para futuros estudos de modo a completar de forma mais consistente e completa o estudo deste CPC.

Nos anexos, encontram-se o modelo dos protocolos utilizados para o registo experimental.

CAPÍTULO

2

Introdução

2.1 Dos cimentos acrílicos aos cimentos à base de fosfato de cálcio

Muitos materiais têm sido propostos para o uso em cirurgia ortopédica, quer na reparação de defeitos ósseos, quer em cirurgias feitas a articulações, essencialmente da anca e do joelho após a ocorrência de artroses em estado mais avançado, ou na coluna vertebral quando a pessoa sofre de osteoporose. Em todos os casos, o comportamento do material em contacto directo com o osso é crítico, pois isso pode condicionar o sucesso de uma cirurgia.

Até final do século XX os materiais mais utilizados na substituição de articulações, consistem em endoprotéses feitas de titânio, ou liga de titânio fixa ao osso por cimento acrílico. Para além deste tipo de cirurgias que se efectuam desde 1940, este cimento também é utilizado como apoio interno da coluna vertebral e preenchimento e reconstrução de cavidades ósseas [10].

Estes cimentos são sobretudo compostos por metil metacrilato (MMA), presente na fase líquida, e PMMA, presente na fase sólida. A fase sólida contém ainda um iniciador da reacção de polimerização do MMA, e assim quando se procede à mistura das duas fases, estas formam uma pasta moldável pronta a ser aplicada no local afectado e que enrijece rapidamente [11].

Os rápidos tempos de secagem, as excelentes propriedades mecânicas [12] bem como a facilidade de manuseamento e moldação, tal qual pastilha elástica, são propriedades ainda inatingíveis por outros cimentos [13]. No entanto, apesar destas excelentes propriedades os cimentos acrílicos não são bioactivos nem biodegradáveis [14] e podem originar complicações, ao nível das intervenções cirúrgicas, tais como [3]:

- 1) Altas temperaturas durante o processo de secagem/endurecimento, o que pode levar à necrose do osso e lise óssea;
- 2) Retraimento da matéria durante o processo de endurecimento, o que no caso das próteses pode levar à sua má colocação na cavidade do osso. A pequena lacuna que pode ficar entre a prótese e o osso é fechada com tecido fibroso que permite um micro-movimento da prótese em relação ao osso e que pode muitas vezes causar osteólise¹.
- 3) A cirurgia em si, pode levar a ossificação heterotópica² e deste modo a uma imobilização sendo necessário efectuar várias revisões cirúrgicas ao longo do tempo.

¹ A osteólise é a absorção do tecido ósseo que pode provocar a destruição mais ou menos extensa dos ossos.

² A ossificação heterotópica é a formação de osso em tecidos moles junto a articulações, isto é, é um processo biológico metaplásico, no qual há neoformação de osso em tecidos moles adjacentes às grandes articulações, locais onde, normalmente o tecido ósseo não é encontrado [130].

Na tentativa de evitar todos os malefícios citados, há muitos anos que se estudam outras alternativas. A mais promissora é ter um implante de CaP, que endurece como um cimento, pois este material apresenta alta biocompatibilidade e a maleabilidade de um cimento acrílico.

Os fosfatos de cálcio, tais como a hidroxiapatite e o β -TCP, são os constituintes principais da parte mineral do osso normal e dentes. Sendo materiais bioativos e osteocondutores, distinguem-se pela formação de um forte laço biológico permitindo o crescimento e proliferação do osso até ao implante. O β -TCP, por ser biodegradável, à medida que é reabsorvido, permite o crescimento ósseo até à completa substituição do implante, daí que seja o material de eleição para este tipo de produto.

Em 1984, Gruninger e os seus colaboradores designaram este novo tipo de produto de “cimento fosfato de cálcio”(CPC) e, segundo a sua designação, consiste numa mistura entre sais de fosfatos de cálcio com água, ou uma solução aquosa, para formar uma pasta que possa reagir à temperatura ambiente ou corporal, dando origem a um precipitado que contém um ou mais fosfatos de cálcio e que endurece pelo intercruzamento dos cristais do precipitado [4].

Este cimento pode então ser aplicado em excertos ósseos, e substituição de partes danificadas do sistema ósseo, oferecendo grandes vantagens que se traduzem por uma fácil manipulação e excelente contacto entre o enxerto e o osso. É preparado durante a cirurgia, não necessitando de forma prévia, para além de ser biocompatível e bioactivo.

Os CPC também podem servir como sistemas de administração de fármacos, tais como antibióticos, anti-tumorais e anti-inflamatórios [15].

Para além disto, as grandes vantagens dos CPC em relação ao PMMA são que estes reagem a baixas temperaturas, não causando a necrose do tecido envolvente, nem da matriz óssea. Durante um certo período de tempo a pasta é moldável, permitindo o fácil manuseio quer para a colocação e utilização do produto numa seringa, quer para moldação e posicionamento do produto no local com as próprias mãos. O produto final, também é composto por fosfatos de cálcio que promovem a osteointegração, o que não acontece com o PMMA. Contudo as características do produto final podem variar, consoante a composição das fases do cimento, a razão entre a fase líquida e sólida (L/S), a razão molar Cálcio/Fósforo (Ca/P) e a presença de aditivos.

2.2 A química dos cimentos fosfato de cálcio

2.2.1 Componentes dos Cimentos Fosfatos de cálcio

A maioria dos CPC resulta de uma combinação de pós de ortofosfatos (OrtoF) de cálcio³ com uma solução aquosa, que poderão no entanto ter alguns aditivos com o intuito de melhorar as suas propriedades intrínsecas.

Na tabela 2.1 encontram-se listados os OrtoFCa mais importantes e usualmente utilizados na formulação dos CPC e a respectiva razão Ca/P.

Tabela 2.1 - Ortofosfatos de cálcio existentes, mais utilizados nas formulações dos cpc.

Nome do Composto	Abrev.	Mineral	Ca/P	Fórmula Química
Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM		0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Fosfato monocálcico anidro	MCPA		0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD	Brushite	1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Fosfato dicálcico anidro	DCPA ⁴	Monetite	1,0	CaHPO_4
Fosfato octacálcio	OCP		1,33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
α - fosfato tricálcico	α -TCP		1,5	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
β - fosfato tricálcico	β -TCP		1,5	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Fosfato de cálcio amorfo	ACP		1,2-2,2	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n=3-4,5$; 15-20% H_2O
Hidroxiapatite deficiente em cálcio	CDHA ⁵		1,5-1,67	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)
Hidroxiapatite	HA		1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Fluorapatite	FA		1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
Fosfato tetracálcico	TTCP	Hilgensto-ckite	2.0	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$
Apatite carbonatada	CAP	Dahlite		$\text{Ca}_{8.8}(\text{HPO}_4)_{0.7}(\text{PO}_4)_{4.5}(\text{CO}_3)_{0.7}(\text{OH})_{1.3}$

Como aditivos, certos CPCs utilizam principalmente iões tais como o Na^+ , K^+ , Mg^{2+} . Outros utilizam também sais de cálcio, tais como os pirofosfatos⁶ de cálcio e o óxido de cálcio (CaO).

³ Família de fosfatos de cálcio que contém o grupo PO_4^{3-} .

⁴ Também referida somente como fosfato dicálcio (DCP).

⁵ Também referida como hidroxiapatite precipitada (PHA), quando $x=0$.

⁶ Família de fosfatos de cálcio que contém o grupo $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$.

A maioria dos CPCs, tendem a desintegrar-se, após a implantação, ao entrarem em contacto com os fluidos corporais ou com o sangue. Por esta razão, têm sido feitos alguns estudos adicionando-se também agentes coesivos para evitar que essa desintegração ocorra.

Assim, há autores que para melhorar a coesão de um cimento à base de TTCP e DCP, adicionaram alginato de sódio à fracção líquida do cimento, outros tentaram usar diferentes polissacarídeos tais como o hidroxipropilcelulose, carboximetilcelulose, acetato de quitosano, lactato de quitosano [16]. Todos estes aditivos melhoraram as propriedades de manuseio do cimento, no que diz respeito à sua coesão, contudo verificou-se que isso alterou outras propriedades do cimento. Nos derivados de celulose o tempo de consolidação (*setting time*) aumentou, enquanto que nos derivados do quitosano a resistência mecânica diminuiu [17].

Para outra formulação de cimento, contendo ACP e DCPD, estudou-se os efeitos da adição de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), polietileno glicol (PEG), glicerina e ácido cítrico nas propriedades reológicas e injectabilidade do cimento. Com isto verificaram que a injectabilidade e o *setting time* do cimento pode ser aumentada pela adição de solução de fosfato dissódico (Na_2PO_4) mas diminuídas quando se adiciona PEG, glicerina ou ácido cítrico à pasta [18].

Em todos os estudos se verifica que as propriedades do cimento, tais como a plasticidade inicial, o tempo de consolidação ou coesão, e de endurecimento, assim como a resistência mecânica final e injectabilidade podem ser controladas fazendo-se variar diversos factores, sendo os principais a considerar os descritos na tabela 2.2 [19].

Tabela 2.2 - Factores que afectam as propriedades das pastas de CPC.

Fase sólida	<ul style="list-style-type: none">→ A pureza dos principais constituintes sólidos;→ A proporção da mistura entre os principais constituintes sólidos;→ Aditivos (aceleradores, retardadores, agentes coesivos);→ Tamanho das partículas e humidade dos sólidos;
Fase líquida	<ul style="list-style-type: none">→ Aditivos;→ pH;
Mistura	<ul style="list-style-type: none">→ Relação líquido/sólido (L/S)
Maturação	<ul style="list-style-type: none">→ Temperatura→ Humidade→ pH do meio

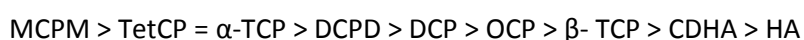
2.2.2 Solubilidade

Os CPC são preparados utilizando-se uma solução aquosa e um ou vários CaP. A maioria dos CaP são classificados como reabsorvíveis, o que significa que em condições fisiológicas estes se dissolverão. Assim, nos CPC quando os constituintes são misturados com o líquido para a reação, os CaP começam por se dissolver na solução. Esta solubilização ocorre, (i) até que a composição do líquido encontre um ponto invariante, que corresponde ao ponto de intersecção das linhas de solubilidade dos componentes; (ii) até se atingir o ponto de saturação da solução, no caso de um único CaP. Quando esse ponto é encontrado, solubilizações adicionais dos sais de fosfato de cálcio, só poderão acontecer se ocorrer a precipitação de alguns CaP com o qual a solução aquosa está supersaturada, removendo íões de cálcio e fosfato da solução. O pH determinará o tipo de precipitado, excepto quando se tratar de formas amorfas, que será um tipo de CaP menos solúvel (tabela 2.3). Durante a reação de precipitação os cristais de CaP crescem dando origem a um emaranhado de cristais, conferindo desta maneira rigidez mecânica ao cimento [20].

Tabela 2.3 - Fosfatos de cálcio que podem ser precipitados à temperatura ambiente ou corpórea [20].

Ca/P	Abrev.	Nome do precipitado	Fórmula	pH
0,5	MCPM	Fosfato monocálcico monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0-2
1,0	DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2-6
1,35	ACP	Fosfato de cálcio amorfo	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3-4,5; 15-20\% \text{H}_2\text{O}$	4-9
1,33	OCP	Fosfato octacálcio	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,5-7,0
1,5	CDHA	Hidroxiapatite deficiente em cálcio	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	6,5-8,5
1,67	HÁ	Hidroxiapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9,5-12

A solubilidade dos fosfatos de cálcio em água é uma propriedade que também se deve ter em conta, pois o comportamento *in vivo* do CPC pode ser previsto em grande parte devido à solubilidade dos seus constituintes e/ou da sua fase final [21]. Se a solubilidade de um CaP, como é o exemplo da hidroxiapatite, for muito baixa, a sua degradação é praticamente inexistente e muito lenta, se por outro lado a solubilidade do cálcio fosfato for elevada, o CPC sofre degradação. Usando as diversas solubilidades dos fosfatos de cálcio, pode-se prever a sua taxa de degradação *in vivo*, em pH7.0, por esta ordem [22]:



O OCP é muitas vezes encontrado como uma fase intermediária e transitória durante a precipitação de outros cálcios OrtoFs mais estáveis, como é o caso do CDHA [23].

O DCPD é o CaP mais facilmente sintetizado pelo organismo. Este já foi detectado em calos de fractura [24], osso [25], e pedras dos rins [26] e também é considerado um precursor da formação de HA no osso [27]. É biocompatível e osteocondutor e a pH fisiológico (pH=7,4) é o mais solúvel (sem contar com o MCPM). Também é metaestável e conseqüentemente pode ser convertido noutros fosfatos de cálcio, tais como o DCP (a pH \approx 6-7) ou CDHA (a pH=7). In vivo o DCPD é rapidamente reabsorvido e substituído por osso novo [8]. Contudo, verifica-se muitas vezes a transformação de DCPD em HA, especialmente em locais onde se verifica uma fraca irrigação de sangue [28].

O CDHA é menos solúvel do que DCPD, mas a sua solubilidade não é muito exacta pelo facto de poder apresentar uma razão Ca/P entre 1.5 a 1.67 [29]. Todavia acredita-se que a solubilidade aumente à medida que a razão diminua. Outra dificuldade em definir a solubilidade do CDHA prende-se com o facto de que muitos CPC possuem aditivos para melhorar as suas propriedades, e o CDHA incorpora facilmente iões estranhos tais como carbonatos, cloro, flúor e magnésio, que podem ter uma grande influência na solubilidade e até no tipo de HA que precipita. Daí que se encontre, em algumas situações, fases de HA substituída, como é o caso da apatite carbonatada (CA) ou fluoroapatite (FA – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) [3]. O tamanho das partículas dos cristais também é importante, pois no CDHA estes são muito pequenos na ordem dos 10-20nm. Nesta ordem, a solubilidade depende do tamanho das partículas, e quanto menor são, maior solubilidade apresentam. O CDHA com uma razão Ca/P de 1.5 também é usualmente chamada de TCP. Este termo pode ser confundido com o β -TCP que apresenta quase a mesma composição química, mas diferentes estruturas cristalográficas. Estima-se que a solubilidade possa estar próxima da do β -TCP [30].

2.2.3 Produtos Finais

Apesar do grande número de formulações que tem sido tentado nestes últimos anos, os CPC dividem-se quanto ao seu produto final, em apenas três: apatite; brushite e CaP amorfo. Contudo num estudo que se fez sobre o CaP amorfo, verificou-se que esta é uma fase metaestável, e que o cimento que dá origem a este produto se converte rapidamente em apatite [31]. Desta forma podemos classificar os CPCs em duas categorias que serão abordadas em separado e que se baseiam na taxa de absorção: apatite e brushite. A grande diferença entre a formação de apatite e a brushite é o pH a que ocorre a reacção: pH neutro ou básico dá origem a apatite e, pH ácido (inferior a 6) forma brushite .

2.2.3.1 Apatite

Nos cimentos cujo produto final é apatite, podem ocorrer precipitados diferentes, tais como uma hidroxiapatite pouco cristalina, e/ou CDHA. Normalmente a reacção de endurecimento destes cimentos ocorre com pouca ou nenhuma libertação de calor e a um pH próximo do fisiológico, podendo este último factor contribuir para a alta biocompatibilidade que estes materiais apresentam. Por isto, eles podem até ser utilizados em sistemas de libertação de fármacos [32,33]. Nesta década, alguns avanços resultaram mesmo em cimentos que apresentam uma resistência mecânica mais próxima dos valores do osso cortical [34]. Apesar destas propriedades bastante atractivas, a maior limitação dos cimentos de apatite é que a hidroxiapatite é praticamente insolúvel a pH fisiológico. Os cimentos são geralmente micro-porosos, sendo normalmente reabsorvidos pelos osteoclastos mediante fagocitose, a partir da superfície do material, e a sua taxa de dissolução é quase inexistente.

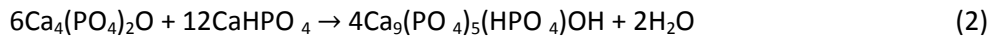
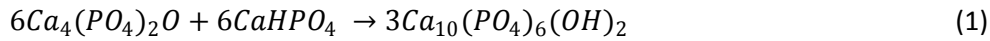
Os cimentos de apatite contêm muitas vezes na sua constituição pós de TCP e/ou TTCP [35], DCPA ou DCP ou ainda CDHA [36].

A reactividade do TCP varia em função da fase cristalina e tamanho das partículas. Geralmente, observa-se uma reactividade maior para fases termicamente mais estáveis e com partículas mais pequenas, daí que a ordem de reactividade para os TCP seja, β -TCP < α -TCP < ACP [3].

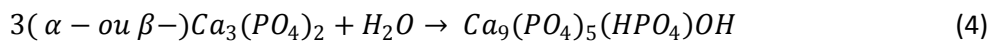
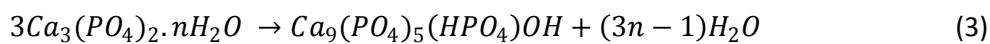
Um exemplo da reacção de obtenção da apatite é o cimento proposto por Brown e Chow composto por uma mistura de DCPD ou DCPA com TTCP numa razão de 1:1 e água ou soluções diluídas de ácido fosfórico (H_3PO_4) [37]. Em ambos os casos o produto final da reacção é HA.

Mais tarde com os mesmos reagentes Brown e Fulmer, mostraram que é possível obter CDHA como produto da reacção alterando apenas a razão do TTCP com DCPD ou DCPA para 1:2 (eq. 1 e 2) [38].

Nestes casos o que ocorre é uma reacção ácido-base, ou seja, uma fase de CaP relativamente ácida, que reage com outra fase relativamente básica para produzir um CaP relativamente neutro. Exemplos deste tipo de reacções apresentam-se a seguir.



A possibilidade do CDHA resultar de uma hidrólise de um α -TCP, foi descrito por Monma e Kanazawa. Mais tarde Ginebra, Fernández e colaboradores verificaram a transformação do α -TCP para CDHA pode ser completa a um tempo clinicamente aceitável (eq. 4) [39]. Nesta reacção ocorre transformação de uma fase metaestável numa fase mais estável em meio aquoso, como resultado, ambos os fosfatos de cálcio têm a mesma razão Ca/P quer na fase inicial, quer no final da reacção. Alguns exemplos deste tipo de reacção são apresentados a seguir.



Devido à presença inicial de carbonatos, o precipitado pode ter como produto final CAP, como é o caso do Norian SRS e o Biocement D (agora Calcibon[®]) [40]. No entanto o CDHA e CAP formam-se num ambiente aquoso e têm baixa cristalinidade, estas são muito semelhantes às apatites biológicas dos ossos e dentes. Acredita-se que estas propriedades sejam as responsáveis pelas excelentes características de reabsorção *in vivo*.

A característica mais importante dos cimentos de apatite, é que a força que liga os novos cristais recém-formados, quer do CDHA, quer do CA é fraca. Consequentemente, estes podem separar-se facilmente da massa do cimento, especialmente depois de ter ocorrido dissolução parcial. E, quando isto ocorre, os osteoclastos e outras células podem facilmente ingerir os cristais de apatite.

Imediatamente após a implantação, qualquer cimento fica exposto ao sangue e a outros fluidos, o que atrasa o *setting time*. O *setting time* para cimentos de apatite tem sido extensivamente estudado e parece ser bastante longo. Por exemplo, a original formulação proposta por Brown e Chow possui um *setting time* que pode ir de 15 a 22 min [9,41] o que pode levar a complicações. Todos os cimentos de apatite são viscosos e facilmente moldáveis mas tendem a ser difíceis de injectar. Daí que para melhorar as suas propriedades seja necessário jogar com a razão L/S e ainda

utilizar aditivos. Os aditivos utilizados neste tipo de cimentos são muitas vezes ácidos fosfóricos, MCPM, e outros OrtoFs solúveis. Estes aditivos promovem a dissolução dos sólidos através da redução do pH do meio, traduzindo-se numa diminuição do *setting time*.

Como exemplo da influência de OrtoF solúveis, como é o caso do Na_2HPO_4 ou NaH_2PO_4 no *setting time* dos cimentos de apatite, é que estes OrtoF de sódio impedem que as partículas de DCPA se encontrem isoladas. O que faz com que a dissolução do DCPA e formação do CDHA durante o endurecimento ocorra de uma forma linear, evitando assim a rápida formação do CDHA. Isto é importante porque se a formação de CDHA for muito rápida, poderá aparecer DCPA que não reagiu, o que diminui a dissolução de DCPA, tornando a reacção mais lenta [42].

Grande parte dos cimentos comerciais são cimentos de apatite, cujo produto final da reacção de solidificação é PHA ou HA carbonatada (tabela 2.4).

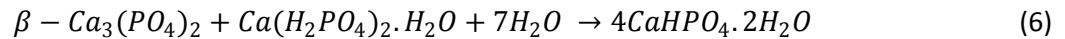
Tabela 2.4 – Composição e respectivo precipitado de alguns cimentos de apatite presentes no mercado [43].

Nome do cimento	Companhia	Componentes	Produto final
α -BSM Embarc Biobon [®]	ETEX	ACP, DCP + H ₂ O	PHA
Norian [®] SRS Norian [®] CRS	Synthes-Norian	α -TCP, CaCO ₃ , MCPM + H ₂ O, Na ₂ HPO ₄	CAP
BoneSource [™]	Leibinger	TTCP, DCP + H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄	PHA
Cementek [®]	Teknimed	α -TCP, TTCP, MCPM + H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄	PHA
Calcibon [®] (antigo Biocement D)	Biomet	α -TCP, DCP, CaCO ₃ , PHA + Na ₂ HPO ₄	CDHA
Mimix [™]	da Lorenz Surgical	α -TCP, TTCP e ácido cítrico	PHA
Biopex [®]	Mitsubishi	α -TCP, TTCP, DCPD, HA + H ₂ O + sais	PHA
Biopex [®] -R	Mitsubishi	α -TCP, TTCP, DCPD, HA, Mg ₃ (PO ₄) ₂ e NaHSO ₄ + H ₂ O, iões	Apatite (Não especificado)
QuikSet Mimix [™]	Lorenz Surgical	Não especificado	Apatite (Não especificado)
Kyphos [™]	Kyphon	α -TCP, Mg ₃ (PO ₄) ₂ , MgHPO ₄ , SrCO ₃ + H ₂ O, (NH ₄) ₂ HPO ₄	Apatite (Não especificado)
Callos [™]	Skeletal Kinetics	Não especificado	Apatite (Não especificado)
Rebone	Shanghai Rebone Biomaterials Co, Lda.	TTCP, DCP+H ₂ O	Apatite (Não especificado)

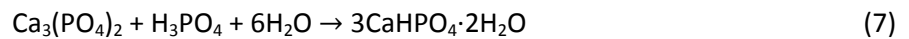
2.2.3.2 Brushite

Os CPC de Brushite são muito diferentes dos de apatite. Enquanto as pastas dos CPC de apatite passam gradualmente de um estado viscoso para uma massa resistente, os CPCs de brushite são geralmente mais líquidos e endurecem mais rapidamente [44].

O produto final conhecido como brushite é o DCPD. Mirtchi e Lemaître [45] foram os primeiros a produzir este tipo de cimentos em 1987, onde utilizaram MCPM (ácido) para reagir com o β -TCP (básico) obtendo como produto final DCPD (neutro).



A utilização do ácido fosfórico (H_3PO_4) para reagir com TCP, foi proposto no mesmo ano pela Bajpai, onde para além deste testou outros tipos de ácidos carboxílicos e monómeros de baixo peso molecular [46]. A reacção é dada por:



Até agora, há mais formulações propostas, como por exemplo β -TCP+ H_3PO_4 [42,47], β -TCP+MCPM [45] e TTCP+MCPM+CaO [28]. Todos os cimentos de brushite solidificam por meio de reacções ácido base (eq. 6 e 7). Como o DCPD precipita a pH inferior a 6, a pasta do cimento de brushite é ácida durante a reacção de endurecimento [48]. Por exemplo, durante a solidificação de um cimento de brushite composto por β -TCP+MCPM o pH varia de valores próximos de 2, até um pH quase neutro de aproximadamente 6 [47]. Ao substituir o MCPM por um ácido OrtoF, este torna as pastas de cimento muito ácidas durante os primeiros 30s, mas depois o pH segue o perfil obtido com o MCPM. Contudo esta segunda formulação traz algumas vantagens em vez do uso de MCPM, nomeadamente o facto de tornar a preparação mais fácil e mais rápida, permitir um melhor controlo da composição química e reactividade e uma melhoria das propriedades físico-químicas (como é o caso de maiores tempos de solidificação, e maior resistência à tracção devido a uma maior homogeneidade da pasta). No entanto, a utilização de ácidos OrtoF pode comprometer a biocompatibilidade da formulação do cimento, devido a apresentar baixos valores de pH durante a conformação [47].

Se uma pasta de cimento contém um excesso de uma fase básica, o pH de equilíbrio será dado pela intersecção das linhas de solubilidade da fase básica da mistura com a linha do DCPD. Por exemplo, o pH de equilíbrio das seguintes combinações: β -TCP+MCPM, HA+MCPM, TTCP+MCPM são respectivamente 5,9, 4,2 e 7,6 [20,49], o que se pode confirmar pela observação da figura 2.1.

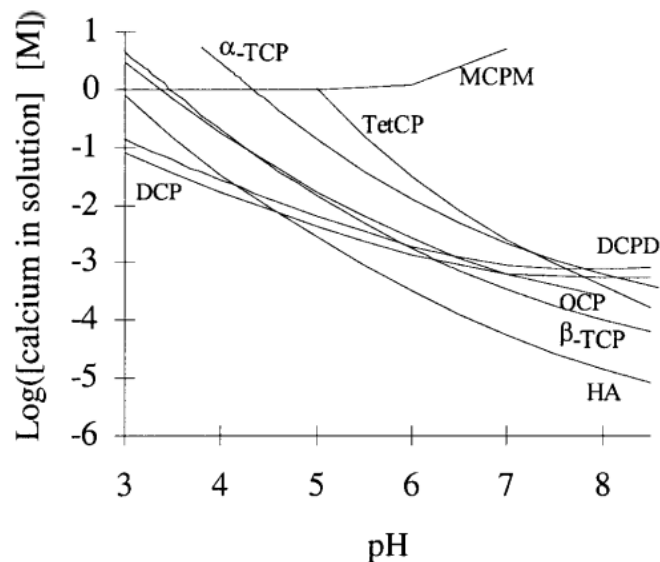


Figura 2.1 - Diagrama de solubilidade de vários CaP em água a 37°C. A solubilidade é expressa na quantidade total de íons de cálcio presentes na solução (log[Ca]) e pH da solução. Os dados de solubilidade foram retirados por Vereecke e Lemaître [22].

A figura 2.1 apresenta as linhas de solubilidade de 8 sais de CaP na forma do logaritmo de concentração total de cálcio, log[Ca], da solução saturada em função do pH.

As linhas de solubilidade da maioria dos sais de CaP apresentam no diagrama, inclinação negativa nas regiões neutras e ácidas, ou seja, a pH abaixo de 7. Isto reflecte o facto de que todos os compostos são mais solúveis à medida que o pH diminui. A inclinação da linha de solubilidade é uma indicação da rapidez a que a solubilidade dos sais aumenta com a diminuição do pH.

O diagrama de solubilidade mostrado na Figura 2.1 é útil porque revela a estabilidade relativa dos sais em vários valores de pH. Num dado pH, um sal cuja linha de solubilidade se encontra abaixo de uma de outro sal significa que este é menos solúvel (mais estável) do que o outro. Assim, é claro a partir do diagrama da figura 1, que a 37°C a HA é o menos solúvel de todos os sais, a não ser que o pH desça abaixo de 4,2, pois nesse caso o DCPA torna-se o menos solúvel. Por outro lado, o MCPM é o mais solúvel, no entanto por ser muito ácido, não é biocompatível, e é um produto que não nos interessa obter, sendo assim, os fosfatos de cálcio com mais conveniência são o DCPD por ser o CaP mais bio-reabsorvível e ser também biocompatível, e a CDHA por ser o CaP mais semelhante ao osso.

A brushite é moderadamente solúvel a pH fisiológico. Portanto, a sua reabsorção pode ocorrer quer por fagocitose quer por dissolução, a seguir à implantação. Os cimentos de Brushite podem ser largamente ou até totalmente reabsorvidos em apenas 16 a 18 semanas [50,51]. Apesar disto, o uso da generalidade dos cimentos de brushite são limitados, por serem, mecanicamente menos resistentes do que a maioria dos cimentos de apatite [52]. Contudo, as propriedades mecânicas tendem a aumentar à medida que o osso volta a crescer [53]. Uma razão para que a

resistência inicial seja menor é que devido a uma reacção de solidificação muito rápida, as pastas de brushite são geralmente muito líquidas, sendo normalmente misturados com uma grande razão L/S, em comparação com a proporção estequiométrica. Isto resulta em alta porosidade e consequentemente num cimento menos resistente. Em certos casos, estas podem endurecer em apenas 10s, chegando ao máximo da sua resistência em apenas 1 dia [44]. A rápida reacção de solidificação deve-se, provavelmente, ao facto de no final da reacção de endurecimento o pH da pasta aumentar, com a diminuição da solubilidade dos reagentes [47]. Para controlar o início da reacção de endurecimento e, consequentemente, proporcionar tempo suficiente para que o cirurgião possa aplicar o CPC de maneira segura, podem ser propostas duas estratégias: o uso de inibidores da nucleação e crescimento de cristais (retardadores) [44], e/ou utilizar reagentes menos solúveis como por exemplo a HA em vez de β -TCP [54,55]. Para controlar a reacção de solidificação total, devem ser utilizadas partículas mais pequenas, de $1\mu\text{m}$ ou inferior, e monodispersas.

Vários aditivos têm sido utilizados para retardar a reacção dos cimentos de brushite, tais como iões citrato, sulfato, e pirofosfato. Num estudo feito por Bohner e colaboradores [56] de todos estes iões, os pirofosfatos parecem ser os mais eficazes. Pensa-se que os pirofosfatos podem actuar como agentes retardantes, por se ligarem à superfície dos cristais recentemente formados e, deste modo, inibir a cristalização. Contudo, os iões pirofosfatos, também abrandam a taxa a que o β -TCP é consumido, resultando num aumento do tempo durante o qual o pH do cimento permanece ácido, o que pode comprometer mais uma vez a biocompatibilidade deste tipo de cimentos.

A adição de ácidos carboxílicos, tais como o ácido cítrico, à fase líquida do cimento, também pode melhorar o *setting time*, a injectabilidade, e as propriedades mecânicas do cimento [57]. Estudos mais recentes, testaram a influência do ácido láctico, málico, cítrico, e tartárico na reacção de solidificação dos cimentos de brushite, e verificam-se que todos eles prolongam a reacção de solidificação mas com diferentes efeitos nas propriedades mecânicas [58].

Como o DCPD é uma fase metaestável, em condições fisiológicas este pode transformar-se em CDHA por meio de dois processos: dissolução e precipitação. Alguns estudos parecem mostrar que esta reacção de transformação pode levar a reacções inflamatórias, pela libertação de ácido durante esse processo [20]. No entanto, Bohner [20] verificou que a adição de pequenas quantidades de iões magnésio ao cimento, actua como um inibidor da precipitação de CDHA prevenindo que isto aconteça, ou seja, reduzindo a possibilidade de inflamação.

No mercado já é possível encontrar cimentos de brushite apesar de serem muito poucos em comparação com os cimentos de apatite. Estes são o ChronOSTM Inject (da Synthes- Norian), Eurobone[®] (da Kasios), e VitalOs (da CalciphOs).

2.3 Propriedades básicas do cimento

2.3.1 Preparação do cimento

Os CPC preparam-se de forma semelhante à de um cimento, tal como se pode observar pelo esquema da figura 2.2. Ao misturar-se os dois componentes, líquido e pó, o produto que se obtém é uma pasta plástica, e extremamente viscosa. Ao longo de um determinado período de tempo, que poderá ir de alguns minutos a várias horas, esta perde a plasticidade e ganha cada vez mais consistência, permitindo o seu fácil manuseio (t_i). A partir do momento em que a pasta se encontra rígida (t_f), diz-se que esta atingiu o *setting time* (endurecimento), e deste ponto em diante o seu manuseio pode levar à deterioração do cimento, desfazendo-o. Contudo a sua resistência mecânica aumenta progressivamente alcançando o máximo do seu valor após um período de tempo que pode ser de várias horas a alguns dias.

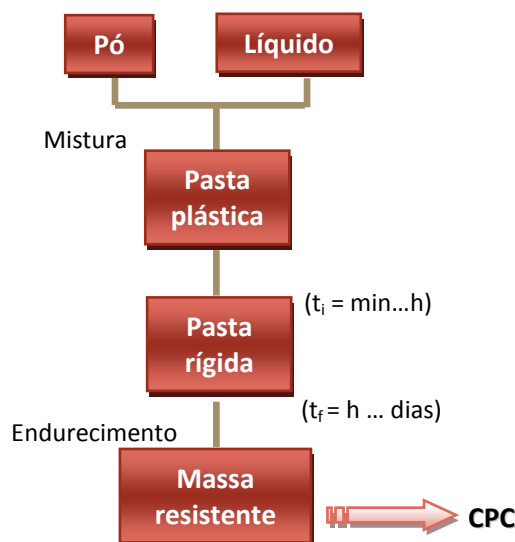


Figura 2.2 - Esquema geral de preparação de um CPC [19].

Segundo Driessens e colaboradores [19], este tipo de material deve apresentar, para o uso clínico, as seguintes características:

- 1) O tempo durante o qual se efectua a mistura dos componentes, deve ser suficiente curto, aproximadamente 1min;
- 2) O tempo de solidificação deve ser tal que permita a manipulação adequada da pasta de cimento, mas não demasiado elevada para não comprometer a aplicação clínica ($t_i \geq 5\text{min}$; $t_f \leq 20\text{min}$);
- 3) O tempo durante o qual se pode manipular o cimento sem diminuir a resistência final, t_D , deve ser estar próximo a t_i ($t_D \approx 5\text{min}$);

- 4) O tempo de coesão, t_c , tempo a partir do qual o cimento não dilata nem se desintegra quando em contacto com os fluidos corporais, deve ser suficientemente menor que t_D e t_i ($t_c < t_D \approx t_i$);
- 5) A resistência à compressão deve ser, pelo menos, da ordem da do osso trabecular;
- 6) O efeito térmico durante o período de consistência/endurecimento deve ser o menos possível;
- 7) O pH durante e depois do período de consistência deve ser similar ao fisiológico para evitar danos citotóxicos ($6.5 \leq \text{pH} \leq 8.5$).

2.3.2 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas são uma preocupação evidente no que diz respeito ao uso de fosfatos de cálcio. Uma vez que estas podem condicionar a aplicação *in situ* destas cerâmicas, este é um assunto de grande interesse para os clínicos. A resistência à compressão do osso cortical e trabecular varia, dependendo da sua densidade, desde 130 até 180MPa, e de 5 a 50MPa respectivamente.

Existem uma série de factores que podem ser os responsáveis pelo aumento ou diminuição das propriedades mecânicas dos CPC. Estes aparecem resumidos na tabela seguinte:

Tabela 2.5 – Resumo das propriedades que podem afectar a resistência do CPC.

Factor	Consequência
Razão L/S	Quanto maior é esta razão, maior a quantidade de líquido presente e menor é a resistência à compressão.
Proporção Ca/P dos reagentes	Esta tem influência na natureza do produto, contudo o máximo de resistência mecânica pode variar para cada formulação.
Tamanho das partículas	Partículas menores, podem levar a uma maior resistência à compressão.
A quantidade de aditivos	Podem levar ao aumento ou diminuição da resistência mecânica consoante o tipo e a quantidade utilizada.
Estabilidade química	Os produtos metaestáveis como é o caso do DCPD ou do OCP podem transformar-se, em condições fisiológicas, noutros que sejam mais estáveis e de baixa solubilidade tal como o CDHA, mantendo a sua resistência, indefinidamente durante o seu armazenamento em soluções aquosas a 37°C quase neutras [30].
Temperatura	Pode levar à desidratação do cimento causando mais porosidade e consequentemente menor resistência mecânica.

Razão L/S

Teoricamente, é de esperar que cimentos com elevadas razões L/S apresentem fracas propriedades mecânicas, porque resultam em cimentos com alta porosidade [59]. Como consequência, baixar a razão L/S do cimento para um valor onde a pasta seja fácil de trabalhar, resulta em formulações com porosidade reduzida o que corresponde a um aumento das propriedades mecânicas do cimento [60]. Por outro lado, sabe-se que a porosidade eleva a degradação dos cerâmicos fosfatos de cálcio, e determina o crescimento natural de novo tecido ósseo. Contudo, isto depende de mais factores do que apenas das propriedades mecânicas em si, tais como o sítio da aplicação (vascularização, carga suportada, dimensão do defeito), as propriedades biológicas do material (biocompatibilidade, osteocondutividade, e degradação) entre outros aspectos [61].

Proporção Ca/P dos reagentes

Um exemplo da influência desta razão é o de um cimento formado por uma mistura de MCPM e CA, em que os valores mais elevados de resistência à compressão obtiveram-se quando a razão Ca/P da mistura se manteve num intervalo de 1,24 a 1,45 [60]. Por outro lado, verificou-se que para um CPC composto por α -TCP e DCP, o máximo de resistência à compressão registou-se quando a razão Ca/P se aproximou do valor de 1,36 [62], enquanto que numa composição parecida, contendo α -TCP e MCPM, o valor máximo foi a Ca/P=1,5 [63].

Tamanho das partículas

Chow e colaboradores [64], modificaram a dimensão das partículas de um cimento composto por TTCP e DCP, e com isto conseguiram uma variação de 0 a 51MPa de resistência à compressão. De acordo com este estudo, o tamanho das partículas tem efeito directo no valor mínimo aceitável para a razão L/S do cimento, de tal maneira que diminuindo a razão L/S, a porosidade também diminui e a resistência mecânica aumenta.

A quantidade de aditivos

Com a adição de **aceleradores** ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4) à fase líquida de um cimento formado por α -TCP e DCP verificou-se um aumento dos valores iniciais de resistência à compressão [65]. Contudo, verificou-se-se que estes provocam um efeito adverso sob o valor óptimo da resistência à compressão, originando reduções até 50%. Ginebra e colaboradores [66], melhoraram as propriedades de um cimento de α -TCP adicionando-lhe mais do que 1% m/m de Na_2CO_3 à fase líquida contendo 4% m/m de Na_2HPO_4 .

Watanabe et. al [67], optaram pela adição de **fluidificantes**, que têm como papel principal a diminuição do tempo de solidificação, no entanto verificou-se que estes também servem para melhorar a resistência mecânica do CPC. Um exemplo disso é o caso do ácido cítrico, este retarda a reacção de dissolução-precipitação do cimento, diminuindo a resistência à compressão durante a fase inicial de solidificação, mas aumentando a resistência no estágio final do cimento, dando origem a CPC mais fortes. Durante o mesmo estudo, estes adicionaram também álcool polivinílico (PVA) com o qual obtiveram, igualmente após o período de endurecimento, em cimentos com melhor resistência mecânica.

Outro tipo de aditivos, consiste na incorporação de **sementes de cristais**, isto é, cristais de fosfatos de cálcio precipitados, à fase sólida dos cimentos, como é o caso de cristais de hidroxiapatite precipitada (PHA) ou brushite (DCPD). A sua inclusão nos cimentos pode levar ao aumento da resistência à compressão, no entanto, o tamanho destes cristais é um factor muito importante. Takezawa e colaboradores [68] mostraram que num cimento composto por TTCP e DCP, ao utilizarem grãos mais pequenos de PHA a resistência à compressão foi acima de 42 MPa, valor muito além do que o que tinham obtido com cristais de maiores dimensões, cerca de 10MPa. A quantidade de cristais também pode ser um factor importante. Brown e Chow [41] não encontraram muita diferença na resistência da sua mistura de TTCP e DCP ao adicionarem mais de 10% de PHA. Contudo Bermudez e colaboradores [69] ao adicionar mais do que 40% de sementes de cristais de DCPD, à mistura entre β -TCP e MCPM, viram que a resistência mecânica diminuía continuamente.

Estabilidade química

Regra geral, os cimentos DCPD desintegram-se durante o período de instabilidade, quando são colocados numa solução neutra e a sua tendência é para hidrolizarem [70]. Também o OCP tende a transformar-se em CDHA, em contacto com uma solução aquosa neutra [30]. Contudo, num cimento de OCP feito a partir de α -TCP, ao adicionar-se PHA, ao fim de um período de armazenamento de 90 dias não se verificou nenhuma alteração na sua resistência mecânica [30].

Driessens e colaboradores [30] mostraram que a resistência de cimentos CDPD obtidos por uma mistura de fosfatos de cálcio tais como α -TCP ou TTCP com ácidos, ou soluções ácidas, depende criticamente das suas condições de armazenamento. Devido à baixa solubilidade do CDHA, e a sua estabilidade relativa, em comparação como outros fosfatos de cálcio, espera-se que os cimentos cujo produto final é CDHA, mantenham a sua resistência indefinidamente durante o seu armazenamento em soluções aquosas a 37°C, quase neutras.

A temperatura

A pH baixo, tal como o registado na matriz dos cimentos de brushite, durante o período de solidificação, e a temperatura superior a 40 °C, mostrou-se que se forma monetite (DCPA). A presença de monetite foi atribuída à desidratação dos cristais de brushite [71]. Uma vez que a monetite é considerada mais densa do que a brushite (2,8 em comparação com 2,32 g cm⁻³), a desidratação da brushite resulta numa retracção da matriz do cimento e a formação de porosidade adicional, reduzindo consideravelmente a resistência à compressão. Para além disso, a desidratação da brushite resulta num desenvolvimento de iões de hidrogénio, que podem diminuir o pH e criar uma reacção adversa in vivo [42].

2.3.3 Propriedades de manuseamento

2.3.3.1 *Setting time – tempo de presa*

A atractividade dos cimentos CaP depende em muito da sua facilidade de manuseamento durante a prática cirúrgica. Estes devem ganhar consistência, num tempo relativamente curto mas que permita ao cirurgião efectuar, a implantação no local e sem que haja atrasos na cirurgia, o que poderia até comprometer a saúde do doente.

Actualmente, existem dois métodos standards para se estudar a consistência e endurecimento do cimento, são eles: o método das agulhas *Gilmore* [Standard Test Method for Time-of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles (ASTM: C 266-89)] e o método das agulhas de Vicat [Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement by Vicat Needle (ASTM C 191-92)].

Ambos consistem numa inspecção visual da superfície do cimento, após uma indentação com uma agulha que poderá ser de Vicat [72] ou Gilmore [73,74]. Quando, após a indentação, a agulha já não deixar marca então considera-se que o cimento se encontra solidificado.

Em qualquer um dos testes é possível obter dois valores, o tempo inicial de presa (t_i) e o tempo final de presa (t_f), ver esquema da figura 2.2. No entanto, não existe um consenso total sobre quais devem ser os valores ideais de t_i e t_f , e qual o seu significado clínico.

Driessens e colaboradores, [31] sugeriram que o cimento deve ser injectado antes de t_i , enquanto a ferida deve ser fechada depois de t_f , certificando-se que de que o cimento não sofreu deformação entre esses dois períodos. Por outro lado Sarda e colaboradores [75], sugeriram que o cimento, provavelmente, alcança resistência suficiente para resistir à pressão durante o fecho da ferida, mesmo que esta ocorra antes de t_f .

Também para Ginebra e colaboradores [76], o significado clínico destes tempos, é que a pasta deve ser implantada antes de t_i e que a ferida pode ser fechada depois de t_f . Um cimento não deve ser deformado entre os tempos t_i e t_f porque neste período da solidificação do cimento, qualquer deformação poderá induzir fendas no mesmo [77]. Assim o período entre t_i e t_f deve ser o tempo que o material leva a solidificar até se tornar num material forte o suficiente, para aguentar uma certa pressão sem deformar ou partir.

Durante as suas investigações Khairoun e colaboradores [78], verificaram que alguns cimentos se desintegravam assim que entravam em contacto com água, soluções aquosas e fluidos corporais, tais como o sangue. Então estes desenvolveram um teste para medir o que chamaram de tempo de coesão (CT), isto é, o tempo a partir do qual o CPC não se desintegra quando é imerso em

solução de Ringer. Desta definição ficou claro que o CPC deve ser aplicado no defeito ósseo após CT, mas antes de t_i .

A primeira tentativa de formular as exigências clínicas, em termos de fixação do tempo de presa e tempo de coesão, veio dos grupos de trabalho de Ginebra e Khairoun e colaboradores [79,80]. Da sua experiência com alguns clínicos, formularam alguns requisitos para o correcto manuseio dos CPC, que se traduzem por:

$$3 \leq t_i < 8 \quad (\text{I})$$

$$t_i - CT \geq 1 \quad (\text{II})$$

$$t_f \leq 15 \quad (\text{III})$$

No qual os números se encontram expressos em minutos.

Esquemáticamente isto pode ser expresso por :

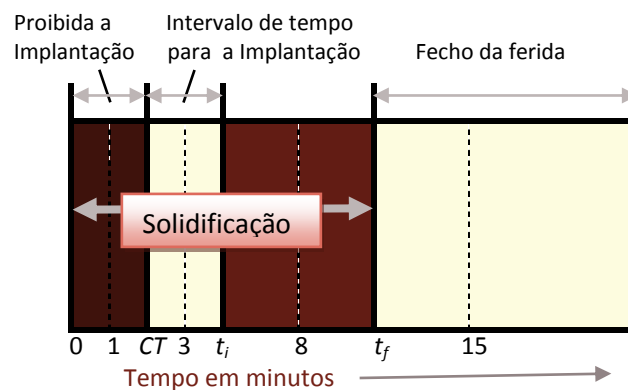


Figura 2.3 – Esquema ilustrativo do setting time [20].

A exigência (II) significa que o CT deve ocorrer pelo menos um minuto antes de t_i , para que o médico tenha no mínimo um minuto para aplicar e moldar o material. Como a mistura dos componentes dura cerca de 1 min, o CT mais curto que é permitido é de apenas 2min. Assim o médico tem pelo menos um minuto para retirar a pasta do local onde é efectuada a mistura, colocando-o na espátula ou seringa na qual efectuará a colocação do CPC no local do defeito ósseo. Este procedimento deve ocorrer após o CT e antes de t_i . Alternativamente o médico também poderá aplicar o CPC directamente com as mãos, moldando-o com os dedos (tipo pastilha-elástica) até obter a forma desejada para a sua utilização, desde que a aplicação ocorra, igualmente, entre CT e t_i . Para aplicações dentárias, o t_i deve ser próximo de 3 min, enquanto para aplicações ortopédicas deve ser próximo de 8 min. Contudo, em nenhum dos casos é tolerável para um clínico que o t_f seja superior a 15min [79,80].

A utilização do CPC como um injectável, pode tornar o processo demorado, uma vez que o CPC é preparado em plena cirurgia pelo clínico. Depois de se efectuar a mistura é necessário transferir a pasta para a seringa, o que pode levar algum tempo. Neste caso, pode ser desejável que o tempo inicial de presa seja mais próximo dos 8 minutos para que se tenha tempo de preparar a seringa, enquanto ainda é possível a deformação do cimento sem que ocorram danos estruturais. Até agora a maioria dos cimentos é preparada manualmente, colocando-se a fase sólida e líquida numa espécie de almofariz, e misturando-se tudo com o pilão ou uma espátula. Idealmente este processo deveria ocorrer sem deixar bolhas presas no interior da pasta [81] e, portanto, foram levantadas algumas preocupações no que diz respeito à existência de misturas que não fiquem homogêneas, que poderiam comprometer a resistência do implante, bem como sobre as inconsistências entre os operadores causando variações imprevisíveis no desempenho do cimento [20,49]. Assim uma forma de melhorar todo o procedimento, poderá passar pela utilização de misturadoras automáticas, que permitam controlar a mistura e a manipulação do CPC e onde o factor humano, desempenhe apenas um papel menor, reduzindo conseqüentemente o risco de ocorrência de falhas. No mercado já se encontram algumas marcas comerciais que possuem misturadoras automáticas para a preparação dos seus CPC.

2.3.3.2 injectabilidade

Para além de um curto período de solidificação e endurecimento, a injectabilidade da pasta também é uma propriedade muito importante. Isto é especialmente verdade, nos processos que envolvem defeitos de acessibilidade limitada, como cavidades restritas, ou quando há necessidade de uma colocação precisa da pasta para a conformação de uma área com defeito, e quando se pretende utilizar técnicas cirúrgicas minimamente invasivas.

Khairoun e colaboradores [17,82] mediram a injectabilidade de um CPC analisando a percentagem de pasta que poderia ser extrudida de uma seringa equipada com uma agulha. Estes caracterizaram uma má injectabilidade quando se verificava a ocorrência de separação de fase entre o sólido e o líquido, levando a uma extrusão parcial. Segundo estes autores quanto maior for a quantidade de cimento extrudido da seringa, mais injectável este é. Em todas as suas experiências, os autores utilizaram o mesmo sistema de injeção e a mesma carga (100N). Faz sentido manter a mesma geometria, pois é espectável que a mudança de geometria provoque alterações da injectabilidade. No entanto, é questionável utilizar sempre a mesma força. De facto, quando se

utilizam polissacarídeos como aditivos, mesmo em pequenas concentrações (até 5%), pode obter-se um CPC muito viscoso [83]. Como tal, a força necessária para extrudir a pasta da seringa pode chegar facilmente a valores superiores a 100N e, conseqüentemente, ser declarada “não-injectável”. Com base nestas observações, o dispositivo utilizado por Khairoun [17,82] e colaboradores não mede a injectabilidade de uma pasta mas sim a sua facilidade de injeção. Esta última propriedade é importante apenas se o cimento se destinar a ser injectado à mão, isto é, quando a força aplicada é limitada (geralmente cerca de 200N). Na prática cirúrgica, muitos cimentos são aplicados sob alta pressão por meio de uma pistola de injeção. Além disso também são utilizadas diferentes geometrias.

Tendo em conta o referido, Bohner e Baroud [84] definiram então a injectabilidade de uma pasta, como sendo a capacidade da pasta se manter homogénea durante a sua injeção. Por outras palavras, este deve poder ser extrudido através de uma agulha, mas sem que ocorra separação de fases. Esta separação de fases pode ocorrer quando a fase líquida da mistura se encontra muito fluida. Neste caso, quando se pressiona, o líquido sai da seringa, enquanto a maioria das partículas de CaP permanecem na seringa funcionando como um filtro. O risco de isto acontecer aumenta quando é necessário aplicar uma grande pressão [49]. Para tal, um dos aspectos cruciais que deve ser levado em conta é a coesão da pasta, pois um CPC com a coesão ideal endurece mesmo em contacto com fluidos sem se desintegrar e sem que haja separação de fases durante a injeção do produto. Outro aspecto, talvez o mais importante, é a sua viscosidade. Para que um CPC seja injectável a pasta deve apresentar baixa viscosidade, de modo a oferecer pouca resistência ao sair da seringa, no entanto formulações mais viscosas são úteis em situações em que o cirurgião opta por colocar manualmente a pasta no local [79].

Vários aspectos devem ser levados em conta, no que diz respeito a melhorar a viscosidade de um cimento. O primeiro, poderá passar pelo próprio aparelho de injeção, pois cânulas mais pequenas, e com um diâmetro maior favorecem a injectabilidade do cimento. Outros aspectos a modificar, já dirão respeito à própria composição do CPC. Aumentando a quantidade de líquido, consegue-se que a pasta fique menos viscosa e conseqüentemente mais fácil de injectar. Contudo, como já foi mencionado, isto poderá trazer conseqüências a nível das propriedades mecânicas, assim como levar à aniquilação da coesão da pasta. Outro ponto, respeitante à composição, passa por variar o tamanho das partículas dos componentes do CPC, optando por partículas mais finas. Porém, um tamanho mais pequeno requer uma maior quantidade de líquido, o que diminui a coesão da pasta e leva a uma maior porosidade e, igualmente, a uma redução nas propriedades mecânicas [20,49].

Para além destes aspectos, um que também tem sido muito estudado é o uso de vários aditivos. Adrianjatovo e Lemaître [85] observaram que a injectabilidade de um CPC de brushite foi bastante melhorado pela adição de polisacarídeos. Contudo, esta melhoria não foi quantificada nem bem descrita. Leroux e colaboradores [86] usaram glicerofosfato de sódio, ácido láctico, e quitosano para melhorar a injectabilidade de um outro tipo de CPC. Estes autores mediram a pressão requerida para extrudir a pasta e observaram que estes aditivos diminuíram essa força. O uso de pequenas quantidades de quitosano levaram a uma boa fluidez e boa injectabilidade. No entanto, uma quantidade mais elevada levou à diminuição quer da injectabilidade, quer do tempo de solidificação. Mais recentemente Belkoff e colaboradores [87] adicionaram soluções de hidroximetilcelulose a um CPC, e Borzacchiello e colaboradores [88] adicionaram álcool polivinílico (PVA) e em ambas as situações se verificou uma melhoria na injectabilidade. Os polissacarídeos são particularmente interessantes neste campo devido à sua compatibilidade e boas propriedades reológicas. A maioria das soluções de polissacarídeos apresentam carácter pseudoplástico, isto é, a viscosidade da solução diminui à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Assim, um CPC que contenha na sua composição uma solução de polimérica pode por isso ser facilmente injectada e apresenta boa coesão. Contudo, apenas só muito poucos polissacarídeos são aceites para uso parental. Além do mais, a solução polimérica pode normalmente apenas ser esterilizada através de ultrafiltração [49].

Também Sarda e colaboradores [73] descobriram que pela simples adição de íões de citrato conseguiam igualmente melhorar em 50-100% a injectabilidade de um cimento composto por uma mistura de α -TCP e água. Um resultado semelhante foi obtido pelo grupo de Barralet [59,89] para cimentos de brushite e apatite.

2.4 Aplicações médicas

Diferentes estudos já mostraram que os CPC são materiais altamente biocompatíveis e osteocondutores, que podem estimular a regeneração óssea [90,91]. A principal finalidade dos CPC é preencher lacunas no osso metafisário, reduzindo a necessidade de se recorrer a enxertos ósseos, embora estes também possam ter outras aplicações em medicina, tais como nos campos ortopédico e dentário.

O primeiro CPC comercial, foi introduzido no mercado para o tratamento de defeitos e deformações maxilo-faciais [92], e posteriormente para o tratamento de defeitos em zonas fracturadas [40]. Agora, as companhias começam a introduzir no mercado os chamados cimentos de segunda geração, e a alargar o seu portfólio para preencher os vários requisitos dos seus clientes. Por exemplo, como se provou, em estudos efectuados em animais, que os cimentos de brushite são mais rápidos a serem reabsorvidos do que os cimentos de apatite, este tipo de CPC tem interessado cada vez mais os clínicos [74].

2.4.1 Campo ortopédico

Brown e Chow [9,41], consideraram que este tipo de materiais poderia ser utilizado na **substituição de osso** que tivesse sido retirado durante uma cirurgia, ou perdido após um trauma [93], ou como **material de selagem** para cirurgia ortopédica, tendo em conta que este seria capaz de promover crescimento ósseo nas suas proximidades.

Moore e colaboradores [94] tentaram usar um CPC para aumentar a **fixação de fracturas da anca** instáveis e melhorar a sua fixação por meio de parafusos transpediculares, usados para fixar com firmeza a instrumentação posterior da coluna. A comparação dos testes *in vitro* de compressão e distensão deste cimento com o clássico PMMA, demonstraram resultados favoráveis á sua utilização

Schwarz e colaboradores [95] utilizaram um cimento CaP para **cimentar uma prótese** da anca canina. Os resultados são bastantes satisfatórios quando se compara os resultados da aplicação de carga *in vitro* aos obtidos com o cimento ósseo PMMA.

Estudos mais recentes, mostram que os CPC injectáveis, têm sido adoptados para: tratar **quistos do osso calcâneo** [96,97], e **fracturas patológicas**, entre outras [98]; **vertebroplastia ou cifoplastia** (para reparação directa de fracturas do corpo vertebral) [99] e em **cranioplastia** [20].

2.4.2 *Campo odontológico*

Também neste campo os CPC apresentam uma grande potencialidade para várias aplicações tais como:

- a. Suporte ou revestimento para proteger a polpa do dente⁷ [9,41];
- b. Material para tapar uma polpa exposta [9,41];
- c. Material para substituir ou promover a regeneração do osso perdido devido a uma doença periodontal [9,41];
- d. Material temporário de enchimento [9,41];
- e. Material odontológico de enchimento para canais radiculares [100];
- f. Material para preenchimento de cavidades deixadas após a extração dentária [101].
- g. Cimento para selagem em odontologia [9,41];
- h. Material de cimentação de *pins* de reconstrução [102].
- i. Material para encher defeitos ósseos à volta de implantes dentários [103].

⁷ A **Polpa dentária** é uma estrutura interna do dente. Esta é formada por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e innervado. Se a polpa se encontra danificada, infeccionada ou morta é necessário proceder-se à sua remoção. O espaço resultante deve ser limpo, preparado e preenchido. Este procedimento veda o canal. Os casos mais comuns ocorrem devido a um dente partido ou uma cárie profundo. Alguns anos atrás, os dentes com polpas infeccionadas ou mortificadas eram extraídos. Hoje em dia, um tratamento de preenchimento do canal salva muitos dentes que de outra forma teriam sido perdidos

CAPÍTULO

3

**Caracterização
dos materiais**

3.1 Ensaio de Compressão

Os ensaios de compressão foram implementados sobre provetes de cada amostra de CPC, na forma de barras cilíndricas, com diâmetro de 6mm e comprimento de 12mm, determinado pela norma ABNT NBR ISO 5833 [104]. Para cada amostra foram ensaiados cinco provetes de uma unidade de CPC.

Este ensaio consiste na aplicação de uma força axial compressiva sobre os cilindros de CPC. Um exemplo da montagem do ensaio e respectivo resultado (típico deste material) estão apresentados na figura 3.1 e 3.2 respectivamente.

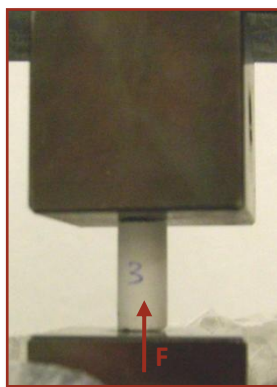


Figura 3.1 – Exemplo do ensaio de compressão num dos provetes de CPC.

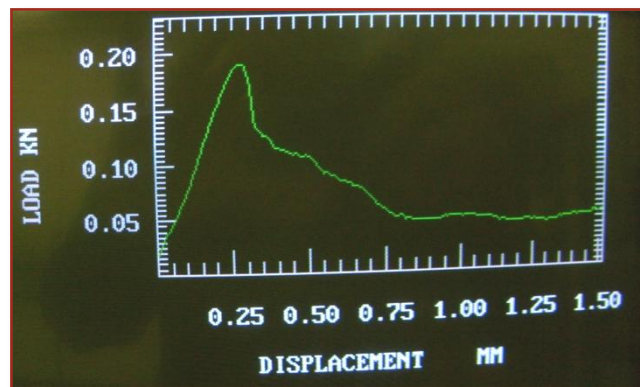


Figura 3.2 – Curva típica resultante do ensaio de compressão de um provete.

No presente trabalho usou-se uma máquina universal de ensaios de Tracção, marca Instron, modelo 4507 (figura 3.3 e 3.4) com capacidade para aplicar forças de compressão a velocidade constante. Pela norma, para os cimentos acrílicos, a velocidade definida é de 25mm/min. No entanto, como é um material cerâmico optou-se por uma velocidade mais reduzida, de 5mm/min.



Figura 3.3 - Máquina universal de ensaios mecânicos



Figura 3.4 - Consola e computador de apoio

Antes do início do ensaio, deve-se ter algum cuidado relativamente aos provetes, nomeadamente verificar as suas bases quanto à horizontalidade. Se necessário, devem ser ligeiramente decapadas, a fim de se obter uma superfície lisa e perpendicular ao eixo vertical do provete. No final, os provetes são novamente medidos e as suas dimensões inseridas na máquina. O ensaio decorre automaticamente até que se atinge a ruptura do provete, o que corresponde à carga máxima suportada. Na ruptura, a máquina pára automaticamente de adquirir dados e fornece o valor de tensão máxima exercida em N, bem como a tensão de ruptura em MPa.

Em teoria a resistência à compressão é dada pela tensão de ruptura, que se traduz pela divisão da carga máxima suportada pelo provete pela área da secção transversal sobre a qual foi aplicada a força.

$$\text{Tensão de ruptura (MPa)} = \frac{\text{carga máxima suportada}}{\text{área da secção transversal}} \leftrightarrow \sigma(\text{MPa}) = \frac{F(\text{N})}{A(\text{mm}^2)} \quad (8)$$

3.2 Flexão

O ensaio de flexão realizou-se sobre provetes de cada amostra de CPC com a forma de uma barra paralelepédica com 75mm de comprimento, 10mm de largura e 3.3mm de espessura. Estes valores encontram-se de acordo com a norma ABNT ISSO 5833 [104]. Para cumprir os requisitos desta norma foram ensaiados cinco provetes de cada amostra de CPC. Para este ensaio, utilizou-se igualmente a máquina universal de ensaios de tracção referida no ensaio de compressão.

A técnica do ensaio consiste em apoiar o provete em dois pontos, com uma distância entre eles (L), e aplicar lentamente uma força de flexão (F), a meia distância entre os pontos de apoio L (ver figura 3.5). A este dá-se o nome de ensaio de flexão em 3 pontos.

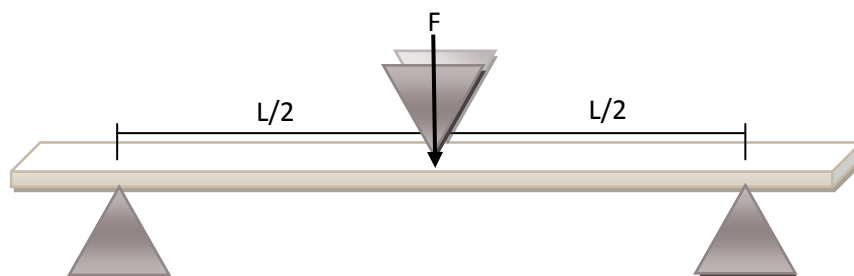


Figura 3.5 – Esquema do sistema utilizado para os ensaios de flexão em 3 pontos

Antes do ensaio, deve-se conferir a linearidade da espessura dos provetes, e medir cada um em comprimento, largura e espessura. Os provetes são então colocados na máquina de tracção, ajustando-a à espessura dos provetes. Após a colocação dos dados, da respectiva amostra no sistema informático da máquina, inicia-se o ensaio a uma velocidade de 1mm/min. Na ruptura, a máquina pára automaticamente de adquirir dados e fornece o valor de tensão máxima exercida em N, bem como a resistência e módulo de flexão em MPa.

A resistência à flexão é a tensão máxima desenvolvida na superfície da barra quando sujeita a uma força que leva a barra a quebrar. A resistência à flexão em 3 pontos é dada pela fórmula seguinte:

$$\sigma_{fs} = \frac{3F_{max} L}{2bh^2} \tag{9}$$

Onde:

σ_{fs} : resistência à flexão do material em MPa;

F_{max} : força aplicada no momento da fractura;

L: distância entre os pontos de suporte (mm);

b: largura do provete (mm);

h: espessura do provete rectangular (mm);

Deste ensaio pode retirar-se, não só o valor de resistência à flexão, como também o módulo de flexão. Este é medido pela tensão aplicada e a deformação resultante dentro do limite elástico, em que a deformação é totalmente reversível e proporcional à tensão. Regra geral, uma curva de tensão Vs deformação, mostra uma zona linear no início (figura 3.7).

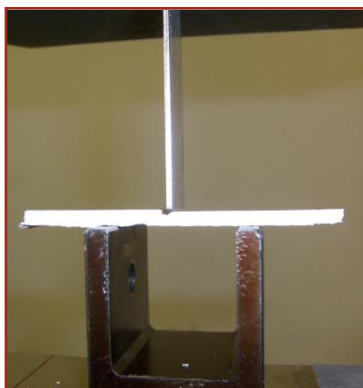


Figura 3.6 – Exemplo do ensaio de flexão num dos provetes de CPC.

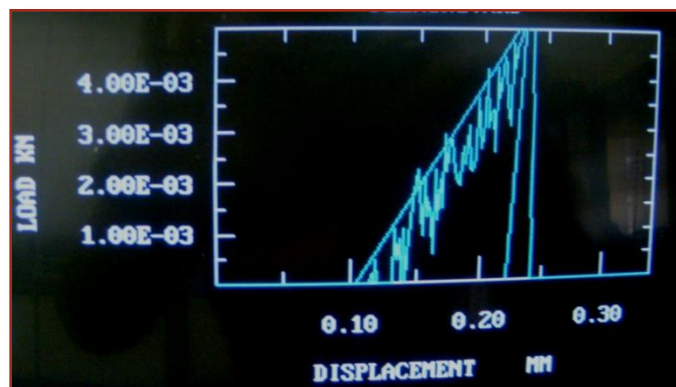


Figura 3.7 – Curva típica resultante do ensaio de flexão de um provete.

Nesta região a deformação é reversível, e o material é perfeitamente elástico retornando completamente ao seu formato original quando se retira a carga aplicada. O coeficiente angular na região de linearidade é denominado módulo de elasticidade e é dado pela fórmula:

$$E = \left(\frac{F}{d}\right) \left(\frac{L^3}{4bh^3}\right) \quad (10)$$

Onde:

F/d: corresponde ao declive da parte linear da curva força vs deslocamento

L: distância entre os pontos de suporte;

b: largura do provete;

h: espessura do provete;

3.3 Injectabilidade

Além da resistência á compressão e flexão, a injectabilidade do cimento ósseo também tem uma importância crítica quando se trata da utilização de técnicas minimamente invasivas. Tais como a fixação de fracturas *in situ*, ou a vertebroplastia percutânea, para preencher e fortalecer as lesões ósseas osteoporicas em risco de fractura.

As maiores vantagens que os CPCs injectáveis trazem são o facto de reduzir do tempo da intervenção cirúrgica, minimizar os efeitos prejudiciais de uma grande retracção muscular, reduzir a dor pós operatória e tamanho da cicatriz, e por fim, mas igualmente importante reduzir os custos de todo o procedimento cirúrgico.

Na prática definimos a injectabilidade de uma pasta, como a força necessária para expedir a pasta através da seringa, considerando-se o CPC injectável se a força necessária para tal não exceder os 100N.

Assim para a realização deste ensaio utilizou-se mais uma vez a máquina de tracção, em modo de compressão a uma velocidade de 5mm/min. Contudo desta vez interessa-nos a carga máxima que a máquina efectua, e não a tensão de ruptura.

Para o ensaio utilizou-se uma seringa polimérica de 5ml, sem agulha, cuja montagem aparece ilustrada na figura 3.8. Cada ensaio foi iniciado depois de decorridos 3 min e 30 s da adição da fracção líquida, e para cada amostra utilizou-se uma nova seringa. As leituras foram efectuadas na curva de força/deslocamento em intervalos de tempo adequados, registando-se a força máxima em Newtons.

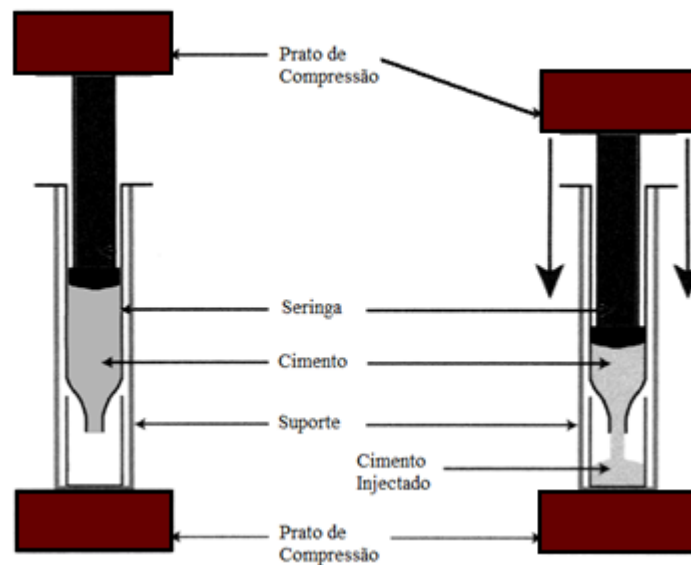


Figura 3.8 – Esquema do sistema utilizado para os ensaios de injectabilidade.

3.4 Tempo de presa

O tempo de presa é um ensaio que visa controlar o tempo de endurecimento do material. O controlo desse endurecimento pode efectuar-se observando a penetração de uma agulha de Vicat na superfície da pasta de CPC, até ao momento que esta atinge um valor determinado.

3.4.1 Determinação do tempo de início de presa ou *dough time*

O tempo de início de presa, ou *dough time*, é o tempo decorrido entre a mistura do cimento e o momento a partir do qual é possível manipulá-lo sem que este esteja pegajoso. Deste modo, este procedimento é muito simples e não necessita de ser efectuado com recurso ao aparelho de vicat. Como alternativa, o procedimento utilizado foi o mesmo aconselhado pelo anexo B da norma ABNT ISSO 5833. Para este, começa-se por misturar os componentes e dá-se início à medição do tempo. Após aproximadamente 1 min examina-se a superfície do cimento, pressionando a mesma com um dedo, utilizando-se luvas cirúrgicas sem pó, e observa-se se entre estes há formação de fibras. Limpa-se a luva de todo o material aderente e repete-se o procedimento em intervalos de tempo regulares até que a separação entre a luva e o cimento se faça de maneira limpa, ou seja, até ao momento em que este deixa de colar às luvas, registando este último como tempo de início de presa.

3.4.2 Determinação do tempo de fim de presa ou *Setting time*

O tempo de fim de presa, é o tempo necessário para a pasta adquirir a firmeza suficiente de modo a resistir a uma certa pressão. Neste caso o ensaio foi realizado por adaptação da norma NP EN 196-3 [106], no departamento de civil da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) da Universidade Nova de Lisboa.

Para este ensaio utilizou-se uma agulha de Vicat em aço, munida de um acessório anelar (figura 3.9). As partes móveis apresentavam uma massa total de aproximadamente 300g, sendo seu movimento vertical e sem fricção apreciável e o seu eixo coincidente com o da agulha (figura 3.10).

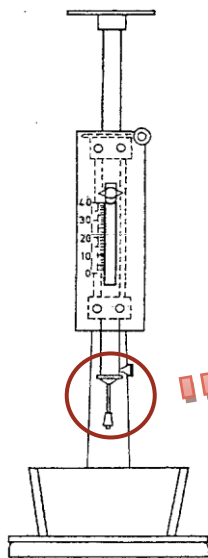


Figura 3.9 - Vista de frente mostrando a montagem para a determinação do tempo de fim de presa [106].

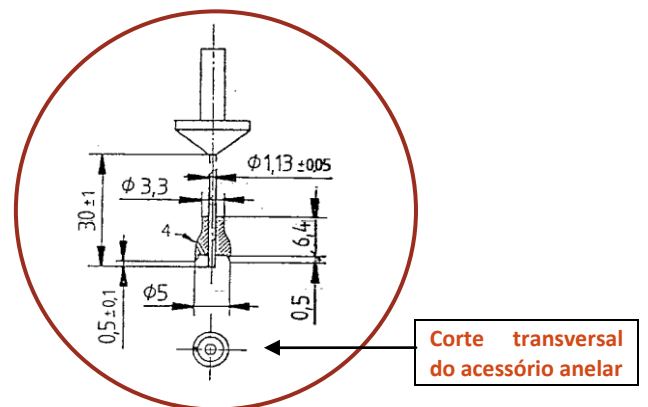


Figura 3.10 - Cotas da agulha com acessório para determinação do tempo de fim de presa [106].

Numa primeira fase do ensaio prepara-se o aparelho colocando a agulha e levantando-a até à posição de espera. O registo de tempo tem início, quando se procede à mistura dos componentes. Enche-se o recipiente e coloca-se por baixo do aparelho. Em intervalos de tempo adequados, baixa-se a agulha com cuidado até que entre em contacto com a pasta, evitando uma aceleração adicional das partes móveis, e em seguida liberta-se. O tempo final de presa, ou *setting time* é dado pela primeira vez que a agulha penetra apenas 0,5mm na pasta. Este é o tempo ao fim do qual o acessório anelar deixa de fazer um traço na pasta, notando-se apenas um ponto marcado pela própria agulha.

3.5 Viscosidade

A viscosidade de um material expressa as propriedades de escoamento de um fluido (quanto maior a viscosidade, maior é a resistência que as camadas internas impõem a fluir). Esta define-se quantitativamente em termos de dois parâmetros básicos: a tensão de cisalhamento τ e taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$. A figura 3.11 mostra o esquema da acção e uma força sobre uma camada de fluido em caso de regime laminar. A partir deste, estabelece-se um sistema rectangular de coordenadas onde o eixo do x corresponde à direcção do escoamento, e onde o eixo do y é perpendicular à superfície do fluido, ou seja, paralelo ao gradiente de velocidade. O eixo do z é mutuamente perpendicular aos outros. Este é o caso de um cisalhamento simples.

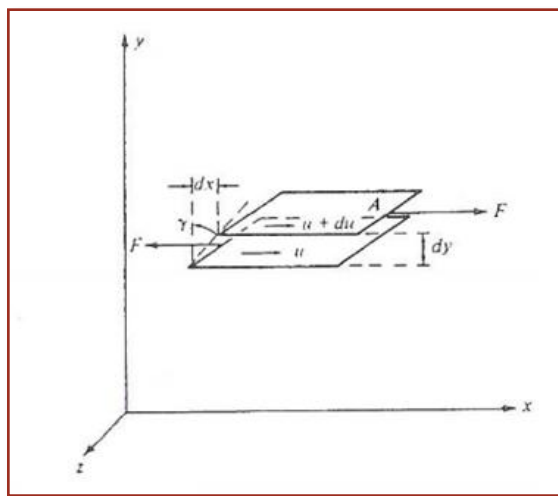


Figura 3.11 – Acção de uma força de cisalhamento aplicada num fluido [107].

A força F da origem a uma força com a mesma intensidade mas em sentido contrário, que existe somente devido às forças de coesão do fluido entre as várias camadas. Uma camada do fluido em y move-se com uma velocidade $u = dx/dt$ na direcção x, enquanto outra camada em $y + dy$ tem a velocidade $u + du$. O gradiente de deslocação, dx/dy é dada pelo símbolo γ .

$$\gamma = \frac{dx}{dy} \tag{11}$$

A taxa de variação do gradiente de deslocação ao longo do tempo, $\dot{\gamma}$, é a chamada taxa de cisalhamento. Matematicamente, a taxa e cisalhamento é a derivada do gradiente de deslocação em função do tempo (eq.12).

$$\dot{\gamma} = \frac{d}{dt}(\gamma) = \frac{d}{dt}\left(\frac{dx}{dy}\right) = \frac{du}{dy} \text{ (tempo}^{-1}\text{)} \tag{12}$$

Assim a taxa de cisalhamento é idêntica ao gradiente de velocidade du/dy .

A tensão de cisalhamento é a força (na direcção do fluxo) por unidade de área normal ao eixo do y .

$$\tau_{xy} = \frac{F \text{ (na direcção do } x\text{)}}{xA \text{ (normal à direcção de } y\text{)}} \quad \left(\frac{\text{força}}{\text{comprimento}^2} \right) \quad (13)$$

A viscosidade η define-se como a razão entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento (eq.14) e as suas unidades são, em unidades SI de $N.s/m^2 = Pa.s$.

$$\eta \equiv \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (14)$$

A relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento a temperatura constante é conhecida como curva de escoamento. Os perfis de alguns tipos de comportamento reológico frequentemente observados são apresentados na Figura 3.12.

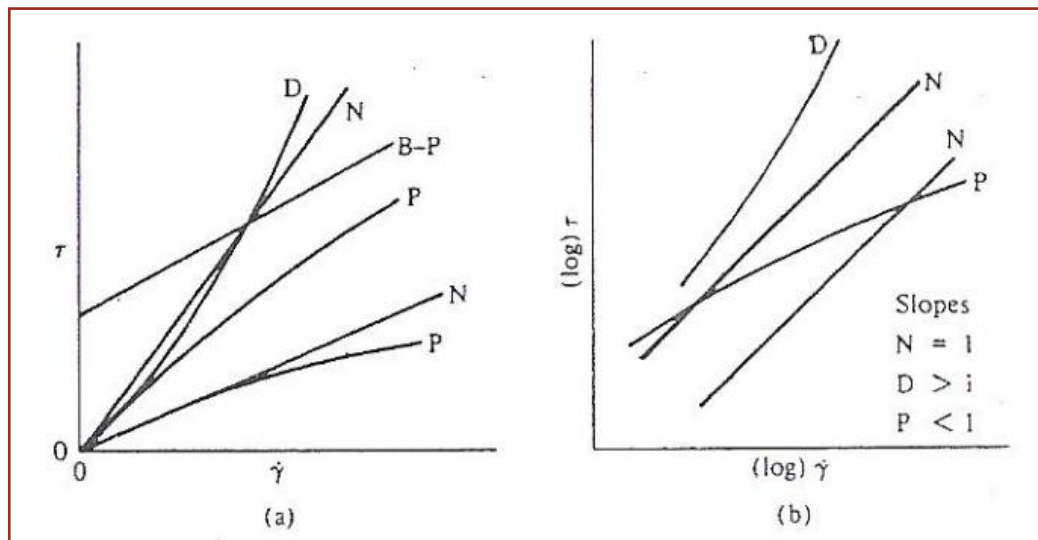


Figura 3.12 – Tipos de curvas de fluxo para diferentes tipos de comportamento reológico: a) escala aritmética, b) escala logarítmica. N, Newtoniano; P, Pseudo-plástico; B-P, Bingham-plastic (infinitamente pseudoplástico); D, Dilatante [107].

Segundo Newton, a relação apresentada na eq.14 é linear, ou seja, verifica-se que há uma proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. Os fluidos que seguem este comportamento designam-se fluidos newtonianos.

Para além dos fluidos newtonianos, dependendo das suas características de escoamento, os fluidos também podem ser não newtonianos. O fluido newtoniano é aquele cuja viscosidade é igual, independentemente da tensão de cisalhamento a uma dada temperatura. Por outro lado, o fluido não newtoniano caracteriza-se por uma mudança na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (figura 3.13).

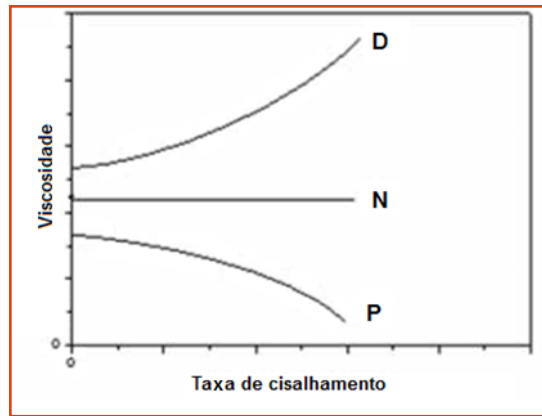


Figura 3.13 – Curvas de viscosidade correspondentes a diferentes comportamentos reológicos: Newtoniano; P, Pseudo-plástico; D, Dilatante.

Os sistemas não-newtonianos apresentam dois tipos de fenômenos que os distinguem de sistemas newtonianos: fenômenos independentes do tempo e fenômenos dependentes do tempo.

Nos fenômenos independentes do tempo, os líquidos que podem apresentar comportamentos designados por pseudoplásticos, plásticos e dilatantes.

Os pseudoplásticos são os líquidos que apresentam diminuição da viscosidade aparente com o aumento da tensão de cisalhamento (exemplo: tintas). Os plásticos são líquidos que apresentam uma tensão de cisalhamento mínima para iniciar o escoamento. Os dilatantes são líquidos onde há o aumento da viscosidade aparente com o aumento da tensão de cisalhamento. Estes fluidos comportam-se de maneira semelhante a um líquido a baixas tensões de cisalhamento, contudo, quando submetidos a tensões de cisalhamento elevadas, podem tornar-se tão rígidos quanto um sólido (exemplo: maisena).

Os fenômenos dependentes do tempo dividem-se em dois casos possíveis: tixotrópicos e reopéticos.

Os fluidos tixotrópicos apresentam uma diminuição de viscosidade enquanto se aplica a tensão de corte, quando esta pára este volta a ficar mais viscoso. Por outro lado os fluidos reopéticos apresentam um comportamento inverso, ou seja, a viscosidade destes fluidos aumenta com o tempo de aplicação da tensão, retornando igualmente à viscosidade inicial quando essa força cessa (figura 3.14).

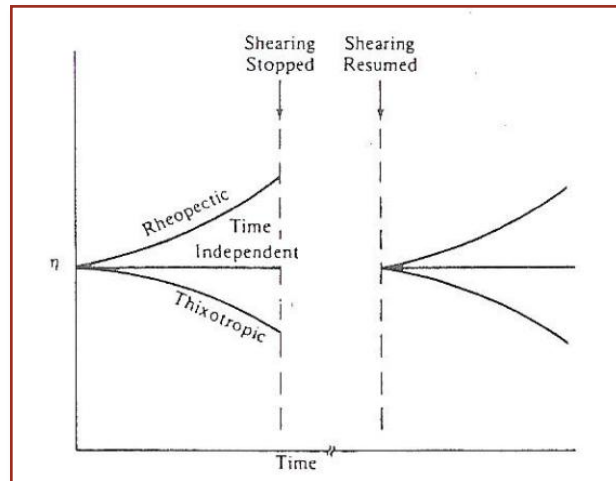


Figura 3.14 – Comportamento dos fluidos dependentes do tempo [107].

Para o estudo da viscosidade, utilizou-se um viscosímetro de Brookfield (figura 3.14), o qual permite medir electronicamente a força de torção já convertida em viscosidade, na unidade de centipoise⁸ (cP). O viscosímetro funciona pelo princípio da rotação de um cilindro (*spindle*) submerso na amostra a ser analisada, medindo-se a força da torção necessária para superar a resistência da rotação. Este possui vários "*spindles*" cada um apropriado para medir a viscosidade de fluidos de uma faixa específica: os de menor diâmetro, servem para medir viscosidades mais elevadas; os de maior diâmetro, viscosidades menores.

Para a determinação da viscosidade da fase líquida do CPC, utilizou-se o *spindle* R3 a uma velocidade de rotação de 100rpm, numa sala com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 3.15 – Viscosímetro de Brookfield

⁸ 1cP = 10^{-3} Pa.s

3.6 Espectroscopia de infravermelhos

A espectroscopia de infravermelhos, é uma técnica de absorção, uma espécie de espectroscopia vibracional, que permite identificar compostos químicos e grupos substituintes. É uma técnica rápida e barata, muito útil na identificação de certos grupos funcionais em moléculas e até na identificação de um composto desconhecido, por comparação do seu espectro com um de referência [106].

O espectro vibracional de uma molécula é considerado uma propriedade física única e característica de cada molécula, não existindo dois compostos exactamente com o mesmo espectro de infravermelhos. Todas as moléculas estão em constante vibração, mesmo à temperatura do zero absoluto. As suas ligações interatómicas distendem-se (e contraem-se), e flectem-se relativamente umas às outras. Um exemplo simples e ilustrativo dos vários tipos possíveis de vibração de uma molécula é o metanal (H_2CO), que possui 6 tipos de vibração, tal como se pode ver na imagem seguinte:

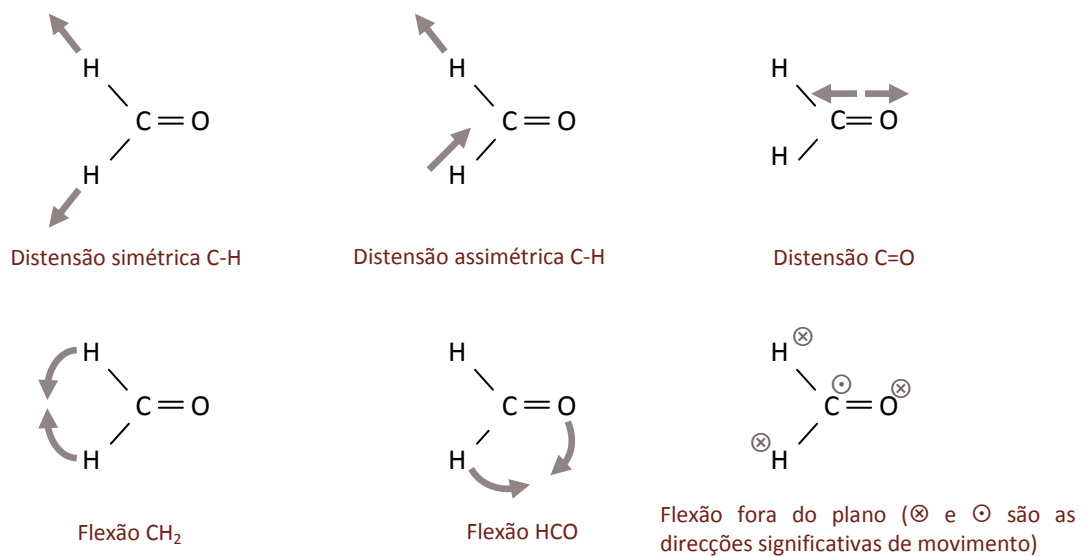


Fig.3.16 – Tipos de vibração da molécula de metanal.

A radiação do infravermelho causa excitação dos estados de vibração moleculares. Isto ocorre somente quando a radiação infravermelha interage com uma molécula que sofre uma mudança de dipolo, e quando o fóton incidente tem energia suficiente para a passagem ao próximo estado de energia vibracional permitido. Se estas duas regras não forem cumpridas a absorção não pode ocorrer.

Uma banda de absorção observada a um dado comprimento de onda específico indica a presença de uma ligação particular, ou de um grupo de ligações, na molécula, o que ajuda a revelar a estrutura do composto. Embora a absorção seja apenas ligeiramente afectada pelo meio da ligação molecular ou do grupo, é possível determinar, a partir de pequenas variações nas frequências de banda, que tipo de ligações se trata.

Os espectros de FTIR das amostras de Hidroxipropilo quitosano (HPCS), CS e CPC foram obtidos a partir de pastilhas de KBr. Cada amostra sólida foi triturada com um almofariz de forma a obter um pó fino e homogéneo. Ao pó foi misturado Brometo de Potássio (KBr), na razão de 1:10 nas amostras correspondentes ao HPCS e quitosano, e 1:100 nas amostras correspondentes ao CPC. Procedeu-se à maceração de cada mistura com ajuda de um almofariz e pilão, até completa homogeneização. A mistura obtida foi introduzida no pastilhador e posteriormente prensada a uma pressão de 10mbar. A pastilha de KBr foi colocada no respectivo suporte e o conjunto inserido na câmara do espectrofotómetro. O espectro de infravermelhos foi obtido para comprimentos de onda na gama de 500 a 4000 cm^{-1} num espectrómetro FTIR Mid-IR ABB Bomem, FTLA2000.



Figura 3.17 – Equipamento de FTIR.

3.7 Ressonância magnética nuclear (^1H -RMN)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que permite determinar a estrutura de moléculas orgânicas e de biomoléculas em solução, a partir da identificação de sinais referentes a diferentes espécies nucleares (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , etc...) quando os respectivos átomos têm diferentes localizações no edifício molecular.

Esta tira vantagem das propriedades magnéticas do núcleo capaz, de sentir a proximidade de átomos electronegativos, ligações duplas, e outros núcleos magnéticos dentro da estrutura molecular. Alguns átomos, comportam-se como se o seu núcleo se encontrasse carregado, a rodar num eixo. A rotação destas partículas carregadas – rotação de carga – tal como uma corrente eléctrica, dá origem a um pequeno campo magnético nuclear, orientado segundo o eixo de *spin*, o que significa que estes funcionam como minúsculas barras magnéticas. Um desses átomos, aquele que nos interessa neste trabalho, é o hidrogénio, ^1H . Na ausência de campo magnético externo, os momentos magnéticos dos prótons de uma amostra encontram-se orientados aleatoriamente. No entanto, quando colocado num forte campo magnético externo, o núcleo magnético tenta alinhar como se fosse uma agulha no campo magnético da terra. O momento magnético pode assumir duas orientações possíveis: a favor ou contra o campo externo, correspondendo aos dois estados de *spin* possíveis. O alinhamento segundo o sentido do campo é o mais estável e terá de haver absorção de energia para fazer saltar o minúsculo magneto protónico para o alinhamento menos estável, contra o campo.

A energia mínima necessária capaz de provocar a passagem estado de energia mais baixo para o estado de maior energia, depende da intensidade do campo externo. Assim, quanto mais forte for o campo externo (B_0), maior é a tendência para se manter o alinhamento mais estável, pois mais alta será a frequência da radiação (ν_0) necessária para efectuar a inversão. A fórmula seguinte demonstra essa relação.

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (15)$$

Onde:

ν_0 é a frequência de Larmor, em Hz, a frequência de ressonância que, quando atingida, permite que haja uma transição de estado.

γ é a constante característica do núcleo, denominada razão giromagnética, cujo valor é $2,675 \times 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o H.

B_0 é a intensidade do campo magnético externo.

Os dois alinhamentos do próton num campo magnético, não têm a mesma energia. Sem campo magnético não há diferença, no entanto sob um campo magnético, se o próton estiver

alinhado a favor do campo a sua energia é mais baixa do que se estiver alinhado contra o campo (figura 3.10). Ao aplicar-se um impulso de radiofrequência (rf) à amostra, por absorção de energia, os spins alinhados a favor, podem transitar para estados de energia menos estável (contra o campo). No entanto, este facto ocorre apenas se o impulso de rf magnética estiver à frequência de ressonância do núcleo, uma vez que a absorção de energia desses elementos é quantizada.

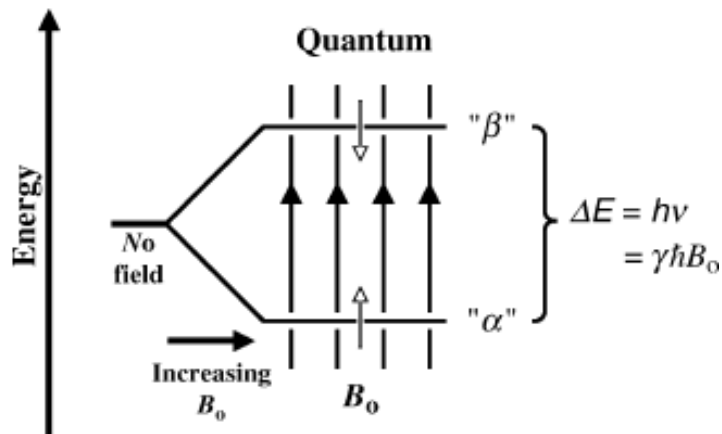


Figura 3.18 – Possíveis estados de energia do próton ao ser colocado sob um campo magnético [108].

A frequência de ressonância é diferente para cada núcleo, o que permite que se obtenham espectros característicos para cada elemento. Por exemplo, a frequência não é a mesma para o carbono e o hidrogénio, sendo para um espectrómetro típico de RMN (Bruker MSL 300 P) respectivamente 73 e 300 MHz, num campo de 7 Teslas. Esta frequência depende linearmente do campo (eq.11). A fig 3.19 é ilustrativa disso.

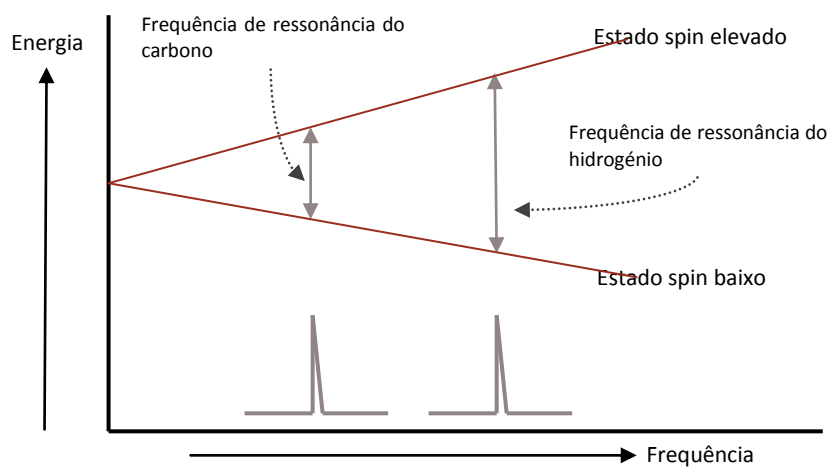


Figura 3.19 – Esquema ilustrativo de como se obtêm os espectros característicos de cada elemento.

Os spins nucleares ficam excitados no estado menos estável, apenas enquanto o impulso de rf estiver ligado. Assim que o impulso termina estes voltam ao estado de energia mais estável (de menor energia) perdendo a energia extra, que tinha sido fornecida pelo impulso de rf, no momento em que tinham transitado para o estado de alta energia. Isto é conseguido pela emissão de frequências de rf que se podem detectar dando origem a um espectro RMN de frequência, onde os sinais (picos) correspondem às energias emitidas.

Estas frequências emitidas serão ligeiramente diferentes da frequência de original. As diferenças ocorrem devido aos diferentes ambientes químicos dos átomos das amostras e o número de spins associados a cada, que introduzem campos locais ΔB no campo principal B_0 .

Para o ^1H -RMN as frequências medidas são feitas relativamente a um composto de referência, o tetrametilsilano (TMS), e o deslocamento químico é expresso em parte por milhão (ppm) do campo magnético principal. Divide-se o deslocamento observado em Hz pelo valor da rf utilizada, e assim o deslocamento químico traduz-se por um valor constante, independente da rf e do campo magnético.

$$\delta = \frac{\text{deslocamento observado (Hz)} \times 10^6}{\text{frequência do espectrómetro (Hz)}} \quad (16)$$

O resultado a que se chega é um espectro com muitos picos de absorção, cujas posições relativas, por reflectirem diferenças de ambiente dos prótons, dão indicações pormenorizadas sobre a estrutura molecular. Na interpretação destes espectros existem vários factores a ter em conta, a saber:

1. O número de sinais – que nos indica quantas “espécies” de prótons diferentes há na molécula, uma vez que, prótons com o mesmo ambiente absorvem à mesma indução magnética (cada sinal pode apresentar uma estrutura fina independente do campo B_0).
2. As posições dos sinais – que nos dão informações acerca do ambiente electrónico de cada espécie de próton, ou seja, de que tipo de próton se trata: aromático ou alifático; primário, secundário ou terciário; benzílico, vinílico ou acetilénico; adjacente de átomos de halogénio ou outros átomos ou grupos de átomos. Estas diferentes espécies de prótons têm diferentes ambientes electrónicos e é precisamente isso que determina o local exacto do espectro em que um próton absorve (figura 3.12). Estas posições dependem de B_0 .

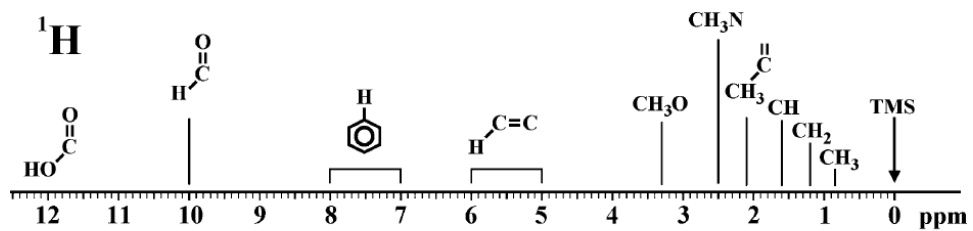


Figura 3.20 – Posições dos sinais correspondentes a cada espécie de protão em relação ao TMS [108].

3. As intensidades dos sinais – que nos revelam quantos protões de cada espécie existem na molécula. A área de um sinal de RMN é directamente proporcional ao número de spins associados ao sinal, isto é, ao número de átomos na amostra responsável pelo sinal. A área de um sinal obtém-se simplesmente por integração do mesmo, produzindo um traço de integral.
4. O desdobramento de um sinal em vários picos (estrutura fina) – que nos informa sobre o ambiente de um protão no que respeita a outros que se encontrem na vizinhança. Em geral o sinal de um protão com n protões vizinhos desdobra-se em n+1 picos com uma razão de intensidades determinada pelo triângulo de Pascal.

As amostras foram preparadas dissolvendo 0,3g de HPCS em 2ml de água deuterada. Antes de se dar início ao ensaio a solução foi filtrada utilizando-se filtros de membrana de porosidade 0.45µm. O ensaio decorreu no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT) num aparelho da marca Bruker MSL 300P.



Figura 3.21 – Espectrómetro de RMN do CENIMAT

3.8 Difracção de raios-x (DRX)

A técnica de difracção de raios-X oferece uma vasta informação sobre a microestrutura de um determinado material, sendo que neste caso permite-nos a identificação das fases cristalográficas presentes no CPC, ou seja, identificar a composição final do cimento.

Dado que os comprimentos de onda dos raios-X são aproximadamente iguais às distâncias entre os planos atômicos dos sólidos cristalinos, quando um feixe de raios-X colide com um sólido cristalino, podem produzir-se picos reforçados de radiação, de diversas intensidades. Bragg conseguiu obter uma relação entre o comprimento de onda da radiação-X e o ângulo dos raios-X reflectidos

Um átomo ao ser atingido por radiação-X com determinada frequência, faz com que os seus electrões vibrem com a mesma frequência, espalhando essa radiação em todas as direcções. Como os cristais apresentam uma estrutura cuja distância entre os planos é da ordem do comprimento de onda da radiação incidente, então haverá uma interferência construtiva em certas direcções e destrutiva noutras. Contudo, a difracção ocorre somente na interferência construtiva e para que isso ocorra é necessário que a diferença entre as distâncias percorridas pelos raios-X seja igual ao múltiplo inteiro do comprimento de onda, isto é

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\theta \quad (17)$$

Esta equação, conhecida como lei de Bragg [109], dá a relação entre as posições angulares dos feixes difractados reforçados, em termos do comprimento de onda λ do feixe de raios-X incidente e da distância interplanar d_{hkl} dos planos cristalográficos. Na maior parte dos casos usa-se difracção de primeira ordem, em que $n = 1$; neste caso a lei de Bragg toma a forma:

$$\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\theta \quad (18)$$

A análise de DRX foi obtida por utilização de um difractómetro Phillips modelo PW 1830, instalado no Departamento de Materiais do Instituto Superior Técnico (UTL) com raios-X gerados a partir de uma ampola de cobre sob um potencial de aceleração de 40kV e um feixe de corrente de 30mA. A velocidade angular do goniómetro foi de 2θ /passo e o varrimento foi feito com foco nos picos mais relevantes de 20° a 45° .

As fases obtidas por este método foram então comparadas com as fichas padrões do JCPDS.

3.9 Cromatografia líquida de exclusão molecular (GPC/SEC)

A cromatografia é um processo que permite separar compostos de misturas complexas com grande precisão. Este é essencialmente um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais estacionária e outra móvel através da primeira. A distinção entre os principais métodos cromatográficos é feita em termos das propriedades da fase móvel. Deste modo temos numerosas técnicas cromatográficas, sendo aquela que nos interessa para caracterizar o HPCS uma cromatografia líquida de exclusão molecular. Nesta, como o nome indica, a fase móvel é um líquido de baixa viscosidade, e como a fase estacionária é um sólido poroso faz-se a separação em função do tamanho molecular. No entanto quando se utiliza esta técnica no estudo de polímeros a fase estacionária é um gel, chamando-se por isso cromatografia de permeação de gel ou GPC.

A determinação do peso molecular do HPCS foi realizada num equipamento de marca *KNAUER* com bomba modelo *Smartline Pump 1000*. As soluções foram filtradas utilizando filtros de membrana de porosidade $0.45\mu\text{m}$, e as amostras de polímero foram injectadas com a concentração de 0,001 % (p/v) e um volume de $100\mu\text{L}$.



Figura 3.22 – Equipamento de GPC/SEC

3.10 Citotoxicidade

No estudo da biocompatibilidade de um material para implante, o primeiro passo que deve ser efectuado são os ensaios *in vitro* de citotoxicidade. Estes visam minimizar o uso de animais em laboratório, servindo como uma pré-selecção dos materiais que devem ser implantados.

Os testes foram efectuados com o intuito de testar a viabilidade celular, isto é o número de células que se encontram viáveis após o contacto com o produto, e consequentemente a citotoxicidade do cimento. Estes foram realizados de acordo com a norma ISO 10993-5 [110], tendo sido parte dos testes realizados no INETI e outra parte no departamento de química e engenharia biológica do Instituto Superior Técnico.

A citotoxicidade foi determinada recorrendo ao teste do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) em extractos. Este consiste essencialmente em colocar o material a ser testado (indirectamente) em contacto com uma cultura de células e, em tempo apropriado, observar as alterações celulares que este material ocasiona.

Este teste é um método quantitativo e que permite a avaliação da função mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazolium que é reduzido por enzimas desidrogenases, nas células viáveis formando cristais de formazana solúveis em etanol. Este funciona como um indicador colorimétrico da actividade metabólica celular, sendo a sua forma oxidada amarela e a forma reduzida púrpura.

Para o teste as células (linha celular de fibroblastos L929) foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo em cada poço 1.6×10^3 células e então incubadas a $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ em atmosfera húmida com 5% CO_2 . Preparam-se extractos dos diferentes materiais (incubando o material com meio de cultura a 37°C durante 24 horas), nos quais as células foram plaqueadas e determinou-se a actividade metabólicas das células após 48 horas.

Como controle negativo utilizou-se células com meio adicional de 10% de soro fetal, para proporcionar um meio óptimo ao seu desenvolvimento e desta forma não se obter qualquer resposta citotóxica. Para além deste efectuou-se um controlo positivo (meio com 0.01 M de fenol), que é utilizado para se obter uma resposta reprodutível da percentagem de células viáveis.

Por fim, adicionou-se o corante MTT, que em presença de células viáveis, é reduzido a um produto de cor púrpura, permanecendo amarelo no caso de a viabilidade ser reduzida ou quase inexistente. O corante precipitado é diluído em isopropanol e ácido clorídrico e a leitura da densidade óptica (DO) é medida a 570nm com filtro de referência de 655nm.

Para cada material efectuou-se cinco réplicas assim como do controlo de células. No controlo positivo o número de réplicas foi de 3.

Por fim percentagem de viabilidade celular é obtida com base nas leituras de absorvância e através da comparação da percentagem de células vivas em presença de cada amostra com o controlo de células.

3.11 Ensaios *In vivo*

A fim de comprovar a ausência de toxicidade do composto CPC, avaliar o grau de biocompatibilidade e comprovar a sua eficácia como substituto ósseo realizaram-se ensaios *in vivo* em coelhos. O ensaio *in vivo* foi realizado conforme a norma ISO/TR 10993 - *Biological Evaluation of Medical Devices* [110], num total de 8 coelhos, que por serem animais de fácil obtenção e manuseamento servem para uma avaliação primária dos objectivos.

Os ensaios decorreram seguindo protocolos anestésicos e cirúrgicos habituais, e a sua evolução foi acompanhada por meio de radiografias.

Finalizado o tempo do ensaio, pretende-se ver confirmados: a ausência de toxicidade do composto e a biocompatibilidade, bem como avaliar o efeito do composto no crescimento de novo tecido ósseo.

CAPÍTULO

4

**Composição
do CPC em
estudo**

Este cimento, tal como os cimentos acrílicos, é constituído por duas fases: uma componente em pó (fase sólida da mistura) e a uma componente líquida, que reagem quando misturados formando uma pasta que enrijece em poucos minutos, sendo possível com esta obter o efeito de colagem.

4.1 Composição da fase sólida

A fase sólida é composta por β -TCP que possui um rácio entre cálcio e fósforo (Ca/P) de 1.5.

Como foi referido, também os diâmetros de partícula dos fosfatos de cálcio usados podem ter influência. Neste caso foi usado o β -TCP com partículas de 5 μm de diâmetro, de forma a se obter uma maior superfície difusional, que provoca uma diminuição no tempo de endurecimento.

O β -TCP que compõe a fase sólida do cimento ósseo foi-nos fornecido pela Plasma Biotal Limited, Uk, (p 251s, BM 168).

4.2 Composição da fase líquida

A fase líquida é composta por agentes de dois tipos: um agente retardador e um agente estruturante.

4.2.1 Agente retardador:

Na reacção de solidificação, a dissolução do CaP com um solvente aquoso poderá ser muito rápida, formando-se um cimento de estrutura irregular e com baixa resistência. Para regular a cinética desta reacção e tornar o cimento adequado ao uso médico, introduziu-se um agente retardador, composto por um ácido orgânico.

O ácido orgânico, escolhido para este efeito foi o ácido málico. Esta selecção está de acordo com a necessidade de dissolução do agente estruturante que necessita de um pH menor que 6.5. Por outro lado, este é um produto biocompatível, usado em várias aplicações tais como comidas, bebidas e produtos de beleza por ser acidulante, aromatizante e estabilizante (é identificado pelo número **E296** na indústria alimentícia). Preserva o sabor, ajusta o pH e na indústria farmacêutica, o ácido málico é utilizado na higienização e regeneração de fermentos e queimaduras. Contudo, o factor essencial para a escolha do ácido é a quantidade de grupos carboxilo que este possui.

Neste caso optou-se por uma solução aquosa com 40% (em peso) de ácido málico, de forma a obter uma elevada presença de grupos carboxilo. Esta elevada concentração de ácido garante também que o agente estruturante seja totalmente dissolvido.

4.2.2 Agente estruturante:

Como também foi referido, os CPC por serem cerâmicos podem resultar em rupturas precoces e eventuais fragmentações dos implantes rígidos, fracturando catastroficamente quando submetidas a forças relativamente pequenas [111]. Assim de forma a evitar este efeito e contornar esse problema, adicionou-se na fase líquida um agente estruturante, o HPCS. Este é um derivado do quitosano capaz de formar matrizes não rígidas, que lhes permitem suportar forças maiores do que os CPC.

O Quitosano é um biopolímero obtido da desacetilação da quitina, que é o maior constituinte do exoesqueleto de crustáceos e outros animais marinhos [112]. Actualmente este tem sido utilizado no tratamento de águas, produção de cosméticos, drogas e medicamentos, aditivos alimentares e em membranas semipermeáveis. Mas, é no desenvolvimento dos biomateriais e aplicações biomédicas que este tem sido mais estudado devido às suas excelentes propriedades [113]. Este é biocompatível, biodegradável, não tóxico, pode ser utilizado como agente hidratante, como material encapsular na produção de sistemas de libertação de fármacos e servir de matriz na reconstrução óssea, para além de apresentar propriedades cicatrizantes e eficácia contra bactérias vírus e fungos [114].

O HPCS, tal como o quitosano, é não tóxico e biocompatível e conhecido pelas suas propriedades gelificantes (que depende tanto do grau de polimerização, como da conformação do polímero).

O HPCS deverá imobilizar as partículas do CPC, mantendo todas as partes que compõem o cimento numa mistura uniforme, melhorando as propriedades de maleabilidade e injectabilidade [16].

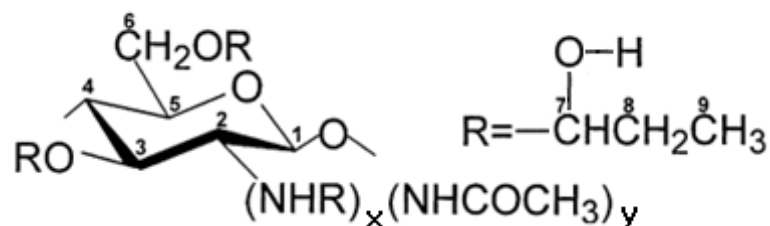


Figura 4.1 – Ilustração esquemática da estrutura química do HPCS ($x > y$; $x+y = 1$).

CAPÍTULO

5

**Produção e
caracterização do
HPCS e da fase
líquida do CPC**

5.1 Procedimento Experimental da síntese de HPCS

O HPCS é obtido por modificação química do CS. A reacção de modificação dá-se em duas etapas. Primeiro utiliza-se hidróxido de sódio (NaOH) para a reacção de alcalinização, e em seguida pela adição de álcool isopropílico ((CH₃)₂CHOH) e óxido de propileno (C₃H₆O) são introduzidos grupos hidroxipropilo principalmente nos carbonos 3 e 6, podendo também ocorrer substituição no grupo NH₂ do quitosano (Figura 4.1).

Esta substituição visa aumentar a reactividade pela inserção de mais grupos reactivos conseguindo-se melhores propriedades de trabalho durante o tempo de presa e propriedades mecânicas finais superiores, sem ter de se recorrer a outros elementos para regulação da estrutura ao longo da reacção.

A síntese do HPCS foi efectuada com ligeiras alterações a um procedimento existente na literatura [115], pois período de alcalinização foi reduzido para 1h e a amostra não foi mantida durante a noite a -18°C. Na segunda etapa de obtenção do hidroxipropilo, adicionou-se 8 ml de álcool isopropílico e passado uma hora 16ml de óxido de propileno mantendo a mistura a agitar em refluxo. Para a optimização do processo fez-se variar a temperatura e tempo de reacção em refluxo. A designação das amostras e respectivos parâmetros encontram-se descritos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Parâmetros variáveis das respectivas amostras de HPCS.

Designação da amostra	Temperatura (°C)	Tempo de reacção (h)
P1	40	2
P2	40	4
P3	60	2
P4	60	4
P5	80	2
P6	80	4

5.2 Caracterização do hidroxipropilo quitosano

A caracterização do HPCS foi efectuada tendo em conta três ensaios diferentes. Através dos ensaios de FTIR verificámos se e onde ocorreu a substituição do grupo hidróxilo no quitosano. Esses dados foram então confirmados por ensaios de RMN que nos permitiram também quantificar o grau de substituição. Por fim utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de exclusão molecular (GPC/SEC), para verificar o efeito do processo, duração da reacção e temperatura, no peso molecular uma vez que este está relacionado com as propriedades gelificantes do polímero.

5.2.1 FTIR

Com o intuito de verificar as modificações ocorridas no processo de síntese, efectuou-se a comparação das amostras de HPCS com uma amostra do quitosano precursor.

Consequentemente em todas as amostras de HPCS se verificou a presença de uma grande banda de absorção entre os 1320 - 1465 cm^{-1} e outra não tão evidente a 2970 cm^{-1} . Ambos característicos da presença do grupo hidroxipropilo, e que correspondem respectivamente à flexão e distensão dos grupos CH_3 , CH_2 e CH correspondentes respectivamente ao carbono 9, 8 e 7 (figura 4.1).

Também se verificou que, em todos os HPCS, a banda correspondente à absorção do grupo hidroxilo ($-\text{OH}$), entre o 3400-3500 cm^{-1} , diminuiu quando comparado com as bandas a 2970 cm^{-1} , devido a uma diminuição da razão molar OH/CH_3 (CH_2 , CH). Ou seja, houve efectivamente substituição dos grupos hidroxilo por grupos hidroxipropilo o que levou ao aumento dos grupos CH_3 , CH_2 e CH presentes na molécula durante a reacção de síntese do hidroxipropilo.

Com isto pode-se afirmar que em todas as amostras ocorreu substituição com a incorporação do grupo hidroxilo. De todas as amostras de HPCS, aquelas que demonstraram ter um pico mais evidente a 2970 cm^{-1} foram as amostras cuja reacção procedeu a 60°C.

Para além destes picos confirma-se a presença de um outro a 1100 cm^{-1} , devido à absorção da ligação C-O do grupo hidróxilo secundário (grupo hidroxilo ligado a um carbono secundário), correspondente ao grupo hidroxilo do hidroxipropilo quando substituídos. Isto indica que deverá ter ocorrido igualmente substituição no carbono C_6 , levando à substituição de um hidroxilo primário por um secundário.

Para além disto, observa-se que em algumas das amostras a banda a 1590 cm^{-1} desaparece quase por completo, o que mostra uma diminuição evidente dos grupos NH_2 , e implica uma substituição no grupo amina do quitosano. Este facto é mais evidente em todos os que reagiram durante 4 horas, e segundo a literatura é representativo de graus de substituição mais elevados [115].

Com base nesta análise conclui-se que o HPCS mais substituído é o P4, e o seu espectro de comparação com o quitosano é apresentado a seguir.

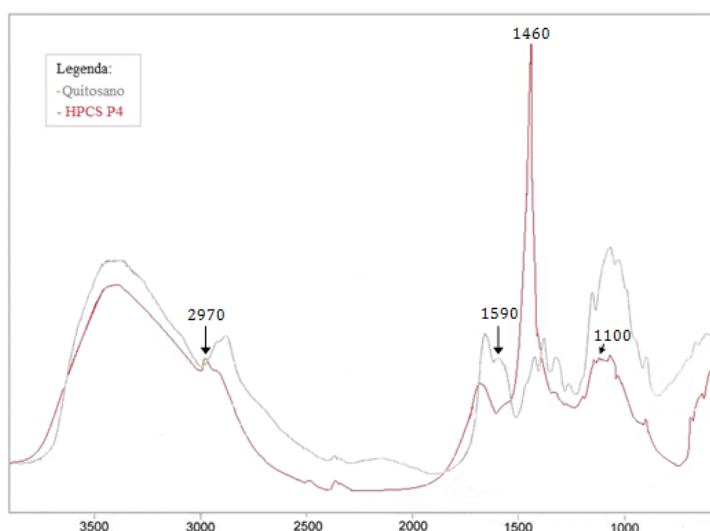


Figura 5.1- Comparação entre o espectro de FTIR do CS e do HPCS P4.

5.2.2 GPC

Dos resultados de cromatografia (tabela e figura 5.2) retira-se que o HPCS com maior massa molecular é o P4, apesar da grande polidispersão, que no entanto se regista para todas as amostras.

Comparando os valores entre si, observa-se uma analogia de comportamento no que diz respeito ao aumento do tempo de reacção. Assim, ao aumentar-se a duração da reacção de 2 para 4h verifica-se que a massa molecular das amostras também aumenta.

A temperatura parece ser um factor crucial na reacção. Com o aumento da temperatura, verifica-se um aumento da massa molecular. Contudo para os 80°C os valores de Mw descem significativamente quando comparados com os restantes HPCS, e mais ainda quando comparado com o quitosano precursor (CS), o que nos leva a crer que esta é uma temperatura crítica e deve ser evitada. Desta forma, a temperatura ideal a que deve ocorrer a reacção será de 60°C, obtendo-se com isso um HPCS com um peso molecular mais elevado.

Tabela 5.2 - Pesos moleculares e polidispersão obtidas para as amostras de Hpcs e quitosano precursor.

Amostra	Mw	PD
P1	315532	3.7
P2	358143	3.9
P3	406131	3.3
P4	563914	3.9
P5	98956	2.7
P6	111338	2.7
CS	900379	3.2

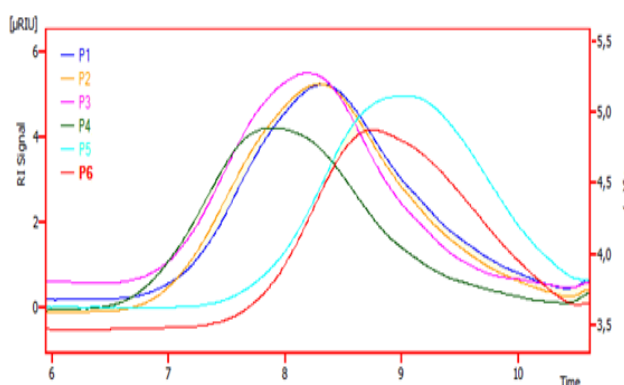


Figura 5.2 – Cromatogramas das amostras de hpcs

5.2.3 H-NMR

A espectroscopia de ressonância magnética permite que se faça uma análise quantitativa da substituição do hidroxipropilo. A análise do grau de substituição (DS), foi feita de acordo com a literatura [115], por comparação das áreas dos picos utilizando-se a fórmula seguinte:

$$\frac{I_{H9}}{I_{H2-8}} = \frac{3DS}{6 + 3DS} \quad (19)$$

Onde I_{H9} corresponde à área do pico de absorção do hidrogénio relativo ao carbono 9 e I_{H2-8} à área do pico de absorção do conjunto dos hidrogénios dos carbonos 2 ao 8 (ver figura 4.1). O espectro de H-RMN obtido para o P4 do HPCS está ilustrado na figura 5.4.

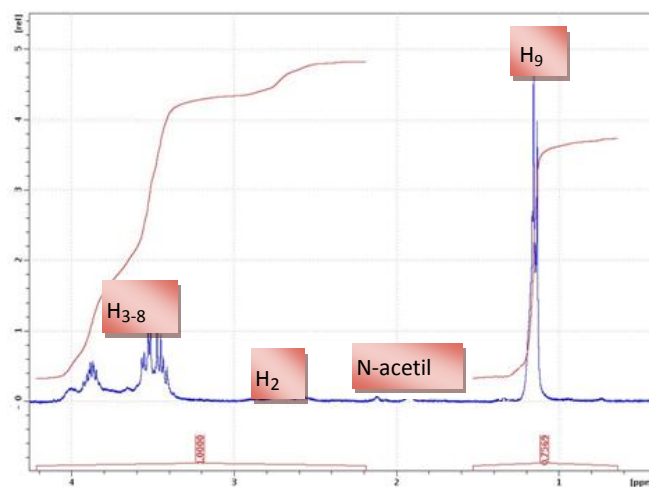


Figura 5.3 – Espectro de H-RMN do P4 do HPCS

Substituindo os valores encontrados para os respectivos integrais, $I_{H9} = 0,75$ e $I_{H2-8} = 1$, obtém-se um DS de 6. Este valor sugere que para além da substituição dos três grupos possíveis, C3, C6 e amina, houve substituição do próprio OH do grupo hidroxilo, levando à incorporação de mais do que um grupo reactivo em cada um desses grupos, resultando em algo muito semelhante ao que está representado na figura 5.5.

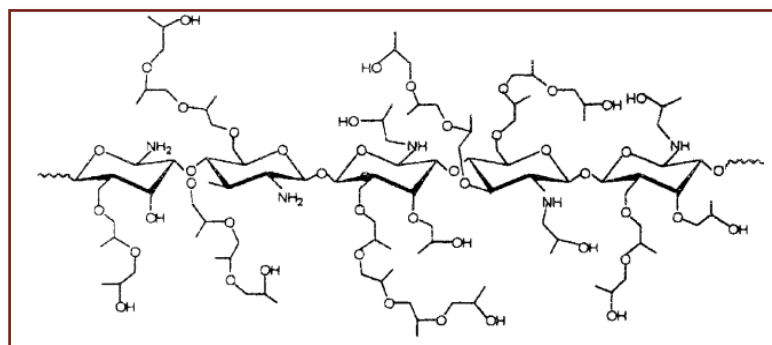


Figura 5.4- Figura representativa de um HPCS com DS = 5,2 [115].

5.3 Caracterização da fase líquida

Uma vez que nos interessa um HPCS com o máximo de grupos substituídos, o HPCS escolhido para constituir a fase líquida do cimento foi o P4.

No entanto, como a concentração do agente estruturante também deverá ter influência nas características do cimento, optou-se por prosseguir os testes testando diferentes concentrações de HPCS (1, 3 e 5%) na fase líquida.

5.3.1 Viscosidade

Para testar a influência da concentração do HPCS na viscosidade da fase líquida do cimento, utilizou-se um viscosímetro de brookfield. Os resultados estão apresentados no gráfico da figura 5.5.

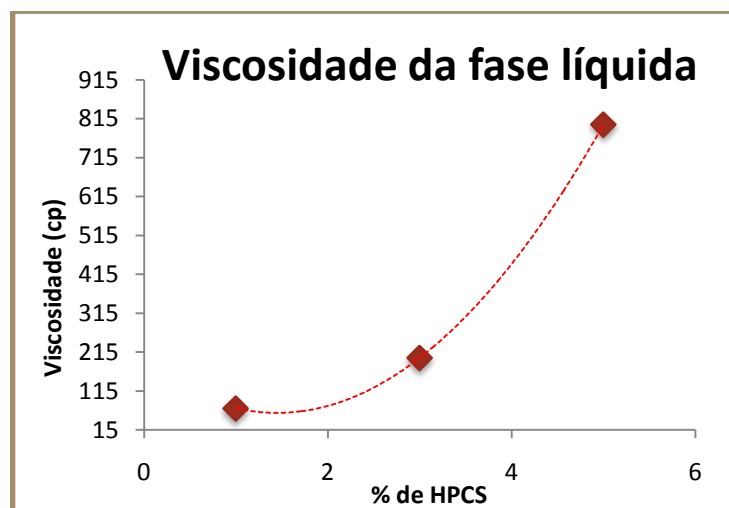


Figura 5.5 – Gráfico de viscosidade das diferentes fases líquidas do CPC

Com base neste gráfico verificou-se que para uma concentração mais elevada, a viscosidade é maior. Isto traduz-se por um efeito de massa, isto é, com uma maior percentagem de HPCS, aumenta a massa do sistema, que leva ao aumento da viscosidade do sistema.

CAPÍTULO

6

**Produção e
caracterização
do CPC**

6.1 Procedimento experimental da produção do CPC

Como foi descrito no capítulo 4, este cimento é formado por duas fases: uma líquida e uma sólida. A fase líquida é composta por uma solução aquosa de ácido málico (AM) a 40% (em peso) e HPCS em diferentes concentrações e a fase sólida apenas por β -TCP. Daqui resultaram 3 formulações diferentes, em função da quantidade de agente estruturante presente na fase líquida, designadas por CPC1, CPC2 e CPC3, cujas composições estão descritas na tabela seguinte:

Tabela 6.1 – Designação e composição de cada CPC em estudo.

Designação do CPC	Fase sólida	Fase líquida	
		Agente retardador	Agente estruturante
CPC1	β -TCP	AM a 40%	1% de HPCS
CPC2	β -TCP	AM a 40%	3% de HPCS
CPC3	β -TCP	AM a 40%	5% de HPCS

6.2 Caracterização do CPC

Cada um dos 3 CPC foi caracterizado, testando-se ao mesmo tempo, a influência da razão líquido/sólido (L/S) no tempo de presa, resistência à compressão, flexão, e injectabilidade. Estas razões L/S foram designadas por **R1**, **R2** e **R3** que correspondem aos valores **1**, **0,75** e **0,5** respectivamente.

Para além destes testes, verificou-se a citotoxicidade do cimento e efectuou-se ainda DRX e da amostra de CPC que revelou ter melhores propriedades, para verificar a composição final do cimento.

6.2.1 Tempo de presa

Na tabela 6.2 apresentam-se os resultados em minutos para o tempo de presa, dos vários CPC, em função da razão L/S, medido com o auxílio de um aparelho de Vicat. As medições foram efectuadas no laboratório à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Tabela 6.2 – Resultados do tempo de presa para os vários CPC e diferentes razões L/S

Composição	Razão L/S	Tempo de final presa (min)
CPC1	R1	23 ± 1
	R2	16 ± 1
	R3	5 ± 1

Composição	Razão L/S	Tempo de final presa (min)
CPC2	R1	19 ± 1
	R2	12 ± 1
	R3	4 ± 1
CPC3	R1	18 ± 1
	R2	10 ± 1
	R3	3 ± 1

Nestes verifica-se que para uma razão onde a quantidade de fase sólida é maior, o cimento endurece mais rapidamente. Assim se passarmos de uma razão de 1:1 para uma razão de 1:2 (L/S) o cimento leva muito menos de metade do tempo a solidificar. A quantidade de agente estruturante também parece ter efeito neste caso, pois para qualquer razão L/S observa-se que tempo de final de presa do cimento aumenta da seguinte forma: CPC1>CPC2>CPC3, ou seja, observam-se menores tempos de presa para formulações com maiores quantidades de agente estruturante.

Dos valores obtidos, interessa-nos mais as razões R2 e R3, uma vez que com R1 qualquer uma das formulações demora um tempo superior ao aceitável para uso cirúrgico.

6.2.2 Resistência á compressão

Os provetes foram confeccionados num molde que permitisse produzir vários espécimes provenientes da mesma pasta e com as mesmas dimensões. Para tal utilizou-se um molde com as características ilustradas na figura seguinte. Este é uma adaptação do modelo proposto pela norma ABNT NBR ISO 5833, sendo que permite produzir 7 provetes de uma só vez, enquanto que o proposto pela norma dá apenas para 5, contudo o procedimento de confecção utilizado foi o mesmo, e os provetes apresentam igualmente 6mm de diâmetro por 12mm de altura.

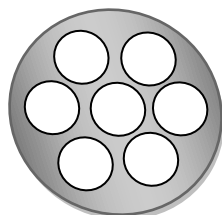


Figura 6.1a – Vista superior do molde

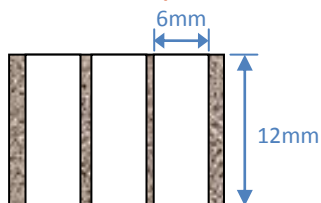


Figura 6.1c – Corte vertical do molde

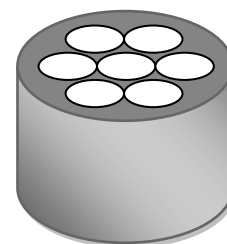


Figura 6.1b – Vista em perspectiva do molde



Figura 6.2 – Provetes obtidos com o molde

Os ensaios de compressão foram realizados de modo a verificar o efeito da razão L/S, mas também de maneira a acompanhar a evolução da resistência do CPC ao longo do tempo. Assim, foram realizados testes para cada CPC após 1 e 24h de armazenamento em estufa a 37°C, e humidade relativa (Hr) de 55%, testando-se para cada, um mínimo de 5 provetes. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores.

A par dos resultados apresenta-se também o respectivo módulo de weibull (m) [116,117]. Este permite-nos caracterizar a variância na resistência do material, sendo análogo ao desvio padrão do mesmo. Contudo, quanto maior o valor de m, menos dispersos são os valores de resistência mecânica.

Tabela 6.3– Resultados do teste de compressão para os vários CPC e diferentes razões L/S

Composição	Razão L/S	Resistência média, à compressão (MPa) após 1h	m	Resistência média, à compressão (MPa) após 24h	m
CPC1	R1	*	-	0,9	2,09
	R2	0.77	1,09	1,39	2,35
	R3	1.34	1,49	1,95	4,43
CPC2	R1	*	-	1,89	1,74
	R2	0.93	2,03	3,69	2,88
	R3	1.32	2,49	4,5	4,60
CPC3	R1	*	-	4,43	2,16
	R2	0.92	7,20	6,22	5,19
	R3	0.99	4,25	9,21	2,90

*- Baixa consistência, partiram ao retirar do molde.

Pela análise de resultados verifica-se que, como seria de esperar, a resistência do CPC aumenta com o tempo. Passado uma hora da sua confecção a resistência é mínima, aproximadamente 1MPa, e semelhante para todas as formulações verificando-se contudo, dentro de cada composição, um ligeiro aumento destes valores para uma menor razão L/S. Passado 24h as diferenças entre as formulações são mais evidentes, e mais ainda quando se compara em termos de razão líquido/sólido. A concentração do agente estruturante, aliada a uma menor razão L/S, parece ser o factor mais importante pois com uma variação de 1 para 5% consegue melhorar-se os valores de resistência em cerca de 7MPa, obtendo-se um máximo de 9.21MPa.

Em termos de módulo de weibull, podemos dizer que também com a diminuição da razão líquido sólido os valores entre os provetes foram menos dispersos, à excepção do CPC3 R3 que tem um valor mais baixo por se ter obtido um provete com um máximo de 12MPa de resistência enquanto todos os outros rondaram os 9MPa.

Em geral o parâmetro m , observado numa vasta faixa de materiais cerâmicos, depende fortemente do processamento, microestrutura, distribuição de poros, e do acabamento superficial. Estes valores variam tipicamente entre 3 e 15 para materiais cerâmicos [116,118], o que significa que materiais com $m = 15$ apresentam menor espalhamento de valores de resistência à fractura do que materiais com $m = 3$. Foi relatado que lotes de materiais cerâmicos com m acima de 10 podem ser considerados bons e fiáveis [119,120] o que não se obtém em nenhum dos casos. No entanto o melhor resultado foi o CPC3 R2 com $m=5$, o que significa que de todos foi o que apresentou menor dispersão de valores considerando-se o CPC mais fiável.

Assim, concluí-se que para as formulações onde a quantidade de sólido e agente estruturante é maior, a resistência também aumenta, provavelmente devido a um aumento de coesão entre as partículas e diminuição de porosidade.

6.2.3 Resistência à flexão

Os provetes foram confeccionados num molde que permitisse produzir vários espécimes da mesma amostra com dimensões aproximadas de 75 mm de comprimento, 10 mm de largura e 3,3 mm de espessura (figura 6.3a, 6.3b, 3.6c).

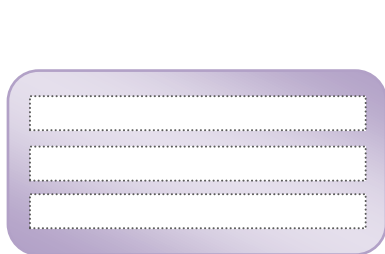


Figura 6.3a – Vista superior do molde

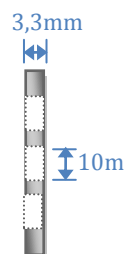


Figura 6.3b – Vista lateral do molde em corte

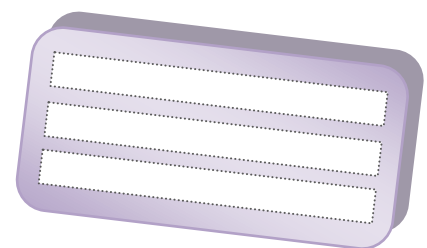


Figura 6.3d – Vista em perspectiva do molde

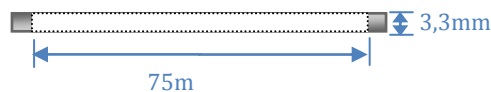


Figura 6.3c – Vista lateral do molde em corte

O procedimento para a obtenção dos provetes foi o mesmo utilizado no ensaio de resistência à compressão. Estes foram testados após 24h de armazenamento em estufa a 37 °C e Hr de 55%.

Os resultados obtidos para R1 e R2 estão apresentados a seguir e correspondem à média dos resultados para os vários provetes. R3 não foi calculado porque nestes casos, devido às dimensões do molde e da rápida reacção de solidificação da pasta, não se conseguiu proceder ao seu correcto preenchimento. Isto quer dizer que esta formulação não é muito indicada para aplicação cirúrgica, a não ser que a quantidade a aplicar seja mínima (de 1 a 2ml).

Os resultados da resistência e módulo de flexão encontram-se nas tabelas 6.4 e 6.5 respectivamente, assim como o módulo de weibull para cada amostra.

Tabela 6.4 – Resultados da resistência à flexão dos ensaios para os vários CPC a diferentes razões L/S e respectivos módulos de weibull.

	R1 (MPa)	m	R2 (MPa)	m
CPC1	5,9 x 10 ⁻¹	1,3	6,0	5,7
CPC2	1,6	4,0	6,17	4,3
CPC3	3,1	3,2	6,77	3,1

Tabela 6.5 - Resultados do módulo de flexão dos ensaios para os vários CPC a diferentes razões L/S e respectivos módulos de weibull.

	R1 (GPa)	m	R2 (GPa)	m
CPC1	4,2 x 10 ⁻¹	2,2	2,7	2,2
CPC2	6,2 x 10 ⁻¹	1,6	4,8	1,7
CPC3	1,4	2,8	7,2	2,2

Na resistência à flexão verifica-se que a razão L/S é um factor muito importante, uma vez que para uma maior quantidade de líquido, a resistência à flexão diminui bastante, ainda que aumente ligeiramente quando se aumenta a quantidade de agente estruturante. O módulo de flexão segue o mesmo princípio, aumentando significativamente de R1 para R2 e também de CPC1 para CPC2. Tal como anteriormente referido, isto dever-se-á ao aumento de coesão entre partículas e diminuição da porosidade.

Em termos de módulo de weibull verifica-se que, quer para a resistência à flexão, quer para o módulo de elasticidade, os valores são bastante dispersos e existe nenhuma relação directa entre o tipo de CPC e os valores encontrados.

6.2.4 Injectabilidade

De modo a testar a aplicabilidade do CPC em técnicas minimamente invasivas, procedeu-se à medição da injectabilidade registando a força necessária para extrudir a pasta da seringa. Até uma força de 100N o cimento pode ser aplicado manualmente, sem qualquer problema.

Na tabela 6.6 encontram-se os resultados obtidos para este teste relativos a cada CPC e cada razão L/S.

Tabela 6.6 – Resultados do teste de injectabilidade para os vários CPC e diferentes razões L/S

CPC1	R1	Minutos	3,5	8,5	13,5	18,5
		Máximo de carga aplicada (N)	5	6	11	55
	R2	Minutos	3,5	8,5	13,5	
		Máximo de carga aplicada (N)	6	25	90	
	R3	Minutos	2	4		
		Máximo de carga aplicada (N)	42	268		
CPC2	R1	Minutos	3,5	8,5	13,5	18,5
		Máximo de carga aplicada (N)	6	9	25	68
	R2	Minutos	3,5	4,5		
		Máximo de carga aplicada (N)	15	51		
	R3	Não dá para injectar				
	CPC3	R1	Minutos	3,5	8,5	13,5
Máximo de carga aplicada (N)			6	9	32	69
R2		Minutos	3	4,5		
		Máximo de carga aplicada (N)	11	65		
R3		Não dá para injectar				

Pela observação dos resultados, verifica-se que à medida que aumenta a quantidade de agente estruturante, aumenta a resistência que a pasta oferece para sair da seringa que se traduz por uma pasta com menos fluidez. Em todos os CPCs esta resistência aumenta mais rapidamente à medida que se aproxima do setting time, e para a razão R3 só se conseguiu efectuar medições no CP1, pois os restantes endurecem muito rápido e mesmo que se coloque a pasta no interior da seringa, esta endurece rapidamente no seu interior e não dá para injectar.

A título de exemplo, e para tornar mais fácil a percepção dos resultados, na figura 6.4 representa-se graficamente a influência do agente estruturante na injectabilidade da pasta, confirmando-se o que foi dito acima.

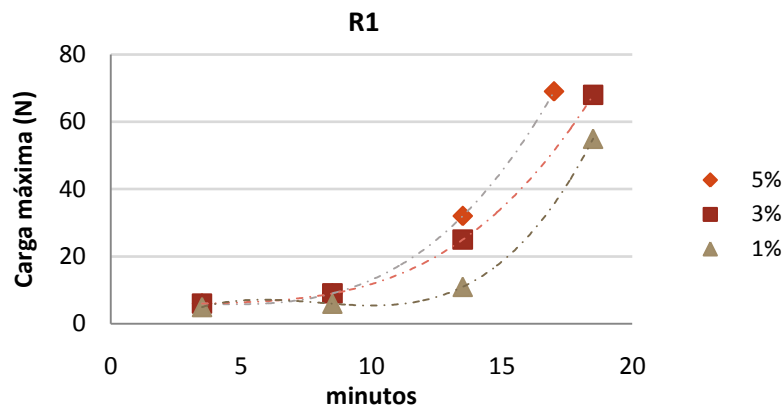


Figura 6.4 – Gráfico comparativo da injectabilidade dos diferentes CPCs com a razão L/S R1.

6.2.5 DRX

Os resultados de difracção de DRX, permitiram observar o produto que se forma quando o CPC endurece. A figura 6.5 corresponde ao difractograma do CPC3/R2, mantido a 37°C e a 55% de Hr, 24h após a mistura dos componentes.

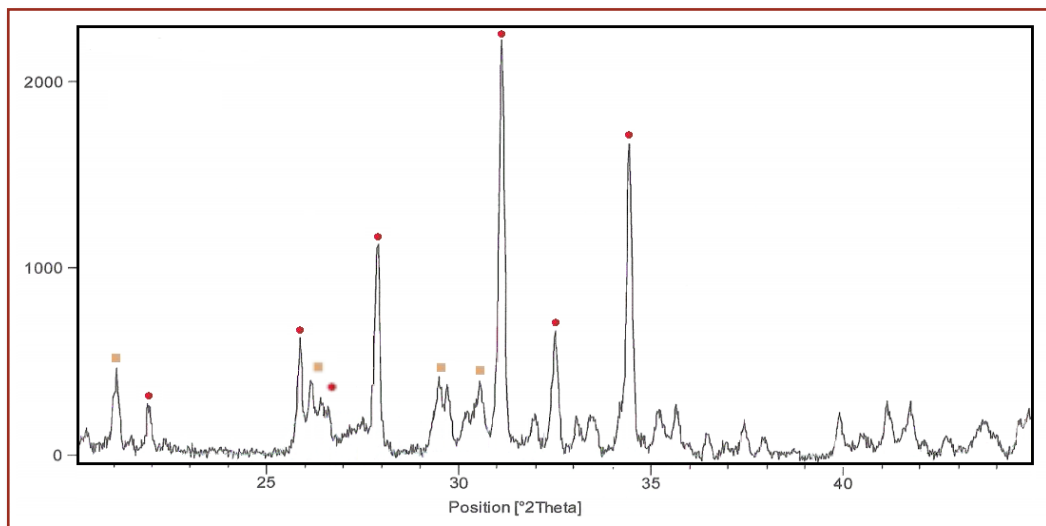


Figura 6.5 – Difractograma de raio-X do CPC3/R2 24 horas após a mistura, ●- β -TCP, ■- brushite.

Neste difractograma pode observar-se a presença de uma grande quantidade de β -TCP, mas também de alguma brushite já formada. O que leva a crer que neste período houve a reacção levou à dissolução de algum β -TCP e que este se transformou em brushite.

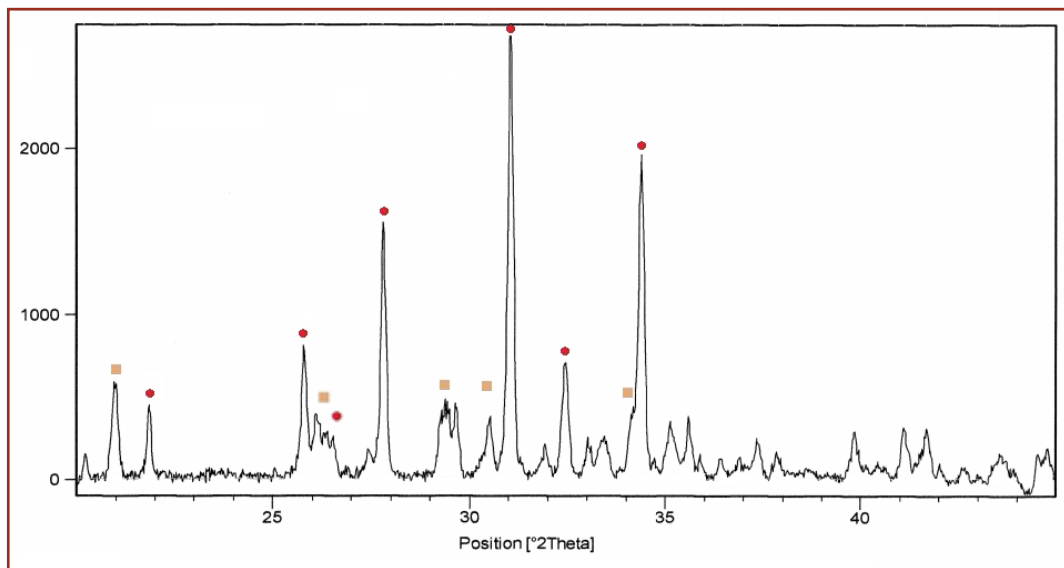


Figura 6.6 – Diffractograma de raio-X do CPC3/R2 3 semanas após a mistura, ●- β -TCP, ■-brushite.

Ao fim de 3 semanas nas mesmas condições as variações são praticamente inexistentes e para além da brushite formada ainda se verifica a existência de muito β -TCP. Contudo também Grover e seus colaboradores [121] ao observarem a composição final do seu CPC de brushite, à base de β -TCP e ácido fosfórico, verificaram que, mesmo após um período de 28 dias, apesar de se verificar um pequeno aumento da quantidade de brushite, o β -TCP permanece em maior quantidade. Isto deve-se à quantidade e ácido utilizada não ser suficiente para reagir totalmente com o β -TCP, o que poderá ser um justificativo igualmente válido para esta situação.

6.2.6 Citotoxicidade

Nos testes de citotoxicidade começou por se medir a viabilidade de todas as formulações e razões L/S, pelo método de MTT em extracto. As amostras de cimento foram esterilizadas com etanol de síntese a 96% durante 21h, ficando a incubar durante 24h a 37°C. Em seguida colocou-se o meio de extracção em contacto com as células durante 42h. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 6.7.

Tabela 6.7 - Resultados do teste de citotoxicidade pelo método do MTT em extracto dos 3 CPC e respectivas razões L/S

Controlo positivo: 2,37%

	Viabilidade celular em %		
	R1	R2	R3
CPC1	3,61	1,69	1,34
CPC2	1,12	1,82	1,66
CPC3	1,61	1,69	1,34

Em todas as amostras se verifica que a viabilidade é muito reduzida, sendo os valores da mesma ordem de grandeza do controlo positivo, não se registando grandes diferenças em termos de razão L/S nem entre cada formulação. Contudo estes resultados podem dever-se ao facto da reacção não estar completa o que faz com que tanto o CPC como o meio de extracção apresentem um pH muito baixo causando morte celular.

Após estes primeiros resultados procederam-se a novos testes, para tentar compreender a extensão da reacção e a sua influência na viabilidade do cimento. Nestes utilizou-se apenas um CPC, aquele que reuniu as melhores propriedades ao longo dos testes anteriores, ou seja, o CPC3 com a razão de 0,75 (R2).

Contudo, neste caso variou-se o tempo após o qual se adicionou o meio de extracção à amostra e o método de incubação. No final algumas das reacções foram paradas colocando-se as amostras em etanol e secando-se a 50°C, para ver se isso também poderia interferir com a viabilidade.

A designação de cada amostra de CPC e as condições a que cada uma foi mantida é apresentado na tabela 6.8.

Tabela 6.8 – Designação e condições a que cada amostra foi mantida antes dos testes de citotoxicidade

Amostra	Condições
1	O CPC foi preparado e mantido durante 4 dias a 37°C e 55% de Hr
2	O CPC foi preparado e mantido durante 4 dias a 37°C e em soro fisiológico.
3	O CPC foi preparado e mantido durante 4 dias a 37°C e em soro fisiológico, no final a reacção foi parada com etanol.
4	O CPC foi preparado e mantido durante 3 meses à temperatura ambiente.
5	O CPC foi preparado e mantido durante 3 meses à temperatura ambiente, no final a reacção foi parada com etanol.

Os resultados dos do teste de contacto indirecto das respectivas amostras são apresentados no gráfico seguinte.

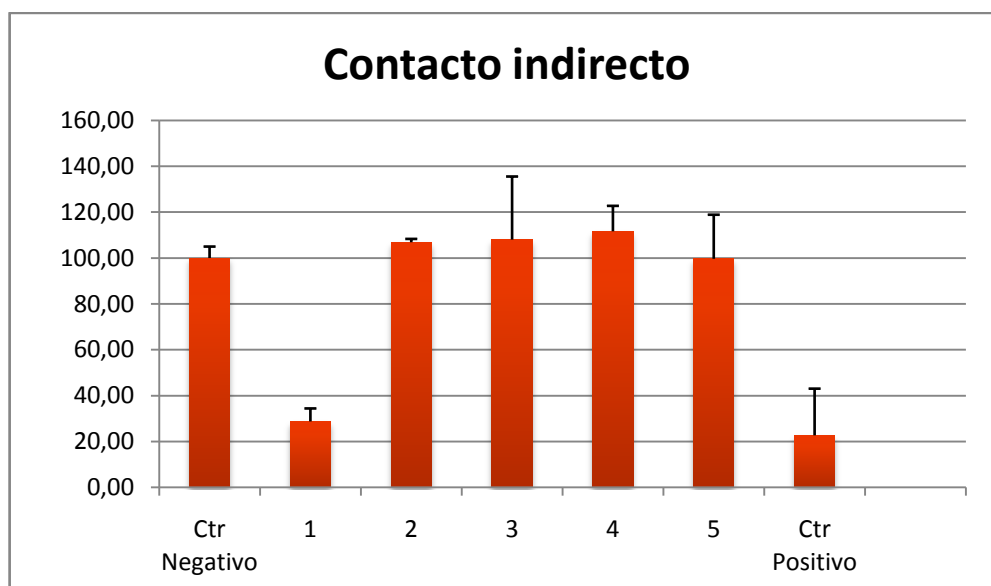


Figura 6.7 – Resultados do segundo teste de citotoxicidade por contacto indirecto.

Observando os valores, verifica-se que o único caso onde a viabilidade continua a ser reduzida é aquele que secou apenas a uma Hr de 55%. Qualquer uma das outras amostras, quer com apenas 4 dias, quer com 3 meses apresentam uma viabilidade tão ou mais elevada do que o controlo negativo (100%), ou seja, o número de células que se obteve no final foi, na maioria dos casos, superior ao número inicial, o que significa que nesta situação o material não têm qualquer efeito citotóxico. O facto de se usar o etanol para se parar a reacção parece não ter relação directa com a viabilidade.

A resposta citotóxica, como nos sugerem os primeiros resultados, deve-se provavelmente à utilização de uma grande concentração de ácido, que faz com que o pH inicial da pasta seja muito baixo, contudo teoricamente o pH tende a aumentar e estabilizar perto de 6, uma vez que este é o pH de equilíbrio para um cimento de brushite (DCPD) composto inicialmente por β -TCP, como foi referido na introdução (pg 15).

A par desta experiência, efectuou-se a medição do pH para se confirmar a teoria. Verificou-se que para todos os CPC que contêm uma fase líquida com 40% de ácido málico, na altura da mistura dos componentes, a pasta é extremamente ácida com o pH a rondar os 3,1. Após uma hora, as amostras foram colocadas em soro fisiológico e efectuaram-se novas medições, mudando-se o soro

todos os dias. Ao fim de 1 dia, verificou-se que o pH era de 4,6, ao fim de 3 dias de 5,1, e ao fim de 6 dias de 5,8, o que confirma a teoria.

Assim, não é de estranhar que este apresente uma resposta citotóxica durante os primeiros dias em que está em contacto com fluidos pois o pH é muito baixo, levando a alguma morte celular. No entanto, como nos sugerem os resultados da segunda experiência, onde se deixou as amostras a “envelhecer” em soro fisiológico, verificou-se que, passado apenas 4 dias, este já não provoca qualquer resposta citotóxica e até permite o crescimento celular (viabilidade acima de 100%). Assim apesar da toxicidade inicial do CPC, não se deve excluir à partida a sua utilização porque com o tempo este torna-se completamente viável, daí que a reacção *in vivo* deva ser bastante aceitável. Isto é de certa forma o que acontece com os cimentos de PMMA. O monómero MMA é citotóxico ao início, causando igualmente morte celular, contudo este cimento não deixa de ser utilizado.

CAPÍTULO

7

Vertebroplastia

Como já foi referido, uma doença dos nossos tempos, e principalmente dos países desenvolvidos, que afecta particularmente as pessoas mais idosas é a osteoporose. Esta deixa os ossos fragilizados facilitando a ocorrência de fracturas. Actualmente, o número de fracturas tem vindo a crescer mais do que o envelhecimento populacional faria prever. Uma vez que as fracturas dos corpos vertebrais são uma das mais incidentes têm sido feitos esforços no sentido de criar CPCs para o uso em vertebroplastia, isto é, para reforço de um ou vários corpos vertebrais [122].

Visto isto, fez-se mais uma experiência para verificar o comportamento do CPC numa situação semelhante à vertebroplastia. Para esta utilizaram-se 4 vértebras de uma coluna lombar de porco.

Existem duas formas de efectuar a vertebroplastia: por cirurgia aberta ou percutânea. A última é a preferida para cirurgia, por se tratar de uma técnica menos invasiva.

A vertebroplastia percutânea, é realizada através da pele, não necessitando de anestesia geral na maior parte dos casos, sendo geralmente realizada sob sedação leve e anestesia local. O seu procedimento consiste na inserção de uma agulha especial através do tecido macio das costas. A posição da agulha pode ser vista durante todo o processo devido a imagens obtidas por meio de radiografias. Em seguida prepara-se uma pequena quantidade de cimento (2,5 a 5 mililitros em média), e através da agulha aplica-se o cimento no corpo vertebral. A radiopacidade do cimento é um factor importante pois é necessário verificar, durante e após a colocação do cimento, se a cavidade fica bem preenchida e se este não extravasa. Após a injeção do cimento, que se traduz por uma pasta espessa, este endurece rapidamente reduzindo o tempo necessário para a operação. Normalmente, é injectado em ambos os lados direito e esquerdo do corpo vertebral, quase no meio da coluna [123].

Para esta experiência testou-se em cada vértebra um tipo CPC (tabela 7.1), deixando uma livre para controlo, e a técnica utilizada foi um pouco diferente sendo necessário criar inicialmente uma pré-lesão por se tratar de vértebras saudáveis. O registo experimental foi efectuado num protocolo como o do anexo A, e o procedimento efectuado é descrito a seguir.

Tabela 7.1 – Designação das vértebras e respectivo CPC utilizado.

Designação da vértebra	Cimento utilizado	Razão L/S
Controlo	Nenhum	-
V2	CPC3	0,75 (R2)
V3	CPC2	0,65

A razão líquido sólido utilizada teve em consideração o tempo final de presa e injectabilidade do cimento. Assim para o CPC3 utilizou-se a razão R2 mas para CPC2 alterou-se um pouco essa razão

de modo a ter um CPC injectável e com um tempo de presa mais apropriado (≈ 10 min), fornecendo tempo suficiente para a sua colocação na seringa e aplicação, mas não demasiado longo.

7.1 Procedimento:

1. Efectuou-se a separação e limpeza das vértebras de porco para remoção total de tecidos moles e cartilagens.

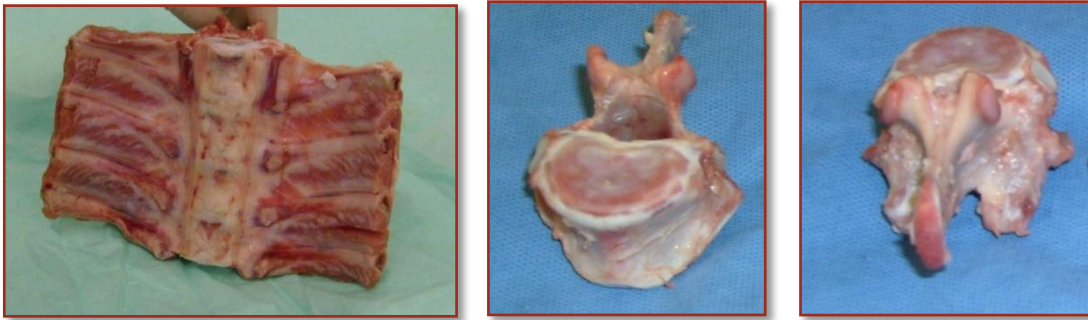


Figura 7.1 – Coluna lombar de porco utilizada e respectivas vertebrae já preparadas.

2. Efectuou-se uma pré-lesão unilateral utilizando inicialmente um trocar acoplado a um berbequim para a perfusão das vértebras através do pedículo até ao corpo vertebral.



Figura 7.2 – Procedimento de criação da pré-lesão de um dos corpos vertebrais

3. Com uma cureta removeu-se o osso esponjoso no interior do corpo vertebral para promover a eliminação/ruptura das trabéculas ósseas e assim aproximar o estado do osso ao de um osso fragilizado por osteoporose.

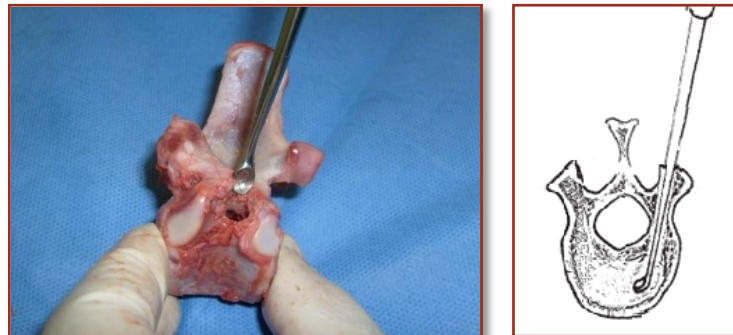


Figura 7.3 – Remoção do osso esponjoso do interior do corpo vertebral

4. Pesou-se a vértebra após a lesão.
5. Preparou-se 5ml de cimento e colocou-se numa seringa.
6. Realizou-se a injeção do cimento ósseo sob pressão na vértebra até preencher na totalidade a cavidade repetindo-se o procedimento para cada vértebra deixando apenas uma sem cimento, para controlo

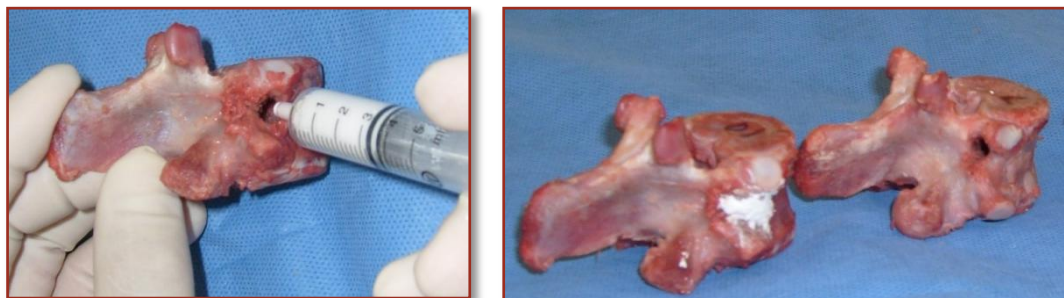


Figura 7.4 – Cimentação dos corpos vertebrais

7. Pesou-se novamente as vértebras cimentadas e aguardou-se um período de secagem do cimento de aproximadamente 24 horas em temperatura constante de 37° C com a finalidade de simular a temperatura fisiológica do corpo humano.
8. As vértebras não cimentadas foram mantidas nas mesmas condições.

7.2 Resultados

A resistência das vértebras foi determinada, como o descrito na literatura [124], efectuando-se um ensaio de compressão, a uma velocidade de 5mm/min, 24h após a colocação do cimento. As vértebras foram posicionadas na máquina universal de testes de modo a que esta abrangesse todo o corpo vertebral. Os resultados foram obtidos através da medição da força máxima aplicada sobre a vértebra imediatamente antes de ocorrer fadiga vertebral, resultando em fractura.

Na figura seguinte é possível observar a vértebra de controlo (sem cimento) antes e após a aplicação da carga de compressão.

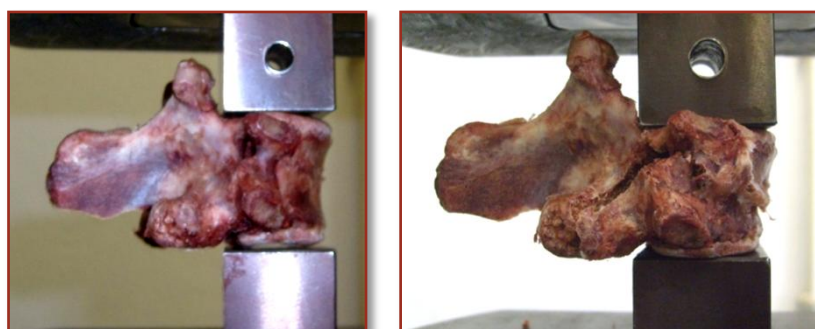


Figura 7.5 – Corpo vertebral de controlo colocado na máquina de compressão antes e após do ensaio.

Após a compressão os resultados registados foram os seguintes:

Tabela 7.2 – Resultados do ensaio de compressão efectuado às vértebras.

Vertebra	Vertebras de porco
	Força máxima de compressão
Controlo	4.432 kN
V2	4.909 kN
V3	4.720 kN

Pelos resultados verifica-se que todos corpos vertebrais cimentados oferecem uma maior resistência à compressão, e que quando comparadas as 2 formulações, foi na V2 que se obteve maior resistência, isto é, para o cimento CPC3 R2. Contudo estes testes foram efectuados utilizando-se apenas uma vértebra para cada formulação podendo ser elucidativos quanto ao que poderá acontecer no caso de se utilizar o CPC no interior das vértebras, mas para se ter a certeza, este deve ser repetido com um número de vértebras muito superior ao utilizado neste estudo preliminar. E apesar dos corpos vertebrais usados possuírem aproximadamente as mesmas dimensões, a experiência deve ser efectuada de modo a poder-se comparar vértebras da mesma localização.

CAPÍTULO

8

Testes in vivo

Com o intuito de avaliar a biocompatibilidade do cimento ósseo fosfato de cálcio (CPC) e a sua eficácia como substituto ósseo, o CPC foi testado em 8 coelhos da espécie New Zealand.

O CPC utilizado foi o CPC3 com razão líquido sólido R2. Este foi o CPC escolhido por apresentar a melhor resistência mecânica tendo em conta o *setting time* e a injectabilidade do mesmo. A aplicação decorreu injectando-se, em cada coelho, o CPC na cavidade medular do fémur do membro posterior direito.


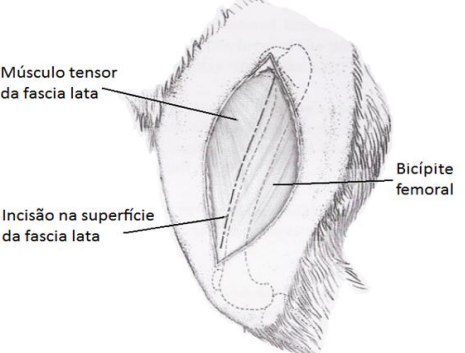
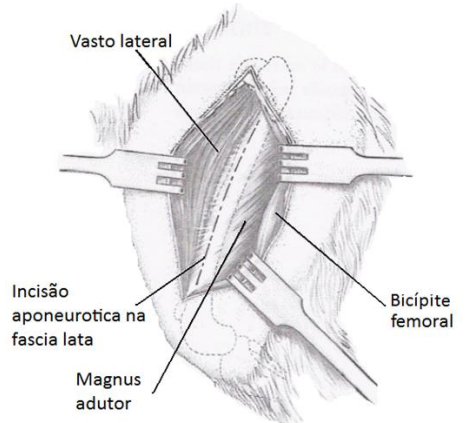
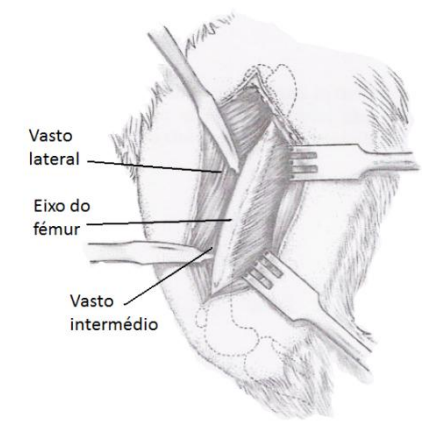
As matérias primas foram esterilizadas em autoclave e para todos os animais utilizou-se aproximadamente a mesma quantidade de cimento, estando esta condicionada às dimensões da cavidade criada no fémur.

A análise das reacções entre o CPC e o tecido ósseo, assim como a própria regeneração óssea foram baseadas em análises radiográficas (para avaliar quantitativamente a reabsorção do cimento e a sua substituição por tecido ósseo), efectuadas após um período de observação de 4 meses pós-operatório. No final deste período foi feita uma recolha de material de vários órgãos, nomeadamente do coração, pulmões, rins, baço, fígado e cérebro para a análise histológica. Com isto pretende-se ainda avaliar se houve uma possível lesão e/ou contaminação destes pela substância em estudo. Os órgãos, bem como os fémures no qual foi implantado o CPC, foram mantidos em formol a 10% e enviados para a Universidade de Ciências Médicas – Ubi, na Covilhã.

Após o período das 16 semanas, foi ainda testada a resistência do osso por meio de um teste de flexão em 3 pontos, escolhido por ser menos destrutivo. Este foi efectuado utilizando-se como controlo o fémur da pata esquerda (sem nada implantado).

8.1 Técnica cirúrgica

Tabela 8.1 – Descrição da técnica cirúrgica [126].

<p>A. O animal é posicionado em decúbito lateral sobre o lado contralateral em mesa cirúrgica comum. Faz-se uma incisão na pele, ao longo do eixo do osso, começando logo acima do grande trocânter, até à patela (rótula). A gordura subcutânea e a fascia superficial são cortadas directamente por baixo da incisão feita na pele.</p>	
<p>B. As margens da pele são afastadas e o véu superficial da fascia lata é cortado ao longo do músculo do bicípite femoral. Esta incisão estende-se a todo o comprimento da incisão da pele.</p>	 <p>Músculo tensor da fascia lata</p> <p>Bicípite femoral</p> <p>Incisão na superfície da fascia lata</p>
<p>C. O afastamento dos bicípites femorais revela a diáfise⁹ do fémur. É necessário cortar o <i>septum</i> aponeurótico fascial, na parte lateral do osso de forma a poder-se afastar adequadamente o músculo vasto lateral.</p>	 <p>Vasto lateral</p> <p>Incisão aponeurótica na fascia lata</p> <p>Magnus adutor</p> <p>Bicípite femoral</p>
<p>D. O vasto lateral e intermédio são afastados da superfície do eixo do fémur permitindo um fácil e total acesso à sua diáfise.</p>	 <p>Vasto lateral</p> <p>Eixo do fémur</p> <p>Vasto intermédio</p>

⁹ Diáfise – Extensão entre as extremidades dos ossos longos

8.2 Procedimento cirúrgico

Os coelhos foram anestesiados com isoflurano e preparados assepticamente para a cirurgia, removendo-se o pêlo na zona envolvente.



Figura 8.1 – Preparação da cirurgia (anestesia e limpeza asséptica da área a operar).

A cirurgia iniciou-se efectuando o acesso cirúrgico ao fémur pela técnica anteriormente descrita.

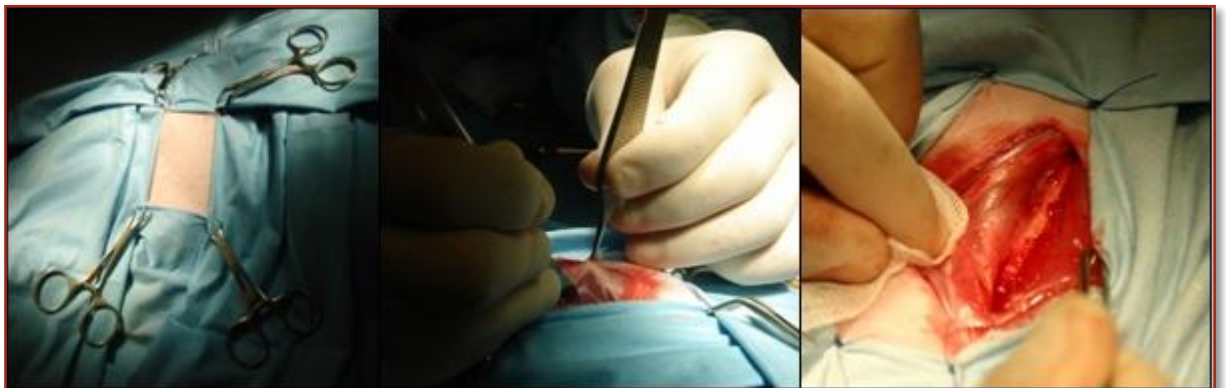


Figura 8.2 – Acesso cirúrgico à diáfise do fémur.

Após contacto com o fémur, foram feitos dois orifícios com uma broca de 2mm de diâmetro, um localizado na parte posterior e outro na parte inferior no osso. Efectuou-se a limpeza dos tecidos moles da cavidade medular com soro fisiológico de modo a permitir a colocação do cimento.

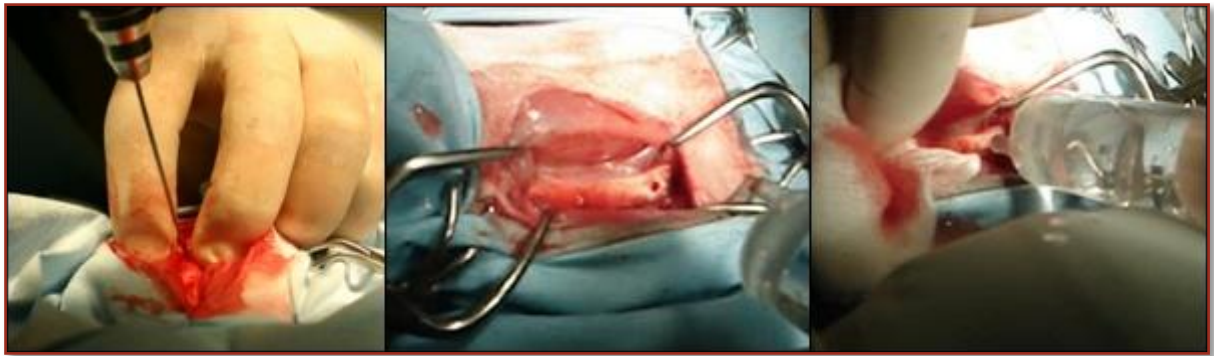


Figura 8.3 – Abertura dos orifícios e limpeza da cavidade medular.

O cimento foi preparado na altura, e aplicado com uma seringa. Este foi colocado de modo a preencher toda a cavidade, sendo inserido por um dos orifícios até chegar ao outro.



Figura 8.4 – Aplicação do cimento na cavidade medular.

Por fim estes foram suturados, tanto no músculo com sutura de aproximação, como na pele através de uma sutura intradérmica e seguidamente por uma sutura cutâneo. Por fim foram novamente limpos assepticamente, ficando prontos para a primeira radiografia.



Figura 8.5 – Sutura.

8.3 Resultados

Após a cirurgia os coelhos foram mantidos a antibiótico durante uma semana.

Os animais recuperaram imediatamente após a cirurgia, com excepção de um coelho que contraiu uma fractura um dia após a colocação do cimento. Este foi então excluído, mas os restantes 7 coelhos permaneceram no estudo.

A aplicação cirúrgica do cimento foi fácil e correspondeu às expectativas do cirurgião, por ter uma viscosidade óptima. Contudo, em cirurgia, este demonstrou alguma dificuldade em solidificar por completo, e observando-se o fémur do coelho que teve a fractura, um dia após a aplicação do cimento, este não se apresentava completamente endurecido no interior da cavidade medular (figura 8.6).

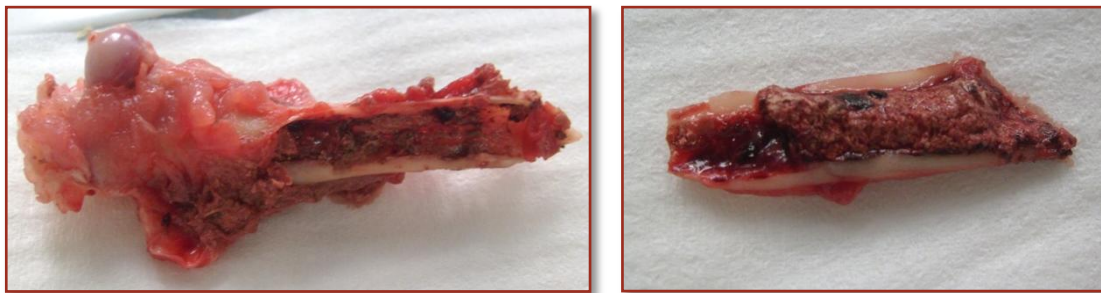


Figura 8.6 – Fotos do Fémur do coelho que contraiu a fractura.

O endurecimento do cimento pode ter sido afectado pela hemorragia capilar da cavidade medular, no entanto para tentar compreender melhor este comportamento, realizaram-se mais alguns testes apresentados no capítulo seguinte.

Durante a primeira semana, dois dos 7 coelhos, coelho 2 e 3, desenvolveram inflamação na zona da cirurgia, e o tecido envolvente apresentou sinais de necrose. Estes foram tratados recuperando por completo ao fim de duas semanas. O facto de todos os outros coelhos terem reagido bem à cirurgia e não terem desenvolvido qualquer reacção alérgica, leva a crer que a inflamação possa ter sido provocada por factores externos que não dizem respeito à implantação do CPC. No entanto, não se deverá por de lado a hipótese desta resposta advir da alta concentração de ácido, tal como o referido por Yokoyama e colaboradores [124] que registaram uma resposta inflamatória, devido à utilização de um ácido carboxílico (ácido cítrico), sendo esta mais proeminente para altas concentrações de ácido.

8.4 Análise radiográfica

Os coelhos foram radiografados logo após a cirurgia, assim como no decorrer da experiência, até ao período final (após 4 meses).

Passado 3 meses verificou-se que no coelho 2 parece ter ocorrido uma mudança ao nível da cortical e o osso aparenta uma ligeira ondulação, o que se poderá eventualmente chamar de hipertrofia da cortical, isto é, resposta natural do osso a algo. Essa resposta não é desejável, o ideal era que não existisse, e que a osteointegração do cimento não conduzisse a nenhuma hipertrofia mas também não é obrigatoriamente má. Na realidade o osso fica, à partida, mais resistente.



Figura 8.7 – Radiografia coelho 2 no momento da cirurgia



Figura 8.8 – Radiografia coelho 2 após 3 meses



Figura 8.9 – Radiografia coelho 4 no momento da cirurgia

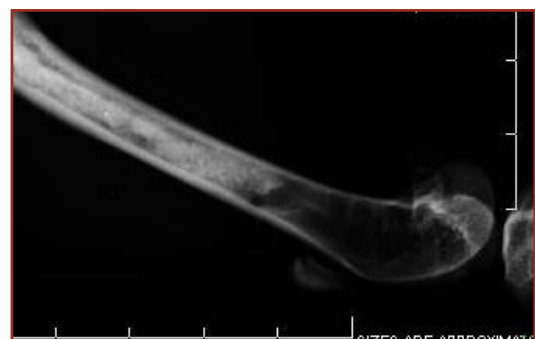


Figura 8.10 – Radiografia coelho 4 após 3 meses

A razão para tal aparência é seguramente uma resposta ao cimento que parece agredir a cortical, contudo isto só aconteceu para o coelho 2, os restantes tiveram uma resposta semelhante à apresentada na radiografia do coelho 4, nos quais não se verifica formação de osso fora da cortical. Contudo para uma análise mais detalhada será necessário ter em conta o estudo histológico. Aos 3 meses é possível verificar igualmente que no interior do osso o cimento se tornou menos denso devido provavelmente à dissolução de pequenas partículas deste.

Após os 4 meses sacrificou-se os coelhos e foi possível comparar lado a lado todos os fêmures (figura 8.11). Contudo uma vez que estes foram operados em alturas diferentes apenas os 5 primeiros apresentam nesta altura 4 meses, daí que não sejam apresentados os resultados correspondentes a todos os coelhos.



Figura 8.11 – A) Imagem dos fêmures na altura da radiografia, B) Radiografia dos fêmures na posição frontal, C) Radiografia dos fêmures na posição lateral.

Pelas últimas radiografias é possível observar claramente que o coelho 2 foi o que sofreu mais alterações apresentando um grande calo ósseo na cortical. Para além disto vê-se que o coelho 1 e 3 já têm pouco material no interior, o que não acontece no caso do coelho 4 e 5.

Estas diferenças podem ser explicadas talvez devido à quantidade de material implantado em cada fémur. Apesar dos esforços para implantar sempre a mesma quantidade de CPC, a técnica cirúrgica foi melhorando com a prática, daí que no primeiro coelho a quantidade de CPC implantada tenha sido menor, e no coelho 5 esta já tenha sido maior (figura 8.12).

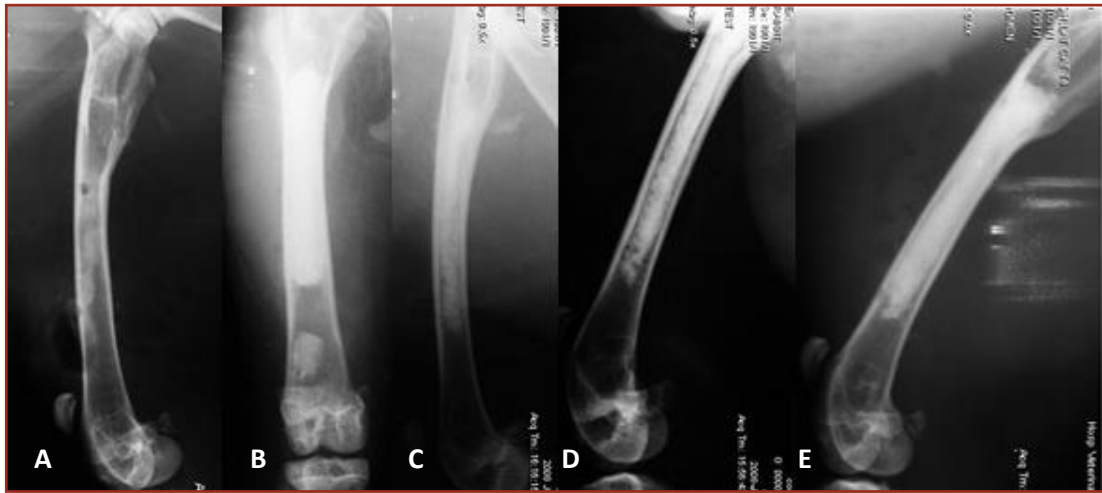


Figura 8.12 – Radiografias dos primeiros 5 coelhos retiradas após a cirurgia: A) coelho 1; B) coelho 2; C) coelho 3; D) coelho 4; E) coelho 5.

E segundo Flautre e colaboradores [127], a quantidade de cimento implantada pode ter muita influência. Estes verificaram que ao colocarem o mesmo cimento (estudado previamente em coelhos) em ovelhas, por necessitarem de uma quantidade maior, este levou o triplo do tempo a ser reabsorvido e a verificar-se osteointegração.

8.5 Resistência mecânica

As possíveis consequências, em termos de resistência mecânica, foram medidas através de um ensaio de flexão em 3 pontos, semelhante ao descrito no ponto 3.2.

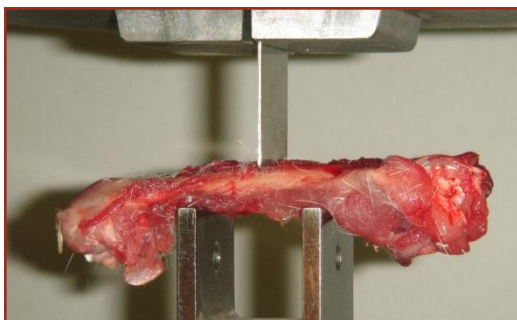


Figura 8.13 – Esquema da montagem para testar a resistência dos fêmures.

Devido ao fêmur apresentar uma forma irregular, o que se mediu neste ensaio foi a força máxima, isto é, a resistência que o osso oferece antes de quebrar, comparando-se, caso a caso, o fêmur cimentado (fêmur da pata direita) com o controlo (fêmur da pata esquerda).

Os resultados estão apresentados na tabela 8.2.

Tabela 8.2 – Resultados do ensaio de flexão para medir a resistência entre os fêmures cimentados e os sem cimento.

Coelho	Força máxima de flexão (kN)	
	Fémur cimentado	controlo
1	12,2	9,74
2	31,45	10,62
3	15,28	13,68
4	16,43	13,28
5	15,28	14,46

Analisando os resultados verifica-se que em todos os casos a resistência aumentou e, no coelho 2, que apresentava à partida as alterações mais evidentes, com um aumento da espessura da cortical, a formação de novo osso é tal que a resistência triplicou.

8.6 Inspeção visual do osso

Após os ensaios de flexão, foi possível uma primeira inspeção, apenas visual, ao conteúdo no interior do osso. As imagens obtidas estão apresentadas nas figuras seguintes.

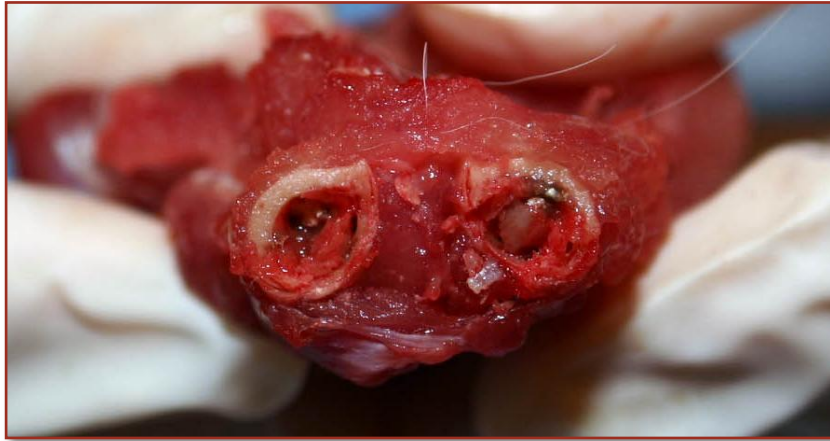


Figura 8.14 – Fémur do coelho 1, 4 meses após a implantação o CPC.



Figura 8.15 – Fémur do coelho 2, 4 meses após a implantação o CPC.



Figura 8.16 – Fémur do coelho 3, 4 meses após a implantação o CPC.



Figura 8.17 – Fémur do coelho 4, 4 meses após a implantação o CPC.



Figura 8.18 – Fémur do coelho 5, 4 meses após a implantação do CPC.

Através destas imagens verifica-se que nos 3 primeiros coelhos parece ter ocorrido formação de novo osso e que a quantidade de material no interior, é já muito reduzida. Contudo, os últimos dois apresentam, tal como já se tinha percebido pela análise radiográfica, uma maior quantidade de material no interior, e pouco ou nenhum osso formado. Também nestes parece haver um halo (linha) de separação entre o cimento e o tecido ósseo, que é um sinal de que não houve integração óssea. Para além disto em todos os casos se verifica que o material se encontra preto, e no caso do coelho 5, por ser o que se encontra mais denso, essa camada aparece apenas à volta do material. Isto poderá advir da citotoxicidade inicial do cimento que, quando entra em contacto com o sangue, devido ao seu carácter ácido inicial, resultou em células mortas que ficaram agregadas ao CPC. Contudo isto são apenas suposições e para se ter a certeza será necessário ter os resultados dos exames histológico.

8.7 Produto final

Após estes resultados recolheu-se uma amostra do material no interior do fémur do coelho 5, por ser o que continha maior quantidade, e realizou-se uma análise de drx para ver qual seria a sua composição. O resultado é apresentado no difractograma da figura 8.19.

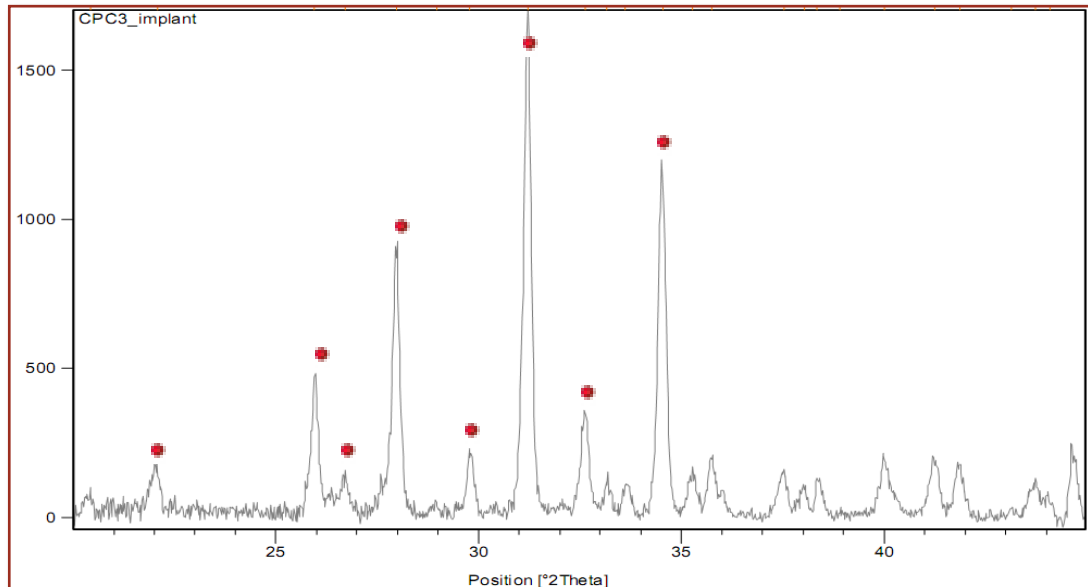


Figura 8.19 – Difractograma de raio-x do CPC após 4 meses de implantação (coelho 5), ●- β -TCP.

Com base neste, verifica-se que ao fim de 4 meses a brushite já foi toda reabsorvida e o único material que se encontra na cavidade medular é apenas o β -TCP que tínhamos em excesso desde o início da reacção.

8.8 Análises histológicas.

As análises histológicas do osso não foram claras nem esclarecedoras como se esperava, em parte devido a uma falha no procedimento. O que se passou foi que como não se adicionou nenhum marcador de crescimento ósseo, não foi possível distinguir com certeza se o que se encontrava no interior dos fémures dos coelhos era osso neoformado (osso novo), ou osso antigo, pois ambos coram da mesma forma. O que foi possível confirmar é que a alta formação de osso no coelho 2, visível claramente a olho nu, adveio da inflamação pois este possuía uma osteomielite¹⁰. Nos últimos dois coelhos não se verifica qualquer formação de osso nem inflamação. Em todos os casos, pelo que foi possível avaliar das lâminas, também não se verificou sinais de necrose óssea em nenhum dos casos.

Quanto à análise dos órgãos não se verificou nenhuma anomalia, pelo que se verifica que não sofreram qualquer tipo de contaminação pela aplicação do Cimento.

¹⁰ A osteomielite é uma inflamação do tecido ósseo, que resulta frequentemente de infecção bacteriana.

CAPÍTULO

9

**Caracterização
mecânica *in vitro***

Com 2 ossos do mesmo coelho (2 rádios) seguiu-se o mesmo procedimento utilizado na cirurgia e aplicou-se exactamente o mesmo CPC (CPC3/R2). Fizeram-se dois orifícios, limpou-se a cavidade com água destilada e em seguida preencheu-se a cavidade por completo com o CPC, desde um orifício até ao outro (figura 9.1).



Figura 9.1 – Limpeza e preenchimento do osso do coelho para experiência *in vitro*.

Os ossos com o CPC foram colocados num recipiente com soro fisiológico e mantidos a 37° durante 24 e 42h. Em cada um destes períodos retirou-se um dos ossos e cortou-se o osso por um dos orifícios de forma a verificar como se encontrava o material no seu interior.



Figura 9.2 – Aparelho utilizado no corte do osso com o CPC após a sua imersão em soro fisiológico.



Figura 9.3 – CPC implantado no osso ao fim de um dia imerso em soro fisiológico e a 37°C.



Figura 9.4 – CPC implantado no osso ao fim de dois dias imerso em soro fisiológico e a

Após 24h verificou-se que o CPC se mantinha pastoso no interior do osso, e que ao fim de 48h este já apresentava uma maior consistência, apesar de se mostrar muito frágil. Com estes resultados decidimos quantificar a resistência à compressão produzindo novos provetes como referido em 6.2.2, mas desta vez mergulhando-os em soro fisiológico após a sua remoção dos moldes. Os provetes foram mantidos em soro fisiológico durante 6 dias e a 37°C.



Tabela 9.1 – Resistência mecânica média do CPC3/R2 após 6 dias em soro fisiológico.

Composição	Razão L/S	Resistência mecânica média (MPa)	Módulo de weibull (m)
CPC3	R2	0,843	10,97

Figura 9.5 – Provetes de CPC3/R2 após 6 dias em soro fisiológico.

Após este período os provetes apresentaram uma resistência mínima, que não chegou nem a 1MPa, pelo módulo de weibull vemos que os resultados são fiáveis. Para além da baixa resistência também se verificou que estes se dissolveram um pouco, precipitando sob a forma de pequenos flocos. Contudo também Grover e colaboradores [121], ao fazerem os mesmos testes *in vitro* a um cimento de brushite verificaram que o tempo de envelhecimento tem um efeito considerável na porção de massa perdida do cimento e que esta é superior a 2% passado 5 dias.

Os provetes utilizados no teste de compressão foram aproveitados e com estes efectuou-se uma análise de FTIR para tentar perceber a razão desta grande variação nos valores de resistência.



Figura 9.6 – Resultados de FTIR do CPC3/R2 após 6 dias em soro fisiológico.

Nesta amostra verificou-se a presença de dois picos de absorção a 1589 e 1402 cm^{-1} correspondentes, respectivamente, à distensão assimétrica e simétrica o grupo COO do carboxilato de cálcio (COOCa). A precipitação de brushite fazia antever que se encontrassem 5 picos

característicos em 3550, 3465, 3255, 3160 e 1640 cm^{-1} , correspondentes à banda OH, contudo a inexistência de mais do que um pico no OH, demonstra que o precipitado deverá ser monetite (DCPA) em vez de DCPD [128].

Para além destes os restantes picos do espectro a 1120, 1098, 1046, 945, 608 e 553 cm^{-1} são semelhantes aos encontrados nos espectros quer de hidroxiapatite, quer de β -TCP. No entanto, enquanto a hidroxiapatite possui uma banda de vibração do PO_4^{3-} a 1097 cm^{-1} , esta banda de absorção aparece para o β -TCP em 1120 cm^{-1} [129]. De acordo com isto então podemos concluir que estes picos se tratam da absorção de β -TCP e também de alguma HA.

Outros estudos já demonstraram que a brushite (DCPD) pode transformar-se em apatite, durante os testes *in vitro*, quando o CPC é colocado em água, soro fisiológico, ou PBS. Hofmann e colaboradores [128] num estudo de monitorização do endurecimento de um cimento de brushite por FTIR, demonstraram que o simples facto de utilizar uma concentração mais elevada de ácido carboxílico, no seu caso ácido cítrico, levou à precipitação de DCPA em vez de DCPD, quando imerso em água e que ao fim de 24h estes níveis já eram significantes. Estes referem ainda que a presença de DCPA na fase final do cimento reduz a resistência do material pelo aumento da porosidade.

Além disto, pensa-se que a presença do carboxilato de cálcio, como uma fase intermédia, contribua igualmente para a diminuição das propriedades mecânicas, pela diminuição da homogeneidade do cimento, daí que este CPC apresente uma resistência à compressão muito fraca quando imerso em soro fisiológico durante alguns dias.

CAPÍTULO

10

**Conclusão e
Perspectiva de
Trabalhos Futuros**

Os objectivos fundamentais deste trabalho consistiram na caracterização de uma nova formulação de um CPC, assim como a compreensão do efeito que este pode ter na reparação óssea.

Os ensaios de compressão e flexão permitiram a caracterização da resistência mecânica. Observou-se que esta varia consoante a razão L/S e igualmente com a concentração de agente estruturante. Obteve-se um máximo de 9MPa de resistência à compressão, e 6MPa de resistência à flexão, ambas correspondentes ao CPC3 com a razão R3. Assim confirmou-se pelos resultados o que se esperava obter teoricamente, isto é, que uma razão L/S menor proporciona maior resistência mecânica, quer em compressão quer em flexão. Por outro lado verificou-se que a quantidade ideal de agente estruturante, das quantidades testadas, é 5% (CPC3), pois é à formulação que permite obter uma maior resistência mecânica para qualquer razão L/S.

Estes dois factores, razão L/S e concentração de agente estruturante, também condicionam o tempo de presa e injectabilidade. Assim para o CPC3, uma razão L/S de 0,5 (R3) pode levar a um rápido endurecimento (3 ± 1 min). Tão rápido que não permite a sua utilização numa seringa, não inviabilizando a sua utilização directa, podendo ser moldado e rapidamente aplicado no defeito ósseo por meio de uma espátula, ou pelos dedos do próprio cirurgião, desde que a quantidade necessária não seja muito elevada, mas apenas 1 a 2 ml. Caso seja necessário uma grande quantidade, pode acontecer que o CPC endureça antes da total colocação, por ser um processo mais moroso. No entanto para a utilização de técnicas menos invasivas, deve escolher-se a razão R2, de 0,75, pois esta confere mais tempo para se efectuar a transferência da pasta para a seringa, e proceder-se à sua aplicação sem que esta ofereça grande resistência ao sair da seringa.

Pelas análises de DRX verificou-se que ao fim de um dia, apesar da grande quantidade de β -TCP, observa-se igualmente formação de brushite. Ao fim de 3 semanas, este não sofre grande diferença e o β -TCP permanece em quantidade superior à brushite formada, o que sugere que a quantidade de ácido, só por si, não é suficiente para reagir com todo o β -TCP utilizado. Por outro lado, quando se colocou CPC em soro fisiológico durante 6 dias, verificou-se que a brushite deu origem a monetite e também a alguma HA. A presença de monetite, como produto intermédio, deve ser a responsável pela diminuição da resistência mecânica deste cimento.

Em relação à citotoxicidade verificou-se que todos os casos apresentam inicialmente uma viabilidade muito reduzida e que esta deverá estar directamente relacionada com o pH do CPC. Observou-se que neste o pH varia com o tempo, sendo bastante ácido no início mas aproximando-se do pH fisiológico à medida que o tempo passa e a reacção estabiliza. Após 4 dias apenas, a viabilidade já é mais elevada e, se estiver em contacto com fluidos, o pH deverá subir mais rapidamente.

Para melhor avaliar a citotoxicidade do material, e não excluir à partida o uso deste material como substituto ósseo, analisou-se o comportamento *in vivo*, com o intuito de avaliar a sua biocompatibilidade e o efeito do CPC no crescimento de novo tecido ósseo.

Uma vez que foi feito o acompanhamento radiográfico ao longo do tempo, ao fim de 3 meses verificou-se que o coelho 2 apresentava uma alteração no fémur, uma hipertrofia da cortical, o que significa que houve resposta do osso. Contudo, os restantes permaneceram sem alterações evidentes e, ao fim de 4 meses esta continuou a ser, em relação aos restantes 4 casos (possíveis de avaliar no momento), a principal mudança. Pelas radiografias foi possível verificar igualmente que no final o coelho 5, 4 e 2 são os que possuem mais quantidade de material no seu interior, contudo isso pode estar relacionado igualmente com a quantidade de material que implantado inicialmente. No coelho 1 e dois parece haver igualmente um pequeno aumento de densidade na cortical, o que poderá significar que houve osteointegração.

Pela resistência mecânica, em todos os casos se verificou um aumento da resistência, que é mais evidente no coelho 2. Este também é à partida o que parece ter uma maior quantidade de osso formado, daí que não seja de estranhar que a resistência tenha triplicado, passando de 10,62 para 31,45kN.

A inspeção visual dos vários ossos após o ensaio de flexão, veio confirmar os pressupostos retirados pelas radiografias. Assim verifica-se efectivamente que os coelhos 1, 2 e 3 são os que parecem conter alguma quantidade de osso formado, enquanto que os coelhos 4 e 5 apresentam pouco ou nenhum osso novo pelo que se poderá dizer que não houve integração óssea. Para além disto, em todos os casos parece existir necrose (o material encontra-se preto), que poderá ter resultado da reacção inicial logo após a colocação do CPC por este ser inicialmente ácido.

As análises histológicas não nos disseram muito mais, no entanto, verificou-se que não existia sinais de necrose, e que o material é biocompatível. Ao mesmo tempo verificou-se que a alta ossificação do coelho 2 resultou de uma resposta do osso a uma reacção de inflamação que resultou numa osteomielite. Quanto à análise efectuada nos diferentes órgãos não se verificou qualquer alteração, pelo que também não houve qualquer lesão ou contaminação provocada pela aplicação do CPC.

Os resultados obtidos *in vivo* não são muito conclusivos, pois as análises histológicas não nos permitiram dizer com certeza que houve osteointegração, e também não se verificou um padrão entre os 5 casos. O facto de a integração ocorrer mais ou menos depressa poderá ter a ver com a quantidade de cimento implantada inicialmente, contudo essa variação poderá não ser tão significativa ao ponto de provocar tal efeito. Por outro lado, e talvez o mais correcto, é que o local e tipo de procedimento cirúrgico poderá não ter sido o melhor, pois é mais difícil que ocorra uma

ligação entre o osso cortical (osso compacto¹¹) e a cavidade medular, do que de uma simples lesão (um furo para preenchimento) na epífise¹² do osso (que contém osso esponjoso¹³). Além disto o estudo foi feito tendo por base apenas 5 coelhos que só por si podem reagir de maneira diferente ao produto.

Ao fim dos 4 meses, verificou-se ainda que a brushite inicialmente formada foi totalmente reabsorvida, e que o produto que resta no interior dos fêmures é apenas o β -TCP que tínhamos em excesso desde o início da reacção.

Da experiência que se fez para simular a aplicação do cimento em vertebroplastia, verificou-se que em todas as formulações houve um aumento da resistência à compressão. Contudo, nesta aplicação o cimento encontra-se numa situação em que é sujeito a grande carga, e uma vez que as cargas são aplicadas logo após a colocação do cimento, é essencial que o CPC atinja rapidamente altas propriedades mecânicas, acima dos 30MPa, o que não é possível para já com esta formulação.

Tal como foi referido no início do capítulo 2 (tabela 2.2), existem inúmeros factores capazes de alterar as propriedades do CPC, quer na fase líquida, quer na fase sólida, quer na própria mistura ou condições do meio, e com o qual se pode jogar até se atingir um produto óptimo. Esta foi a primeira tentativa de um produto que parece promissor, mas que no entanto deverá sofrer algumas alterações até que se possa dizer que é um produto de excelência, e que não comprometa à partida a segurança dos pacientes.

Desta forma como sugestões a para uma melhoria do produto foco dois objectivos essenciais: A melhoria da resistência mecânica, e a diminuição da citotoxicidade inicial.

A solução para estes dois problemas poderá passar simplesmente pelo facto de se conseguir obter um cimento de apatite em vez de brushite, uma vez que a apatite por si só é mais resistente, e também se forma a pH superior (superior a 6). Para este facto há igualmente inúmeros casos que podem ser tentados. Poder-se-á, por exemplo, diminuir a quantidade de ácido (mas aí ficaria ainda mais β -TCP por reagir), ou adicionar uma base que aumente o pH. A adição de mais um fosfato de cálcio à fase sólida que seja mais básico, tal como o TTCP, poderá ser uma boa opção. Outra opção poderá passar por se utilizar α -TCP em vez de β -TCP que, para além de ser mais reactivo, é mais solúvel, e o seu pH de equilíbrio com a brushite é mais elevado, o que significa que mesmo que se forme brushite a reacção ficará completa a um pH mais elevado.

¹¹ O osso compacto é osso denso com poucos espaços internos; forma a diáfise e cobre o osso esponjoso as epífises.

¹² As epífises correspondem às extremidades dos ossos longos

¹³ O osso esponjoso é osso com muitos espaços pequenos; encontra-se nas epífises disposto em trabéculas.

Além disto, uma vez que se tratam de cerâmicos, a resistência mecânica está sempre relacionada com a porosidade e coesão do CPC. Assim, para se aumentar a resistência poder-se-á aumentar a concentração de agente coesivo, contudo este processo irá alterar o tempo de presa e poderá deixar o CPC demasiado pastoso diminuindo a injectabilidade.

De qualquer forma, não só esta última mas qualquer modificação que se faça, deverá ter sempre consequências, quer na resistência mecânica, quer no *setting time*, quer na injectabilidade e que será necessário quantificar. Em função dos novos resultados, e porque cada caso é um caso, deverá ser necessário efectuar-se um novo ajuste da razão L/S, e no caso de se utilizar outro fosfato de cálcio, otimizar a quantidade de material a utilizar de cada um.

Para melhor avaliar a osteointegração sugiro também várias alterações relativamente ao que foi efectuado neste estudo:

- O local da cirurgia deve ser alterado optando-se por efectuar a cirurgia na epífise e, deste modo, poder-se-á confirmar se esse foi o factor que afectou a osteointegração neste primeiro estudo.
- Deverá utilizar-se um coelho unicamente para controlo, provocando-lhe a mesma lesão, em vez de se comparar apenas com o outro fémur.
- Deverão utilizar-se diferentes marcadores de crescimento ósseo para melhor avaliar os resultados histológicos. Cada marcador deve ser administrado em alturas diferentes do estudo, como no início, meio e fim para que desta forma se possa observar, numa mesma imagem, os diferentes estágios do desenvolvimento ósseo.
- Para além disto, poder-se-ão repetir os testes *in vivo* utilizando igualmente para controlo um outro CPC, que deverá ser de apatite durante um período máximo de 6 meses e avaliações periódicas de 2 em 2 meses. Permitindo assim uma comparação do tempo de reabsorção e da quantidade de osso formado comparativamente a outro produto já existente.

A optimização de um produto não é um processo fácil, nem rápido, principalmente num caso como este onde as variáveis são mais que muitas, no entanto com esforço e dedicação acho que a seu tempo se chegará a bom porto.

BIBLIOGRAFIA

- [1] **Duarte.** *Osteoporose causa 300 fracturas anuais.* Jornal da Madeira. 20 de Outubro de 2005
- [2] **Dr. Gonçalo Neto d'Almeida, Médico Neurocirurgião.** «Grupo Português da saúde - Dicas e conselhos». <http://www.gpsaude.pt/gps/Menu/Clientes/InformacaoSaude/DicaseConselhos/neurocirurgia>. Consultado a 12 de Março de 2008.
- [3] **F. C. M. Driessens, J. A. Planell, and F. J. Gil.** *Calcium phosphate Bone cement.* Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering: Applications, Vol. 2, pp. 855, (1995).
- [4] **Gruninger, S.E., et al.** *Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cemen.* J. Dent. Res, Vol. 63, p. 200 (1984).
- [5] **Ogose, Akira, et al.** *Comparison of Hydroxyapatite and Beta Tricalcium Phosphate as Bone Substitutes After Excision of Bone Tumors,* Wiley InterScience, pp. 94-101, (2004).
- [6] **Albee, F.H. e Morrison, H.F.** *Studies in bone growth: tricalcium phosphates as a stimulus to osteogenesis,* Ann Surg, Vol. 71, pp. 32-39. (1920).
- [7] **Constantino, P. D., et al.** *Hydroxyapatite cement: I. Basic chemistry and histological properties,* Head Neck Surg, Vol. 117, pp. 379-384, (1991).
- [8] **Munting, E., Mirtchi, A. A. e Lemaître, J.** *Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study.* J Mater Sci Mater Med , Vol. 4, pp. 337-344, (1993).
- [9] **Brown, W. E. e Chow, L. C.** *A new calcium phosphate water setting cement.* Cements research progress, Westerville : Americam Ceramics Society, p. 352, (1986).
- [10] **Chanrley, J.** *Acrylic cement in orthopaedic surgery,* Edinburgh and London : E & S Livingstone, (1970).
- [11] **Demian, H. W. e McDermot, K.** *Regulatory perspective on characterization and testing of cements,* Biomaterials, Vol. 19, pp. 1607-1618, (1998).
- [12] **Saha, S. e Pal, S.** *Mechanical properties of bone cement: A review,* J. Biomed. Mater. Res., Vol. 18, pp. 435-462, (1984).
- [13] **Yaszemski, J.** *Biomaterials in Orthopaedics.* [ed.] Marcel Dekker Inc. 2nd., (2004).
- [14] **Chaplin, R. P. S., et al.** *The mechanical properties of recovered PMMA bone cement: a preliminary study,* J Mater Sci Mater Med Dec, Vol. 17 (12), pp. 1433-1448, (2006).
- [15] **Yu, D., et al.** *Self-setting hydroxyapatite cement: a novel skeletal drug delivery system for antibiotics,* J. Pharm Sci, Vol. 81(6), pp. 529-31, (1992).
- [16] **Cherng, A., Takagi, S. e Chow, L. C.** *Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement.* J Biomed Mater Res, Vol. 35, pp. 273-277, (1997).
- [17] **Khairoun, I., et al.** *Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements.* Biomaterials, Vol. 20, pp. 393-398, (1999).
- [18] **Wang, Xiupeng, Ye, Jiandong e Wang, Hai.** *Effects of Additives on the Rheological Properties and Injectability of a Calcium Phosphate Bone Substitute Material,* Wiley InterScience, pp. 259-264, (2005).
- [19] **Driessens, F. C. M., et al.** *Calcium phosphates and ceramics bone cements vs. acrylic cements.* Anales de Química, Vol. 93, pp. S38-S43, (1997).
- [20] **Bohner, M.** *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements,* Injury, Vol. 31, pp. SD 37-47, (2000).
- [21] **Driessens, F. e Verbeek, R.** Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates. [autor do livro] de Lange GL, de Groot K, Lee AJC de Putter C. Amsterdam : Elsevier, pp. 105-111, (1988).
- [22] **Verecke, G. e Lemaître, J.** *Calculation of the solubility diagrams in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$.* J. Crystal Growth, Vol. 104, pp. 820-832, (1990).

- [23] **Dorozhkin, S. V.** *Calcium orthophosphates*, J. Mater. Sci., Vol. 42, pp. 1061-1095, (2007).
- [24] **Lenárt, G., Bidló, G. e Pintér, J.** *Some basic problems in the examination of the calcium hydrogen phosphates of bone*, Clin Orthop Rel Res, Vol. 83, pp. 263–272, (1972).
- [25] **Muenzenberg, K. J. e Gebhardt, M.** *Brushite, octocalcium phosphate, and carbonate-containing apatite in bone*. Clin Orthop Rel Res, Vol. 90, pp. 271–273, (1973).
- [26] **Werness, P. G., Bergert, J. H. e Smith, L. H.** *Crystalluria*. J Crystal Growth, Vol. 53, pp. 166–181, (1981).
- [27] **Francis, M. D. e Webb, N. C.** *Hydroxyapatite formation from a hydrated calcium monohydrogen phosphate precursor*. Calcified Tissue Res, Vol. 10, pp. 82–90, (1972).
- [28] **Constantz, B. R., et al.** *Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites*. J Biomed Mater Res, Vol. 43, pp. 451– 461, (1998).
- [29] **Brown, P. W. e Martin, R. I.** *An analysis of hydroxyapatite surface layer formation*. J Phys Chem, Vol. 103, pp. 1671–1675, (1999).
- [30] **Driessens, F.C.M e Verbeeck, R.M.H.** *Biomaterials*. s.l. : CRC Press, Boca Raton, pp. 179–209, (1990).
- [31] **Driessens, F. C. M., et al.** *Osteotransductive bone cements*. Proc. Inst. Mech. Eng.: Eng. Med., Vol. 212(H), pp. 427-435, (1998).
- [32] **Blom, E. J., et al.** *Transforming growth factor-beta 1 incorporation in an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dihydrate/tetracalcium phosphate monoxide cement: release characteristics and physicochemical properties*. Biomaterials, Vol. 4, pp. 1261–1268, (2002).
- [33] **Ginebra, M. P., et al.** *Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug*. J Biomed Mater Res, Vol. 57, pp. 113–118, (2001).
- [34] **Barralet, J.E., et al.** *High-strength apatitic cement by modification with α -hydroxy acid salts*. Adv Mater, Vol. 15, pp. 2091–2094, (2003).
- [35] **Rey, C., et al.** *Biomimetism and Calcium Phosphate Cements*. [ed.] D. Mainard e J.P. Louis. Paris : Editions Romillat, Actualités en Biomatériaux, Vol. 6, pp. 27-37, (2002).
- [36] **Tas, A. C. e Aldinger, F.** *Formation of Apatitic Calcium Phosphates in a Na-K-Phosphate Solution of pH 7.4*. J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 16, pp. 167-174, (2005).
- [37] **Brown, P. W.** *Effects of particle size distribution on the kinetics of hydration of tricalcium silicate*. J. Am. Ceram. Soc., Vol. 72, pp. 1829-1832, (1989).
- [38] **Brown, P. W. e Fulmer, M.** *Kinetics of hydroxyapatite formation at low temperature*. J. Am. Ceram. Soc., Vol. 74, pp. 934-940, (1991).
- [39] **Ginebra, M. P., et al.** *Setting Reaction and Hardening of an Apatitic Calcium Phosphate Cement.*, J. Dent. Res, Vol. 76 (4), pp. 905-912, (1997).
- [40] **Constantz, B. R., et al.** *Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone*. Science, Vol. 267, pp. 1796–1799, (1995).
- [41] **Brown, W. E. e Chow, L. C.** *Dental restorative cement pastes*. 4518430 US (21 de May de 1985).
- [42] **Bohner, M., Lemaître, J. e Ring, T.** *Hydraulic properties of tri-calcium orthophosphate—phosphoric acid—water mixtures*. [ed.] P. Duran e J.F. Fernandez, Castellon de la Plana : Faenza Editrice Iberica S.L., pp. 95–100, (1993).
- [43] **Bohner, M., Gbureck, U. e Barralet, J. E.** *Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment*. Biomaterials, Vol. 26, pp. 6423-6429, (2005).
- [44] **Bohner, M. e Gbureck, U.** *Thermal reactions of brushite cements*. J Biomed Mater Res Part B, Vol. 84B, pp. 375-385, (2008).
- [45] **Lemaître, J., Mirtchi, A. e Mortier, A.** *Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development*. Silicates Industriels, Vols. 9-10, pp. 141-146, (1987).
- [46] **Bajpai, P. K., Fuchs, C. M. e McCullum, D. E.** *Development of tricalcium phosphate ceramic cements*. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications, Vol. 953, pp. 377-388, (1987)

- [47] **Bohner, M., et al.** *Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement.* J Mater Sci: Mater Med, Vol. 8, pp. 675–681, (1997).
- [48] **Elliott, J.C.** *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates.* Amsterdam : s.n., Elsevier, (1994).
- [49] **Bohner, M.** *Physical and Chemical Aspects of Calcium Phosphates Used in Spinal Surgery.* Eur. Spine J., Vol. 10, pp. S114-S121, (2001).
- [50] **Ohura, K., et al.** *Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study.* J. Biomed. Mater. Res., Vol. 30, pp. 193–200, (1996).
- [51] **Fraysinnet, P., et al.** *Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement.* Biomaterials, Vol. 19, pp. 971–977, (1998).
- [52] **Charriere, E., et al.** *Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements.* Biomaterials, Vol. 22, pp. 2937–2945, (2001).
- [53] **Ikenaga, M., et al.** *Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics.* J Biomed Mater Res, Vol. 40, pp. 139–144, (1998).
- [54] **Lilley, K. J., et al.** *Cement from Nanocrystalline Hydroxyapatite: Effect of Calcium Phosphate Ratio.* J Mater Sci: Mater Med, Vol. 16, pp. 1185-1190, (2005).
- [55] **Barralet, J. E., et al.** *Cements from nanocrystalline hydroxyapatite.* J Mater Sci Mater Med, Vol. 15, pp. 407–411, (2004).
- [56] **Grover, L. M., et al.** *Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of b-TCP-pyrophosphoric acid bone cement.* J Mater Chem, Vol. 15, pp. 4955–4962, (2005).
- [57] **Barralet, J. E., Grover, L. M. e Gbureck, U.** *Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II : hypodermic injection and strength improvement of brushite cement.* Biomaterials, Vol. 25, pp. 2197–2203, (2004).
- [58] **Hofmann, M., et al.** *Carboxylic acids as brushite bone cement setting retardants.* Naples : s.n., Proceedings of the 19th European Conference on Biomaterials. pp. 411–418, (2005).
- [59] **Bermudez, O., et al.** *Compressive strength of some calcium orthophosphate cements: a pilot study.* J. Mater. Sci. Mat. Med., Vol. 4, pp. 389-393, (1993).
- [60] **Bermúdez, O., et al.** *Optimization of a calcium orthophosphate cement formulation occurring in the combination of monocalcium phosphate monohydrate with calcium oxide.* J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 5, pp. 67-71, (1994).
- [61] **Fisher, John P., Mikos, Antonios G. e Bronzino, Joseph D.** *Tissue Engineering.* New York : CRC Press, (2007).
- [62] **Bermúdez, O., et al.** *Development of an octocalcium phosphate cement.* J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 5, pp. 144–146, (1994).
- [63] **Bermúdez, O., et al.** *Development of some calcium phosphate cements from combinations of a-TCP, MCPM and CaO.* J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 5, pp. 160–163, (1994).
- [64] **Chow, L. C., et al.** *Self-setting calcium phosphate cements.* s.l. : Mater. Res. Soc. Symp. Proc., Vol. 179, pp. 3–24, (1991).
- [65] **Miyamoto, Y., et al.** *In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement.* s.l. : Biomaterials, Vol. 16, pp. 855–860, (1995).
- [66] **Ginebra, M. P., et al.** *Effect of various additives and temperature on some properties of an apatitic calcium phosphate cement.* s.l. : J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 6, pp. 612–616, (1995)
- [67] **Watanabe, M., et al.** *Development of calcium phosphate cement.* J Eur Ceram Soc, Vol. 26, pp. 549–552, (2006).
- [68] **Takezawa, Y., et al.** *Self-setting apatite cement. II. Hydroxyapatite as setting accelerator.* J. Jpn Soc. Dent. Mater and Dev., Vol. 6, pp. 426-431, (1987).
- [69] **Bermudez, O., et al.** *Compressive strength and diametral tensile strength of some calcium orthophosphate cements: a pilot study.* J. Mater. Sci. Mat. Med, Vol. 4, pp. 389-393, (1993).

- [70] **Mirtchi, A. A., Lemaître, J. e E., Munting.** *Calcium phosphate cements: study of the b-tricalcium phosphate - dicalcium phosphate - calcite cements.* Biomaterials, Vol. 11, pp. 83-88, (1990).
- [71] **Bohner, M., Merkle, H. P. e Lemaître, J.** *In vitro aging of a calcium phosphate cement.* J. Mater. Sci.: Mater. Med., Vol. 11, pp. 155–162, (2000).
- [72] **M., KOMATH, VARMA, H. K. e SIVAKUMAR, R.** *On the development of an apatitic calcium phosphate bone cement.* Bull. Mater. Sci., Vol. 23, pp. 135-140, (2000).
- [73] **Sarda, S., et al.** *Kinetic study of citric acid: Influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent.* J. Biomed. Mater. Res, Vol. 61, pp. 653-659, (2002).
- [74] **Apelt, D., et al.** *In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements.* Biomaterials, Vols. 25 (7-8), pp. 1439–1451, (2004).
- [75] **Sarda, S, et al.** *Rheological properties of an apatitic bone cement during initial setting.* J. Mater. Sci, Vol. 12, pp. 905-909, (2001).
- [76] **Ginebra, M. P., et al.** *Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with the short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry.* Clin Mater, Vol. 17, pp. 99-104, (1994).
- [77] **Driessens, F. C., et al.** *Osteotransductive bone cements.* Proc. Inst. Mech. Eng., Vol. 212, pp. 427-435, (1998).
- [78] **Khairoun, I., et al.** *Effect of Calcium Carbonate on Clinical Compliance of Apatitic Calcium Phosphate Bone Cement.* J Biomed Mater Res, Vol. 38, pp. 356–360, (1997).
- [79] **Khairoun, I., et al.** *Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements.* J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 9, pp. 667– 671, (1998).
- [80] **Ginebra, M. P., et al.** *The effects of temperature on the Behaviour of na apatitic calcium phosphate cement.* J. Mater. Sci. Mater. Med., pp. 857-860, (1995)
- [81] **Leung, K. S., et al.** *An In Vitro Optimized Injectable Calcium Phosphate Cement for Augmenting Screw Fixation in Osteopenic Goats.* J. Biomed. Mater. Res. Part. B: Appl. Biomater, Vol. 78B, pp. 153-160, (2006).
- [82] **Khairoun, I., et al.** *Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements.* J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 9, pp. 425–428, (1998).
- [83] **Santini, M. T., et al.** *Effects of hyaluronan viscous materials on cell membrane electrical properties.* J. Biomed. Mater. Res. Vol. 41, pp. 211–220, (1998).
- [84] **Bohner, M e Baroud, G.** *Injectability of calcium phosphate pastes.* Biomaterials, Vol. 26, pp. 1553–1563, (2005).
- [85] **Andrianjatovo, H. e Lemaître, J.** *Effects of polysaccharides on the cement properties in the monocalcium phosphate/b-tricalcium phosphatesystem.* Innov Tech Biol Med, Vol. 16S, pp. 140–147, (1995).
- [86] **Leroux, L., et al.** *Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement.* bone, Vol. 25, pp. S31–S34, (1999).
- [87] **Belkoff, S. M., et al.** *An ex vivo biomechanical evaluation of a hydroxyapatite cement for use with vertebroplasty.* s.l. : 26, Spine, pp. 1542–1546, (2001).
- [88] **Borzacchiello, A., et al.** *Characterization of an injectable hydrogel composite for orthopedic applications.* Proceedings of the Second International Conference on New Biomedical Materials, pp. 6-8, (2003).
- [89] **Gbureck, U., et al.** *Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement.* Biomaterials, Vol. 25, pp. 2187–2195, (2004).
- [90] **Jansen, J.A., et al.** *Evaluation of tricalciumphosphate/ hydroxyapatite cement for tooth replacement; an experimental animal study.* Journal of Materials Science: Materials in Medicin, Vol. 6, pp. 653–657, (1996).
- [91] **Schmitz, J. P., Hollinger, J. O. e Milan, S. B.** *Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements.* J Oral Maxillofac Surg, Vol. 57, p. 1122, (1999).
- [92] **Kamerer, D. B., et al.** *Hydroxyapatite cement: a new method for achieving watertight closure in transtemporal surgery.* Am. J. Otol., Vol. 15 (1), pp. 47–49, (1994).


- [93] **Friedman, C. D., et al.** *Hydroxyapatite cement. II. Obliteration and reconstruction of the cat frontal sinus.* Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. : s.n., Vol. 117, pp. 385-389, (1991).
- [94] **Moore, D. C., et al.** *Fixation enhancement with a new, in situ setting Ca-P cement.* Davos : s.n., 10th European Conference on Biomaterials. p. 94, (1993).
- [95] **Schwarz, P. D., et al.** *Evaluation of an in situ setting carbonated calcium phosphate cement in a dynamically loaded canine femoral component.* Davos : s.n., 10th European Conference on Biomaterials. p. 8C, (1993).
- [96] **Mainard, D. e Galois, L.** *Treatment of a Solitary Calcaneal Cyst With Endoscopic Curettage and Percutaneous Injection of Calcium Phosphate Cement.* THE JOURNAL OF FOOT & ANKLE SURGERY, Vol. 45 (6), pp. 436-440, (2006).
- [97] **Csizy, M., Buckley, R. E. e C., Fennell.** *Benign calcaneal bone cyst and pathologic fracture surgical treatment with injectable calcium-phosphate bone cement (Norian): a case report.* Foot Ankle Int , Vol. 22, pp. 507–510, (2001).
- [98] **Lobenhoffer, P., et al.** *Use of an Injectable Calcium Phosphate Bone Cement in the Treatment of Tibial Plateau Fractures: A Prospective Study of Twenty-Six Cases With Twenty-Month Mean Follow-Up.* Journal of Orthopaedic Trauma, Vol. 16(3), pp. 143-149, (2002).
- [99] **Verlaan, J. J., et al.** *Balloon vertebroplasty with calcium phosphate cement augmentation for direct restoration of traumatic thoracolumbar vertebral fractures.* Spine, Vol. 27, pp. 543-548, (2002).
- [100] **Chohayeb, A. A., Chow, L. C. e Tsaknis, P. J.** *Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer-filler material.* J. Endodontics : s.n., Vol. 13, pp. 384-387, (1987).
- [101] **Boyne, P.J. e James, R.** *Grafting of the maxillary sinus floor with autogeneous marrow and bone.* Journal of Oral Surgery, Vol. 38, pp. 613–618, (1980).
- [102] **Aral, A., et al.** *Injectable calcium phosphate cement as a graft material for maxillary sinus augmentation: an experimental pilot study.* Clin. Oral Impl. Res. , Vol. 19, pp. 612–617, (2008).
- [103] **Comuzzi, L., Ooms, E. M. e Jansen, J. A.** *Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goat.* Clinical Oral Implants Research : s.n., Vol. 13, pp. 304–311, (2002).
- [104] **NBR ISO 5833:** Implantes para cirurgia – Cimentos de resina acrílica
- [105] **NP EN 196-3:** Métodos de ensaios de cimento; Parte 3: Determinação do tempo de presa e da expansibilidade.
- [106] **Coates, J.** *Interpretation of infrared spectra, a practical approach.* Encyclopedia of analytical chemistry. R. A. Meyers (ed), pp. 10815-10837, (2000).
- [107] **Rosen, S. L.** *Fundamental Principles of Polymeric Materials.* 2ª edição, John Wiley & Sons Ed., Nova Iorque, (1993).
- [108] **Jacobsen, N. E.** *NMR Spectroscopy Explained,* John Wiley & Sons, Inc., (2007).
- [109] **Smith, W. F.** *Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais.* Terceira edição, s.l. : Mc Graw Hill, (1998).
- [110] **ISO 10993-5:** *Biological Evaluation of Medical Devices*
- [111] **G.D, Brown, et al.** *Hydroxyapatite cement implant for regeneration of periodontal osseous defects in humans.* J Periodontol, Vol. 69, pp. 146-157, (1998).
- [112] **Gossen, M. F. A.** *Applications of Chitin and Chitosan.* Lancaster : Publishing Company Book, pp. 31-54, (1997).
- [113] **Mathur, N. K. e Narang, C. K.** *Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals.* J. Chem. Educ., Vol. 67, pp. 938-942, (1990).
- [114] **Rinaudo, Marguerite.** *Chitin and chitosan: Properties and applications.* Prog. Polym. Sci., pp. 603–632, (2006).
- [115] **Dong, Y., et al.** *Influence of degree of molar etherification on critical liquid crystal behavior of hydroxypropyl chitosan.* Eur. Polym. J., Vol. 37, pp. 1713–1720, (2001).
- [116] **Romano, R. C. O. e Pandolfelli, V. C.** *Obtenção e propriedades de cerâmicas porosas pela técnica de incorporação de espuma.* Cerâmica, Vol. 52, (2006).

- [117] **Weibull, W. e Sweden, S.** *A statistical Distribution Function of Wide Applicability*. September de ASME Journal of Applied Mechanics, pp. 293-297, (1951).
- [118] **Walker, W. J. e Reed, J. S.** *Influence of granule character on strength and Weibull modulus of sintered alumina*. J. Am. Ceram. Soc., Vol. 82, pp. 50-56, (1999).
- [119] **Quinn, G. D.,** *Strenght and Proof Testing*. Engineered Materials Handbook: Ceramics and Glasses, s.l. : ASM International, Vol. 4, pp. 585-598, (1991).
- [120] **Teixeira, L. H. P., et al.** *Sinterização e propriedades mecânicas do compósito Y-TZP/Al₂O₃*. Cerâmica, Vol. 53, pp. 227-233, (2007).
- [121] **Grover, L.M., et al.** *In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, Vol. 24, pp. 4133–4141, (2003).
- [122] **Bai, B., et al.** *The use of an injectable, biodegradable calcium phosphate bone substitute for the prophylactic augmentation of osteoporotic vertebrae and the management of vertebral compression fractures*. Spine , Vol. 24, pp. 1521–1526, (1999).
- [123] **Masato, N., et al.** *Percutaneous transpedicular vertebroplasty with calcium phosphate cement in the treatment of osteoporotic vertebral compression and burst fractures*. Journal of neurosurgery, Vol. 97, pp. 287-293, (2002).
- [124] **Hübner, A., et al.** *Comparação da resistência do corpo vertebral pré e pós vertebroplastia. Estudo experimental em vértebras de suínos*. COLUNA, Vol. 3 (2), pp. 82-86, (Junho de 2004).
- [125] **Yokoyama, A., et al.** *Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials*. Biomaterials, Vol. 23, pp. 1091–1101, (2002).
- [126] **Sauners, W. B.** *An Atlas of Surgical Approaches to the Bones and Joints of the dog and cat*. Piermattel, third edition, (1993).
- [127] **Flautre, B., et al.** *Volume Effect on Biological Properties of a Calcium Phosphate Hydraulic Cement: Experimental Study in Sheep*. Bone, Vol. 25, pp. 35S–39S, (1999)
- [128] **Hofmann, M. P., et al.** *FTIR-monitoring of a fast setting brushite bone cement: effect of intermediate phases*. J. Mater. Chem., Vol. 16, pp. 3199–3206, (2006).
- [129] **Peña, J. e Vallet-Regí, M.** *Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique*. Journal of the European Ceramic Society, Vol. 23, pp. 1687–1696, (2003).
- [130] **Castro, A. W. e D'Andréa Greve, J. M.** *Ossificação heterotópica em pacientes com lesão medulartraumática: associação com antígenos do sistema HLA*. Acta Ortop Bras, Vol. 11(2), pp. 102-109, (2003).

ANEXO

A

**Protocolos de
registro
experimental**

	<h2>Registo Experimental</h2> <p>Vertebroplastia</p>	<p>Exp....</p>
---	--	----------------

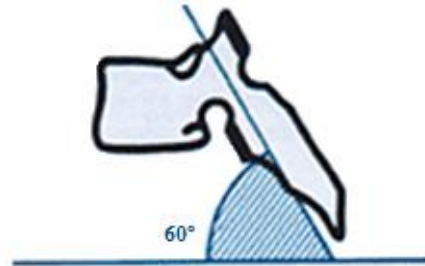
LOCAL DA PRÉ-LESÃO:



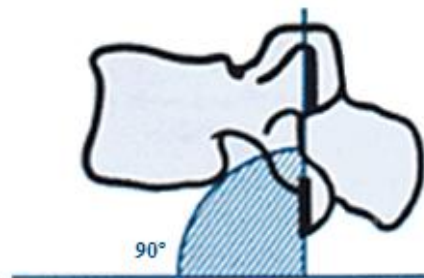
Vértebra Cervical



Vértebra Dorsal



Vértebra Lombar



OBSERVAÇÕES:

	<h2 style="margin: 0;">Registo Experimental</h2> <p style="margin: 0;">Vertebroplastia</p>	Exp...
---	--	--------

PROCEDIMENTO:

N.º de vértebras: _____

Designação: _____

Peso antes da vertebroplastia: _____

Peso após vertebroplastia: _____

Cimento utilizado: _____

N.º de vértebras: _____

Designação: _____

Peso antes da vertebroplastia: _____

Peso após vertebroplastia: _____

Cimento utilizado: _____

N.º de vértebras: _____

Designação: _____

Peso antes da vertebroplastia: _____

Peso após vertebroplastia: _____

Cimento utilizado: _____

N.º de vértebras: _____

Designação: _____

Peso antes da vertebroplastia: _____

Peso após vertebroplastia: _____

Cimento utilizado: _____

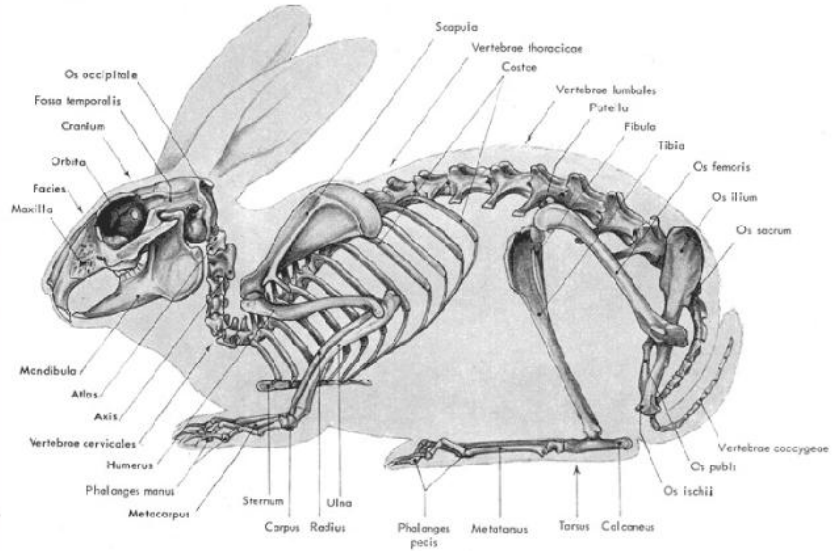
OBSERVAÇÕES:

Data: _____

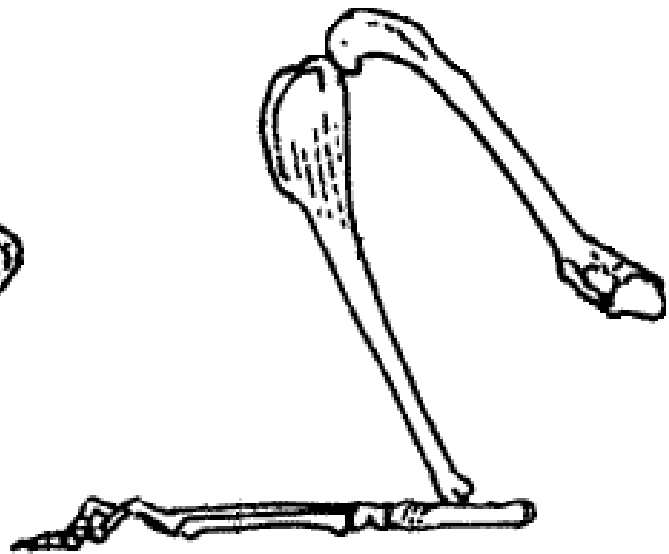
O Responsável: _____

	<h2>Registo Experimental</h2> <p>Biocompatibilidade</p>	Exp....
---	---	---------

LOCAL DA PRÉ-LESÃO:



Pata posterior



Pata anterior

OBSERVAÇÕES:

	<h2 style="margin: 0;">Registo Experimental</h2> <p style="margin: 0;">Biocompatibilidade</p>	Exp....
---	---	---------

PROCEDIMENTO:

N.º de coelhos: _____
 Designação: _____
 Local da pré-lesão: _____
 Quantidade de cimento injectado: _____
 Cimento utilizado: _____

N.º de coelhos: _____
 Designação: _____
 Local da pré-lesão: _____
 Quantidade de cimento injectado: _____
 Cimento utilizado: _____

N.º de coelhos: _____
 Designação: _____
 Local da pré-lesão: _____
 Quantidade de cimento injectado: _____
 Cimento utilizado: _____

N.º de coelhos: _____
 Designação: _____
 Local da pré-lesão: _____
 Quantidade de cimento injectado: _____
 Cimento utilizado: _____

OBSERVAÇÕES:

Data: _____
 O Responsável: _____