



DEGRADAÇÃO *in vitro* DE GRÂNULOS BIFÁSICOS DE FOSFATO DE CÁLCIO
DOPADOS COM ESTRÔNCIO

Paula Gil Patricio Bezerra

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e Materiais.

Orientadoras: Glória Dulce de A. Soares.
Helena Marques da Silva

Rio de Janeiro
Dezembro de 2011

DEGRADAÇÃO *in vitro* DE GRÂNULOS BIFÁSICOS DE FOSFATO DE CÁLCIO DOPADOS
COM ESTRÔNCIO

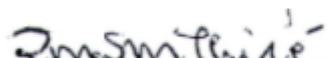
Paula Gil Patricio Bezerra

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

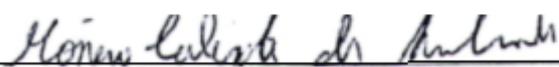
Examinada por:



Profa. Glória Dulce de Almeida Soares, D.S.C.



Profa. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.S.C.



Profa. Mônica Calixto de Andrade, D.S.C.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
DEZEMBRO DE 2011

Bezerra, Paula Gil Patricio

Degradação *in vitro* de grânulos bifásicos de fosfato de cálcio dopados com estrôncio/ Paula Gil Patricio Bezerra. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XII, 59 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Glória Dulce de Almeida Soares

Helena Marques da Silva

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 54-59.

1.Fosfato de cálcio. 2. Estrôncio. 3. Degradação.

I.Soares Glória Dulce de Almeida et al. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma etapa realizada em minha vida, por ter me dado força neste período tão difícil onde o carro se tornou a minha casa, e que permitiu que eu saísse ileza do acidente em uma das minhas indas e vindas à Itatiaia e que hoje pudesse estar aqui realizando mais um sonho.

Aos meus pais, Paulo e Edna, e minhas irmãs Camila e Carol por todo incentivo, amor, carinho e por ser meu porto seguro.

Às minhas orientadoras, Prof. Glória Soares e Helena Marques, pela oportunidade e paciência para desenvolver o presente trabalho.

As minhas amigas, Michelle e Dany que incondicionalmente me deram força para realização de mais uma fase da minha vida, sendo me ouvindo ou me ajudando nos experimentos quando por causa do trabalho eu não podia estar presente.

Ao meu amigo e namorado, que me incentiva, teve paciência e me deu muito amor e carinho, Jean Shoantes.

Aos amigos do laboratório de Biomaterias do PEMM, por todos os estudos, discussões e grande auxílio na realização e interpretação dos experimentos. Em especial às amigas Renatinha, Mariana e Gaby por todo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis. A grande Ingrid que apesar da chegada já no final do trabalho muito me ajudou e auxiliou em momentos difíceis.

Aos funcionários do PEMM que de forma direta e indireta auxiliaram na realização deste trabalho. Em especial à Aline, Ana Paula e Nathália que foram fundamentais para a conclusão dos trabalhos.

Aos novos amigos que conquistei neste período passado na COPPE como Érico e tantos outros que dividiram um pouco de seus conhecimentos comigo.

.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPERJ pelo suporte financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada a COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DE GRÂNULOS BIFÁSICOS DE FOSFATO DE CÁLCIO DOPADOS COM ESTRÔNCIO

Paula Gil Patricio Bezerra

Dezembro/2011

Orientadores: Glória Dulce de Almeida Soares

Helena Marques da Silva

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho grânulos de fosfatos de cálcio contendo estrôncio foram produzidos utilizando pós sintetizados pelo método de precipitação úmida. Grânulos esféricos foram obtidos a partir da mistura do pó sintetizado com solução de alginato de sódio e sinterizados a 1150 °C. A caracterização dos grânulos produzidos incluiu fluorescência de raios X (XRF); difração de Raios-X (DRX); microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Um estudo comparativo de bioatividade *in vitro* dos grânulos de fosfato de cálcio (CaP) e dos fosfato de cálcio contendo estrôncio (CaP-Sr) foi realizado a partir da imersão dos mesmos em solução de Ringer-Lactato e solução de acetato de potássio por até 168 horas sob condições estática e dinâmica. Um biorreator foi usado para os experimentos sob condição dinâmica. Os resultados de DRX indicaram que o Sr foi incorporado ao fosfato de cálcio. A concentração de cálcio nas soluções foram medidas por absorção atômica e as transformações de superfícies foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e após imersão. Ambos os grânulos apresentaram morfologia esférica e rugosa e com a sinterização duas fases foram identificadas: HA e β -TCP em teores da ordem de 73 e 27%, respectivamente, para o CaP e de 76 e 24%, respectivamente, para o CaP-Sr. A introdução de Sr na estrutura da apatita possivelmente levou ao aumento da solubilidade em relação à HA, o que favoreceu a precipitação de apatita na superfície dos grânulos CaP-Sr. Para ambos os grânulos (CaP e CaP-Sr) ocorreu uma menor precipitação quando imersos em solução de acetato de potássio em relação ao Ringer-Lactato.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

IN – VITRO STATIC AND DYNAMIC DEGRADATION OF BIPHASIC GRANULES OF CALCIUM PHOSPHATE DOPED WITH STRONTIUM

Paula Gil Patricio Bezerra

December/2011

Advisors: Glória Dulce de Almeida Soares ,
Helena Marques da Silva

Department: Metallurgical and Material Engineering

In this work granules of calcium phosphates containing strontium were produced from powders synthesized by a wet chemical route. Spherical ceramic granules were obtained from the mixture of the powder synthesized with sodium alginate solution and sintering at 1150°C. The characterization of the granules produced included fluorescence X-ray (XRF), diffraction X-ray (XRD), scanning electron microscopy (SEM) with energy dispersive spectroscopy (EDS) and Fourier transform infrared spectroscopy analysis (FTIR). After the preparation of granules, a comparative study of *in vitro* bioactivity of biphasic granules of calcium phosphate (CaP) and doped with strontium (CaP-Sr) has been carried out by immersion in a Ringer's and acetate potassium solutions during 168 hours under static and dynamic conditions. A specific bioreactor was used for the experiments under dynamic conditions. The results of XRD indicated that the Sr was incorporated into calcium phosphate. The calcium concentration in the solutions were measured by atomic absorption and transformation of surfaces were characterized by SEM before and after immersions. Both granules exhibited spherical and roughness morphology and, two phases were identified, HA and β -TCP, around 73% and 27%, respectively in CaP and 76% and 24%, respectively, in CaP-Sr. The introduction of Sr in the apatite structure possibly lead to increased solubility compared to the HA, which favored the precipitation of apatite on the surface of the granules CaP-Sr. For both the granules (CaP and CaP-Sr) there was less precipitation when immersed in a solution of potassium acetate compared to Ringer's Lactate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 FOSFATO DE CÁLCIO.....	3
2.2-HIDROXIAPATITA.....	6
2.3-SUBSTITUIÇÕES NA HIDROXIAPATITA.....	7
2.4-HIDROXIAPATITA COM ESTRÔNCIO.....	9
2.5-PRODUÇÃO DE GRÂNULOS.....	10
2.5.1-Alginato de sódio.....	11
2.6-TESTE DE DEGRADAÇÃO DE CERÂMICAS.....	12
2.6.1-Estudo da dissolução.....	14
2.7-BIORRETORES.....	17
3 OBJETIVOS.....	19
3.1GERAL.....	19
3.2 ESPECÍFICO.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1-SÍNTESE DOS PÓS DE HIDROXIAPATITAS PURA E CONTENDO ESTRÔNCIO.....	21
4.2-PRODUÇÃO DOS GRÂNULOS.....	21
4.3-CARACTERIZAÇÃO DOS GRÂNULOS.....	23
4.4-ESTUDO DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1-CARACTERIZAÇÃO DO FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO SUBSTITUÍDO COM ESTRÔNCIO.....	26
5.2-ESTUDO DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	31

5.2.1-Ensaio dinâmico	31
5.2.1.1--Imersão em solução Ringer Lactato.....	31
5.2.1.2--Imersão em solução de acetato de potássio (pH5).....	36
5.3.1-Ensaio estático	43
5.3.1.1--Imersão em solução Ringer Lactato.....	43
5.2.1.2--Imersão em solução de acetato de potássio (pH5).....	45
5.4-Estudo das Soluções utilizadas	49
6 CONCLUSÕES	52
7.SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Lista de Figuras

Figura 2.1- Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo c- célula unitária (Elliot, 1994).....	6
Figura 2.2: Estrutura polimérica do alginato. Ligações do tipo 1-4.....	11
Figura 2.3: Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ à 37 °C: isoterma de solubilidade mostrando $\log[\text{Ca}]$ e pH de soluções em equilíbrio com vários sais.....	16
Figura 4.1: Diagrama esquemático de procedimento experimental.....	19
Figura 4.2: Esquema da produção de grânulos de HA e Sr-HA.....	21
Figura 4.3: - Diagrama esquemático do sistema do biorreator sob temperatura constante (37°C). Um tubo de silicone (2) faz a conexão entre o novo fluido contido na garrafa (1), uma das 8 câmaras (4) contendo as amostras (5) e garrafa de recolhimento do fluido (6). Uma bomba peristáltica (3) com 8 canais disposta antes da câmara mantém o fluxo do fluido constante à 2mL/h.....	23
Figura 5.1: Espectros de Raios-X de CaP e CaP-Sr sinterizados a 1150°C (ICDD 09-0432 referente à hidroxiapatita e ICDD 09-0169 à whitlockite, β -TCP).....	26
Figura 5.2 – Espectroscopia das CaP pura e substituída com estrôncio.....	27
Figura 5.3 – Micrografias das superfícies dos grânulos de CaP-Sr (a e b) e EDS (c) após sinterização à 1150°C.....	27
Figura 5.4: Diagrama de Rietveld da CaP; (a) - o perfil calculado; (b)– as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).....	28
Figura 5.5: Diagrama de Rietveld do CaP-Sr; (a)- o perfil calculado; (b) – as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).....	29
Figura 5.6: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição dinâmica.....	31
Figura 5.7: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição dinâmica.....	32

Figura 5.8: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos na solução Ringer-Lactato por 7 dias sob condições (a) estática e (b) dinâmica.....	33
Figura 5.9: Concentração de cálcio sob condição estática para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Ringer-Lactato.....	34
Figura 5.10: Concentração de cálcio sob condições dinâmica para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Ringer-Lactato.....	34
Figura 5.11: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Ringer Lactato em meio (a) estático e (b) dinâmico.....	35
Figura 5.12: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP-5%Sr, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Ringer Lactato em meio (a) estático e (b) dinâmico.....	36
Figura 5.13:Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição dinâmica.....	38
Figura 5.14: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição dinâmica.....	39
Figura 5.15:Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos na solução Acetato por 7 dias sob condições (a) estática e (b) dinâmica.....	40
Figura 5.16: Concentração de cálcio sob condição estática para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio.....	42
Figura 5.17: Concentração de cálcio sob condições dinâmica para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio.....	42
Figura 5.18: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Acetato de Potássio em meio (a) estático e (b) dinâmico.....	44
Figura 5.19: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP-5%Sr, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Acetato de Potássio em meio (a) estático	

e (b) dinâmico.....	45
Figura 5.20: Espectros de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR) obtidos dos ensaios dinâmico em Biorreator em solução de acetato.....	45
Figura 5.21: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição estática.....	46
Figura 5.22: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição estática.....	47
Figura 5.23: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos em Solução de Acetato de Potássio por 7 dias sob condição (a) estática.....	48
Figura 5.24: Concentração de cálcio sob condições estática para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio.....	48
Figura 5.25: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos em soluções (a) Ringer-Lactato e (b) Acetato de Potássio por 7 horas sob condição dinâmica.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Composição iônica da parte inorgânica de alguns tecidos do corpo humano (E. BOANINI <i>et al</i> , 2009).....	4
Tabela 2.2: Principais fosfatos de cálcio (modificado de BOHNER, 2000).....	5
Tabela 2.3: Exemplos de substituições na estrutura da apatita (LeGeros e LeGeros,1993).....	8
Tabela 2.4: Logaritmo da constante do produto de solubilidade de vários fosfatos de cálcio (modificado de DOROZHKIN & EPPLE, 2002)./ solubilidade é relacionada com o logaritmo da constante do produto de solubilidade para dado composto (excluindo-se a água de hidratação), com concentrações em mol.L-1; [b] Não pode ser medido precisamente. Entretanto, encontram-se os seguintes valores na literatura: 25,7 (pH 7,40), 29,9 (pH 6,00) e 32,7 (pH 5,28).....	15
Tabela 2.5: Variáveis envolvidas na descrição dos mecanismos de dissolução.....	16
Tabela 4.1:Freqüências de vibração ativa em infravermelho dos fosfatos de cálcio(SLlosarczyk <i>et al.</i> , 2005; Stoch <i>et al.</i> , 2000; Marques, 2003; Markovic <i>et al.</i> , 2004).....	22
Tabela 5.1 – Resultados de dosagem de Ca, P e Sr por fluorescência de raios X.....	25
Tabela 5.2: Parâmetros de rede das amostras de CaP e CaP- 5%Sr.....	29
Tabela 5.3: Distribuição do Sr ²⁺ nos sítios doCa ²⁺	29

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma etapa realizada em minha vida, por ter me dado força neste período tão difícil onde o carro se tornou a minha casa, e que permitiu que eu saísse ileza do acidente em uma das minhas indas e vindas à Itatiaia e que hoje pudesse estar aqui realizando mais um sonho.

Aos meus pais, Paulo e Edna, e minhas irmãs Camila e Carol por todo incentivo, amor, carinho e por ser meu porto seguro.

Às minhas orientadoras, Prof. Glória Soares e Helena Marques, pela oportunidade e paciência para desenvolver o presente trabalho.

As minhas amigas, Michelle e Dany que incondicionalmente me deram força para realização de mais uma fase da minha vida, sendo me ouvindo ou me ajudando nos experimentos quando por causa do trabalho eu não podia estar presente.

Ao meu amigo e namorado, que me incentiva, teve paciência e me deu muito amor e carinho, Jean Shoantes.

Aos amigos do laboratório de Biomaterias do PEMM, por todos os estudos, discussões e grande auxílio na realização e interpretação dos experimentos. Em especial às amigas Renatinha, Mariana e Gaby por todo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis. A grande Ingrid que apesar da chegada já no final do trabalho muito me ajudou e auxiliou em momentos difíceis.

Aos funcionários do PEMM que de forma direta e indireta auxiliaram na realização deste trabalho. Em especial à Aline, Ana Paula e Nathália que foram fundamentais para a conclusão dos trabalhos.

Aos novos amigos que conquistei neste período passado na COPPE como Érico e tantos outros que dividiram um pouco de seus conhecimentos comigo.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPERJ pelo suporte financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada a COPPE/UFRJ como parte dos requisitos

necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DE GRÂNULOS BIFÁSICOS DE FOSFATO DE CÁLCIO DOPADOS COM ESTRÔNCIO

Paula Gil Patricio Bezerra

Dezembro/2011

Orientadores: Glória Dulce de Almeida Soares

Helena Marques da Silva

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho grânulos de fosfatos de cálcio contendo estrôncio foram produzidos utilizando pós sintetizados pelo método de precipitação úmida. Grânulos esféricos foram obtidos a partir da mistura do pó sintetizado com solução de alginato de sódio e sinterizados a 1150 °C. A caracterização dos grânulos produzidos incluiu fluorescência de raios X (XRF); difração de Raios-X (DRX); microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Um estudo comparativo de bioatividade *in vitro* dos grânulos de fosfato de cálcio (CaP) e dos fosfato de cálcio contendo estrôncio (CaP-Sr) foi realizado a partir da imersão dos mesmos em solução de Ringer-Lactato e solução de acetato de potássio por até 168 horas sob condições estática e dinâmica. Um biorreator foi usado para os experimentos sob condição dinâmica. Os resultados de DRX indicaram que o Sr foi incorporado ao fosfato de cálcio. A concentração de cálcio nas soluções foram medidas por absorção atômica e as transformações de superfícies foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e após imersão. Ambos os grânulos apresentaram morfologia esférica e rugosa e com a sinterização duas fases foram identificadas: HA e β -TCP em teores da ordem de 73 e 27%, respectivamente, para o CaP e de 76 e 24%, respectivamente, para o CaP-Sr. A introdução de Sr na estrutura da apatita possivelmente levou ao aumento da solubilidade em relação à HA, o que favoreceu a precipitação de apatita na superfície dos grânulos CaP-Sr. Para ambos os grânulos (CaP e CaP-Sr) ocorreu uma menor precipitação quando imersos em solução de acetato de potássio em relação ao Ringer-Lactato.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

IN – VITRO STATIC AND DYNAMIC DEGRADATION OF BIPHASIC GRANULES OF CALCIUM PHOSPHATE DOPED WITH STRONTIUM

Paula Gil Patricio Bezerra

December/2011

Advisors: Glória Dulce de Almeida Soares ,
Helena Marques da Silva

Department: Metallurgical and Material Engineering

In this work granules of calcium phosphates containing strontium were produced from powders synthesized by a wet chemical route. Spherical ceramic granules were obtained from the mixture of the powder synthesized with sodium alginate solution and sintering at 1150°C. The characterization of the granules produced included fluorescence X-ray (XRF), diffraction X-ray (XRD), scanning electron microscopy (SEM) with energy dispersive spectroscopy (EDS) and Fourier transform infrared spectroscopy analysis (FTIR). After the preparation of granules, a comparative study of *in vitro* bioactivity of biphasic granules of calcium phosphate (CaP) and doped with strontium (CaP-Sr) has been carried out by immersion in a Ringer's and acetate potassium solutions during 168 hours under static and dynamic conditions. A specific bioreactor was used for the experiments under dynamic conditions. The results of XRD indicated that the Sr was incorporated into calcium phosphate. The calcium concentration in the solutions were measured by atomic absorption and transformation of surfaces were characterized by SEM before and after immersions. Both granules exhibited spherical and roughness morphology and, two phases were identified, HA and β -TCP, around 73% and 27%, respectively in CaP and 76% and 24%, respectively, in CaP-Sr. The introduction of Sr in the apatite structure possibly lead to increased solubility compared to the HA, which favored the precipitation of apatite on the surface of the granules CaP-Sr. For both the granules (CaP and CaP-Sr) there was less precipitation when immersed in a solution of potassium acetate compared to Ringer's Lactate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 FOSFATO DE CÁLCIO.....	3
2.2-HIDROXIAPATITA.....	6
2.3-SUBSTITUIÇÕES NA HIDROXIAPATITA.....	7
2.4-HIDROXIAPATITA COM ESTRÔNCIO.....	9
2.5-PRODUÇÃO DE GRÂNULOS.....	10
2.5.1-Alginato de sódio.....	11
2.6-TESTE DE DEGRADAÇÃO DE CERÂMICAS.....	12
2.6.1-Estudo da dissolução.....	14
2.7-BIORREATORES.....	17
3 OBJETIVOS.....	19
3.1GERAL.....	19
3.2 ESPECÍFICO.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1-SÍNTESE DOS PÓS DE HIDROXIAPATITAS PURA E CONTENDO ESTRÔNCIO.....	21
4.2-PRODUÇÃO DOS GRÂNULOS.....	21
4.3-CARACTERIZAÇÃO DOS GRÂNULOS.....	23
4.4-ESTUDO DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1-CARACTERIZAÇÃO DO FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO SUBSTITUÍDO COM ESTRÔNCIO.....	26
5.2-ESTUDO DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	31
5.2.1-Ensaio dinâmico.....	31
5.2.1.1--Imersão em solução Ringer Lactato.....	31

5.2.1.2--Imersão em solução de acetato de potássio (pH5).....	36
5.3.1-Ensaio estático.....	43
5.3.1.1--Imersão em solução Ringer Lactato.....	43
5.2.1.2--Imersão em solução de acetato de potássio (pH5).....	45
5.4-Estudo das Soluções utilizadas.....	49
6 CONCLUSÕES.....	52
7.SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

Lista de Figuras

Figura 2.1- Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo c- célula unitária (Elliot, 1994).....	6
Figura 2.2: Estrutura polimérica do alginato. Ligações do tipo 1-4.....	11
Figura 2.3: Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ à 37 °C: isoterma de solubilidade mostrando $\log[\text{Ca}]$ e pH de soluções em equilíbrio com vários sais.....	16
Figura 4.1: Diagrama esquemático de procedimento experimental.....	19
Figura 4.2: Esquema da produção de grânulos de HA e Sr-HA.....	21
Figura 4.3: - Diagrama esquemático do sistema do biorreator sob temperatura constante (37°C). Um tubo de silicone (2) faz a conexão entre o novo fluido contido na garrafa (1), uma das 8 câmaras (4) contendo as amostras (5) e garrafa de recolhimento do fluido (6). Uma bomba peristáltica (3) com 8 canais disposta antes da câmara mantém o fluxo do fluido constante à 2mL/h.....	23
Figura 5.1: Espectros de Raios-X de CaP e CaP-Sr sinterizados a 1150°C (ICDD 09-0432 referente à hidroxiapatita e ICDD 09-0169 à whitlockite, β -TCP).....	26
Figura 5.2 – Espectroscopia das CaP pura e substituída com estrôncio.....	27
Figura 5.3 – Micrografias das superfícies dos grânulos de CaP-Sr (a e b) e EDS (c) após sinterização à 1150°C.....	27
Figura 5.4: Diagrama de Rietveld da CaP; (a) - o perfil calculado; (b)– as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).....	28
Figura 5.5: Diagrama de Rietveld do CaP-Sr; (a)- o perfil calculado; (b) – as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado).....	29
Figura 5.6: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição dinâmica.....	31
Figura 5.7: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição dinâmica.....	32

Figura 5.8: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos na solução Ringer-Lactato por 7 dias sob condições (a) estática e (b) dinâmica.....	33
Figura 5.9: Concentração de cálcio sob condição estática para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Ringer-Lactato.....	34
Figura 5.10: Concentração de cálcio sob condições dinâmica para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Ringer-Lactato.....	34
Figura 5.11: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Ringer Lactato em meio (a) estático e (b) dinâmico.....	35
Figura 5.12: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP-5%Sr, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Ringer Lactato em meio (a) estático e (b) dinâmico.....	36
Figura 5.13:Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição dinâmica.....	38
Figura 5.14: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição dinâmica.....	39
Figura 5.15:Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos na solução Acetato por 7 dias sob condições (a) estática e (b) dinâmica.....	40
Figura 5.16: Concentração de cálcio sob condição estática para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio.....	42
Figura 5.17: Concentração de cálcio sob condições dinâmica para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio.....	42
Figura 5.18: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Acetato de Potássio em meio (a) estático e (b) dinâmico.....	44
Figura 5.19: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP-5%Sr, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Acetato de Potássio em meio (a) estático	

e (b) dinâmico.....	45
Figura 5.20: Espectros de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR) obtidos dos ensaios dinâmico em Biorreator em solução de acetato.....	45
Figura 5.21: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição estática.....	46
Figura 5.22: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição estática.....	47
Figura 5.23: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos em Solução de Acetato de Potássio por 7 dias sob condição (a) estática.....	48
Figura 5.24: Concentração de cálcio sob condições estática para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio.....	48
Figura 5.25: Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos em soluções (a) Ringer-Lactato e (b) Acetato de Potássio por 7 horas sob condição dinâmica.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Composição iônica da parte inorgânica de alguns tecidos do corpo humano (E. BOANINI <i>et al</i> , 2009).....	4
Tabela 2.2: Principais fosfatos de cálcio (modificado de BOHNER, 2000).....	5
Tabela 2.3: Exemplos de substituições na estrutura da apatita (LeGeros e LeGeros,1993).....	8
Tabela 2.4: Logaritmo da constante do produto de solubilidade de vários fosfatos de cálcio (modificado de DOROZHKIN & EPPLE, 2002)./ solubilidade é relacionada com o logaritmo da constante do produto de solubilidade para dado composto (excluindo-se a água de hidratação), com concentrações em mol.L-1; [b] Não pode ser medido precisamente. Entretanto, encontram-se os seguintes valores na literatura: 25,7 (pH 7,40), 29,9 (pH 6,00) e 32,7 (pH 5,28).....	15
Tabela 2.5: Variáveis envolvidas na descrição dos mecanismos de dissolução.....	16
Tabela 4.1:Freqüências de vibração ativa em infravermelho dos fosfatos de cálcio(SLlosarczyk <i>et al.</i> , 2005; Stoch <i>et al.</i> , 2000; Marques, 2003; Markovic <i>et al.</i> , 2004).....	22
Tabela 5.1 – Resultados de dosagem de Ca, P e Sr por fluorescência de raios X.....	25
Tabela 5.2: Parâmetros de rede das amostras de CaP e CaP- 5%Sr.....	29
Tabela 5.3: Distribuição do Sr ²⁺ nos sítios doCa ²⁺	29

1 INTRODUÇÃO

Os fosfatos de cálcio sintéticos e naturais são amplamente empregados na medicina e na odontologia para a reparação de perdas de tecidos ósseos devido à similaridade que apresentam com a fase inorgânica do osso. Dentre estes fosfatos, a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - HA possui grande importância pois é o que apresenta maior estabilidade termodinâmica próxima da temperatura ambiente. Além disso, a hidroxiapatita permite diversas substituições atômicas durante a sua síntese, o que pode modificar seu desempenho clínico, devido às modificações químicas e estruturais. Assim sendo, suas diversas propriedades, tais como cristalinidade, substituição atômica (ou iônica), tamanho de cristalitos e anisotropia, precisam ser determinadas para que se assegure seu adequado comportamento *in vivo*.

Dentre os minerais presentes no tecido ósseo, o estrôncio vem sendo bastante estudado. A presença do estrôncio (Sr) no osso parece influenciar positivamente a densidade mineral e o conteúdo mineral (NIELSEN *et al.*, 1999), o que resultou em várias pesquisas envolvendo síntese e caracterização de HA contendo Sr (LI *et al.*, 2007; LANDI *et al.*, 2008; DOURADO, 2006). O estrôncio substitui os íons cálcio, formando uma solução sólida total na hidroxiapatita, entretanto, o excesso de Sr parece ter efeito deletério na mineralização (LANDI *et al.*, 2008).

Em aplicações clínicas, fosfatos de cálcio (CaP) são produzidos e processados a fim de se obter como produto final materiais granulares ou em blocos (CONZ *et al.*, 2005) por diversas rotas, como por exemplo, compactação de blocos porosos seguido de cominuição (LIMA *et al.*, 2006) e a obtenção de grânulos homogêneos pelo método do alginato (LIMA, 2011). Fosfatos bifásicos (HA + fosfato tricálcico – TCP) são também produzidos visando conjugar a estabilidade da hidroxiapatita com a degradabilidade do TCP (KIM *et al.*, 2004).

A obtenção de grânulos de fosfatos de cálcio contendo estrôncio se justifica como um material de futuro promissor para a engenharia óssea. Com o envelhecimento populacional e o acesso crescente da população a serviços odontológicos pelo SUS, há um aumento de demanda para produtos de preenchimento que também são empregados em ortopedia (SOARES, 2010). Assim, o objetivo do trabalho é produzir e caracterizar físico-quimicamente grânulos sintéticos de fosfatos de cálcio incorporados com 5 mol% estrôncio (SrHA) para finalidades médico-odontológicas.

Em engenharia tecidual, a cultura dinâmica de células, usando biorreatores,

apresenta resultados promissores, assim investir na pesquisa de ensaios dinâmicos *in vitro* constitui-se uma maneira eficaz de mimetizar a condição *in vivo* (SILVA, 2009). A condição dinâmica pode promover uma tensão aplicada pelo meio que estimula a proliferação e diferenciação celular (BOTELHO *et al.*, 2002; BJERE *et al.*, 2008). Em ensaios dinâmicos, a superfície pode ser modificada pelo fluxo constante imposto ao material, podendo afetar o comportamento celular. Dessa forma o uso de meios dinâmicos se justifica como uma previsão mais realista da cultura de células e da situação clínica. Os testes de degradação, na ausência de células também podem ser realizados em biorreatores (SILVA, 2009).

O objetivo deste trabalho é avaliar a degradação *in vitro* da hidroxiapatita contendo estrôncio sob condições estática e dinâmica utilizando como fluido solução de acetato de potássio e solução de Ringer Lactato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio mais utilizados são β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \beta$), hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ou uma mistura bifásica de β -TCP e HA em uma proporção variável de acordo com as propriedades desejadas (LEGEROS, 1993; HENCH, 1998). A solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta à medida que a razão Ca/P diminui. Desta forma, a hidroxiapatita estequiométrica, razão molar Ca/P igual a 1,67, é pouco solúvel em meios biológicos. Mesmo que a composição química de alguns fosfatos de cálcio se aproxime das apatitas biológicas, a bioatividade desses materiais artificiais fica relativamente limitada (HENCH, 1998). Uma maneira de melhorar suas propriedades biológicas seria ajustar sua composição próxima à dos ossos, via substituição na estrutura da apatita (VALLET-REGI & ARCOS, 2005).

Existem diferentes classes de fosfatos de cálcio que podem ser absorvíveis e não-absorvíveis. Muitas formas desses materiais podem ser usadas na engenharia de tecidos, com drogas que atuam como agente de ligação e transporte de genes não-virais, revestimentos protéticos (confecção de prótese dentária) e compósitos. Todas essas aplicações dos fosfatos de cálcio têm como interesse a reconstrução do tecido ósseo, a correção de defeitos da estrutura óssea, podendo também ser empregados no preenchimento ósseo, no transporte de drogas e como revestimento de próteses metálicas.

Tais características positivas ao reparo ósseo podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, os íons cálcio e fosfato, constituintes também do tecido ósseo, proporcionam um equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica (BEST *et al.*, 2008). Na tabela 2.1 estão relacionadas a composição dos diferentes íons encontrados na parte inorgânica do corpo humano.

Tabela 2.1: Composição iônica da parte inorgânica de alguns tecidos do corpo humano (E. BOANINI *et al.*, 2009)

	ESMALTE	DENTINA	OSSO
Ca (wt.%)	37.6	40.3	36.6
P (wt.%)	18.3	18.6	17.1
CO ₂ (wt.%)	3.0	4.8	4.8
Na (wt.%)	0.70	0.1	1.0
K (wt.%)	0.05	0.07	0.07
Mg (wt.%)	0.2	1.1	0.6
Sr (wt.%)	0.03	0.04	0.05
Cl (wt.%)	0.4	0.27	0.1
F (wt.%)	0.01	0.07	0.1
Zn (ppm)	263	173	39 ^c
Ba (ppm)	125	129	
Fe (ppm)	118	93	
Al (ppm)	86	69	
Ag (ppm)	2	0.6	
Cr (ppm)	1	2	0.33
Co (ppm)	0.1	1	<0.025
Sb (ppm)	10.7		
Mn (ppm)	0.6	0.6	0.17
Au (ppm)	0.1	0.07	
Br (ppm)	34	114	
Si (ppm)			500
Ca/P	1.59	1.67	1.65

Uma forma conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0, conforme mostra a Tabela 2.2.

Tabela 2.2– Principais fosfatos de cálcio (modificado de BOHNER, 2000)

Nome	Fórmula	Ca/P	Mineral	Símbolo
Dihidrogeno fosfato de cálcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	-	MCP
Monohidrogeno fosfato de cálcio	CaHPO_4	1.0	Monetita	DCP
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.33	Brushita	DCPD
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	-	OCP
Hidroxiapatita Deficiente	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2$	1.50-1.67	-	CD-HA
Fosfato de cálcio amorfo n = 3-4.5; 15-20% H2O	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.5	-	ACP
Dihidrogeno fosfato de cálcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.5	-	MCPM
α -Fosfato tricálcico	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	-	α -TCP
β -Fosfato tricálcico	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	-	β -TCP
Hidroxiapatita sinterizada (800 °C)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1.67	Hidroxiapatita	HA
Oxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1.67	-	OXA
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	Hilgentschickita	TetCP

Embora as cerâmicas inorgânicas não possuam capacidade osteoindutiva, ou seja, não são capazes de induzir a formação óssea, elas certamente possuem capacidade osteocondutiva, ou seja, servem de arcabouço para formação óssea, assim como uma extraordinária capacidade de se ligar diretamente ao osso (BURG *et al.*, 2000).

2.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) foi identificada como sendo componente mineral do osso pela primeira vez em 1926. Dejong realizou o primeiro estudo de Difração de Raios-X (DRX) do osso e reconheceu que sua fase inorgânica assemelha-se às estruturas minerais conhecidas como apatitas (CHAI e BEN-NISSAN, 1999).

A HA é um composto de composição, estequiometria ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e cristalografia definida. Pertence ao sistema hexagonal, com um grupo espacial P 63/m e parâmetros de rede $a=b=0.942$ nm e $c=0.688$ nm (POSNER, 1958). A hidroxiapatita pura é um sal duplo de fosfato tricálcico e hidróxido de cálcio.

A célula unitária da HA é formada por 10 íons de Ca^{2+} , 6 íons de fosfatos (PO_4)³⁻ e 2 íons de hidroxila OH^- . Os íons de Ca^{2+} estão dispostos em dois sítios, sendo 4 íons no sítio I e 6 íons no sítio II; a existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes para as hidroxiapatitas que contém substituições catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser afetadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza. Os 24 íons de oxigênio ocupam 3 sítios na estrutura da HA, os 6 íons de fosfatos e o grupo OH^- ocupam apenas um sítio, cada um.

A hidroxiapatita (HA) é umas das principais cerâmicas usadas em aplicações clínicas visando a regeneração óssea e dentária. Ela possui composição química similar à fase mineral dos tecidos calcificados e pode ser sintetizada com relativa facilidade em laboratório. Apresenta excelente biocompatibilidade e bioatividade com tecido ósseo. A HA é, ainda, osteocondutiva, ou seja, conduz o osso neo-formado por entre seus poros (VALLET-REGUI, 2005).

As apatitas biológicas diferem da HA pura em composição, tamanho do cristal, morfologia e estequiometria. A razão Ca/P da HA pura é de 1,67, mas em geral, as apatitas biológicas são não-estequiométricas (1,59 para o esmalte, 1,67 para a dentina e 1,65 para o osso). A deficiência em cálcio nas apatitas é refletida pela formação de

fosfato tricálcico do tipo β - (β -TCP) após calcinação a partir de 700 °C (LEGEROS, 1994).

Devido à sua composição química semelhante à fase mineral do tecido ósseo, a HA favorece o crescimento ósseo nos locais onde se encontra, fenômeno chamado de osteocondução, estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea. (ASCHAR *et al.*, 2003; AOKI, 1991; HENCH, 1997; SAERIA *et al.*, 2003).

Embora seja um material que possua uma microestrutura adequada, a HA como outras cerâmicas, não apresenta um alto desempenho mecânico. As deficiências de caráter mecânico, normalmente estão associadas a porosidade do material. Várias propriedades mecânicas (dureza, tenacidade, resistência à flexão e à compressão, etc.) demonstram uma redução com o aumento da microporosidade (RIBEIRO, 2003).

2.3 Substituições na hidroxiapatita

A solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta à medida que a razão Ca/P diminui. Desta forma, a hidroxiapatita estequiométrica, razão molar Ca/P igual a 1,67 é pouco solúvel em meios biológicos. Mesmo que a composição química de alguns fosfatos de cálcio se aproxime das apatitas biológicas, a bioatividade desses materiais artificiais fica relativamente limitada (HENCH, 1998). Uma maneira de melhorar suas propriedades biológicas seria ajustar sua composição próxima à dos ossos, via substituição na estrutura da apatita (VALLET-REGI e ARCOS, 2005)

A estrutura da hidroxiapatita é conhecida por sua propriedade hospedeira, permitindo substituições de inúmeros íons apresentado na Tabela 2.3. Substituições dos íons Ca, (PO_4) ou (OH) na rede cristalina resultam em variações nas propriedades físico-químicas e morfológicas geralmente sem variação na simetria hexagonal (LeGeros e LeGeros, 1993). A substituição parcial dos íons PO_4^{3-} e OH^- pelo íon CO_3^{2-} resulta na contração dos eixos **a** e expansão do eixo **c** da célula unitária, aumento da solubilidade, variação nas posições atômicas, mudança na morfologia dos cristalitos e diminuição da cristalinidade.

Tabela 2.3 – Exemplos de substituições na estrutura da apatita (LeGeros e LeGeros, 1993).

<i>Substituições</i>	<i>Fórmulas químicas teóricas</i>
Sítio Ca²⁺	
Mg ²⁺	Ca _{10-x} Mg _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Zn ²⁺	Ca _{10-x} Zn _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Sr ²⁺	Ca _{10-x} Sr _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Ag ⁺	Ca _{10-x} Ag _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Sítio B (PO₄³⁻)	
CO ₃ ²⁻	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x}
SiO ₄ ⁴⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) _{6-x} (SiO ₄) _x (OH) _{2-x}
HPO ₄ ²⁻	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (HPO ₄) _x (OH) _{2-x}
Sítio A (OH)	
F ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} F _{2x}
Cl ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} Cl _{2x}
CO ₃ ²⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} (CO ₃) _x

Um dos substituintes mais estudado é o magnésio, sendo o quarto cátion mais abundante no osso humano (0,44 – 1,23% massa). É essencial para a fixação correta do cálcio no organismo, sua carência pode causar descalcificação nos ossos (osteoporose). A presença do Mg²⁺ na estruturada HA afeta sensivelmente a sua cristalização, desestabilizando sua estrutura e favorecendo a formação de β-TCP (CACCIOTTI *et al.*; 2009).

A substituição de grupamentos fosfatos por grupamentos íons SiO₄ na HA aumenta a bioatividade dos materiais. As cerâmicas dopadas com Si desenvolvem uma camada de apatita biológica na superfície em contato com os fluidos fisiológicos

mais rapidamente que HA pura (BOTELHO *et al.*,2002; PORTER *et al.*,2004).

O zinco (Zn^{2+}) está presente nos ossos humanos em baixas quantidades (entre 126-276 $\mu\text{g/g}$). O Zn^{2+} estimula o crescimento e a mineralização óssea (HASHIZUME & YAMAGUCHI, 1993), sua presença na apatita nos sítios do cálcio diminui a reação de inflamação induzida pela fagocitose dos pós de HA (GRANDJEAN-LAQUERREIRE *et al.*; 2006).

O flúor pode ser incorporado na HA substituindo os grupos OH^- , tornando a estrutura hexagonal mais estável e menos solúvel que a hidroxiapatita estequiométrica. O flúor pode ainda aumentar a formação óssea (KANNAN *et al.*, 2007).

Os grupos carbonatos alteram a cristalinidade da hidroxiapatita, acelerando os processos de dissolução da estrutura, o que é verificado nas cáries dentárias e nos processos de reabsorção óssea (MAVROPOULOS; 1999). Landi e colaboradores, através de testes *in vivo*, demonstraram que HA carbonatada apresenta uma boa compatibilidade, boa osteointegração e uma bioressorção mais rápida comparada com a HA estequiométrica (LANDI *et al.*; 2003).

2.4 Hidroxiapatita com estrôncio

O estrôncio está naturalmente presente no osso, por isso muitos estudos procuram observar seus efeitos em animais e humanos. O Sr^{2+} tem grande importância em aplicações biológicas, pois promove a formação óssea, diminui a reabsorção, além de reduzir o risco de fraturas vertebrais devido à osteoporose no período pós-menopausa (MARIE *et al.*, 2001).

A substituição de íons de cálcio por íons estrôncio é observada devido ao fato de ambos serem metais alcalinos terrosos. A estrutura da HA permite uma substituição de até 100% dos íons de Ca^{2+} por íons de Sr^{2+} (LI, 2007), contudo esta substituição deve ser controlada visto que estudos *in vivo* mostraram que os efeitos do metal são dependentes da dose usada (MARIE *et al.*, 2001). Quando usados em baixas doses (4mmol Sr/kg/dia), o estrôncio reduz a reabsorção óssea e aumenta a formação óssea, resultando num aumento da massa óssea em ratos (GRYNPAS e MARIE, 1990). A presença de Sr^{2+} aumenta o número de osteoblastos, células responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz óssea, e diminui o número e a atividade dos osteoclastos, responsáveis pela destruição óssea, levando assim a uma diminuição da reabsorção óssea (CANALIS *et al.*, 1996).

A incorporação de Sr^{2+} nos ossos leva a uma mudança nos parâmetros de rede, no tamanho de cristal, e na cristalinidade pois a distância da ligação Sr-OH será maior do que a Ca-OH, conseqüentemente, a energia de ligação diminui (coesão é inversamente proporcional à distância) o que leva a uma diminuição do módulo de elasticidade.

A dopagem do fosfato de cálcio com íons de estrôncio revelou a presença de duas fases cristalinas distintas: hidroxiapatita e fosfato tricálcico (β -TCP). A inserção do Sr^{2+} em ambas as fases foi total quando baixos níveis de Sr^{2+} foram incorporados, contudo incompleta quando altos níveis foram associados (RENAUDIN *et al.*; 2009).

Um estudo realizado por Boivin e colaboradores, onde macacos foram tratados com doses de ranelato de estrôncio por 13 semanas, mostrou que a adsorção de Sr^{2+} pela fase óssea inorgânica se dá pela troca iônica na superfície dos cristais e, em menor extensão, por troca iônica dentro do retículo cristalino. Neste caso, foi constatado que apenas um entre dez íons Ca^{2+} é substituído pelo íon Sr^{2+} . A substituição por Sr^{2+} não produziu alterações significativas nos parâmetros do retículo cristalino da fase óssea, apesar do Sr^{2+} apresentar raio iônico maior ($\text{Sr}^{2+} = 1,13 \text{ \AA}$) que do Ca^{2+} ($0,99 \text{ \AA}$), e também não foram constatadas alterações nas propriedades coesivas dos cristais dos minerais.

Outro estudo do tratamento com ranelato de estrôncio em ratos, a longo prazo (dois anos), mostrou aumento de massa óssea e de resistência mecânica óssea, como uma resposta ao aumento da superfície óssea ocupada por células osteóides e osteoblastos, revelando um aumento no número de sítios de formação óssea (AMMANN *et al.*, 1996).

O comportamento clínico desses produtos depende fundamentalmente do processo de degradação que ocorre quando em contato com os fluidos corpóreos. A taxa de degradação resulta na liberação de íons que podem estimular o processo de formação óssea ou, se em excesso, provocar a morte celular.

2.5 Produção de grânulos

Para aplicações clínicas, os pós de fosfatos de cálcio são produzidos e processados a fim de se obter como produto final materiais granulares ou blocos (CONZ *et al.*, 2005) por diversas rotas como, por exemplo, compactação de blocos porosos seguido de cominuição (LIMA *et al.*, 2006) e a obtenção de grânulos homogêneos pelo método do alginato (LIMA, 2011).

2.5.1 Alginato de sódio

Os alginatos são polissacarídeos naturais, biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos. É um sal orgânico derivado de carboidratos do tipo fibra. Extraído de algas marrons (macrocytis, Fucus, Laminaria ascophilum), é encontrado em mares e oceanos frios. Após a extração, o alginato de sódio é seco, separado, lavado, fervido e transformado em gel que é prensado, seco e moído. Sua fórmula química é $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$. Tem aplicação na gelificação. Para gelificar, o alginato de sódio reage com íons cálcio (ou com outros elementos similares ao cálcio) e formar um gel termo irreversível (não retorna ao estado líquido com o calor) que constitui a película que reveste as esferas resultantes da esferificação, em uma das técnicas de gelificação externa. Essa técnica consiste em aprisionar um líquido qualquer em uma esfera perfeita, (esferas preparadas com gel). Na esferificação básica trabalha-se com proporções de 0,4% a 0,7% de alginato de sódio no produto.

Estes polissacarídeos são polímeros lineares do ácido (1-4) β -D- Manurônico (unidade M) e ácido α -L-Gulurônico (unidade G) que apresentam variação na proporção e distribuição seqüencial ao longo da cadeia polimérica (figura 2.2). As propriedades físicas destes polímeros são determinadas por sua composição, extensão das sequencias lineares e por seu peso molecular (BOONTHEEKUL *et al.*,2005; PAULA,2008).

A adição de cátions divalentes (Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2} , Zn^{+2}) ao alginato em soluções aquosas, permite estabelecer ligações cruzadas e formar hidrogéis, para forma pontes entre as cadeias poliméricas adjacentes e uma rede tridimensional com o objetivo de estabilizar,permanentemente os polímeros. Este modelo de rede tridimensional, denominado de "egg-box", é baseado nas propriedades físico-químicas dos hidrogéis de alginato e nas propriedades de adesão dos cátions. Esta rede é, frequentemente, formada a partir do gotejamento de solução de alginato de sódio ou potássio, em solução aquosa de íons de cálcio, normalmente composta por cloreto de cálcio (PAULA, 2008).

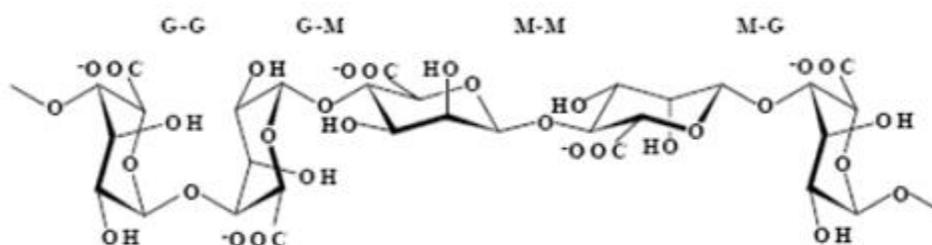


Figura 2.1: Estrutura polimérica do alginato. Ligações do tipo 1-4.

A mistura de pós de fosfato de cálcio com solução de alginato permite a produção de grânulos esféricos que podem ser sinterizados para eliminação do alginato e aumento da resistência mecânica.

2.6 Teste de degradação de cerâmicas

O estudo de mecanismos físico-químicos como diluição, precipitação, adsorção e características de superfície da interface sólido-solução são importantes fatores utilizados para a explicação da degradação (RODENAS e PALACIOS, 2005; LIMA, 2006)

O objetivo do teste de degradação é identificar e quantificar o potencial de degradação do produto testado em soluções fisiológicas. Para isso, é necessário o conhecimento prévio das propriedades químicas, físicas e a morfologia da superfície do material (ISO 10993-5).

Um biomaterial não deve levar ao hospedeiro a obter uma resposta indesejada, ou seja, o material e o organismo devem coexistir sem nenhum efeito tóxico (NATH et al., 2008; THAMARASELVI et al., 2004). Uma parte importante da pesquisa para desenvolver novos materiais biocompatíveis é o estudo das propriedades de dissolução *in vitro* de biomateriais em condições cientificamente controladas.

A grande maioria das cerâmicas de fosfato de cálcio são reabsorvíveis e dissolve quando expostas a ambientes fisiológicos. Contudo a hidroxiapatita é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente na ligação óssea, formando ligações químicas fortes com os ossos circunvizinhos, o que tem sido explorado para recuperação óssea rápida após traumas mais significativos ou cirurgia (KRIEGER, 2003).

No osso podemos encontrar fosfatos de cálcio tanto na forma cristalina quanto na forma amorfa. A presença da fase amorfa causa um aumento na taxa de dissolução em razão de sua maior solubilidade (DOROZHKIN & EPPLE, 2002).

O processo de biodegradação das HA tem sido estudado mostrando uma dependência de vários fatores, como composição química (associada à razão molar Ca/P), e microestrutura do material, bem como pH no meio fisiológico e fatores biológicos (compostos sintetizados pelo próprio organismo que podem interferir no seu funcionamento). A razão molar Ca/P é um parâmetro para se avaliar o comportamento biodegradável de um material em fluidos fisiológicos, pois a degradação é em função da estequiometria; quando a razão molar Ca/P for diferente do valor estequiométrico de 1,67 o material degrada e é absorvido pelo corpo (LACERDA et al.; 2009).

Segundo AOKI (1994) e LEGEROS (1994), a baixa cristalinidade e tamanho reduzido dos cristais estão relacionados com a presença de defeitos na rede das apatitas biológicas. A solubilidade do fosfato também é associada à baixa cristalinidade. Segundo LEGEROS (1994) e ELLIOT (1994) a extensão da dissolução será função da composição, tamanho da partícula, porosidade (micro e macroporosidade), área superficial específica e cristalinidade (tamanho e perfeição do cristal).

A biodegradação é uma das características desejadas para torná-lo ideal. A taxa de biodegradação da cerâmica deve ser controlada para permitir a contínua reconstrução do tecido. Além disso, um material substituto ideal para defeitos ósseos, associado por exemplo à cirurgia ortopédica reconstrutiva, deve conter poros de tamanhos adequados para manutenção da forma e função celular, ser inicialmente flexível e facilmente moldável, mas que tenha uma presa rápida uma vez implantado (BURG *et al.*, 2000; SHEU *et al.*, 2001; NOAH *et al.*, 2002).

Normalmente se acompanha o processo de degradação analisando quimicamente as soluções antes e após testes. Os tempos utilizados variam de minutos à horas e se a solução contiver íons de cálcio e fosfato, como a solução simuladora de fluídos corpóreos (SBF, "simulated body fluid"), poderá ocorrer precipitação de fosfato na superfície do material (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Porter e colaboradores (1993) demonstraram que a adição de silício na hidroxiapatita levou a maior bioatividade sobre hidroxiapatita pura. Isto foi atribuído ao efeito de íons de silicato acelerar a dissolução tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Kohri *et al* (1993) em estudo envolvendo cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (β -TCP e HA) observou que a fase pura de β -TCP e a mistura β -TCP/HA foram gradualmente convertidas em HA quando imersas em água destilada ou solução Ringer.

Estudo recente realizado por Pan e colaboradores (2010) demonstrou que a substituição de cálcio por estrôncio desestabiliza a estrutura cristalina devido ao maior tamanho do íon estrôncio, aumentando assim a solubilidade. Nath e colaboradores afirmam em seu trabalho que toda decomposição de hidroxiapatita resulta na combinação de HA e dissociação em β -TCP (NATH *et al.*, 2008).

Ashok e colaboradores (2010) relataram o comportamento da dissolução da hidroxiapatita pura e compósitos de hidroxiapatita com 20-30% em peso de mulita em fluidos fisiológicos simulados (SBF). Os experimentos de dissolução *in vitro* foram realizados para diferentes tempo de duração a partir de 7 dias até 28 dias, resultados de DRX e MEV mostram quase nenhuma dissolução de hidroxiapatita pura e HA composto com 30% em peso de mulita. No entanto, HA-20% em peso de mulita

apresenta dissolução considerável depois de 7 dias. A fase α -TCP foi a principal responsável pelo processo de dissolução (ASHOK *et al.*,2010).

2.6.1 Estudo da dissolução

O estudo dos mecanismos de dissolução de apatitas tem contribuído na prevenção e simulação de processos, como: produção de fertilizantes, formação de cáries dentárias, osteoporose, biodegradação de materiais *in vivo* e *in vitro* e avaliação da bioatividade de materiais de interesse (DOROZHKIN, 2002).

Um dos parâmetros mais importantes envolvidos na propriedade de dissolução de sólidos é a constante termodinâmica de solubilidade (Kps). Diferentemente da dissolução, a solubilidade é determinada em condições de equilíbrio, enquanto a dissolução só ocorre em condições adversas, sendo influenciada por inúmeras variáveis, incluindo a constante de solubilidade do sólido.

O corpo humano é constituído principalmente por água, sendo assim todas as reações que acontecem no organismo são influenciadas diretamente pela sua presença. Diante disso, a solubilidade do fosfato em água é de grande importância quando este é utilizado como um biomaterial. Valores do logaritmo da constante do produto de solubilidade são apresentados na Tabela 2.4, sendo quanto maior o valor menor a solubilidade do material.

Ainda que todos os parâmetros, exceto a composição, permaneçam constantes, essa ordem apresentada na Tabela 2.4 não é sempre observada experimentalmente. Isto ocorre porque a superfície do fosfato de cálcio, altamente solúvel, é reativa e pode formar uma camada de um fosfato de cálcio pouco solúvel, assim reduzindo a taxa de degradação (BOHNER, 2000).

A natureza dos fosfatos de cálcio precipitados é determinada essencialmente pelo grau de sobressaturação do meio de mineralização. A sobressaturação acontece por aumento das concentrações de cálcio e fosfato e/ou do pH. Além disso, o aumento da temperatura também contribui para o aumento da sobressaturação da solução uma vez que os sais de fosfato de cálcio apresentam solubilidade inversa. (AOBA *et al.*, 1998).

Tabela 2.4 – Logaritmo da constante do produto de solubilidade de vários fosfatos de cálcio (modificado de DOROZHKIN & EPPLE, 2002). Solubilidade é relacionada com o logaritmo da constante do produto de solubilidade para dado composto (excluindo-se a água de hidratação), com concentrações em mol.L-1; [a] Não pode ser medido precisamente. Entretanto, encontram-se os seguintes valores na literatura: 25,7 (pH 7,40), 29,9 (pH 6,00) e 32,7 (pH 5,28).

Nome	<i>log(KPS) a 25°C</i>	<i>log(KPS) a 37°C</i>
Dihidrogeno fosfato de cálcio monohidratado	1.14	-
Monohidrogeno fosfato de cálcio	6.90	7.02
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	6.59	6.63
Fosfato octacálcico	38-44	37-42
Hidroxiapatita Deficiente	≈ 85,1	≈ 85,1
Fosfato de cálcio amorfo n = 3-4.5; 15-20% H2O	[a]	[a]
Dihidrogeno fosfato de cálcio anidro	1.14	-
α-Fosfato tricálcico	25.5	25.5
β-Fosfato tricálcico	28.9	29.5
Hidroxiapatita sinterizada (800 °C)	116.8	117.2
Fosfato tetracálcico	38.44	37.42

A tendência para uma determinada fase de fosfato de cálcio precipitar pode ser determinada a partir de diagramas de solubilidade de fases como o representado na Figura 2.3.

A estabilidade dos fosfatos de cálcio está associada a diferentes valores de pH. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade. Observando-se as isotermas de solubilidade de sete fosfatos de cálcio, Figura 2.3, nota-se a inclinação negativa nas regiões neutras e ácidas do diagrama de fases. Isso reflete o fato de que todos os compostos são mais solúveis conforme o pH diminui. Na região alcalina, a concentração de cálcio aumenta a partir do pH.10 Dessa forma, em pH fisiológico, a solubilidade dos fosfatos de cálcio e, conseqüentemente, sua degradação *in vivo*, é dada pela seguinte ordem: MCPM > α -TCP > DCPD > DCP > OCP > β -TCP > HA (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

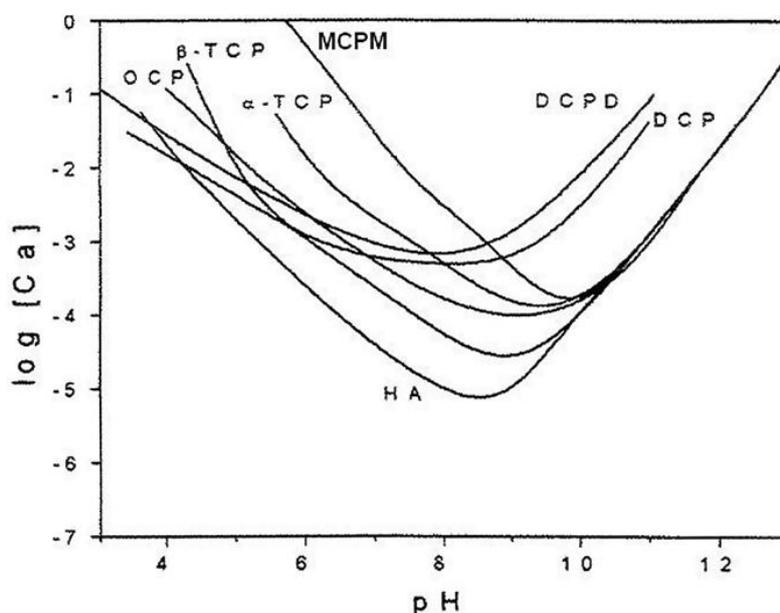


Figura 2.2: Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ à 37 °C: isoterma de solubilidade mostrando $\log[\text{Ca}]$ e pH de soluções em equilíbrio com vários sais. (GUASTALDI e APARECIDA, 2010)

Assim como existem também diferentes parâmetros que podem afetar na taxa de dissolução e na precipitação de uma fase de fosfato de cálcio, os quais estão descritos na Tabela 2.5.

Tabela 2.5- Variáveis envolvidas na descrição dos mecanismos de dissolução

Solução	Sólido	Superfície
pH	composição	defeitos
composição	cristalinidade	adsorção de íons
propiedades hidrodinâmicas	porosidade	transformação de fases

Na avaliação da dissolução de uma biocerâmica fatores como a composição da solução, microestrutura da amostra, condições de ensaio (temperatura, tempo, sistema estático ou dinâmico), relação área da superfície do sólido/volume da solução são decisivos, podendo alterar resultados da análise à medida que são definidas condições de ensaio diferentes. (LEGEROS, 1991).

A macro e microporosidade aceleram a biodegradação do material por aumentar a área da superfície em contato com os fluidos corporais, permitindo uma ampla vascularização do implante, aumentando o potencial osteoindutivo, adsorção de proteínas e fatores de crescimento, aumentando ainda a ação de osteoblastos e osteoclastos durante a fase de neoformação e remodelação óssea, além de permitir uma melhor osteointegração (HING *et al.*, 1999; HABIOVIC *et al.*, 2008).

2.7 Biorreatores

Devido ao aumento do número de materiais cerâmicos utilizados como biomateriais e os diversos aspectos envolvidos na interação com os tecidos vivos, procura-se uma forma de estudar esta relação *in vitro*. Os biorreatores surgem como uma proposta de se definir um conjunto de condições favoráveis necessárias à proliferação celular *in vitro* diante da possibilidade de cultivo de células em larga escala para a produção de uma gama crescente de produtos para saúde humana desde o final da década de 70 e para fins tecnológicos (MORAES *et al.*; 2008).

O uso dos biorreatores, na cultura dinâmica de células, em engenharia de tecidos possibilita resultados promissores. A condição dinâmica promove uma tensão aplicada pelo meio, estimulando a proliferação e diferenciação celular. Além disso, o

sistema enriquece o transporte de massa, assegurando uma nutrição contínua das células e constante renovação do meio (BEJERE et al.; 2008). Biorreatores também podem ser empregados na avaliação da degradação de materiais na ausência de células.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Atualmente a degradação *in vitro* é regida pela norma ISO 10993 parte 14, contudo o processo biológico é muito complexo e este teste serve apenas para comparar diferentes materiais. É importante que nos estudos de degradação sejam investigados meios mais próximos aos biológicos e que os materiais sejam testados dinamicamente para melhor simular o ambiente fisiológico.

Neste trabalho pretende-se avançar na metodologia de teste *in vitro* (em ausência de células) para avaliar a degradação/dissolução de grânulos bifásicos de fosfato de cálcio com 5%mol de Sr em substituição ao cálcio em meio estático e dinâmico, utilizando duas soluções diferentes (Ringer e solução de acetato) por tempos de até 168 horas.

3.2 Especificos

- Síntese de CaP e CaP-5%Sr, por precipitação via úmida, utilizando nitrato de cálcio, nitrato de estrôncio e hidrogenofosfato de potássio como precursores.
- Caracterização do pó formado por técnicas como difração de Raios-X e espectroscopia no infravermelho.
- Confecção de grânulos a partir dos pós sintetizados misturados a uma solução com alginato de sódio, seguido de sinterização.
- Caracterização dos grânulos por técnicas como difração de Raios-X, espectroscopia no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura.
- Exposição dos grânulos em dois diferentes meios (solução de Ringer e solução de acetato com pH 5) em sistema estático e dinâmico. Acompanhamento do processo de degradação pela teor de cálcio existente na solução.
- Análise dos grânulos após exposição aos meios, em alguns tempos selecionados, por DRX (fases cristalinas), FTIR (grupamentos funcionais) e morfologia (MEV).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho consiste no estudo da degradação *in vitro* sob condições estáticas e dinâmicas de duas hidroxiapatitas cálcio deficientes, denominadas por HA (pura) e Sr-HA (contendo estrôncio), as quais foram obtidas via precipitação úmida para posterior produção de grânulos, assim como esquematizado na Figura 4.1.

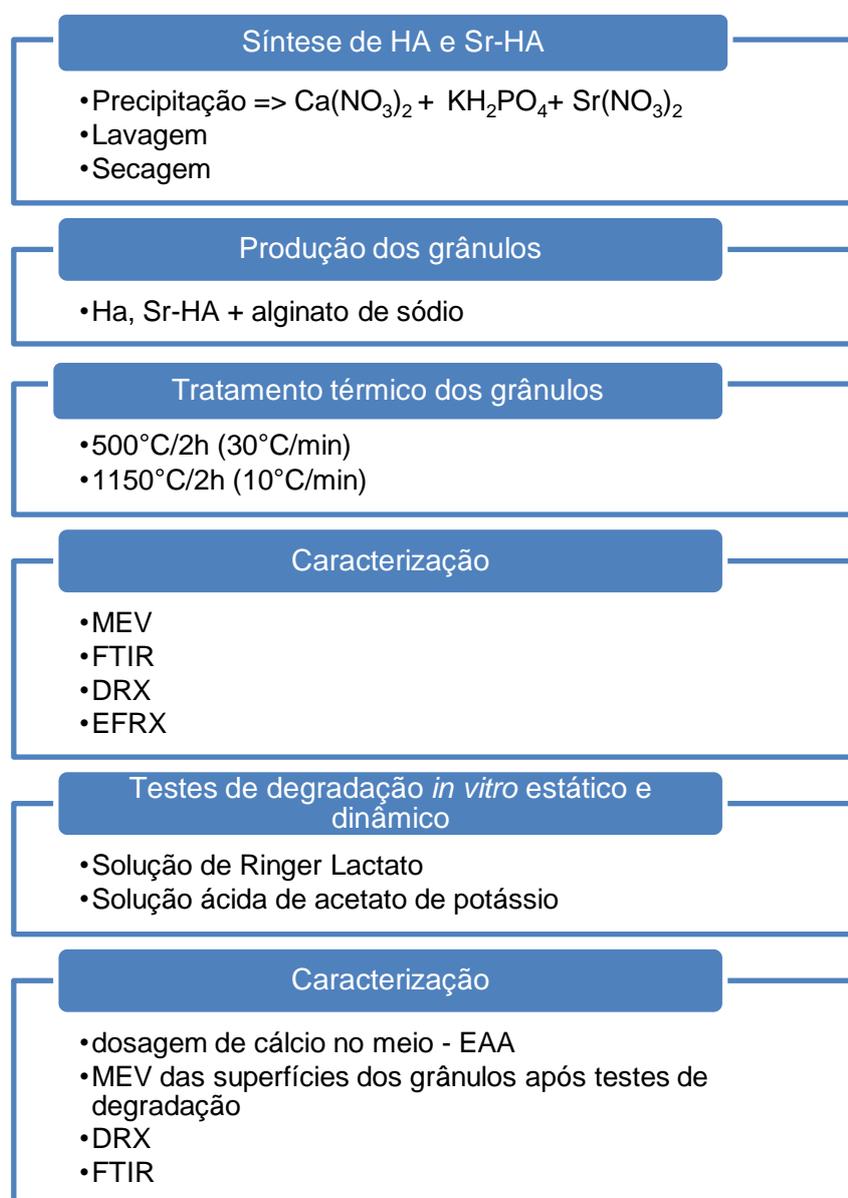


Figura 4.1 - Diagrama esquemático do procedimento experimental.

4.1 Síntese dos pós de hidroxiapatitas pura e contendo estrôncio

Por precipitação em meio aquoso foram produzidas hidroxiapatitas cálcio deficientes, pura e dopada com estrôncio, objetivando razões Ca/P e (Ca+Sr)/P iguais a 1,5.

Como fontes de cálcio e fósforo foram utilizados nitrato de cálcio [Ca(NO₃)₂] (MERCK, 99% puro) e dihidrogeno fosfato de potássio (KH₂PO₄, MERK). Para a síntese Sr-HA adicionou-se nitrato de estrôncio [Sr(NO₃)₂, MERK], como fonte de íons dopante Sr²⁺ substituindo íons de Ca²⁺, sendo 5% a razão molar de [Sr / (Ca + Sr)] utilizada.

As sínteses foram realizadas à uma temperatura próxima de 40°C com agitação constante, o pH foi mantido a 11 com a adição de hidróxido de amônia durante todo o processo de obtenção da cerâmica (LANDI *et al.*, 2007; Sanosh *et al.* 2009) .

O produto da reação foi deixado em suspensão sob as mesmas condições da síntese por um tempo de maturação de 2 horas, para permitir que todo reagente fosse transformado no produto final desejado. O precipitado foi filtrado e lavado com água deionizada até pH em torno de 6 (pH aproximado da água destilada e deionizada), em seguida foi seco em estufa por 48 horas a 37°C. O material resultante foi cominuído manualmente e peneirado.

4.2 Produção dos grânulos

Para produzir grânulos de HA triturou-se o pó obtido em grau de ágata e em seguida peneirou-se a 125µm. Separadamente, pesou-se 3,75g deste pó e 0,25g de alginato de sódio (NaC₆H₇O₆, Sigma-Aldrich).

Em bécheres diferentes, onde um continha alginato de sódio e o outro, o pó de HA peneirado, adicionou-se, lentamente e sob constante agitação, 20mL de água destilada ao primeiro e 5mL de água destilada ao último.

À solução de HA adicionou-se a solução de alginato de sódio, juntamente com mais 25mL de água, resultanto em um material viscoso, o qual foi peneirado a 75 µm.

A mistura foi finalmente extruída com o auxílio de bomba peristáltica à velocidade de 47,9 rpm e agulha hipodérmica com calibre de 0,55 mm, à uma

distância constante de 2cm de uma solução de CaCl_2 (0,15M) sob agitação magnética. A Figura 4.2 apresenta o arranjo experimental utilizado no processo da produção dos grânulos de HA e Sr-HA.

Deixou-se as esferas obtidas em contato com a solução de CaCl_2 (0,15M) por, pelo menos, 24 horas para garantir que houvesse completa troca catiônica de Na^+ pelo Ca^{2+} , sendo em seguida lavadas com água 3 vezes. Posteriormente, secaram-se as esferas à 37°C , separando-as a cada 10 minutos para evitar formação de aglomerados.

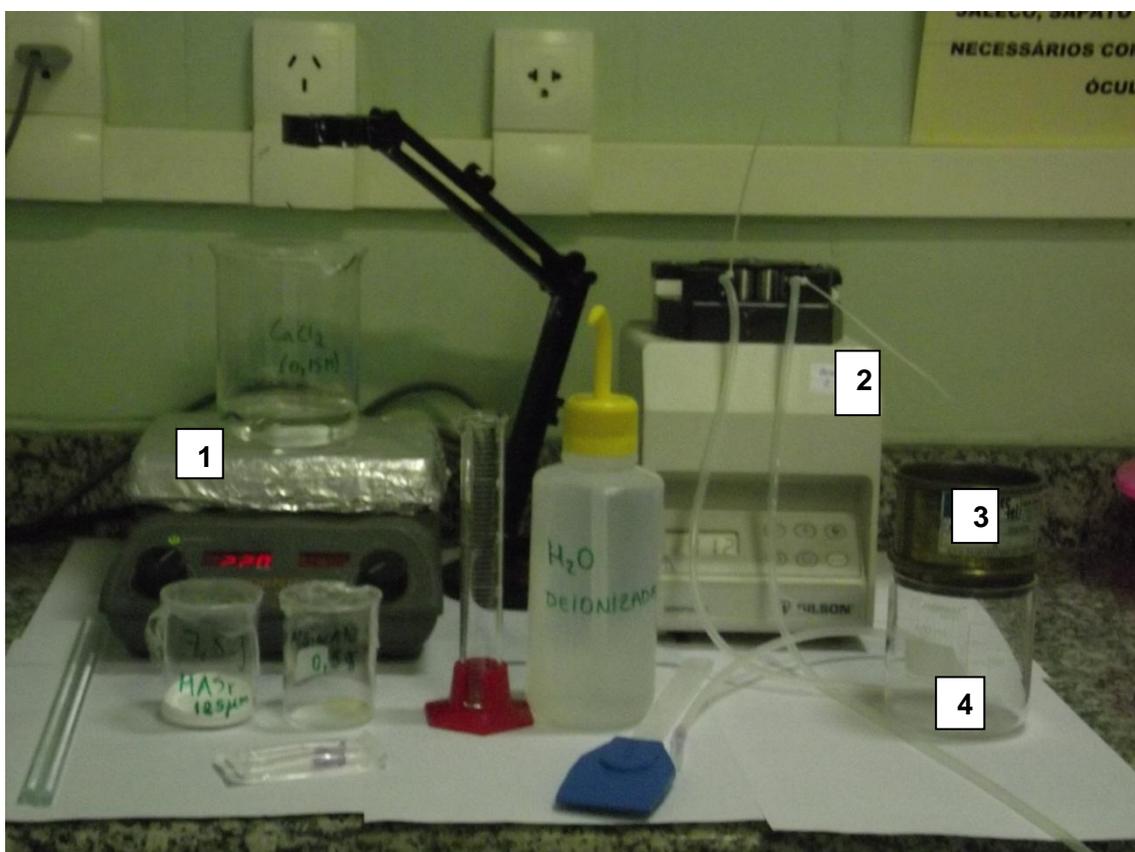


Figura 4.2 Arranjo experimental da produção dos grânulos de HA e -Sr-HA; (1)agitador eletromagnético, (2)bomba peristáltica, (3) peneira e (4)bécher.

As esferas foram tratadas termicamente utilizando-se duas rampas de aquecimento, a 550°C por 2 horas (30°C/min), para total eliminação do alginato de sódio, e a 1150°C por 2 horas (10°C/min), para sinterização dos grânulos. Ressalta-se que a primeira rampa foi lenta visando que todo o alginato fosse liberado sem danificar a estrutura das esferas.

Após o tratamento térmico, peneiraram-se os grânulos para separá-los por tamanho, visando obter uma faixa granulométrica na ordem de 250-600 µm. Sendo a mesma rota foi utilizada para produção dos grânulos de Sr-HA.

4.3 Caracterização dos grânulos

Os elementos cálcio, fósforo e estrôncio foram quantificados por espectroscopia de fluorescência de raio-X (EFRX) modelo Rigaku RIX 3100/ Tubo de Ródio (4KW). As fases presentes foram analisadas por difração de raios-X em um difratômetro SHIMADZU vertical, configuração theta-2theta, modelo XRD 6000, geometria Bragg-Brentano, com raio goniométrico de 185 mm. O alvo utilizado é de cobre (Radiação Cu α) 30kV/30mA. A faixa angular foi 5-70°, com uma velocidade de 1/s e passo 0,05° para identificação dos picos característicos do material. Os grânulos foram triturados para análise.

A morfologia dos grânulos foi observada com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM 6460-LV), e os elementos químicos presentes identificados por meio de espectroscopia por energia dispersiva (EDS).

A análise FTIR (Perkin Elmer, Spectrum 100) foi realizada em pastilhas com brometo de potássio (KBr) na seguinte proporção: 0,001g de grânulo (triturado na forma de pó) para 0,015g de KBr. Os espectros foram obtidos com resolução 4 cm⁻¹, ganho 1, região espectral 4000 a 400 cm⁻¹ e 16 varreduras. A análise das bandas referentes aos revestimentos obtidos foi baseada em dados da literatura, que estão resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Freqüências de vibração ativa em infravermelho dos fosfatos de cálcio (Sliosarczyk *et al.*, 2005; Stoch *et al.*, 2000; Marques, 2003; Markovic *et al.*, 2004).

Bandas (cm ⁻¹)	Interpretação
3568-3574, 3550, 3536	OH _(v1)
3500	H ₂ O
2400-3200	PO-H
1635-1640	H ₂ O
1534-1548, 1455	CO ₃ ²⁻ _(v3) sítio A
1515	CO ₃ ²⁻ AB
1350-1540, 1498-1500, 1470-1471, 1465-1467, 1449-1460, 1414-1430, 1417-1419, 1410-1412, 1321	CO ₃ ²⁻ sítio B
1143-1145	HPO ₄ ²⁻ _(v3)
1090-1100, 1096, 1088-1092, 1085, 1077-1081, 1052-1065, 1064, 1057-1061, 1048-1053, 1034-1046, 1041-1045, 1032-1034, 1036, 999-1004, 1095, 960-1200	PO ₄ ³⁻ _(v3)
1020	HPO ₄ ²⁻ (HA deficiente em Ca)
950-1000, 980-982, 959-966	PO ₄ ³⁻ _(v1)
878-883	CO ₃ ²⁻ _(v2) sítio A
872-877, 870	CO ₃ ²⁻ _(v2) sítio B
866-870	Vibração P-OH em HPO ₄ ²⁻
629-635, 342	OH ⁻
629-633, 614-615, 600-608, 590-592, 580-581, 573-574, 568	PO ₄ ³⁻ _(v4)
540-550, 520-535	HPO ₄ ²⁻
467-472, 446-450, 431-433	PO ₄ ³⁻ _(v2)

4.4 Estudo de degradação *in vitro*

O estudo de degradação *in vitro* dos grânulos de CaP e CaP-Sr foi realizado sob condições estática e dinâmica em contato com dois fluidos diferentes, solução de acetato de potássio, que simula condições ácidas durante a reabsorção osteoclástica, já que os osteoclastos quando ativos liberam H⁺, levando o pH ao seu redor em torno de 4 a 5 (Yao *et al.*, 2009); e e soro de Ringer Lactato, que contém sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto, glicose e tampões para manter as condições mais próximas as do sangue.

Para os testes sob condição estática, os grânulos foram imersos em 23 ml de fluido contido em tubo Falcon. Enquanto que para a condição dinâmica, utilizou-se um sistema (biorreator) que contém oito câmaras com volume conhecido de 23mL, onde os grânulos entram em contato com o fluido. Um tubo de silicone faz a conexão entre o fluido contido em um recipiente e a câmara contendo as amostras, outro tubo faz conexão entre a câmara e garrafa de recolhimento do fluido, que é utilizado para dosagem de íons. Uma bomba peristáltica disposta antes da câmara mantém o fluxo do fluido constante de 2mL/h. As amostras ficam permanentemente em contato com o meio, sob fluxo constante, assim como mostrado na Figura 4.3.

Ambos os testes foram realizados a uma temperatura constante de 37°C. Para cada ensaio realizado $1\pm 0,14$ g de grânulos foi colocado em contanto com respectivos fluidos. Ressalta-se que os após 7, 24, 72 e 168 horas alíquotas dos fluidos foram retiradas para análise do cálcio e as superfícies das amostras analisadas. Os testes foram realizados em triplicata.

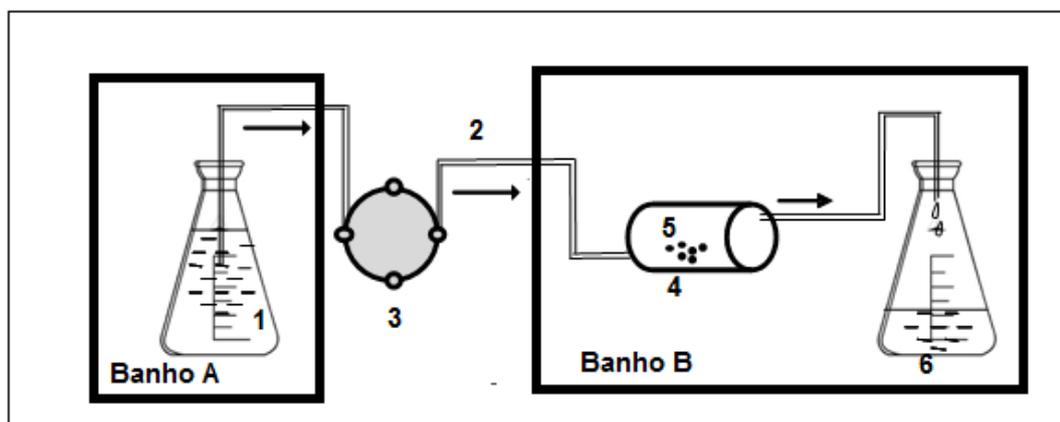


Figura 4.3 - Diagrama esquemático do sistema do biorreator sob temperatura constante (37°C) utilizando-se 2 banhos. Mangueira de silicone (2) faz a conexão entre o novo fluido contido na garrafa (1), uma das 8 câmaras (4) contendo as amostras (5) e garrafa de recolhimento do fluido (6). Uma bomba peristáltica (3) com 8 canais disposta antes da câmara mantém o fluxo do fluido constante à 2ml/h.

Após os testes de degradação, foram realizadas dosagens de cálcio dos meios por espectroscopia de absorção atômica (EAA), em um equipamento Shimadzu modelo AA6800. Após cada tempo pré-determinado (7, 24, 72 e 168 horas) foram coletadas e diluídas em água deionizada, como supressor utilizou-se solução de 10% de KCl. Foi

calculado experimentalmente o limite de detecção do cálcio ($0,04\text{mgL}^{-1}$) e limite de quantificação ($0,37\text{mgL}^{-1}$) .

Ao fim de cada tempo os grânulos foram analisados por FTIR, DRX e MEV, assim como descrito no item 4.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação dividem-se na caracterização de fosfatos de cálcio bifásicos produzidos e no estudo de degradação *in vitro* dos fosfatos de cálcio bifásicos puro e contendo estrôncio sob forma de grânulos em contato com solução de Ringer Lactato e uma solução ácida, sob condições estática e dinâmica.

5.1 Caracterização do fosfato de cálcio bifásico substituído com estrôncio

O fosfato de cálcio sintetizado apresenta aproximadamente 4,3% de substituição do Sr no sítio do Ca, conforme resultados de dosagem dos elementos de Ca, P e Sr por fluorescência de raios-X, Tabela 5.1. A fim de se obter um material livre de CaO, optou-se por produzir um fosfato de cálcio substituído com estrôncio deficiente em Ca, assim a razão Ca+Sr/P obtida é da ordem de 1,45 para CaP-Sr e 1,48 para CaP. Ressalta-se que esses valores estão muito próximos ao valor teórico (1,5).

Tabela 5.1 – Resultados de dosagem de Ca, P e Sr por fluorescência de raios-X.

Cerâmica	Ca(mol)	P(mol)	Sr(mol)	$\frac{(Ca + Sr)}{P}$	Sr/(Ca+Sr)* (%)
CaP	0,9628	0,649	-	1,48	-
CaP-Sr	0,89	0,64	0,04	1,45	4,3
Sr-HA teórica	0,95	0,66	0,05	1,5	5,00

* porcentagem referente à substituição do Sr no sítio do Ca.

A deficiência em cálcio das apatitas produzidas é responsável pela formação de novas fases, além da hidroxiapatita. Assim, como mostrado pela análise de DRX (Figura 5.1), picos característicos de hidroxiapatita e de fosfato tricálcico do tipo β estão presentes em ambos os materiais produzidos, na ordem aproximada de 76% de HA e 24% de β -TCP para CaP-Sr e 73% HA e 27% β -TCP para CaP sem estrôncio. A partir destes materiais, grânulos foram produzidos, a fim de se estudar a degradação *in vitro* sem células sob condições estáticas e dinâmicas.

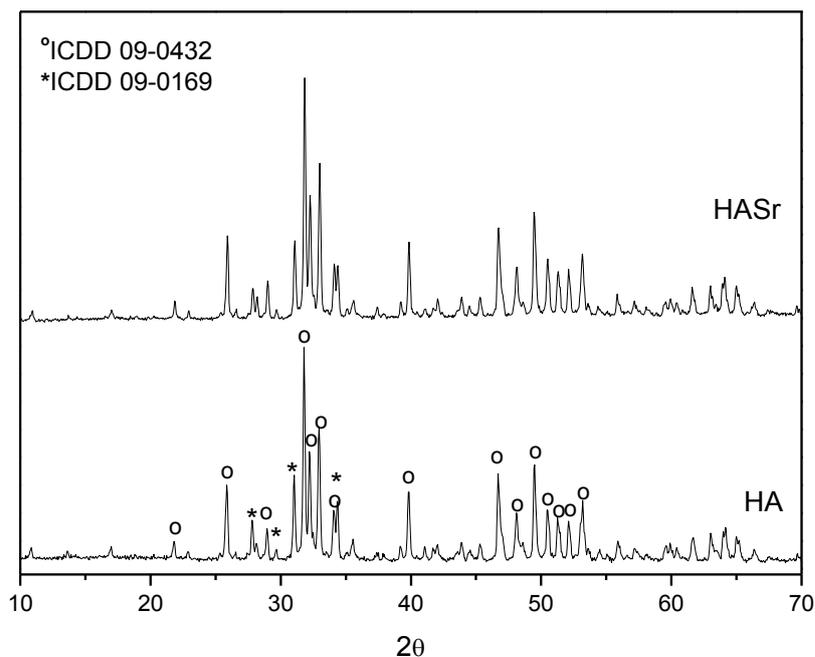


Figura 5.1 – Espectros de Raios-X de CaP e CaP-Sr sinterizados a 1150°C (ICDD 09-0432 referente à hidroxiapatita e ICDD 09-0169 à whitlockite, β -TCP).

A Figura 5.2 apresenta os espectros de absorção no infravermelho para CaP pura e substituída com estrôncio sinterizadas à 1150°C por 2h. Notam-se as bandas de fosfato (PO_4^{3-}) (ν_3 em 1098 e 1044 cm^{-1} e ν_4 em 624, 596 e 552 cm^{-1}) e de hidroxila (OH^-) em 3570 cm^{-1} características da hidroxiapatita. Bandas de carbonato (ν_3 em 1491 cm^{-1}) podem ser atribuídas ao processo de síntese, que não foi feito sob atmosfera inerte.

Os grânulos produzidos a partir da estrusão de uma solução contendo CaP ou CaP-Sr e alginato de sódio passam por um tratamento térmico a fim de eliminar todo o alginato e para se obter a sinterização do material cerâmico. O diâmetro aproximado dos grânulos produzidos é da ordem de 590 μm , assim como visto na Figura 5.3 (a). A superfície desses grânulos apresenta porosidade e grãos interligados por “pescoços” devido ao processo de sinterização, Fig. 5.3 (b). Resultados de EDS, Fig. 5.3 (c), confirmam a presença de Sr nos grânulos produzidos.

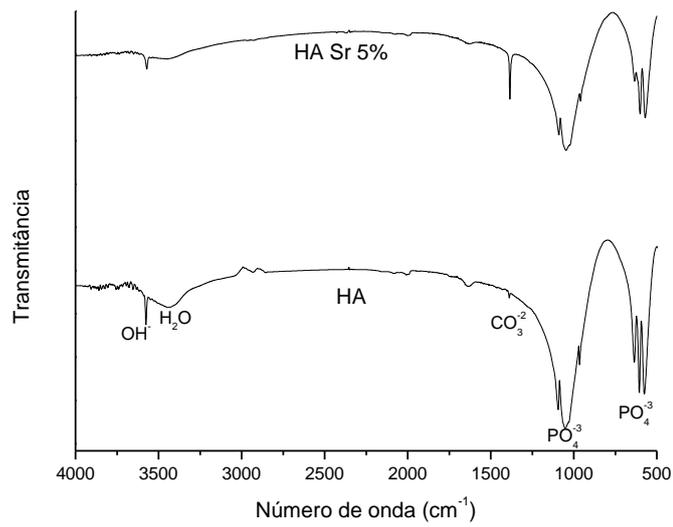


Figura 5.2 – Espectroscopia no infravermelho das amostras de CaP pura e substituída com estrôncio.

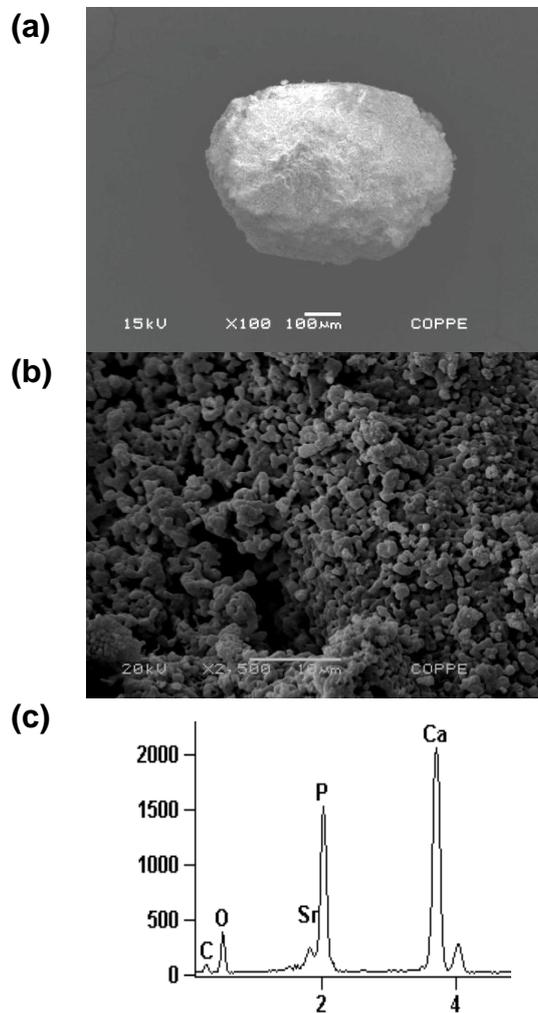


Figura 5.3 – Micrografias das superfícies dos grânulos de CaP-Sr (a e b) e EDS (c) após sinterização a 1150°C.

As Figuras 5.4 e 5.5 mostram os ajustes por Rietveld dos padrões de difração das amostras de fosfato de cálcio sem e com Sr^{2+} . Os parâmetros de rede obtidos pelo refinamento de Rietveld são mostrados na Tabela 5.2 e tabela 5.3. Observa-se um aumento linear dos parâmetros da célula unitária $a=b$ e c e do volume da célula unitária com o aumento da concentração de Sr^{2+} na CaP. Este comportamento indica que o Sr^{2+} , com maior raio iônico ($r = 0.112 \text{ nm}$), substitui o Ca^{2+} ($r = 0.099 \text{ nm}$) nos sítios (I) e (II). A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes para as hidroxiapatitas que contêm impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser modificadas dependendo do sítio ocupado pelo cátion da impureza. Ainda foi observada uma preferência pela ocupação do sítio II (Dourado, 2008). Estudos realizados com substituição do Ba^{2+} ($r = 0.134 \text{ nm}$) e do Pb^{2+} ($r = 0.120 \text{ nm}$) pelo Ca^{2+} mostraram o mesmo efeito da expansão dos parâmetros de rede (MOONEY, 1961), (MOHSENIKOUTCHESFEHANI, 1961), (LEGEROS, 1980). No entanto, a substituição por Cd^{2+} ($r = 0.097 \text{ nm}$) e do Mn^{2+} ($r = 0.080 \text{ nm}$) que possuem raio iônico menor que o cálcio, reduzem os parâmetros de rede da HA (MACCONNEL, 1963), (NOUNAH, 1997).

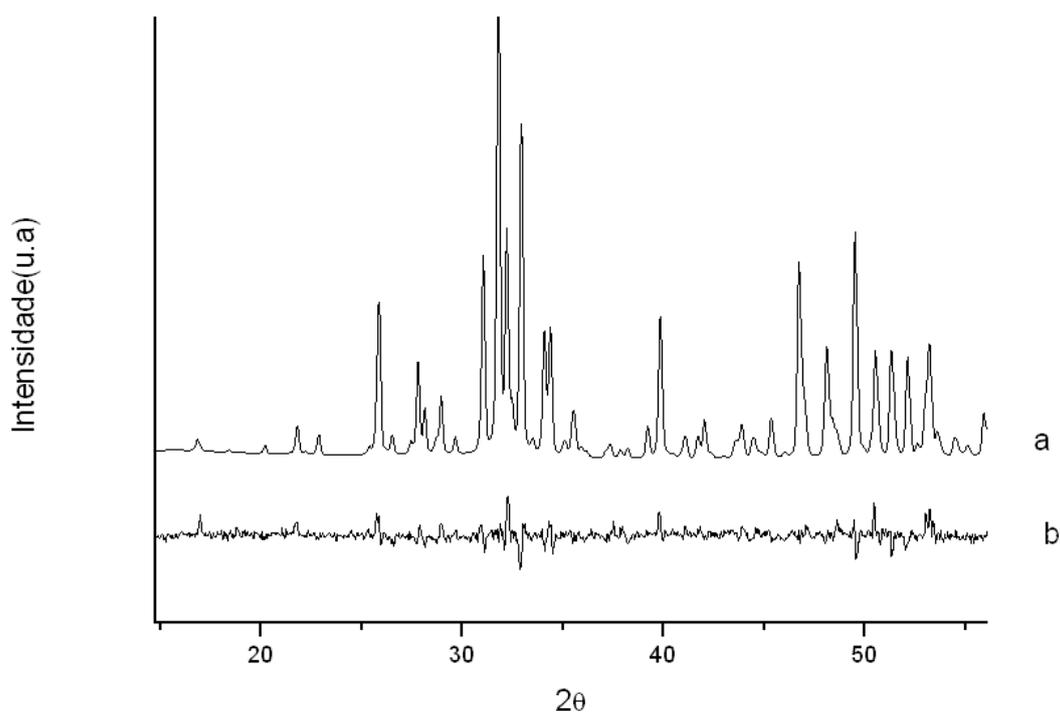


Figura 5.4: Diagrama de Rietveld da CaP ; (a) - o perfil calculado; (b)– as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado). $R_B = 4,45$ e $S = 1,22$.

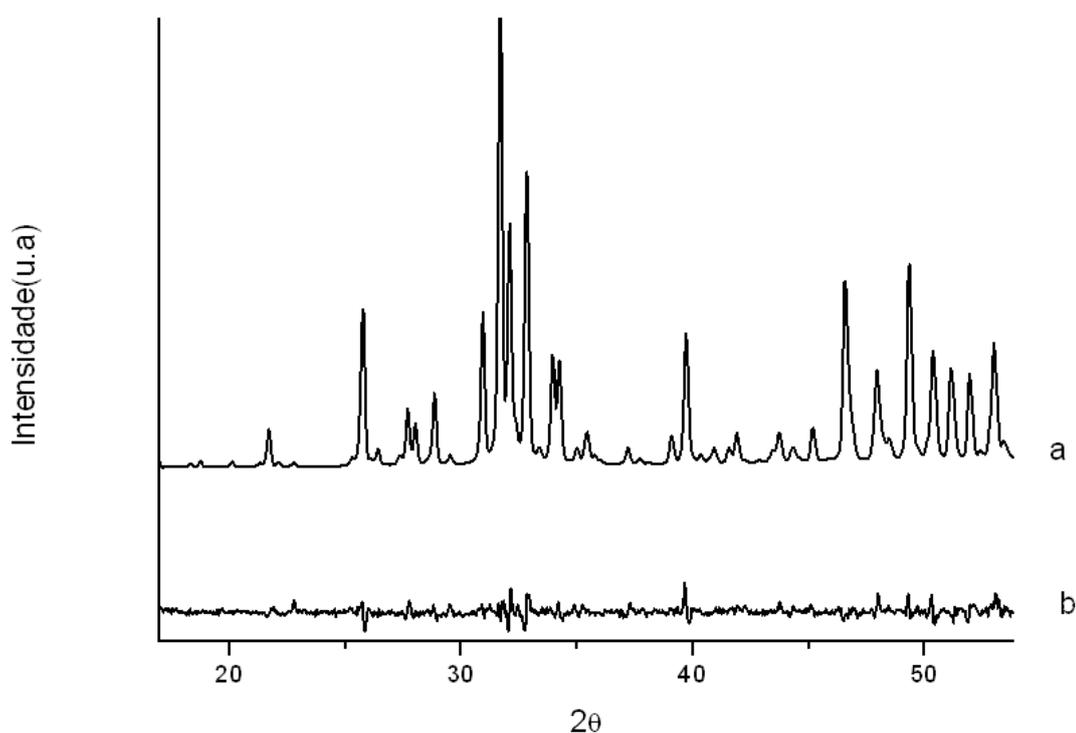


Figura 5.5: Diagrama de Rietveld do CaP-Sr; (a)- o perfil calculado; (b) – as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado). $R_B = 4,43$ e $S = 1,6$.

Tabela 5.2: Parâmetros de rede das amostras de CaP e CaP- 5%Sr.

Cerâmica	Parâmetro a (10^{-1} nm)	Parâmetro b (10^{-1} nm)	Volume(nm)
CaP	9,417142	6,88181300	52,8532548
CaP-Sr	9,443081	6,90495900	53,32356

Tabela 5.3: Distribuição do Sr^{2+} nos sítios do Ca^{2+} :

Amostra	Ocupação do Sr^{2+} no sítio Ca(I)	Ocupação do Sr^{2+} no sítio Ca(II)	% Sr^{2+} no sítio Ca(I)	% Sr^{2+} no sítio Ca(II)
CaP-5%	0,0075	0,03188	1,518	6,376

5.2 Estudo de degradação *in vitro*

Numa primeira fase a maioria dos estudos *in vitro* são realizados em soluções inorgânicas preparadas com concentrações iônicas próximas a do plasma humano. Vários autores estabeleceram que a formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície de um material imerso num fluido inorgânico acelular é um indicador decisivo da sua bioatividade, uma vez que os materiais bioativos se ligam ao osso *in vivo* através de uma camada semelhante (LI et al.,1993; SANTOS et al., 1995)

Os testes de degradação dos grânulos de CaP e CaP-Sr- visam um melhor entendimento do comportamento de dissolução e transformação de superfície destas cerâmicas quando em contato com os meios utilizados para o presente estudo, sendo eles solução de Ringer-Lactato e de acetato de potássio (pH5). Os ensaios estáticos e dinâmicos foram realizados em diferentes tempos, 7, 24, 72 e 168 horas.

A dosagem de cálcio nos meios apresentou resultados insatisfatórios para se fazer uma comparação entre os dados obtidos a partir dos testes estáticos com aqueles obtidos dos dinâmicos. Este inconveniente pode ser devido aos diferentes materiais de recolhimento dos meios, visto que o teste estático era realizado em um material polimérico, ou seja, em um tubo de Falcon, enquanto que para a condição dinâmica, o meio era recolhido em erlrmeyer de vidro. Acredita-se que pela bioatividade do vidro, uma certa quantidade íons de cálcio precipitavam no mesmo antes da dosagem. Resultados diferentes também foram encontrados por Marques (2003) se realizar ensaios em recipientes diferentes, sendo identificado que a cinética da mineralização era influenciada pelo tipo de recipiente. Desta forma, optou-se por correlacionar os resultados de dosagem iônica em função da diferença química dos grânulos.

5.2.1-Ensaio dinâmico

5.2.1-1 Imersão em solução Ringer Lactato

A degradação dos biomateriais envolve um processo de dissolução da amostra e concomitantemente de precipitação dos íons liberados e/ou presentes na solução. Observa-se que a imersão na solução de Ringer Lactato dos grânulos tanto de CaP quanto de CaP-Sr em apenas 7 horas proporciona uma transformação das superfícies cerâmicas, Figuras 5.6 e 5.7, respectivamente. A superfície da CaP-Sr após imersão sob condição dinâmica, Figura 5.7 b, apresenta uma camada de precipitados aparentemente maior quando comparada com a superfície da CaP, Figura 5.6 b.

A introdução de Sr na estrutura da apatita possivelmente levou ao aumento da solubilidade em relação à HA. Sendo assim, uma maior liberação iônica na solução favoreceu ao aumento da concentração iônica próxima à superfície favorecendo a precipitação. Desta forma, acredita-se que o Sr tem papel fundamental no processo de degradação destas biocerâmicas, influenciando positivamente na bioatividade.

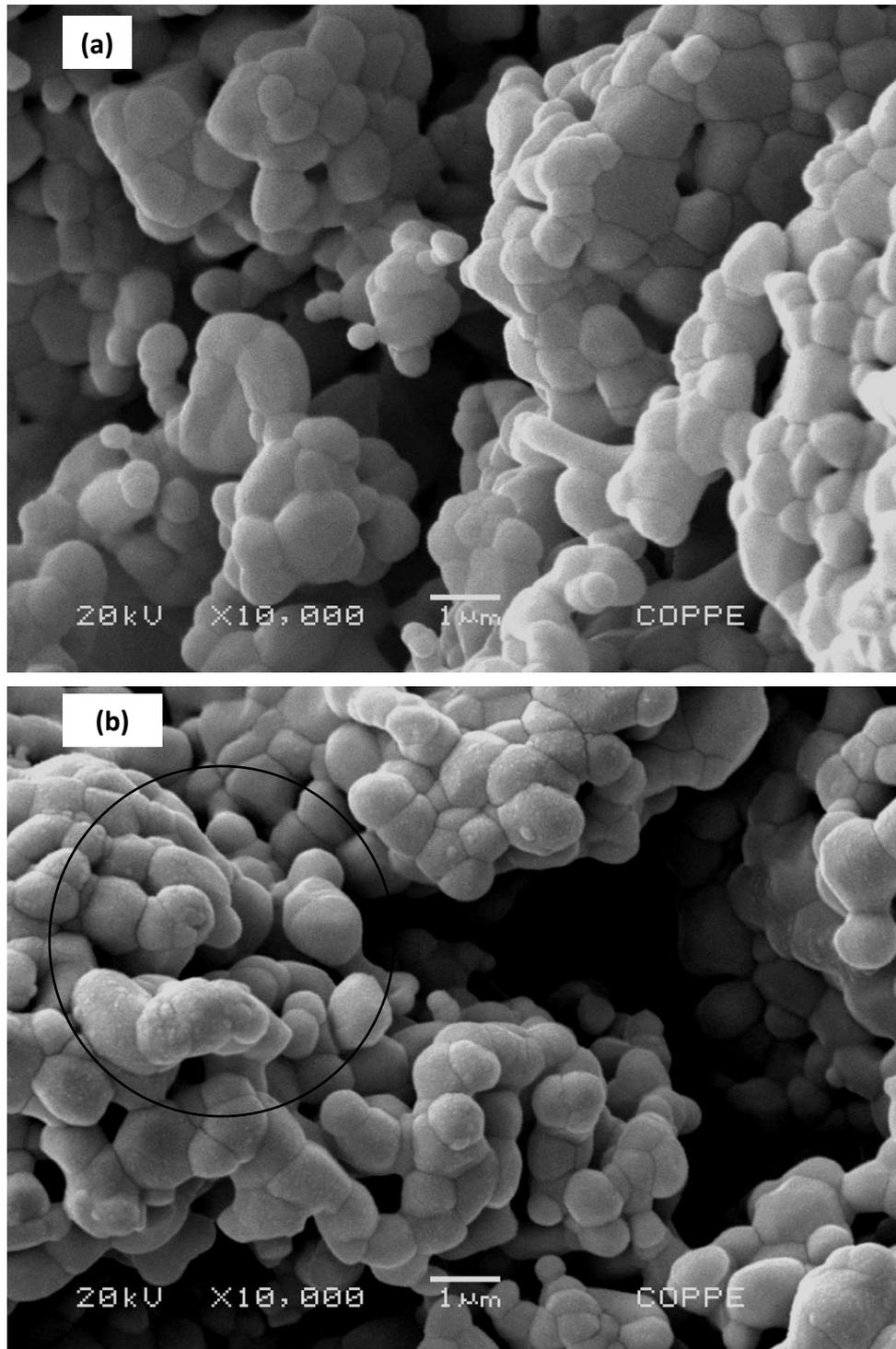


Figura 5.6 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição dinâmica.

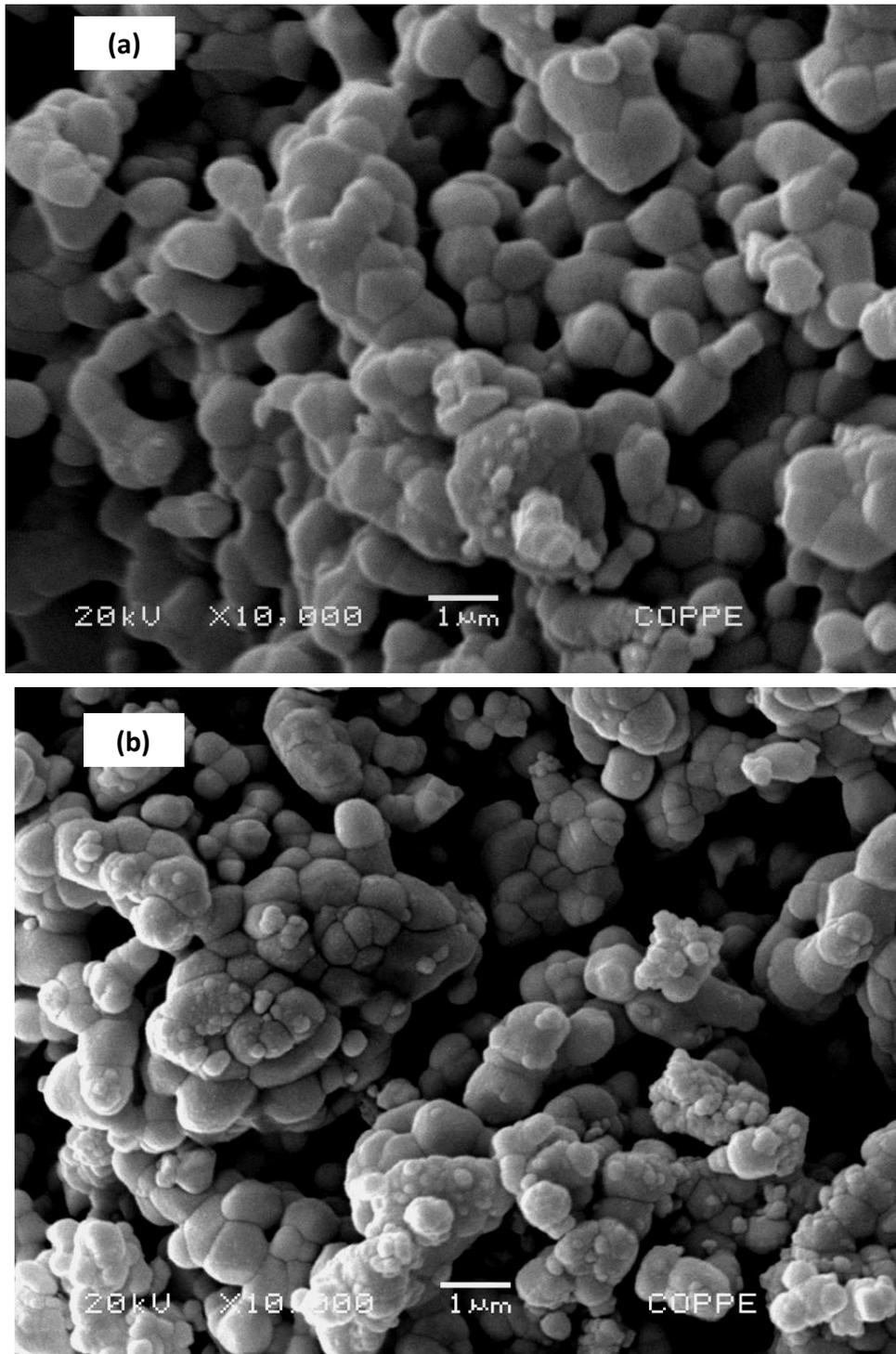


Figura 5.7 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição dinâmica.

As Figuras 5.8 apresenta a variação da concentração de cálcio solução de Ringer Lactato em para CaP (a) e CaP-Sr (b), respectivamente, em função do tempo de imersão sob condição dinâmica.

Nas primeiras 72 horas os resultados encontrados não são significativos, contudo após este tempo ocorre um aumento da concentração, Isto sugere um processo de dissolução e re-precipitação, no qual prevalece um equilíbrio já que concentração retorna aproximadamente a concentração inicial da solução. Ao contrário, para amostra de CaP-Sr há um aumento inicial da concentração nas primeiras 24 horas, sugerindo um processo de dissolução. Em seguida, parece haver um equilíbrio no processo dissolução-precipitação, porém a partir de 72 horas parecer haver predominância do processo de dissolução, possivelmente pela presença do estrôncio.

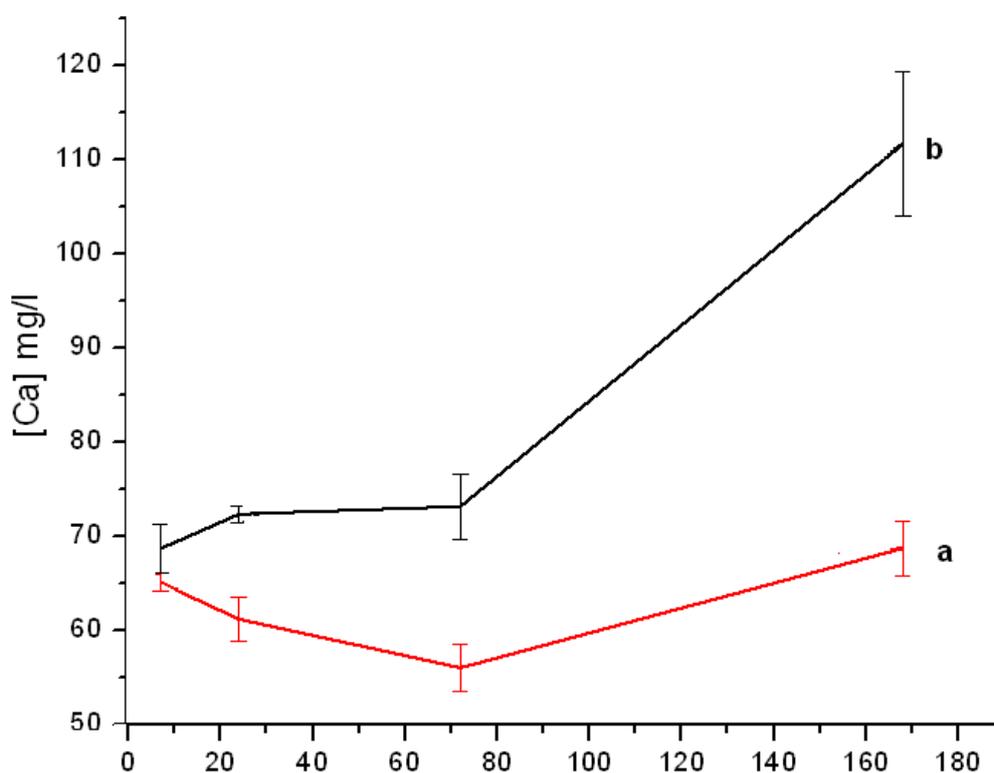


Figura 5.8: Concentração de cálcio sob condições dinâmicas para (a) CaP e (b) CaP-Sr em Solução Ringer-Lactato.

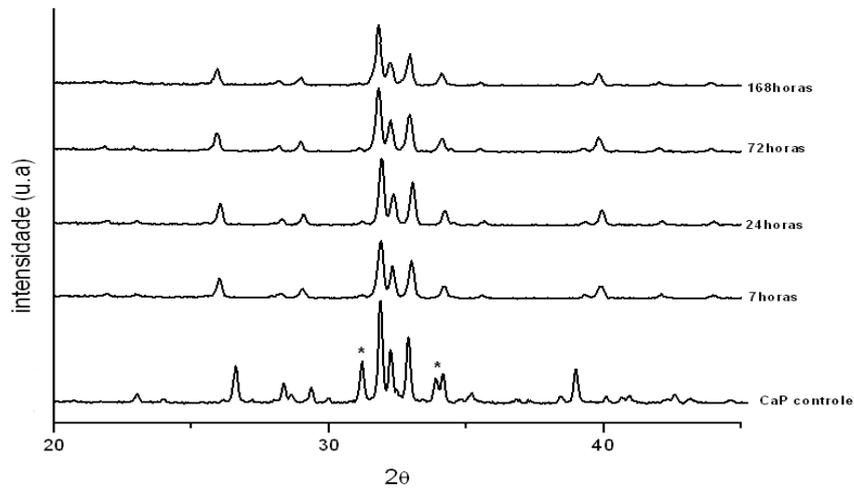


Figura 5.9: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Ringer Lactato em meio dinâmico.

A análise por DRX dos grânulos após diferentes tempos de imersão não detectou a presença de qualquer fase adicional. Entretanto foi possível presenciar diminuição da intensidade dos picos de β -TCP ao longo do tempo, até ao seu desaparecimento. Esta observação permitiu detectar o tempo para o qual esta fase começa a se dissolver, que neste caso ocorreu a partir de 7 horas, demonstrado na figura 5.10.

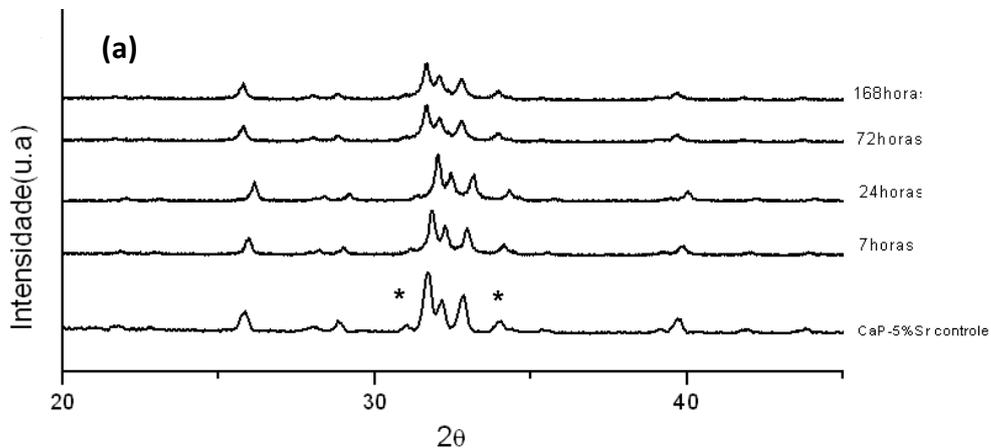
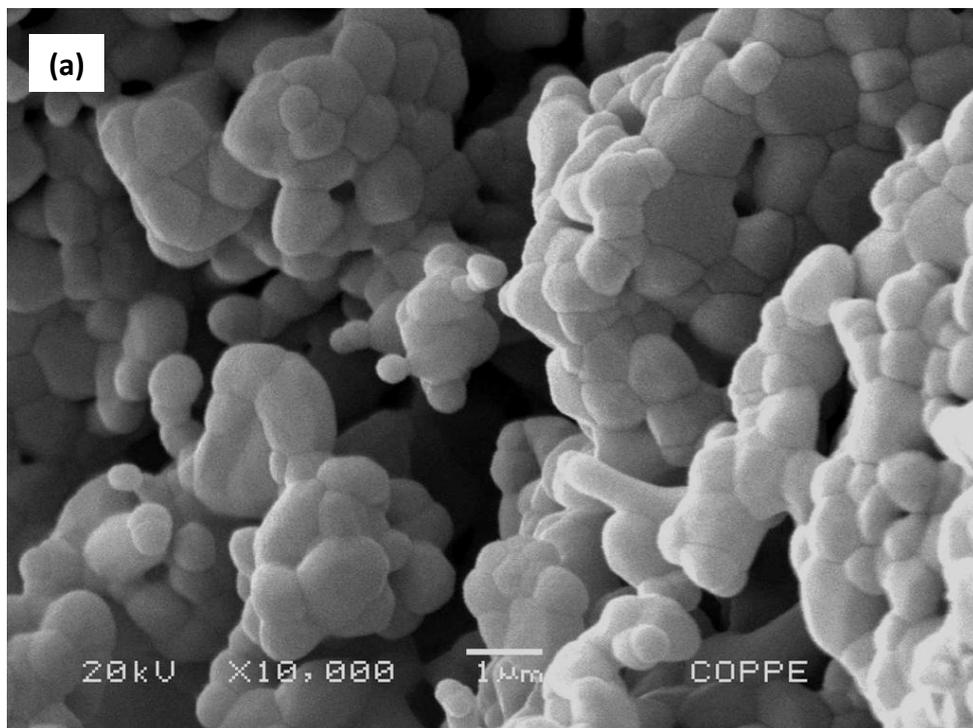


Figura 5.10: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP-5%Sr, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Ringer Lactato em meio (a) dinâmico.

5.2.1-2 Imersão em solução de acetato de potássio (pH5)

As figuras 5.11 e 5.12 apresentam, respectivamente, micrografias de CaP e CaP-5%Sr antes e após imersão em solução de Acetato de Potássio sob condição dinâmica. Observa-se que em ambas as figuras 5.15b e 5.16b a formação de precipitado, sugerindo uma precipitação maior em CaP-Sr.

A figura 5.13 apresenta micrografias de CaP-Sr após 168 horas, sugerindo que em ambos os meios dinâmico houve um processo de re-precipitação, não sendo mais observado a presença de precipitados.



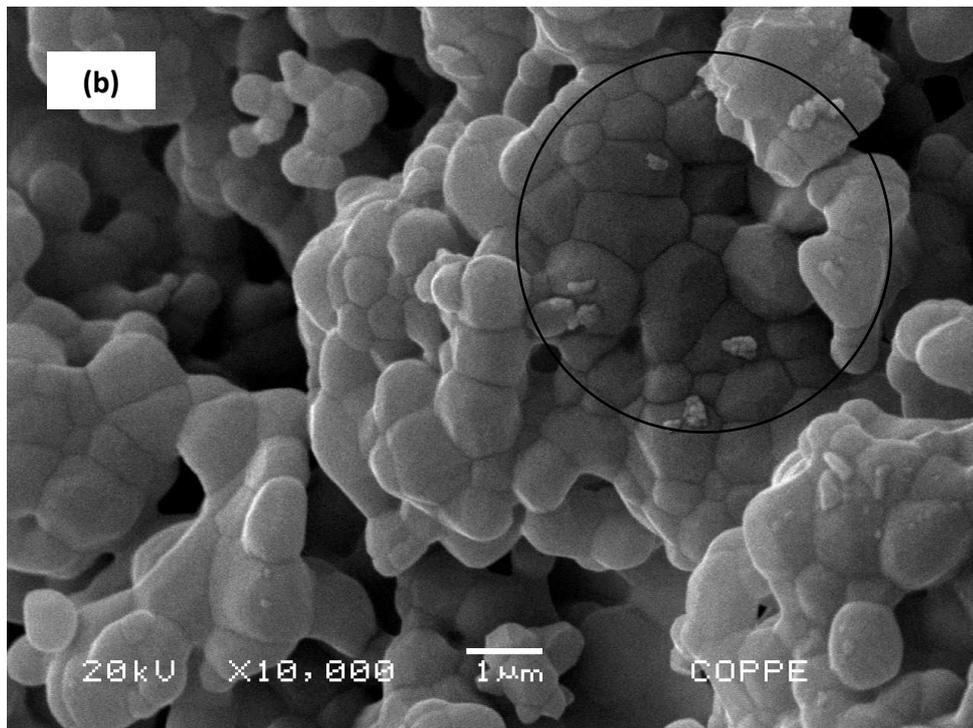
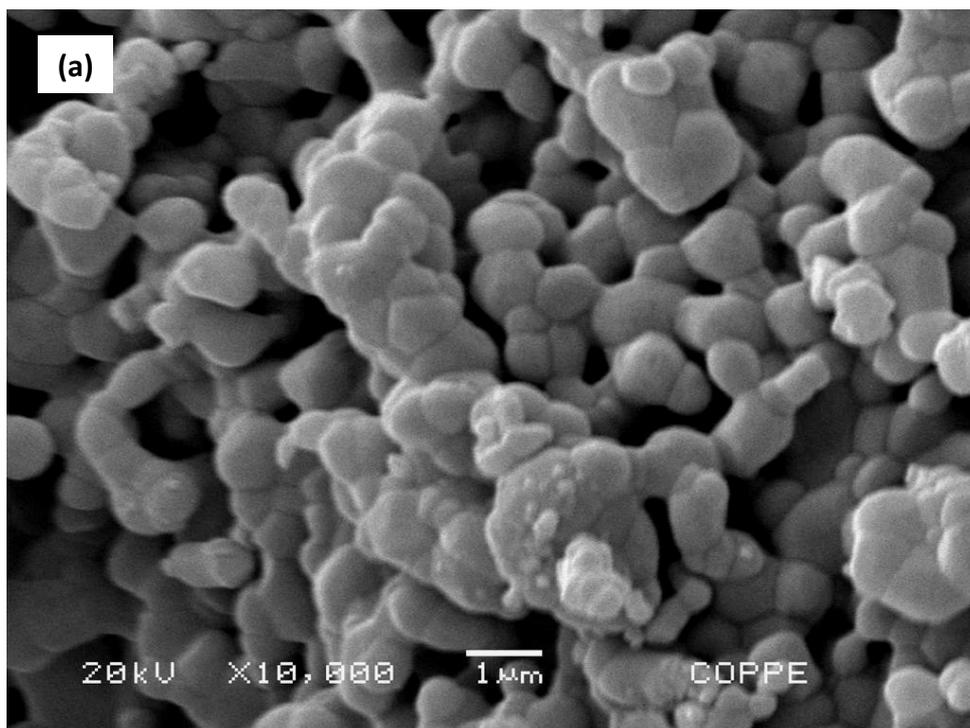


Figura 5.11 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição dinâmica



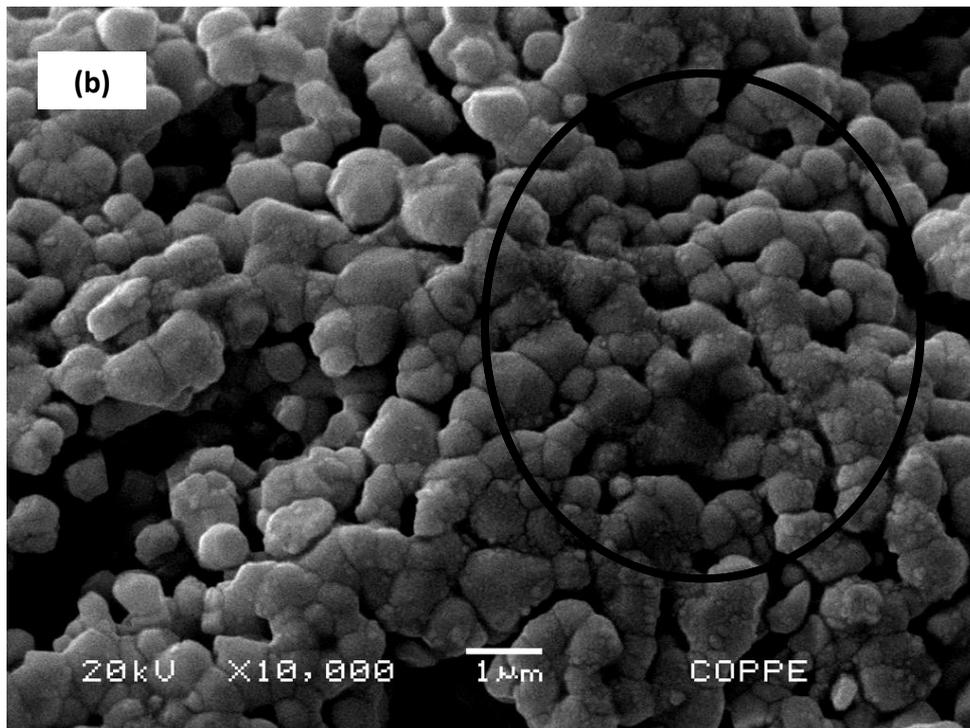


Figura 5.12 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição dinâmica.

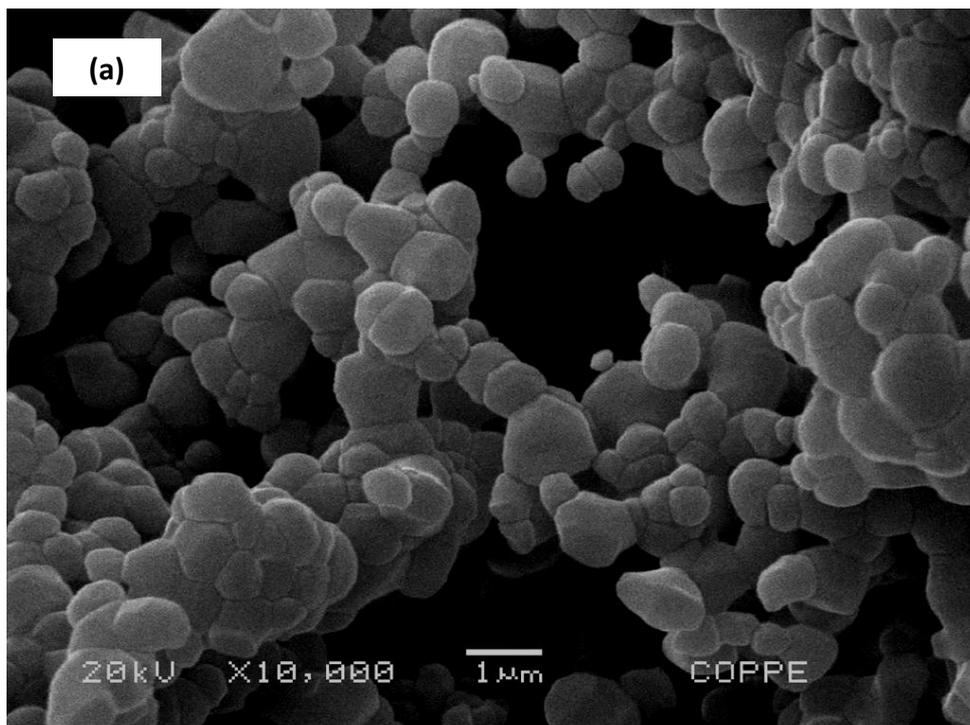


Figura 5.13 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos na solução Acetato por 7 dias sob condições (a) dinâmica.

A Figura 5.14 apresentam a variação da concentração de cálcio em Acetato de Potássio para CaP e CaP-Sr, respectivamente, em função do tempo de imersão sob condição dinâmica.

Observou-se um aumento na concentração de cálcio nas primeiras horas justificando a existência de um constante processo de dissolução nas primeiras 24 horas. Pelo contrário após este tempo ocorre uma diminuição e, em seguida, a concentração atinge um patamar em 76 horas. Isto sugere um processo de dissolução e re-precipitação, no qual prevalece a dissolução, compatível com o baixo pH da solução de acetato. Comportamento semelhante foi observado por Monteiro et al (2003) com uma máxima concentração do cálcio, após 1 hora de imersão de grânulos de fosfatos de cálcio em fluido corporal simulado (SBF). No entanto a precipitação é prorrogada devido ao pH e a quantidade de cálcio na solução de SBF.

No entanto, Silva e colaboradores (2010) não encontraram diferenças na concentração de cálcio quando amostras de hidroxiapatitas foram imersas em meio de McCoy não completo ou médio completo (adicionado com 10% de soro fetal bovino), sob condições dinâmicas. Conseqüentemente, a escolha da solução é um papel importante para compreender a transformação *in vitro* na superfície da biocerâmica. Variações de pH, teor de Ca e a presença de proteínas no meio parecem ser relevantes para a biodegradabilidade desses materiais. Soon-Ho Kwon e colaboradores (2003) ao estudar a dissolução de HA/ β -TCP e β -TCP em solução de Ringer observaram que a concentração de cálcio aumenta inicialmente e depois da primeira 24 horas estabiliza para HA e para o composto bifásico HA/TCP a concentração de cálcio aumento de acordo com o passar do tempo, sendo um resultado intermediário entre a dissolução do TCP e da HA. A liberação mais intensa no sistema estático deve estar relacionado à baixa velocidade do fluxo no sistema dinâmico.

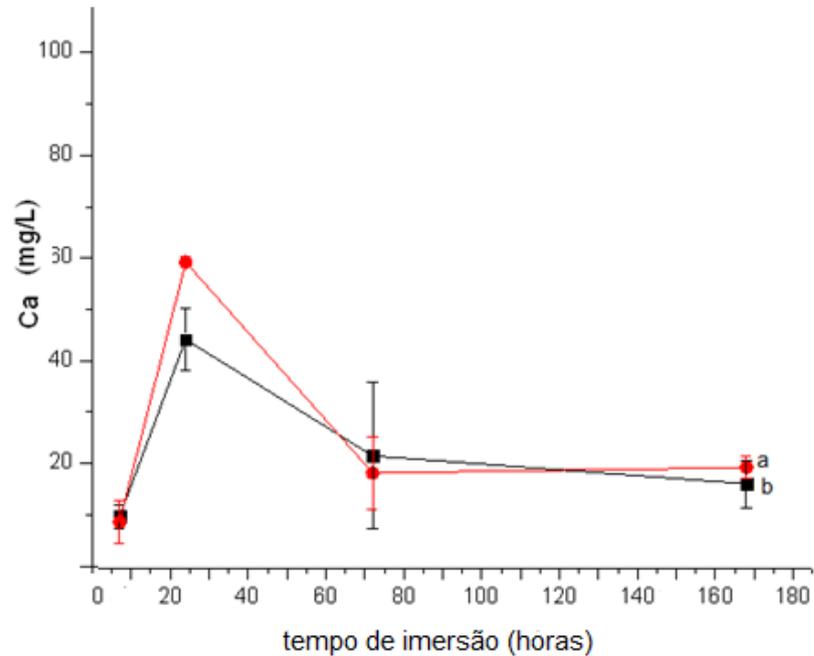


Figura 5.14: Concentração de cálcio sob condições dinâmicas para (a) CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio.

A deficiência de cálcio produzido CaP-Sr é responsável pela formação de nova fase, além da hidroxiapatita, durante o processo de sinterização. Por difração de raios X, 2 novas fases foram identificadas: hidroxiapatita (~76%) e β -fosfato tricálcico tipo (~24%), cartão de 9-432 e 9-169 cartão, respectivamente. As figuras 5.15 e figuras 5.16 mostram o difratograma de grânulos de CaP e CaP-5% Sr antes e após imersão em condição dinâmica para tempos variando de 7 a 168 horas. Não foi identificada nenhuma fase referente ao Sr, sugerindo que todo o estrôncio está na solução sólida. Após exposição à solução de pH baixo, os picos relacionados com o β -TCP desaparecem completamente a partir de 7 horas semelhantemente a solução de ringier, contudo esta fase desaparece provavelmente devido ao baixo pH.

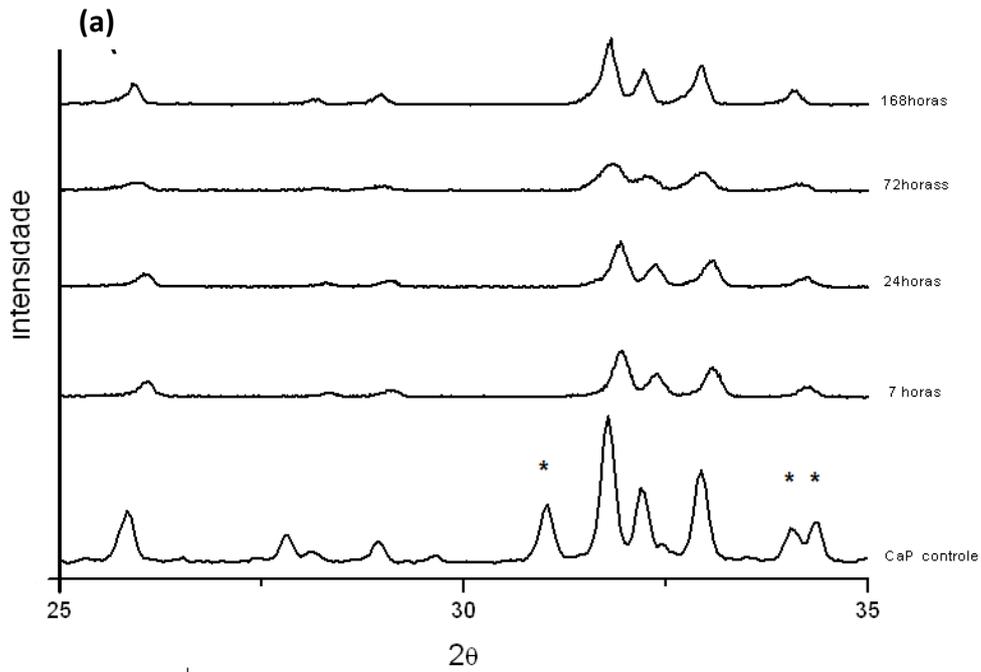


Figura 5.15: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Acetato de Potássio em meio (a) dinâmico.

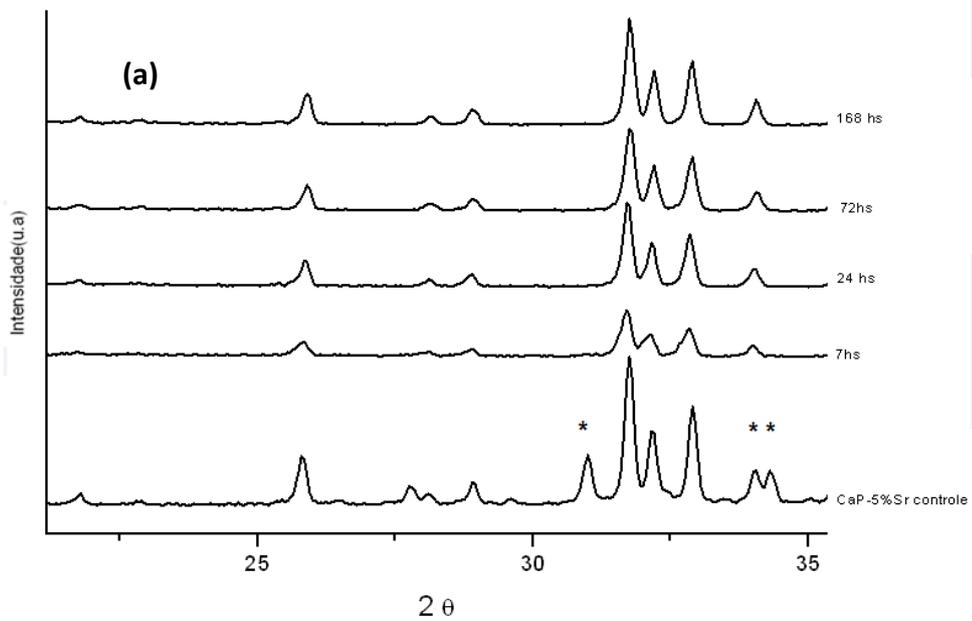


Figura 5.16: Difratoograma de Raios X do grânulo de CaP-5%Sr, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Acetato de Potássio em meio (a) dinâmico.

Através da análise no infra-vermelho por transformada de Fourier foi possível identificar as bandas de vibração dos grupamentos químicos presentes constantemente nas hidroxiapatitas baseadas em fosfatos de cálcio. Os grupamentos químicos de carbonato (1086) e fosfatos (1021) foram encontrados em todas as condições o que confirma nossos resultados que se refere realmente a um material a base de hidroxiapatita originada de dos fosfatos de cálcio.

Desta maneira, na figura 5.17, partindo-se dos grânulos de CaP-Sr e dos tempos experimentais subseqüentes fica evidente que as bandas de fosfato e carbonato aparecem no espectro. Interessante é que conforme o experimento parte dos grânulos *in natura* sinterizados a 1150°C, sendo amostras secas e a medida em que entram em contato com a solução de acetato nos tempos experimentais maiores houve uma evidência maior do aparecimento de água no espectro sugerindo que pode ter havido a formação de uma camada de solvatação e com isso a sugestão de formação de precipitados que foram observados no MEV.

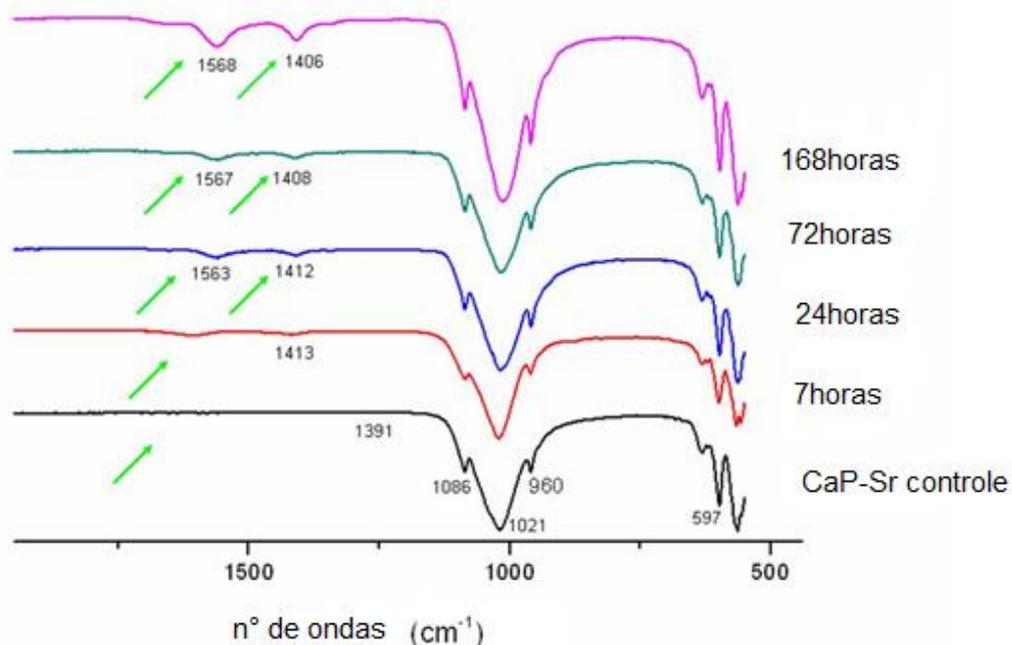


Figura 5.17': Espectros de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR) obtidos dos ensaios dinâmico em Biorreator em solução de acetato

5.3.1-Ensaio estático

5.3.1-1 Imersão em solução Ringer Lactato

Nas primeiras horas não foi observado mudança significativa através das imagens obtidas por MEV na condição estática, como mostrado na figura 5.18. Enquanto que na figura 5.19 existe uma imagem sugestiva de um possível início de processo de precipitação representado pelo círculo.

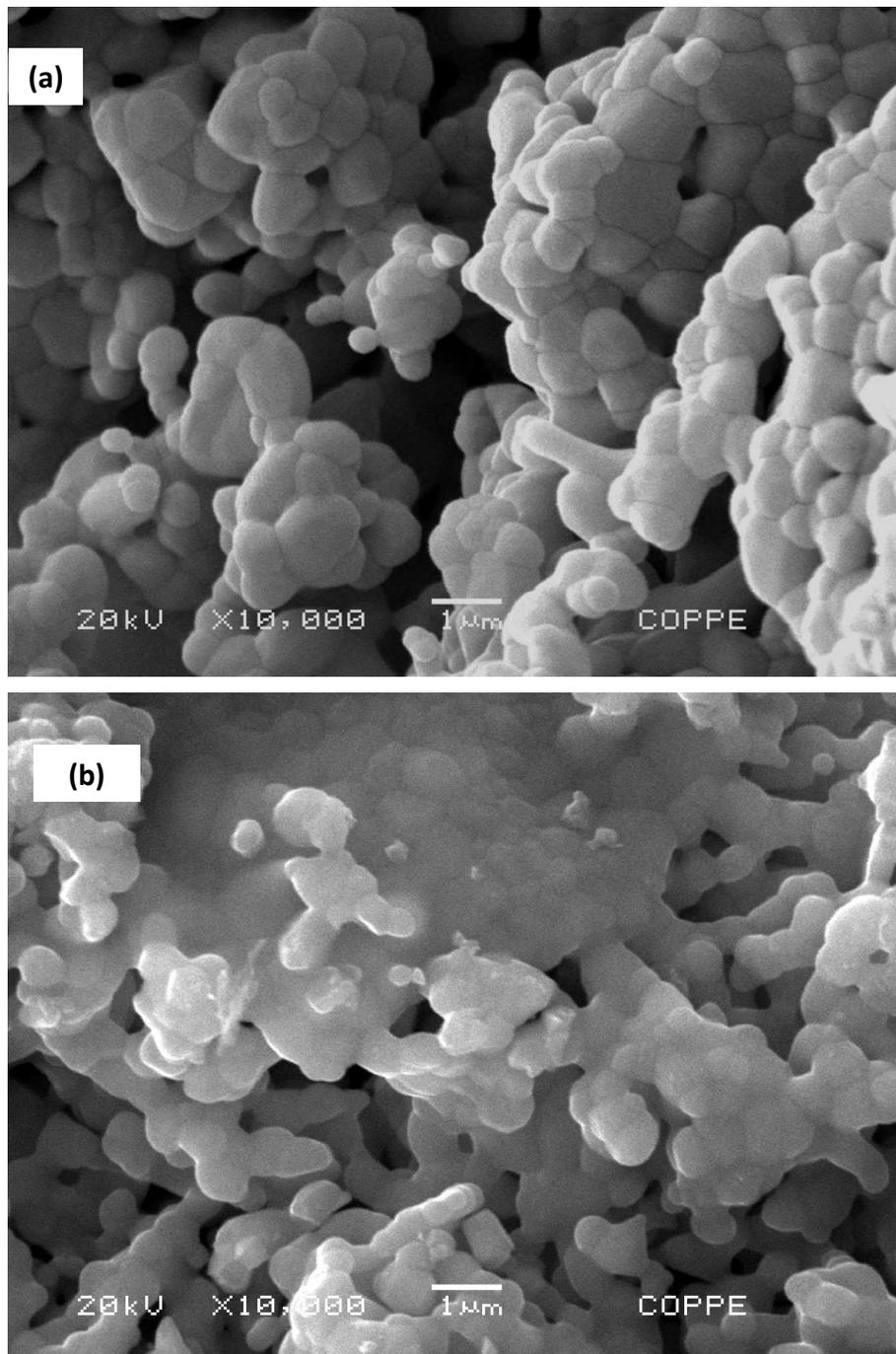


Figura 5.18 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e (b) após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição estática.

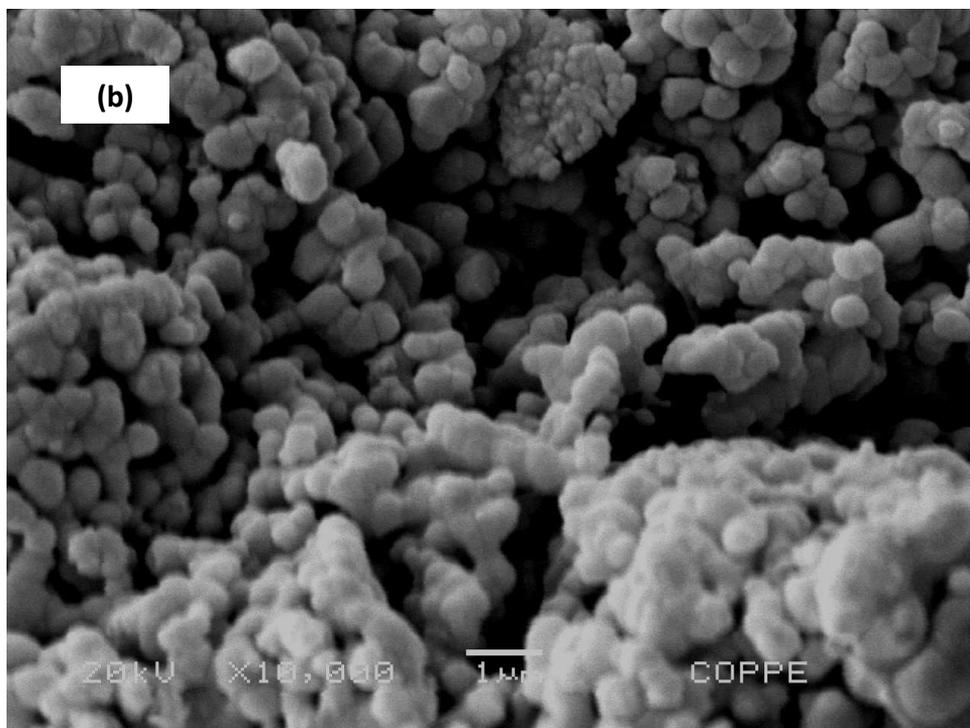
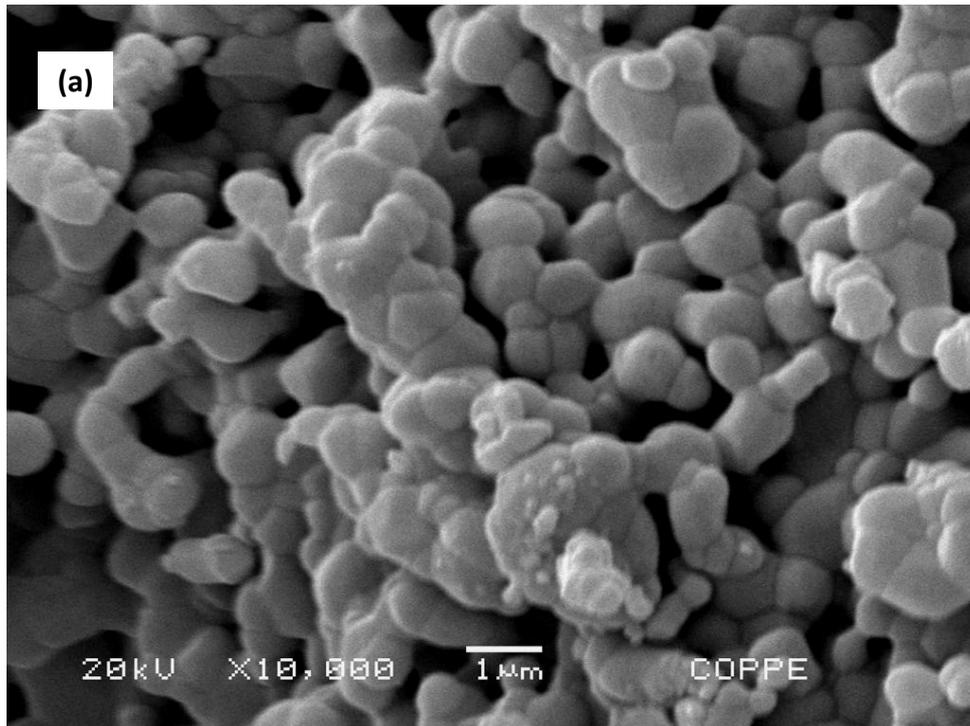


Figura 5.19 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Ringer-Lactato por 7 horas sob condição estática.

A análise por DRX dos grânulos após diferentes tempos de imersão em meio estático conforme o meio dinâmico não detectou a presença de qualquer fase adicional. Sendo possível também presenciar diminuição da intensidade dos picos de β -TCP ao longo do tempo, até ao seu desaparecimento. Esta observação permitiu detectar o tempo para o qual esta fase começa a se dissolver, que neste caso ocorreu a partir de 7 horas, demonstrado na figura 5.10. Esta semelhança entre os resultados sugere que a velocidade utilizada no biorreator pode ser muito baixa, tendendo a estática.

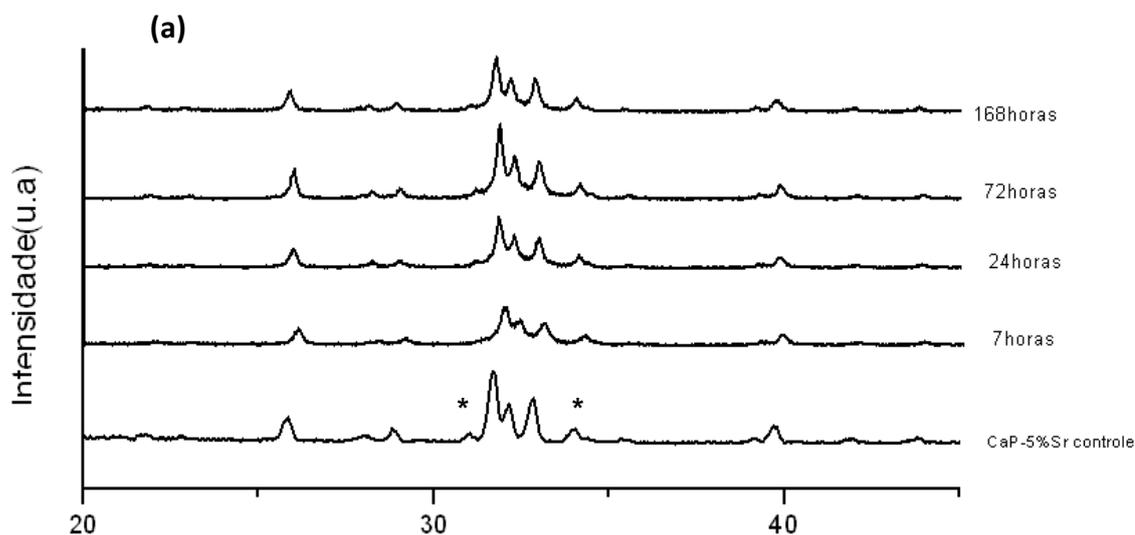


Figura 5.20: Difratograma de Raios X do grânulo de CaP-5%Sr, β -TCP fase (*) após diferentes tempos de imersão em Solução de Ringer Lactato em meio (a) estático

5.3.1-2 Imersão em solução de acetato de potássio (pH5)

As superfícies de CaP e CaP-Sr apresentam morfologia características do processo de precipitação/dissolução, contudo nota-se que não houve um significativo processo, não se observando mudanças na morfologia nas primeiras 7 horas para amostras imersas sob condição dinâmica, provavelmente devido à constante renovação do fluido. Ressalta-se a formação de precipitados em forma de flores sobre superfícies de SiHA sob condição dinâmica após 1 e 3 dias de imersão, Figura V.13. Acredita-se que esse fato seja ligado aos íons de Si dissolvidos no meio de cultura, no entanto não foram encontrados dados na literatura que relatasse tal morfologia de precipitados.

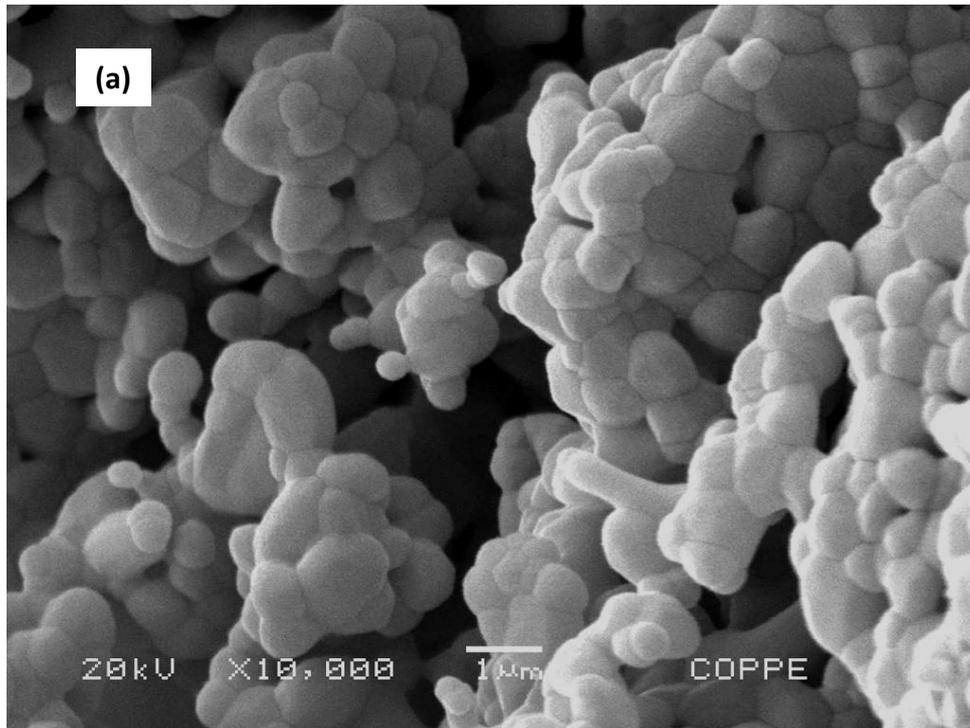


Figura 5.21 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição estática.

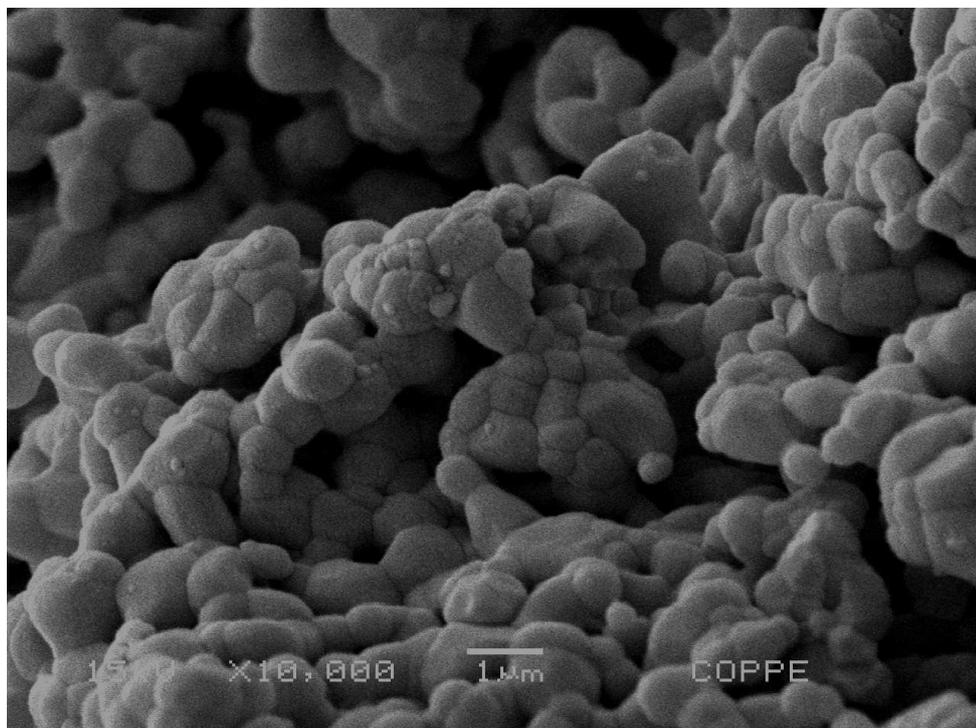
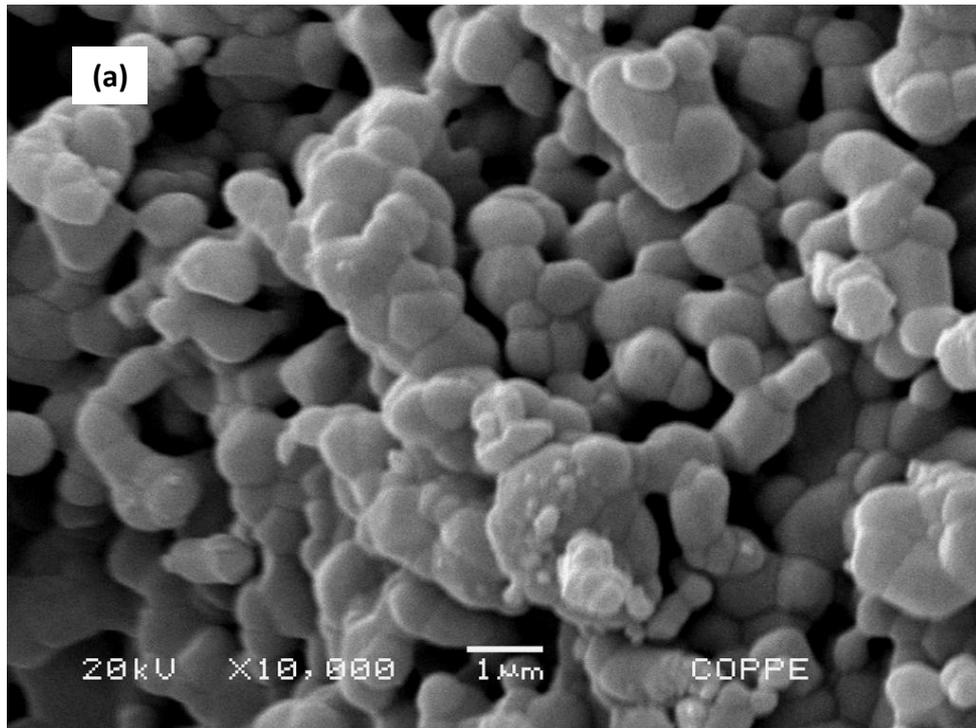


Figura 5.22 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr antes (a) e após imersão em Acetato por 7 horas sob condição estática.



Figura 5.23 – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos na solução Acetato por 7 dias sob condições (a) estática

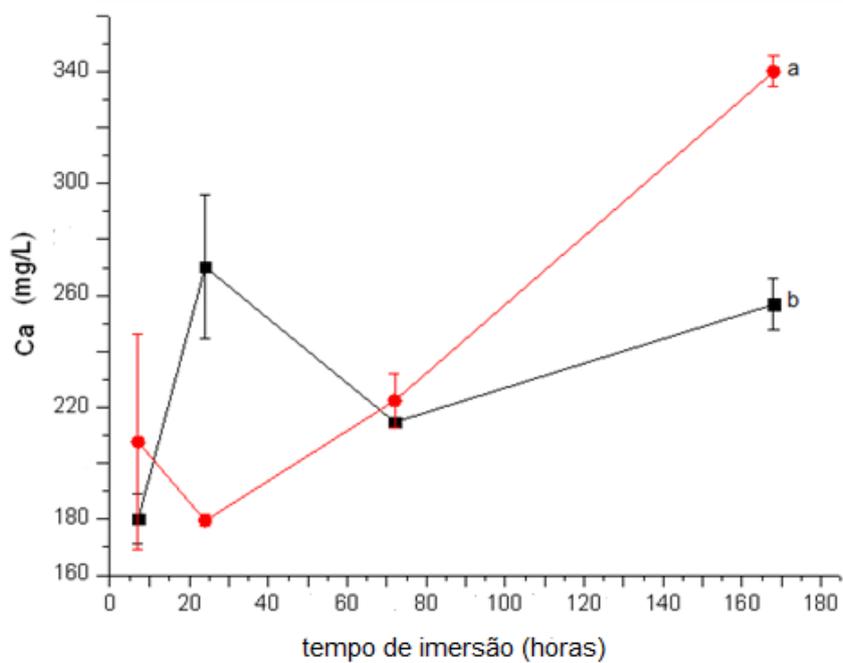


Figura 5.24: Concentração de cálcio sob condição estática para (a)CaP e (b) CaP-Sr em Solução Acetato de Potássio

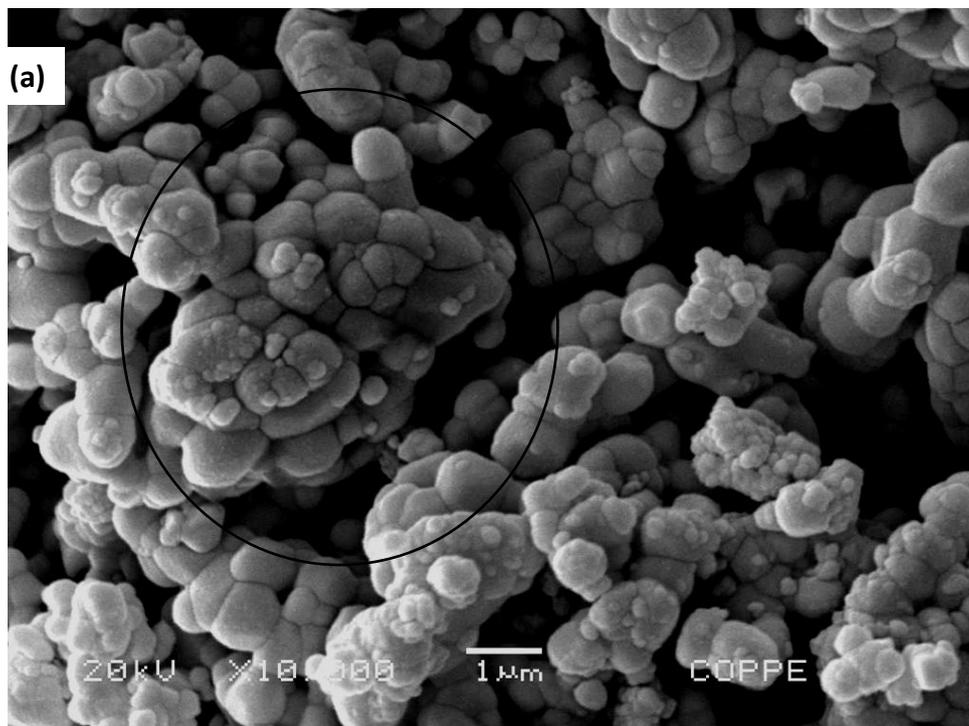
5.4 Estudo das soluções utilizadas

Os mecanismos de formação de uma camada de fosfatos de cálcio entre o implante bioativo e o tecido ósseo têm sido objeto de estudo. Dois modelos complementares e não antagônicos, são atualmente propostos: o primeiro leva em consideração a solubilidade dos fosfatos de cálcio e sua semelhança estrutural com o osso mineral. A solubilidade pode levar a alterações microestruturais na superfície do implante e a semelhança das redes cristalinas proporcionar crescimento epitaxial. O crescimento epitaxial é um processo controlado termodinamicamente, no qual os cristais hospedeiros (neste caso, os cristais do osso) utilizam uma superfície cristalina, o substrato, (por exemplo, a hidroxiapatita) como local de nucleação e padrão para a deposição e crescimento da sua própria fase. Os cristais hospedeiros crescem em orientações cristalográficas bem definidas, embora possam aparecer conjuntos de cristalitos com orientações cristalográficas diferentes. Quando o cristal hospedeiro e o substrato pertencem ao mesmo material, o cristal hospedeiro é uma continuação exata da rede cristalina do substrato. Deste modo, dissolução, reprecipitação e epitaxia serão processos favoráveis ao estabelecimento de uma ligação cerâmico – implante. Contudo nas situações *in vivo* os implantes estão sujeitos a condições biológicas muito complexas e neste caso, o papel da epitaxia não é fácil de definir. (MANN, 1989; BAGAMBISA, 1993)

Por outro lado, o outro modelo deriva-se de uma sequência de eventos iniciada por uma descida de pH produzida imediatamente após implantação e resultante de um processo inflamatório. As condições ácidas favorecem a dissolução parcial da cerâmica de fosfato de cálcio provocando uma sobressaturação local. Esta sobressaturação acompanhada de uma posterior reposição do pH do meio, origina a formação de uma camada de apatite carbonatada. A composição desta camada, a cinética da sua formação e posterior amadurecimento será dependente da solubilidade da cerâmica e da composição dos fluidos utilizados. (LEGEROS, 1991; DHERT *et al*, 1998; SHI *et al*, 2002)

Os testes de degradação dos grânulos de CaP-Sr visam um melhor entendimento do comportamento de dissolução e transformação de superfície destas cerâmicas quando em contato com meio, para isso foram selecionadas duas soluções. Uma, solução de Ringer-Lactato, procurando mimetizar situação fisiológica normal já que sua concentração iônica é muito semelhante a do plasma sanguíneo; Outra, solução de Acetato de potássio, que dado ao baixo pH simula a atuação dos osteoclastos, no processo de reabsorção óssea.

A figura 5.19 faz uma comparação entre as superfícies de CaP-Sr em ambas as soluções estudadas, sugerindo que na fig 5.19(a) há uma maior formação da camada de precipitado possivelmente devido à constante renovação do fluido rico em íons cálcio e fósforo enquanto que na fig 5.19(b), sendo uma solução ácida, não havendo esta renovação constante ocorre uma menor formação de precipitado. Pois o baixo valor pH da solução de acetato, o qual tem dependência elevada em relação a sobressaturação, resultando na diminuição da tendência da solução para a precipitação de HA. Os autores afirmam que ambos os efeitos atuam no mesmo sentido, como por exemplo no aumento da intensidade de lixiviação. Contudo este fenômeno pode traduzir-se na diminuição da possibilidade de cristalização de HA, havendo deste modo um aumento da concentração total de íons cálcio e fosfato em solução (MARQUES, 2003).



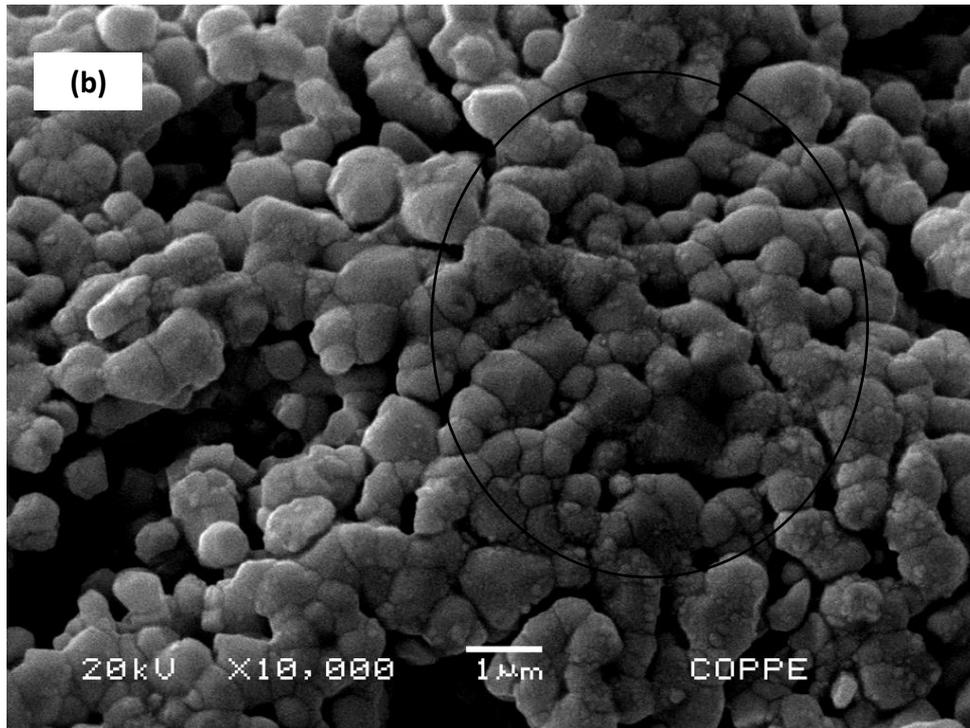


Figura 5.25: – Microscopia das superfícies dos grânulos de CaP-Sr imersos em soluções (a) Ringer Lactato e (b) Acetato de potássio por 7 horas sob condição dinâmica.

6 CONCLUSÕES

i) O fosfato de cálcio sintetizado teve razão (Ca+Sr)/P da ordem de 1,45 para CaP-Sr e 1,48 para CaP, sendo esses valores próximos ao valor teórico (1,5). Obteve-se 4,3 moles % de Sr em substituição aos íons cálcio.

ii) A deficiência em cálcio das apatitas produzidas é responsável pela formação de novas fases, além da HA, nos grânulos sinterizados. Pela análise de DRX, picos característicos de HA e de β -TCP estão presentes em ambos os materiais produzidos, na ordem aproximada de 76% de HA e 24% de β -TCP para CaP-Sr e 73% HA e 27% β -TCP para CaP sem estrôncio. Resultados de EDS confirmaram a presença do Sr, provavelmente, em solução sólida na hidroxiapatita

iii) A introdução de Sr na estrutura da apatita possivelmente levou ao aumento da solubilidade em relação à HA. Sendo assim, uma maior liberação iônica na solução favoreceu ao aumento da concentração iônica próxima à superfície resultando numa maior precipitação de fases contendo Ca e P na superfície dos grânulos.

iv) Para ambas as amostras (CaP e CaP-Sr) ocorreu uma menor precipitação em solução de acetato de potássio em relação ao Ringer-Lactato, isto porque o baixo valor pH da solução de acetato resulta na diminuição da tendência da solução para a precipitação de hidroxiapatita.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Acompanhamento do processo de degradação pelo teor de fósforo e estrôncio presentes nas soluções estudadas nos diferentes tempos.
- Análise em perfilometria das amostras antes e após os testes
- Medição do ângulo de contato.
- Avaliação da citotoxicidade *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMANN, P., RIZZOLI, R., DELOFFRE, P., BONJOUR, J. P., 1996, **Osteoporosis International** 6, 259.

AFSHAR, M., GHORBANI, N., EHSANI, M.R., SAERI, C.C., SORRELL; 2003, "Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite", **Materials and Design**, v.24, pp.197-202.

AOBA, T., KOMATSU, H., SHIMAZU, Y. *et al.*, 1998. "Enamel mineralization and an initial crystalline phase". **Connective Tissue Reserch**, v.38, pp.129-137

AOKI. H.;1991, **Science and medical applications of hydroxyapatite**, JAAS: Tokio.

AOKI, H., 1994, **Medical Application of Hydroxyapatite**. 1º Ed. Tokyo, Ishiyaku, EuroAmericana,.

ASHOK, P.; SHEKHAR, N., KRISHANU B., *et al.*, 2010, " In vitro dissolution of calcium phosphate-mullite composite in simulated body fluid", **Journal Material Science Matererial Medical** , v.21, pp.1817-28. Epub 2010 Apr 22

BAGAMBISA, F. B., JOOS, U., SCHILLI, W., 1993," Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics", **Journal Biomedical Matererial Reserch**, v 27, pp.1047-1055.

BEST, S. M., PORTER, A.E., THIAN, E.S., *et al.*, 2008, "Bioceramics: Past, present and for the future", **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, pp.1319–1327

BJERE, L., BURGER, C.E., KASSEM, M., *et al.*, 2008; "Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds" ,**Biomaterials** ,v.29, pp 2616-2627.

BOANINI, E., GAZZANO, M., BIGI, A., 2010, "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature", **Acta Biomaterialia**, v.6, pp. 1882–1894.

BOTELHO, C. M.; LOPES, M. A.; GIBSON, I. R. *et al.*, 2002, "Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy", **Journal Material Science Matererial Medical**, v. 13, n. 12, pp. 1123-1127

BOHNER, M., 2000, "Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements", *International Journal of the Care of the Injury*, v. 31, pp.37-47.

BURG, K.J.L., PORTER, S., KELLAM, J. F., 2000, "Biomaterial development for bone tissue engineering", *Biomaterials*, v.21, pp. 2347–59.

CAPUCCINI, C., TORRICELLI, P., SIMA, F., *et al.*, 2008, "Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response", *Acta Biomaterialia*, v. 4, pp.1885-1893.

CANALIS, E., HOTT, M., DELOFFRE, P. *et al.*, 1996, "The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro", *Bone*, v.18(6), pp.517–23.

CHAI, C.S., BEN-NISSAN, B., 1999, "Bioactive Nanocrystalline Sol-Gel Hydroxyapatite Coatings", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.10, pp. 456-469.

CONZ, M.B., SOARES, G.A., GRANJEIRO, J.M., 2005, "Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft", *Journal Applied Oral Science*, v.13, n° 2, pp. 136-140.

DHERT, W.J.A., THOMSEN, P., BLOMGREN, A.K., *et al.*, 1998, "Integration of press-fit implants in cortical bone: A study on interface kinetics", *J Biomed Res*, v.41, pp.574-583

DOURADO, É., 2006, "Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio", Dissertação de Mestrado, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas –Rio De Janeiro, RJ, Brasil.

DOROZHKIN, S.V., "A Review on the dissolution models of calcium apatites", 2002, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Material*, p 45-61.

DOROZHKIN, S.V.; EPPLE, M., 2002, "Biological and Medical Significance of Calcium Phosphate", *Chemical International Education*, v.41, pp. 3130-3146.

ELLIOT, J.C., 1994, **Structure and Chemistry of the Apatite and Other Calcium Orthophosphates**, 1° Ed. Amsterdam, Elsevier.

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H., 2010, "Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos", **Química Nova**, V.33, pp. 1352-1358

GRYNPAS, M.D.; MARIE, P.J., 1990, " Effects of low doses of strontium on bone quality and quantify in rats", **Bone**, v. 11, pp. 313-319.

HASHIZUME, M.; YAMAGUCHI, M., 1993, "Stimulatory Effect of Beta-Alanyl-LHistidinato Zinc on Cell-Proliferation Is Dependent on Protein-Synthesis in Osteoblastic Mc3T3-E1 Cells", **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 122, n.1, pp. 59-64.

HENCH, L.L., 1997," Theory of bioactivity: the potential for skeletal regeneration", **Anales de Química, International Edition**, v. 93, pp.44-48

HENCH, L.L., 1998, "Bioceramics, A clinical success", **Jornal of American Ceramic Society**, v., pp.

HENCH, L. L., 2000, "The challenge of orthopaedic materials". **Current Orthopaedics**, v.14, pp. 5-15.

KANNAN, S., REBELO, A., LEMOS, A.F., *et al.*, 2007, "Synthesis and mechanical behavior of chlorapatite and chlorapatite/beta-TCP composites", **Journal of European Ceramic Society**, v.27, pp. 2287-2294.

Kim, H.W., KOH, Y.H., KANG, J.G., *et al.*, 2004, "Strontium substituted calcium phosphate biphasic ceramics obtained by a powded precipitation method", **Journal Material Science – Material Medical**, v.15, pp.1129-1134.

KOHRU, M., MIKI, K., WAITE, D.E., *et al.*, 1993, "In vitro stability of biphasic calcium phosphate ceramics", **Biomaterials**, v.14, pp.299-304.

KRIEGER, S., 2003, **Biocerâmica**, Universidade de São Paulo. Brasil.

LACERDA, K.A.; LAMEIRAS, S.F., 2009, "Avaliação da biodegradação de Matrizes Porosas à Base de Hidroxiapatita para Aplicação como Fontes Radioativas em Braquiterapia", **Química Nova**, v 32, pp.1216-1221.

LANDI, E., LOGROSCINO, G., PROIETTI, L. *et al.*, 2008, "Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behavior", **Journal Material Science – Material Medical**; v.19, pp.239–47.

LEGEROS, R.Z., 1991, "Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Sciences",. V. 15 ,Myers H (ed). Basel: Karger.

LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J. P., “**An introduction to bioceramics**”, In: HENCH, L. L., WILSON, J. (eds). World Scientific, London, 1993, Chapter 9, p. 139-180

Li, P., Ohtsuki, C., Kokubo, T., 1993, “ Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel”, **Journal Material Science – Material Medical** , v.4, pp. 127-131.

LI, Z. Y.; LAM, W. M.; YANG, C., 2007, “ Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite”, **Biomaterials**, v.28, pp.1452- 1460.

LIMA, I. R., COSTA, A.M.; BASTOS, I.N., et al., 2006 , “Development and characterization of 5% mol Zn bioceramic in granular form”, **Materials Research**, v.9, n.4, pp.399-403.

LIMA, I.R., ALVES, G.G., SORIANO, C.A., et al., 2011, ‘Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite. An in vivo multiparametric study on biocompatibility’, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.98 A, pp.351-358.

MANN, S., 1989, “Crystallochemical strategies in biomineralization”. In: Mann S ed. *Biomineralization: chemical and biochemical perspectives*. VCH, NY.

MARIE, P. J., 2001, *Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone*, **Calcified Tissue International**, Lyon, v. 69, pp. 121-129.

MARQUES, P.A.d.A.P., 2003, **Reações de superfície de cerâmicos de fosfato de cálcio em plasma simulado**. tese de doutorado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

MARQUES, P.A.P., SERRO, A.P., SARAMANGO, B.J., et al., 2003, “Mineralisation of two phosphate ceramics in biological model fluids (HBSS and SBF)”, **Journal Material Chemical**, v.10, pp.1039

MARKOVIC, M.; FOWLER, B.O.; TUNG, M. S., 2004, “Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite “, **Journal Research. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg**, v. 109, n. 6, pp. 553-568.

MAVROPOULOS, E., 1999, “**A hidroxiapatita como absorvedor de metais**”, *Dissertação de Mestrado*, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Físicas –Rio De Janeiro, RJ, Brasil.

MONTEIRO, M.M., ROCHA, N.C.C., ROSSI, A.M. *et al.*, 2003, “Dissolution properties of calcium phosphate granules with different compositions in simulated body fluid”, **Journal Biomedical Material Research**, v.65A(2), pp.299 –305.

MORAES, M.A., AUGUSTO, P.F.E., CASTILHO, R.L., 2008, “**Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Gênica**”.

NATH, B.; 2008, “Designing biomaterials for hard tissue replacement”, *J Kor Cer Soc.*; v.45, pp.1–29.

NIELSEN, S.P., SLOSMAN, D., SORENSEN, O.H. *et al.*, 1999, “Influence of Strontium on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content Measurements by Dual X-Ray Absorptiometry”, *Journal of Clinical Densitometry*, v.2, Issue 4, pp. 371-379.

PAN, H.B, LI, Z.Y., LAM, W.M., 2009, “Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration”, *Acta Biomaterial.*, Jun;5(5):1678-85. Epub 2008 Dec 24.

PORTER, A.E., BOTELHO, C.M., LOPES, M.A., 2004, “Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on V and silicon-substituted hydroxyapatite *in vitro* and *in vivo*”, *Journal Biomedical Material Research*, v.69, pp.670–9.

POSNER, A.S., PERLOFF, A., DIONIO, A. F., 1958, “Refinement of the hydroxyapatite structure”, *Acta Crystallographica.*, v.11, pp.308–309.

PAULA, F. L., 2008, “Avaliação *in vitro* de um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo”, *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Universidade Federal da Bahia-Faculdade de Odontologia, Salvador, S.A, Brasil.*

REGÍ, V.M.; ARCOS, D., 2005, “Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants”, *Journal Material Chemical*, v.15, pp.1509–1516.

RENAUDIN, G., JALLOT, E., NEDELEC, J.M., 2009, “Effect of strontium substitution on the composition and microstructure of sol–gel derived calcium phosphates”, *Journal Sol-Gel Science Technology*, v.51, pp.287–294

RIBEIRO, C., 2003, “**Processamento e caracterização de cerâmicas a base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico**”, *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

SANTOS, J.D., JHA, LAKHAN J., MONTEIRO, F.J., 1995, “Surface modifications of glass-reinforced hydroxyapatite composites”, *Biomaterials*, v. 16, pp. 521-526

SANOSH, K.P., CHU, MIN-CHEOL, BALAKRISHNAN, A., *et al.*, 2009; “Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition”, *Current Applied Physics*, doi: 10.1016/j.cap.2009.03.024

SARTORI, S., SIVESTRI, M., FORNI, F., et al, 2003, "Tem-year followup in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation", **Clinical Oral Implant. Reserch**, v.14, pp.:369-372.

SLÓSARCZYK, A., PASZKIEWICZ, Z., PALUSZKIEWICZ, C., 2005, "FTIR and XRD Evaluation of Carbonated Hydroxyapatite Powders Synthesized by Wet Methods", **Journal of Molecular Structure**, v. 744-747, pp. 657-661

SOARES, G.D.A, 2010, "Materiais para saúde médico-odontológica", **In: Materiais Avançados 2010-2012**, CGEE, v.1, pp.297-331.

SILVA, H.M., 2009, "**Avaliação in vitro de hidroxiapatita contendo silício sob condição estática e dinâmica**", Tese de doutorado – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Rio de Janeiro, RJ, Brasil..

SHI, D., JIANG, G., BAUER, J., 2002, "The effect of structural characteristics on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite", **Journal Biomedical Matererial Reserch (Applied Biomaterial)**, v. **63**, pp. 71-78.

TAVARES, D.S.; RESENDE, C.X.; QUITAN, M.P., *et al.*, 2010, "Influence of strontium doping on cytocompatibility of hydroxyapatite: comparison of three in vitro assays", **6º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**.

YAO, F., LEGEROS, J.P., LEGEROS, R.Z., 2009, "Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties", **Acta Biomaterial.**, v. 5, n. 6, pp. 2169-2177.