

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

***ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE APATITAS EM MEIOS DE  
INTERESSE BIOLÓGICO.***

**VINICIUS PEREZ PAVINATO**

**Dissertação de mestrado**

**2012**

**VINICIUS PEREZ PAVINATO**

***ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE APATITAS EM MEIOS DE  
INTERESSE BIOLÓGICO.***

**Dissertação de mestrado  
apresentado ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi

**Araraquara**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Pavinato, Vinicius Perez

P338e          Estudo da solubilidade de apatitas em meios de interesse  
biológico / Vinicius Perez Pavinato. - Araraquara : [s.n], 2012  
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Antônio Carlos Guastaldi

1. Biomateriais. 2. Solubilidade. 3. Hidroxiapatita. 4. Apatitas.  
I. Título.

VÍNICIUS PEREZ PAVINATO

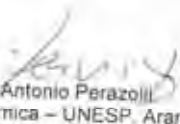
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 03 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Leinig Antonio Perazoli  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Miguel Angel Ramirez Gil  
Faculdade de Engenharia – UNESP, Guaratinguetá

Nome	Vinicius Perez Pavinato
Nome em citações bibliográficas	PAVINATO V. P.
Sexo	Masculino
Filiação	Luiz Carlos Pavinato e Neuza Maria Perez pavinato
Nascimento	30/08/1987 - Piracicaba/SP - Brasil
Carteira de Identidade	40619882-2 SSP
CPF	362318848-48
Endereço residencial	Rua: Hugo Negrini, 132 Quitandinha - Araraquara 14800-030, SP - Brasil Telefone: 16 33575822
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Físico-Química Francisco Degni Quitandinha - Araraquara 14800-800, SP - Brasil URL da home page: <a href="http://www.iq.unesp.br">www.iq.unesp.br</a>
Endereço eletrônico	e-mail: <a href="mailto:vinic_pavinato@yahoo.com.br">vinic_pavinato@yahoo.com.br</a>

### **Formação acadêmica/Titulação**

- 2010 Mestrado em andamento em Química (Conceito CAPES 6) .  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.  
*Título:* DISSOLUÇÃO IN VITRO DE APATITAS E SISTEMAS APATITAS/ FÁRMACOS EM MEIO DE INTERESSE BIOLÓGICO VISANDO APLICAÇÃO EM SUPERFÍCIES DE STENTS.,  
*Orientador:* ☺ Antonio Carlos Guastaldi.  
*Bolsista do(a):* Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior .  
*Palavras-chave:* apatitas; hidroxiapatita; Biomateriais; solubilidade.
- 2006 Graduação em Química .  
-
- 2009 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.  
*Título:* Desenvolvimento e Caracterização de biocompositos formados por polímero/carbonato de cálcio e polímero/hidroxiapatita utilizados em reposição e regeneração óssea.  
*Orientador:* Antonio Carlos Guastaldi.  
*Bolsista do(a):* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico .

### **Formação complementar**

2008 Tintas e tratamentos de superfície. (Carga horária: 16h).  
Universidade Estadual Paulista.

### **Atuação profissional**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

### **Vínculo institucional**

2008/2009 Vínculo: Aluno orientado., Enquadramento Funcional: Iniciação científica projeto de monografia, Carga horária: 12

### **Projetos de Pesquisa**

2010/2012 Dissolução in vitro de apatitas e sistemas apatitas/fármacos em meios de interesse biológico visando aplicação em superfícies de STENT.

*Descrição:* O projeto tem como objetivo o desenvolvimento de novas tecnologias para liberação controlado de fármacos sem a presença do polímeros como matriz de degradação..

*Situação:* Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.

*Integrantes:* Vinicius Pavinato - Coordenador.

*Financiador(es):* CAPES - Centro Anhanguera de Promoção e Educação Social - Bolsa..

2008/2009 Desenvolvimeto e caracterização de biocompósitos formados por: polímero/CaCO<sub>3</sub> e polímero/Hidroxiapatita visando a utilização destes em reposição e regeneração óssea

*Descrição:* Projeto de Iniciação científica, área de Biomateriais.

*Situação:* Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.

*Alunos envolvidos:* Graduação ( 1 ) / Doutorado ( 1 ) .

*Integrantes:* Anahi Herrera Aparecida Thomazini - Coordenador / Vinicius Pavinato - Integrante.

### **Áreas de atuação**

1. *Grande área:* Ciências Exatas e da Terra / *Área:* Química / *Subárea:* Físico-Química.

### **Idiomas**

Inglês Compreende Razoavelmente.

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Português Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

### **Produção bibliográfica**

#### **Apresentações de Trabalho**

1. ★ PAVINATO, V. P. ; APARECIDA, A. H. ; FIGUEIREDO, J. S. L. ; GUASTALDI, A. C. . Processamento e caracterização de compósitos formados por polímero/HA e polímero carbonato de cálcio utilizados em reposição e regeneração óssea.. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. ★ PAVINATO, V. P. ; APARECIDA, A. H. ; GUASTALDI, A. C. . Desenvolvimento e Caracterização de biocompositos formados por polímero/carbonato de cálcio e polímero/hidroxiapatita utilizados em reposição e regeneração óssea.. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

### **Eventos**

#### Participação em eventos

1. CIC - Congresso de Iniciação Científica da Unesp.Desenvolvimento e Caracterização de biocompositos formados por polímero/carbonato de cálcio e polímero/hidroxiapatita utilizados em reposição e regeneração óssea.. 2009. (Congresso).
2. II Comemoração do dia do químico - Um químico no centro de pesquisa da Petrobrás. 2007. (Seminário).

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho  
a minha família,  
por sempre me apoiarem e me incentivarem.



## **AGRADECIMENTOS**

- A toda minha família.
- Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi, pela orientação durante a realização deste trabalho.
- Aos meus amigos de graduação e de pós-graduação.
- Aos meus amigos de laboratório, Anahi, Regina, Edson, Nilson, Diego, Juliana, Aline, Ian, Guilherme, Eliana e Débora.
- Aos professores e funcionários do Instituto por toda ajuda nesses anos de trabalho.
- A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho.
- A CAPES pela ajuda financeira.

## RESUMO

Com o desenvolvimento da ciência e a expansão de grupos multidisciplinares em todo o mundo, a área dos biomateriais ganhou destaque, integrando engenheiros, físicos, químicos, biólogos, médicos, dentistas, dentre outros, possibilitando o desenvolvimento de soluções para as mais diversas enfermidades. Nesse contexto, os biomateriais possuem um importante papel na saúde da sociedade moderna, sendo as apatitas (biocerâmicas de fosfato de cálcio) uma classe de biomateriais que satisfazem uma ampla faixa de aplicações no organismo humano. Apatitas de interesse biológico: Hidroxiapatita (HA), Fosfato de cálcio Amorfo (ACP), Fosfato Octacálcico (OCP) foram sintetizadas juntamente com as principais fases que as acompanham por um método de via úmida. Nos estudos de solubilidade, a mistura que continha hidroxiapatita como componente majoritária apresentou maior tempo de liberação em relação às outras fases nos três meios estudados: água deionizada, soro fisiológico e solução SBF (Simulated Body Fluid - uma solução que simula os fluidos corpóreos), em relação às outras duas amostras, a mistura contendo ACP apresentou maior tempo de degradação em água e SBF quando comparado a mistura com OCP, porém em soro fisiológico ocorreu o contrário devido às transformações que ocorrem no meio ácido dessa solução favorecendo a formação de outras fases de apatita. Os resultados foram explicados em termos das variações na energia livre de Gibbs envolvida nos processos, quanto maior a necessidade de fornecer energia para o processo, maior o tempo de liberação, e também das velocidades de dissolução.

*Palavras chave: Biomateriais, apatitas, hidroxiapatita, solubilidade.*

## ABSTRACT

With the development of science and the expansion of multidisciplinary teams in the world, the area of biomaterials has been highlighted by integrating engineers, physicists, chemists, biologists, doctors, dentists, among others, enabling the development of solutions for many different diseases. In this context, biomaterials play an important role in the health of modern society, and the apatites (calcium phosphate bioceramics) are a class of biomaterials that meet a wide range of applications in the human body. Apatites of biological interest: Hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), octacalcium phosphate (OCP) were synthesized with the main phases that accompany them by a wet method. In solubility studies, the mixture containing hydroxyapatite component majority showed higher release time for the other phases studied in three media: deionized water, saline solution and SBF (Simulated Body Fluid - a solution that simulates body fluids). For the other two samples, the mixture containing ACP resulted in longer degradation in water and SBF compared to mixture with OCP, but in saline was otherwise due to the transformations that occur in this acidic solution that favors the formation of other phases of apatite. The results were explained in terms of variations in the Gibbs free energy involved in the process, the greater the need to provide energy for the process, the greater the release time, and also the velocity of dissolution

*Keywords: biomaterials, apatite, hydroxyapatite and solubility.*

## SUMÁRIO

<b>1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
1.1 – Biomateriais.....	17
1.2 - Biocerâmicas de Fosfatos de Cálcio – Apatitas.....	21
1.2.1 - Hidroxiapatita – HÁ.....	23
1.2.2 - Fosfato de Cálcio Amorfo – ACP.....	25
1.2.3 - Fosfato Octacálcico – OCP.....	27
1.2.4 - Fosfato Tricálcico – TCP.....	29
1.3 – Solubilidade.....	30
1.4 – Stents.....	34
<b>2 – JUSTIFICATIVAS e OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 - Preparação das apatitas.....	40
3.1.1 - Síntese ACP/HA/TCP.....	40
3.1.2 - Síntese OCP.....	41
3.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	42
3.3 – Difractometria de raios X – DRX.....	42
3.4- Método de Rietveld.....	44
3.5 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier – FTIR.....	44
3.6 - Estudos de dissolução “ <i>in vitro</i> “.....	46
3.7 – Quantificação de Cálcio.....	46
3.7.1 - Titulação Complexométrica.....	46
3.7.2 – Eletrodo íon seletivo.....	48
3.8 – Soluções de interesse biológico.....	48
3.8.1 - Água deionizada.....	48
3.8.2 – Soro fisiológico.....	48
3.8.3 – Solução SBF.....	49
<b>4 – RESULTADOS e DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.1 - Caracterização das amostras.....	50
4.1.1 – Caracterização da síntese: ACP/HÁ/TCP.....	50
4.1.2 - Caracterização da síntese: OCP.....	54
4.2 – Estudos de dissolução “ <i>in vitro</i> ”.....	57
4.2.1 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de ACP/HAd em água deionizada.....	59
4.2.1 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de HA/TCP em água deionizada.....	60
4.2.3 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de OCP/DCPD em água deionizada.....	61
4.2.4 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de ACP/HAd em soro fisiológico.....	63
4.2.5 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de HA/TCP em soro fisiológico.....	64

4.2.6 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de OCP/DCPD em soro fisiológico.....	65
4.2.7 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de ACP/HAd em SBF.....	67
4.2.8 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de HA/TCP em SBF.....	68
4.2.9 - Dissolução “ <i>in vitro</i> ” de OCP/DCPD em SBF.....	69
<b>5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>6 – PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Exemplos de biomateriais: a) coração artificial, b) prótese de quadril, c) implante dentário.....	18
<b>Figura 2:</b> Arranjo atômico da HA.....	24
<b>Figura 3:</b> Representação dos Clusters de Posner.....	26
<b>Figura 4:</b> Faixa de temperatura e pH em que o OCP se torna estável.....	27
<b>Figura 5:</b> Estrutura cristalina do OCP.....	28
<b>Figura 6:</b> MEV de partículas contendo a)OCP/DCPD=90/10 b)DCPD/OCP=90/10.....	28
<b>Figura 7:</b> Diagrama de solubilidade para o sistema ternário $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C: isoterma de solubilidade mostrando $\log[\text{Ca}]$ e pH de soluções em equilíbrio com vários sais.....	33
<b>Figura 8:</b> Artéria saudável e artéria com placas de gordura acumuladas.....	34
<b>Figura 9:</b> Cateterismo.....	35
<b>Figura 10:</b> Reestenose coronária.....	35
<b>Figura 11:</b> STENT Coronário.....	36
<b>Figura 12:</b> Processo de inserção do STENT Coronário.....	36
<b>Figura 13:</b> Procedimento experimental para síntese de ACP/HA/TCP.....	41
<b>Figura 14:</b> Procedimento experimental para síntese de OCP.....	41
<b>Figura 14:</b> Estrutura do EDTA complexando com o metal.....	47
<b>Figura 15:</b> Caracterização da biocerâmica obtida antes do tratamento térmico: a) MEV 5000X, b) MEV 100000X.....	51
<b>Figura 16:</b> Difratoograma de raios X da biocerâmica obtida antes do tratamento térmico.....	51
<b>Figura 17:</b> Espectro de Infravermelho da biocerâmica obtida antes do tratamento térmico.....	51
<b>Figura 18:</b> Caracterização da biocerâmica obtida após o tratamento térmico: a) MEV 5000X, b) MEV 100000X.....	53
<b>Figura 19:</b> Difratoograma de raios X da biocerâmica obtida após do tratamento térmico.....	53
<b>Figura 20:</b> Espectro de Infravermelho da biocerâmica obtida após do tratamento térmico.....	53
<b>Figura 21:</b> Caracterização da biocerâmica obtida na síntese de OCP: a) MEV 10000X, b) MEV 50000X.....	55
<b>Figura 22:</b> Difratoograma de raios X da amostra OCP.....	55
<b>Figura 23:</b> Espectro de infravermelho da amostra OCP.....	55
<b>Figura 24:</b> Curva de solubilidade de apatitas medida em função do cálcio.....	57
<b>Figura 25:</b> Curva de solubilidade da mistura ACP/HAD em água.....	59
<b>Figura 26:</b> Curva de solubilidade da mistura HA/TCP em água.....	60
<b>Figura 27:</b> Curva de solubilidade da mistura OCP/DCPD em água.....	61

<b>Figura 28:</b> Curva de solubilidade da mistura ACP/HAd em Soro Fisiológico.....	63
<b>Figura 29:</b> Curva de solubilidade da mistura HA/TCP em Soro Fisiológico .....	64
<b>Figura 30:</b> Curva de solubilidade da mistura OCP/DCPD em Soro Fisiológico.....	65
<b>Figura 31:</b> Curva de solubilidade da mistura ACP/HAd em SBF.....	67
<b>Figura 32:</b> Curva de solubilidade da mistura HA/TCP em SBF.....	68
<b>Figura 33:</b> Curva de solubilidade da mistura OCP/DCPD em SBF.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos biomateriais de acordo com interação com o meio biológico.....	17
<b>Tabela 2:</b> Relação molar Ca/P das fases de apatita.....	22
<b>Tabela 3:</b> Dados cristalográficos das principais fases alotrópicas do TCP.....	29
<b>Tabela 4:</b> Produto de solubilidade dos fosfatos de cálcio.....	32
<b>Tabela 5:</b> Número das fichas padrões da base de dados JCPDS utilizadas para identificação das fases de apatita.....	43
<b>Tabela 6:</b> Frequências de absorção no IV características dos fosfatos.....	45
<b>Tabela 7:</b> Concentrações iônicas da solução SBF.....	49
<b>Tabela 8:</b> Seqüência de adição dos sais para preparação da solução SBF.....	49
<b>Tabela 9:</b> Porcentagem das fases de apatitas obtidas, após realização do método de Rietveld para biocerâmica obtida após o tratamento térmico.....	54
<b>Tabela 10:</b> Porcentagem das fases de apatitas obtidas na síntese do OCP.....	56
<b>Tabela 11: Tempo para o processo de dissolução das apatitas atingir equilíbrio químico.....</b>	<b>70</b>
<b>Tabela 12:</b> Velocidade e tempo de dissolução das apatitas nos meios de interesse biológico.....	71



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><i>ACP</i></b>	Fosfato de Cálcio Amorfo
<b><i>DRX</i></b>	Difratometria de raios X
<b><i>FTIR</i></b>	Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier.
<b><i>DCPD</i></b>	Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado
<b><i>HA<sub>D</sub></i></b>	Hidroxiapatita Deficiente Em Cálcio
<b><i>IV</i></b>	Espectroscopia no Infravermelho
<b><i>MEV</i></b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b><i>OCP</i></b>	Fosfato Octacálcico
<b><i>TCP</i></b>	Fosfato Tricálcico

---

# CAPÍTULO I

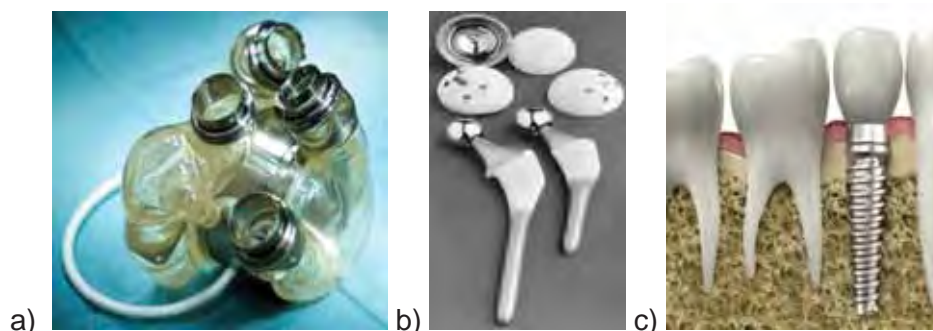
---

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Biomateriais

A ciência dos biomateriais se trata de um campo amplo e excitante que engloba vários aspectos de áreas como medicina, biologia, engenharia, química dentre outros. Em 2008 foi atingida a expectativa de vida ao nascer do brasileiro em 73 anos e estima-se que em 2020, 30 milhões de brasileiros com mais de 60 anos. Com o incremento da longevidade e de traumas decorrentes de acidentes de trânsito e violência, é fundamental consolidar a indústria de produtos para a saúde no Brasil como forma de atender à demanda por procedimentos de alta complexidade fazendo com que o mercado de biomateriais seja um dos mais crescentes no país e no mundo [CGEE, 2010].

Um biomaterial pode ser definido como: material desenvolvido com o propósito de interagir temporária ou permanentemente com a interface de sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano, produzido ou modificado artificialmente [WILLIAMS, 1991]. Adotando uma visão mais contemporânea sobre o assunto biomaterial é todo o material natural ou sintético, compatível com um sistema biológico, utilizado para substituir, num todo ou somente em parte de sistemas biológicos, no entanto deve se levar em conta que é sempre um corpo estranho. Como exemplos de biomateriais podemos citar: juntas de dedos, implantes de seios, válvula do coração, prótese de quadril, coração artificial, lentes de contato implantes dentários dentre outros. A figura 1 mostra alguns desses exemplos.



**Figura 1: Exemplos de biomateriais: a) coração artificial, b) prótese de quadril, c) implante dentário.**

Para que qualquer desses materiais seja inserido no corpo humano ele requer algumas propriedades fundamentais as quais determinam a viabilidade de seu uso como biocompatibilidade, biofuncionalidade e durabilidade.

A biocompatibilidade pode ser considerada a condição fundamental para que qualquer material possa ser utilizado como biomaterial, ela é conceituada como a capacidade de um material a responder de maneira adequada uma aplicação específica, sem causar qualquer reação indesejada ao organismo [WILLIAMS, 1991], assim, por exemplo, um biomaterial não deve causar reações inflamatórias no corpo humano.

A biofuncionalidade é a capacidade que o material possui em desempenhar uma função desejada, ou seja, ele deve resistir e suportar solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração, por exemplo, um implante metálico deve resistir à corrosão eletroquímica não alterando assim sua resistência mecânica [BOSCHI, 1996], e por último deve apresentar durabilidade o que esta relacionado a capacidade de degradação do implante no meio biológico.

Na perspectiva de interação com o meio biológico os biomateriais podem ser divididos em quatro classes principais: bioativos, bioinertes, biodegradáveis e porosos.

Quando um material bioativo é implantado no organismo, uma série de reações ocorre na interface tecido/implante, resultando na formação de uma camada ativa sobre a superfície do material, que possibilita uma ligação química interfacial entre o implante e o tecido vivo, ocasionando a denominada fixação bioativa, como exemplo de biomateriais bioativos podemos citar os fosfatos de cálcio (apatitas), e vitro-cerâmicas [CAO, 1996].

Os materiais bioinertes apresentam resposta interfacial que não resulta na ligação com o tecido hospedeiro, ou seja, é uma fixação morfológica um “acomodamento” do implante no local em que foi inserido. Hoje em dia esse tipo de biomaterial é chamado de “quase bioinerte”, pois sabe-se que nenhum material é completamente inerte e nesse caso sua inserção no corpo humano resulta na formação de uma cápsula fibrosa. Como exemplo podemos citar a alumina, zircônia e polietileno [CAO, 1996].

Os materiais reabsorvíveis ou biodegradáveis são degradados e com o tempo substituídos por novos tecidos, esse processo começa com uma dissolução a qual vagarosamente proporciona a osteogênese. Outra característica importante desses materiais é que a velocidade de degradação do implante deve ser proporcional à velocidade de reposição do tecido vivo como exemplo de biomateriais reabsorvíveis podemos citar o fosfato tri-cálcico (TCP) e poli(ácido lático)-poli(ácido glicólico) [VALLET REGI, 1997].

Os biomateriais porosos proporcionam uma fixação através do crescimento de tecido para dentro dos poros por todo o implante, esta ligação tecido/implante poroso é denominada fixação biológica como exemplo podemos citar a hidroxiapatita porosa [HENCH, 1993].

A seguir é apresentada uma tabela resumindo a classificação dos biomateriais de acordo com a interação com o meio com respectivos exemplos:

**Tabela 1: Classificação dos biomateriais de acordo com interação com o meio biológico [CAO, 1996].**

<b>Tipo de Biomaterial</b>	<b>Tipo de interação</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Bioativo</b>	Ligação interfacial	Fosfatos de cálcio, vitro-cerâmicas
<b>Bioinerte</b>	Fixação morfológica	Alumina, zircônia e polietileno
<b>Poroso</b>	Crescimento de tecido nos poros	Hidroxiapatita porosa
<b>Reabsorvível</b>	Troca por tecido vivo	TCP, ácido polilático PLA

Decorrente da complexidade que o corpo humano possui em sua estrutura se faz necessário utilizar de diferentes tipos de materiais que apresentam as mais diversas características e propriedades, as principais classes que são aplicadas como biomateriais são: metais, polímeros, cerâmicos e compósitos.

Os biomateriais metálicos são usados em aplicações que exigem alta resistência mecânica para suportar os rigores de atividades diárias como caminhar e mastigar. A biocompatibilidade dos implantes metálicos é a principal desvantagem para sua utilização onde esses sofrem corrosão no meio biológico e conseqüentemente isso leva a uma perda de material, causando o enfraquecimento do implante e mais importante ainda, os produtos da corrosão podem cair na corrente sanguínea podendo causar efeitos indesejáveis. Como exemplo de metais ou ligas metálicas utilizadas como biomateriais podemos citar aço inoxidável, titânio, ligas níquel titânio [PARK e LAKES, 1992].

Os biomateriais poliméricos têm despertado interesse na área, já que esses possuem excelente versatilidade estrutural (flexibilidade), ou seja, podem ter seu formato adequado para cada aplicação específica além de serem biodegradáveis. Como exemplo de polímeros utilizados como biomateriais podemos citar quitosana utilizada como matriz para liberação controlada de fármaco e polietileno utilizado em próteses ortopédicas [ORÉFICE, 2006].

Os biomateriais cerâmicos são muito utilizados por possuírem adequada resistência e dureza, eles estão disponíveis como redes porosas, recobrimentos de superfícies, compósitos com polímeros dentre outros. Como exemplo de biocerâmicas podemos citar, alumina, zircônia e as apatitas (fosfatos de cálcio) [CALLISTER, 2002].

Os biomateriais compósitos são aqueles que envolvem a associação de dois ou mais dos materiais acima citados, nesse caso busca-se que os constituintes mantenham sua identidade atuando conjuntamente, ou seja, as propriedades de um compósito é a soma das propriedades dos compostos que o formam. Como exemplo podemos citar um implante dentário feito a base de titânio recoberto com uma camada de hidroxiapatita, combinando assim a resistência mecânica do metal com a bioatividade da cerâmica [RATNER, 2004].

Vale mencionar a existência de normas para avaliação da biocompatibilidade de um dispositivo médico antes de sua utilização, essa é a norma técnica ISO - 10993 que é dividida em 20 partes [ISO, 2004].

**Norma técnica ISO 10993:**

- 1) Avaliação e ensaios;
- 2) Requisitos para o bem estar dos animais;
- 3) Ensaio de genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva;
- 4) Seleção de ensaios para interação com o sangue;
- 5) Testes *in vitro* de citotoxicidade;
- 6) Testes de efeitos locais pós implantação;
- 7) Resíduos da esterilização de óxido de etileno;
- 8) Seleção e qualificação de materiais de referência;
- 9) Sistema para identificação e quantificação dos potenciais produtos de degradação;
- 10) Ensaio de irritação e hipersensibilidade tardia;
- 11) Testes para toxicidade sistêmica;
- 12) Preparação de amostras e materiais de referência;
- 13) Identificação e quantificação dos produtos de degradação poliméricos dos dispositivos médicos;
- 14) Identificação e quantificação dos produtos de degradação de cerâmicas;
- 15) Identificação e quantificação dos produtos de degradação de metais e ligas;
- 16) Estabelecimento de limites toleráveis das substâncias lixiviáveis;
- 17) Estudo toxicocinético para produtos de degradação e lixiviados;
- 18) Caracterização química dos materiais;
- 19) Caracterização físico-química, morfológica e topográfica dos materiais;
- 20) Princípios e métodos para testes imunotológicos de dispositivos médicos;

**1.2 Biocerâmicas de fosfatos de cálcio.**

As cerâmicas de fosfato de cálcio são o tipo de biocerâmica mais estudadas na área de biomateriais e recebem o nome de apatitas. Na natureza as apatitas ocorrem comumente como minerais agregados as rochas ígneas, nos sistemas biológicos elas compõe as fases minerais dos tecidos calcificados como esmalte, dentina e ossos [LEGEROS, 1993]. Existem muitas dessas apatitas e uma forma conveniente de classificá-las é através da razão molar entre cálcio e fósforo a qual varia de 0,5 até 2,0 como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2: Relação molar Ca/P das fases de apatita [AOKI, 1991].

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
<i>Hidroxiapatita (HA)</i>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
<i>Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
<i>Fosfato tricálcico (<math>\alpha</math>, <math>\alpha'</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math>) (TCP)</i>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
<i>Fosfato octacálcico (OCP)</i>	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Monohidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato Heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Dihidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Nenhum desses compostos é encontrado em sua forma pura na natureza ou meio biológico, eles sempre contêm impurezas de outros elementos, por exemplo, íons  $\text{Ca}^{+2}$  podem ser parcialmente substituídos por  $\text{Sr}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  dentre outros, íons  $\text{OH}^-$  podem ser substituídos por  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{CO}_3^{-2}$  e os grupos  $\text{PO}_4^{-3}$  principalmente por  $\text{CO}_3^{-2}$ . O carbonato,  $\text{CO}_3^{-2}$ , pode fazer substituições tanto no

grupo da hidroxila  $\text{OH}^-$  quanto no do fosfato  $\text{PO}_4^{-3}$ , designadas como substituições do tipo A ou B, respectivamente.

As quatro fases que destacadas na tabela são a hidroxiapatita – HA, fosfato de cálcio amorfo – ACP, fosfato tricálcico – TCP e fosfato octacálcio – OCP, essas que ocorrem com maior frequência em sistemas biológicos possuindo assim maior interesse na área de biomateriais sendo a seguir dado enfoque maior em cada uma delas.

### 1.2.1 Hidroxiapatita – HA

A Hidroxiapatita apresenta fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  com razão  $\text{Ca/P}=1,67$ . Ela representa a principal fase mineral constituinte dos ossos e dentes humanos cerca de 90%, o que significa 5% da massa total de um indivíduo, sendo a fase de apatita mais estudada na área de biomateriais devido a essa similaridade com parte do corpo humano além de ser biocompatível, bioativa. As principais aplicações da hidroxiapatita são: reparo de defeitos ósseos e em odontologia e ortopedia como recobrimento de implantes metálicos melhorando assim a bioatividade desses [DOROZHKIN, 2009].

A Hidroxiapatita é um composto de cristalografia definida, pertencendo ao sistema hexagonal, com grupo espacial  $\text{P6}_3/\text{m}$ , que é caracterizado por uma simetria perpendicular a três eixos “a” equivalentes ( $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ), formando ângulos de  $120^\circ$  entre si. A sua célula unitária contém uma representação completa do cristal da apatita, consistindo em grupos de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $\text{OH}^-$  empacotados juntos em um arranjo como visto na Figura 2.



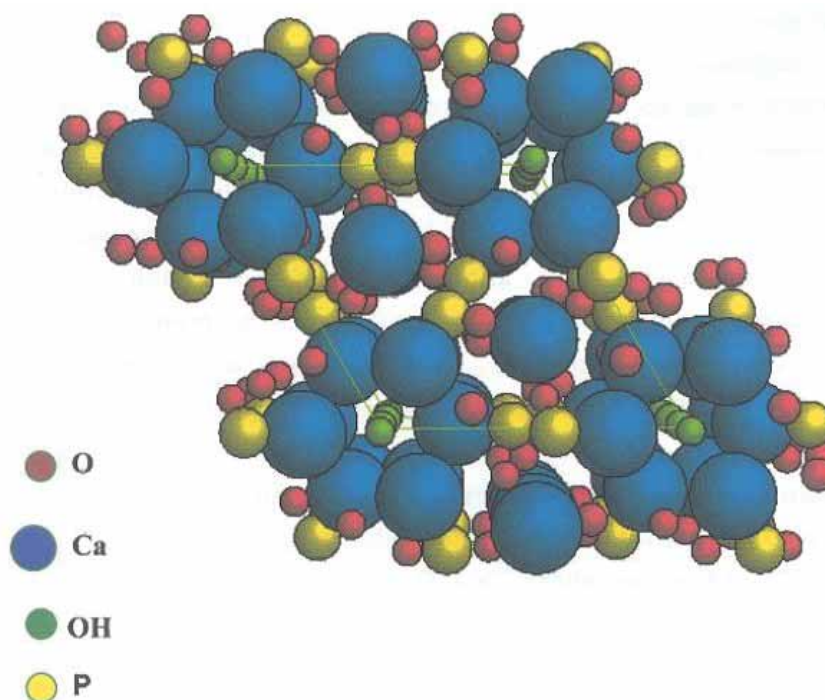


Figura 2: Arranjo atômico da HA [MCGREGOR, 1998].

Assim como as outras fases de apatitas a HA pode sofrer uma grande quantidade de substituições catiônicas e aniônicas sendo capaz de incorporar quase metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Íons  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono e divalentes a mais comum é por  $\text{Na}^+$ . A diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Íons  $\text{PO}_4^{3-}$  podem ser substituídos principalmente por íons,  $\text{CO}_3^{2-}$ , e os íons  $\text{OH}^-$  por íons  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Essa facilidade de trocas faz com que a HA atue como um sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais através de sua liberação ou armazenamento. Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA, que por sua vez alteram a degradação e o comportamento “*in vivo*” [APARECIDA, 2010].

Apesar das várias vantagens para regeneração óssea seu uso nessa área é limitado por possuir uma lenta velocidade de degradação no meio biológico, nesse caso o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação assim a formação de novo tecido ósseo é lenta, porém estudos mostram

que essa mesma lenta degradação da hidroxiapatita é uma vantagem para que ela atue como plataforma para liberação controlada de fármacos já que o tempo de liberação do medicamento depende do tempo de liberação da matriz inorgânica [SUN, 2009]. A maioria dos medicamentos utilizados possui grande quantidade de grupos com polaridade negativa, e uma vez em contato com a hidroxiapatita esses grupos sentiram forte atração dos átomos de cálcio com polaridade positiva (dipolo-dipolo) [OKADA, 2009].

A obtenção de partículas nanométricas, o que é de grande importância em diversos segmentos também tem despertado interesse na área de biomateriais, uma hidroxiapatita nanométrica significa um aumento em na área superficial das partículas o que é muito importante para aplicações médicas, uma vez que as partículas estão constantemente em contato com tecidos biológicos e com uma área de contato maior a interação também é maior aumentando a estabilidade do implante [GIARDINA, 2010].

### 1.2.2 Fosfato De Cálcio Amorfo – ACP

O fosfato de cálcio amorfo – ACP apresenta fórmula química  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , onde n varia de 3 até 4,5. Esse composto é encontrado no nosso organismo como composição de cálculos dentário e urinários (sempre contendo substituintes sendo os principais  $\text{Na}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ).

O ACP é encontrado como fase intermediária durante a formação dos outros fosfatos de cálcio, sendo a principal fase que se deposita nas reações de soluções que contenham íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$ . Uma agitação na solução assim que o ACP é precipitado resulta em uma leve cristalinização do composto, podendo levar a formação de outras fases cristalinas como a hidroxiapatita, por isso fala-se que ele é um intermediário instável [DOROZHKIN, 2009].

A estrutura do ACP ainda é incerta, a hipótese mais aceitável hoje em dia é que esse composto é formado por grãos esféricos chamados de clusters de Posner de fórmula química  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  [YIN, 2002]. Esse composto é considerado uma hidroxiapatita deficiente em cálcio ( $\text{HA}_d$ ) correspondente em composição química ao ACP (os átomos de cálcio e fósforo estão mantendo a mesma estequiometria), as partículas dos clusters possuem 0,95 nm de diâmetro em média [KANAZAWA, 1989]:

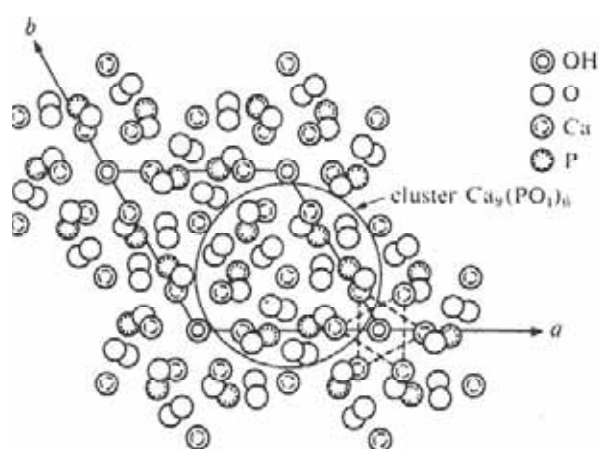


Figura 3: Representação dos Clusters de Posner [KANAZAWA, 1989].

A formação de  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  ocorre como uma fase intermediária depois do início da cristalinização do fosfato de cálcio amorfo para outra fase mais cristalina, a hidroxiapatita, na qual essa transformação passa por um intermediário instável o OCP [KANAZAWA, 1989]:



A maior solubilidade do ACP em relação à hidroxiapatita lhe confere maior velocidade de degradação no meio biológico, essa característica tem favorecido sua utilização em cimentos de fosfato de cálcio, onde sua dissolução forma poros na matriz favorecendo a colonização de células e crescimento de tecido dentro do cimento [JULIEN, 2007].

O fosfato de cálcio amorfo é ainda precursor para outras fases cristalinas que não podem ser obtidas em meio aquoso, apenas por tratamento térmico, como exemplo uma das fases alotrópicas do fosfato tricálcico o  $\beta$ -TCP é obtido por tratamento térmico do ACP em cerca de  $800^\circ\text{C}$  [KANAZAWA, 1989]:



### 1.2.3 Fosfato Octacálcico – OCP

O fosfato octacálcico apresenta fórmula química  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  com razão  $\text{Ca}/\text{P}=1,33$ . Ocorre em nosso organismo como composição de cálculos dentários e urinários, sendo fase intermediária durante a formação de ossos e dentes humanos, convertendo-se diretamente a hidroxiapatita [KANAZAWA, 1989]. A figura 4 mostra as faixas de temperatura e pH em que o OCP é estável:

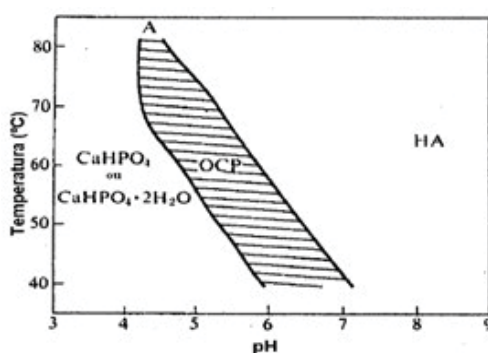


Figura 4: Faixa de temperatura e pH em que o OCP se torna estável [KANAZAWA, 1989].

A principal utilização do OCP na área de biomateriais tem sido como preenchimento de defeitos ósseos, já que esse possui uma excelente velocidade de reabsorção. A reabsorção é uma característica desejada nessas aplicações onde o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação, fazendo com que o composto apresente propriedades de proliferação celular e osteocondutividade mais acentuadas do que a hidroxiapatita [DEKKER, 2005].

A estrutura cristalina do OCP consiste de um arranjo alternado entre camadas com estrutura semelhante a da HA de composição  $4[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}]$  e camadas hidratadas de composição  $4[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ , pertencente ao sistema triclinico ( $P \bar{1}$ ) com parâmetros de rede  $a = 19,71\text{Å}$ ,  $b = 9,53\text{Å}$  e  $c = 6,83\text{Å}$  e  $\alpha = 9,014^\circ$ ,  $\beta = 92,52^\circ$  e  $\gamma = 108,67^\circ$  apresentado na figura 5 [KANAZAWA, 1989].

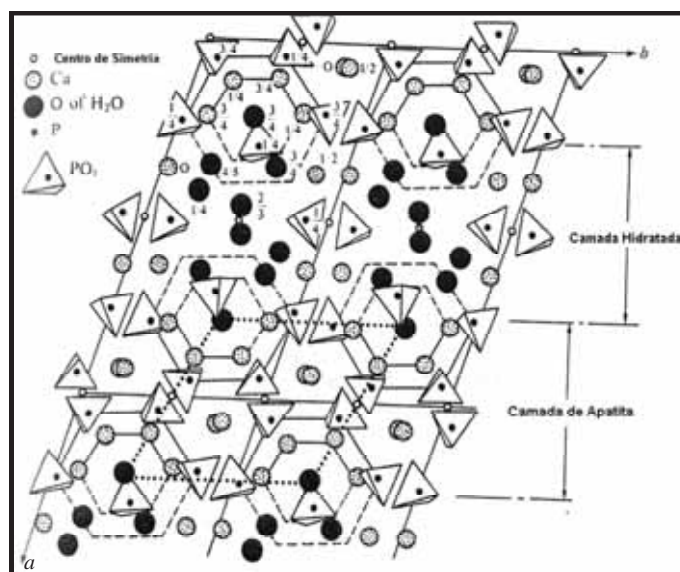


Figura 5: Estrutura cristalina do OCP [KANAZAWA, 1989].

As partículas de OCP apresentam uma morfologia como hastes agulhares, sendo muito comum durante a síntese *in vitro* do OCP a obtenção da fase DCPD em conjunto no qual suas partículas apresentam uma morfologia na forma de pratos, como pode ser visto na figura a seguir, uma imagem das duas fases em conjunto [KOMLEV, 2010].

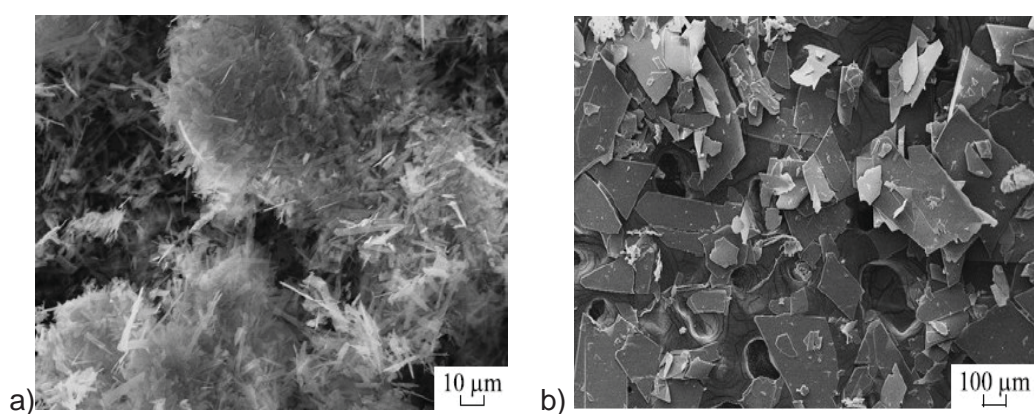


Figura 6: MEV de partículas contendo a)OCP/DCPD=90/10 b)DCPD/OCP=90/10 [KOMLEV, 2010].

Com relação à possibilidade de substituições catiônicas e aniônicas um estudo indicou a influência de diversos metais no processo de formação do OCP e foi

encontrado que o íon  $Mg^{+2}$  inibe a transformação para hidroxiapatita mesmo em concentrações pequenas,  $[Mg^{+2}] = 1\text{mM}$  [MADSEN, 2008].

#### 1.2.4 Fosfato Tricálcico – TCP

O fosfato tricálcico – TCP apresenta fórmula química  $Ca_3(PO_4)_2$  com razão molar Ca/P=1,5. Esse composto não pode ser precipitado a partir de soluções aquosas, ele é obtido por tratamento térmico de fosfato de cálcio amorfo ou hidroxiapatita deficiente em cálcio. O TCP ocorre em nosso organismo como composição de cálculos dentários e urinários sendo o principal constituinte da cárie dentária.

Esse composto possui quatro formas alotrópicas:  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . As temperaturas de transição entre as principais fases alotrópicas do fosfato tricálcico são [KANAZAWA, 1989]:



A fase  $\gamma$ -TCP só ocorre em altas pressões. A estrutura cristalina e os parâmetros de rede para as principais fases são apresentados na tabela 3. A estrutura cristalina da fase  $\alpha'$ -TCP não é conhecida devido à dificuldade de preparação.

**Tabela 3: Dados cristalográficos das principais fases alotrópicas do TCP [KANAZAWA, 1989].**

	Sistema	a (nm)	b (nm)	c (nm)	Densidade(g $cm^{-3}$ )
$\alpha$ -TCP	Monoclínico	12,87	27,28	15,21	2,86
$\beta$ -TCP	Romboédrico	10,43	10,43	37,37	3,08

O fosfato tricálcico possui excelente velocidade de degradação no meio biológico, característica importante para aplicações como regeneração óssea, na qual utilização deste com hidroxiapatita se torna uma alternativa viável aumentando a velocidade de degradação da HA, nesses casos a velocidade de degradação é controlada pela quantidade de TCP utilizado. A dificuldade adotada na síntese desses fosfatos na forma pura também faz com que seja muito comum a utilização dessas duas fases em conjunto [APARECIDA, 2010].



Estudos já vêm sendo realizados com o objetivo de que o fosfato tricálcico seja utilizado como matriz para a liberação controlada de fármacos, Eltohamy apresentou resultados satisfatórios na obtenção de um sistema de TCP com um antibiótico (ampicilina) no qual o perfil ilustrou uma liberação do antibiótico por cerca de 36 horas [ELTOHAMY, 2011].

Com relação às possibilidades de substituições na estrutura do TCP a presença de  $Mg^{+2}$  favorece a formação da fase beta tornando a mais estável. O efeito da incorporação de íons monovalentes como  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Li^+$ , no qual também foi encontrada a estabilização do  $\beta$ -TCP examinando a diminuição no valor da constante de velocidade da transformação para o  $\alpha$ -TCP [MATSUMOTO, 2009].

### 1.3 Solubilidade

Solubilidade pode ser conceituada como a capacidade de uma substância de se dissolver em outra. Esta capacidade, no que diz respeito à dissolução de um sólido em um líquido é limitada, ou seja, existe um máximo de soluto que podemos dissolver em certa quantidade de um solvente. Pode se expressar em mol por litro, gramas por litro, porcentagem de soluto/solvente dentre outros [ATKINS, 1999].

Na solubilidade o caráter polar ou apolar da substância influi muito, já que, devido à polaridade das substâncias, estas serão mais ou menos solúveis em um determinado solvente. Quando um soluto for polar se dissolverá bem em um solvente polar, quando o soluto for apolar se dissolverá bem em um soluto apolar ou seja “semelhante dissolve semelhante”. Se tivermos uma substância com atração intermolecular muito forte, como a água, e misturarmos a ela uma substância com atração intermolecular bem menor, como o óleo de cozinha, as moléculas de água irão interagir fortemente não deixando espaço para que o óleo, com pólos menos intensos, possa interagir com a água, porém se tivermos etanol no lugar do óleo, haverá uma mudança no processo, pois o etanol possui força de atração intermolecular próxima à força de atração intermolecular da água [ATKINS, 1999].

Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio é a solubilidade, isso porque essa pode nos fornecer informações importantes sobre o comportamento *in vivo* desses compostos. Um fosfato de cálcio solúvel possibilita a troca de íons  $Ca^{+2}$  e  $PO_4^{-3}$  com o meio em que esse se encontra [APARECIDA, 2010].

O fator mais importante ao descrever a solubilidade de um composto é seu produto de solubilidade Kps, esse é o produto das concentrações (em mol/L) dos íons existentes em uma solução saturada, estando cada concentração elevada ao coeficiente do íon na equação de dissociação iônica [FELTRE, 2004]. Por exemplo para a hidroxiapatita que possui fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  o Kps é:

$$\text{Kps} = [\text{Ca}^{+2}]^{10} \cdot [\text{PO}_4^{-3}]^6 \cdot [\text{OH}]^2$$

A temperatura é um parâmetro que tem grande influência na solubilidade dos compostos. Em geral na grande maioria dos casos um aumento de temperatura provoca aumento de solubilidade, isso ocorre devido ao fato de que grande parte dessas reações de dissolução serem endotérmicas, assim o Kps aumenta com o aumento da temperatura indicando também um aumento na solubilidade, no caso de reações exotérmicas nota-se um efeito contrário ou seja diminuição no Kps diminuindo também a solubilidade [FELTRE, 2004].

A seguir é apresentada uma tabela com os valores de Kps de diversos fosfatos de cálcio a 25°C e 37°C:



**Tabela 4: Produto de solubilidade dos fosfatos de cálcio [MCDOWELL, 1977, FÉRNANDEZ, 1999, DOROZHKIN 2009].**

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	-log Kps	-log Kps
		25°C	37°C
<b>Fosfato Tetracálcico (TeCP)</b>	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	38-44	37-42
<b>Hidroxiapatita (HA)</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	119,2
<b>Hidroxiapatita def. em cálcio</b>	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	85,1	85,1
<b>Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)</b>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	25,7	25,7
<b>a - Fosfato tricálcico (a - TCP)</b>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	25,5
<b>β - Fosfato tricálcico (β - TCP)</b>	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	29,5
<b>Fosfato octacálcico (OCP)</b>	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	95,9
<b>Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)</b>	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	6,63
<b>Monohidrogênio fosfato de cálcio (DCP)</b>	$\text{CaHPO}_4$	6,90	7,02
<b>Fosfato Monocálcico Monohidratado (MCPM)</b>	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	-

A seguir na figura 7 são ilustradas as isotermas de vários fosfatos de cálcio em função do pH.

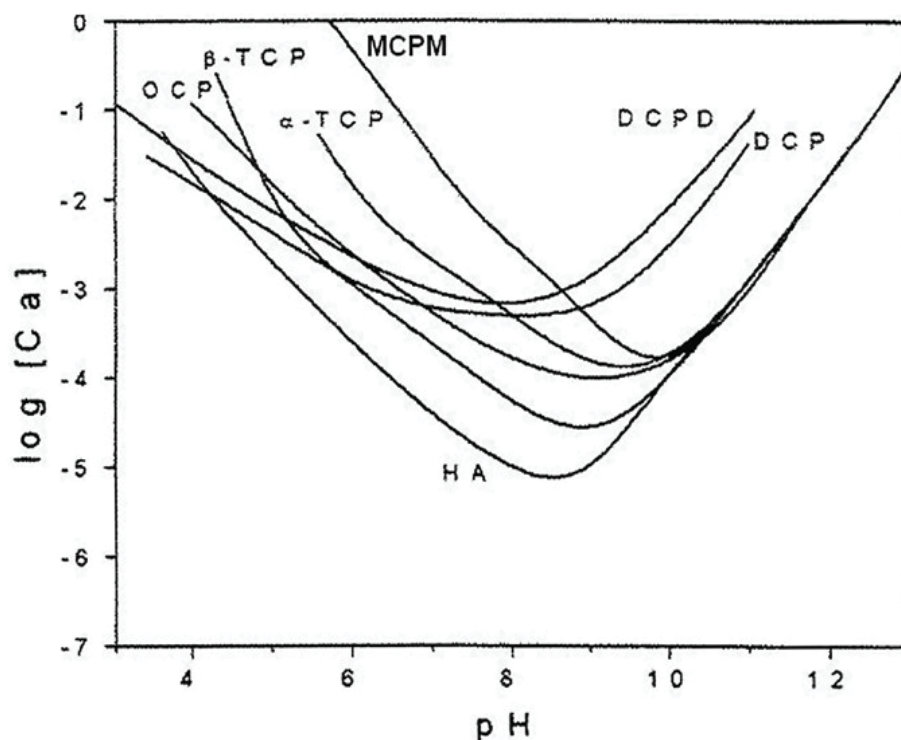


Figura 7: Diagrama de solubilidade para o sistema ternário  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a  $37^\circ\text{C}$ : isoterma de solubilidade mostrando  $\log[\text{Ca}]$  e pH de soluções em equilíbrio com vários sais [LAURENCE, 1991].

Observando as isotermas, nota-se a inclinação negativa nas regiões neutras e ácidas do diagrama de fases o que reflete o fato de que nessa região todos os compostos são mais solúveis conforme o pH diminui. Na região alcalina, a concentração de cálcio aumenta com o aumento do pH. Dessa forma, em pH fisiológico, a solubilidade dos fosfatos de cálcio e, conseqüentemente, sua degradação *in vivo*, é dada pela seguinte ordem:  $\text{MCPM} > \alpha\text{-TCP} > \text{DCPD} > \text{DCP} > \text{OCP} > \beta\text{-TCP} > \text{HA}$  [LAURENCE, 1991].

Após analisar diferentes mecanismos de dissolução das apatitas, Dorozhkin propôs um que é mais aceito hoje em dia que seria uma junção de vários mecanismos encontrados na literatura. O processo envolve uma seqüência de cinco passos principais apresentados a seguir [DOROZHKIN, 2002]:

- a. Difusão de íons da solução (ex:  $\text{H}^+$  e  $\text{OH}^-$ ) para a interface sólido líquido;
- b. Adsorção desses íons na superfície da apatita;
- c. Transformações químicas na superfície;

- d. Desorção dos produtos (íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$ ) da superfície do cristal;
- e. Difusão desses íons para solução;

A presença de outros íons em solução como por exemplo ânions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  ou cátions como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  dentre outros, podem acelerar o processo de dissolução dos fosfatos de cálcio. Isso ocorre devido à alta afinidade iônica que esses possuem com os íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$  presentes nas apatitas, assim, por exemplo, um íon cloreto com carga parcial negativa, esse é fortemente atraído pelo cálcio com carga positiva na superfície, forçando seu desprendimento para a solução.

#### 1.4 Stents

A doença arterial coronária é o tipo mais comum de cardiopatia e uma das maiores causas de morte em todo o mundo. Esta doença surge a partir da aterosclerose, processo em que placas ou depósitos de gordura acumulam-se no interior das paredes das artérias, resultando em estenose, ou seja, estreitamento anormal do um vaso sanguíneo, levando à redução ou até bloqueio do fluxo para o músculo cardíaco [MANI, 2007]. A figura 8 mostra a diferença entre uma artéria saudável e uma artéria com estenose.

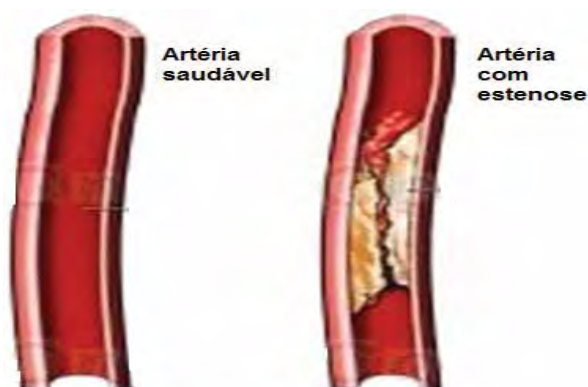
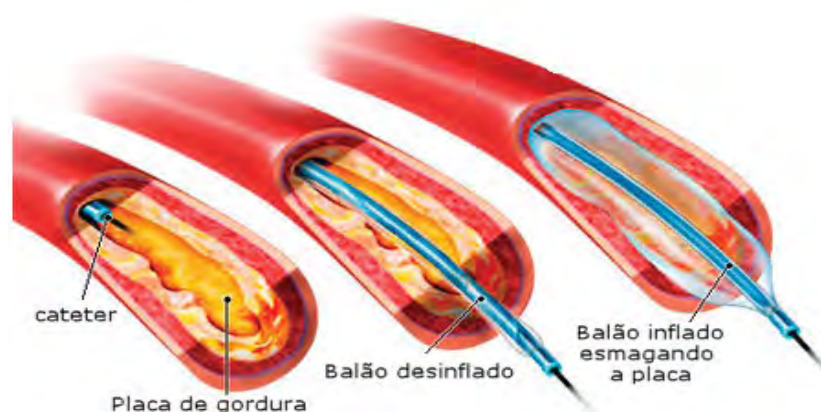


Figura 8: Artéria saudável e artéria com placas de gordura acumuladas.

A técnica de angioplastia coronária transluminal percutânea (ACTP) ou angioplastia com cateter-balão foi introduzida em 1977 e rapidamente tornou-se o

principal método de revascularização coronária da época e o procedimento terapêutico mais freqüentemente utilizado em cardiologia. Essa técnica consiste na inserção de um cateter ligado a um balão inflável na artéria lesionada. Uma vez posicionado no local da lesão o balão é inflado a placa aterosclerótica é expandida e o vaso desobstruído, retomando o fluxo sanguíneo normal [HUNTER, 2006]. A figura 9 ilustra tal procedimento:



**Figura 9: Cateterismo.**

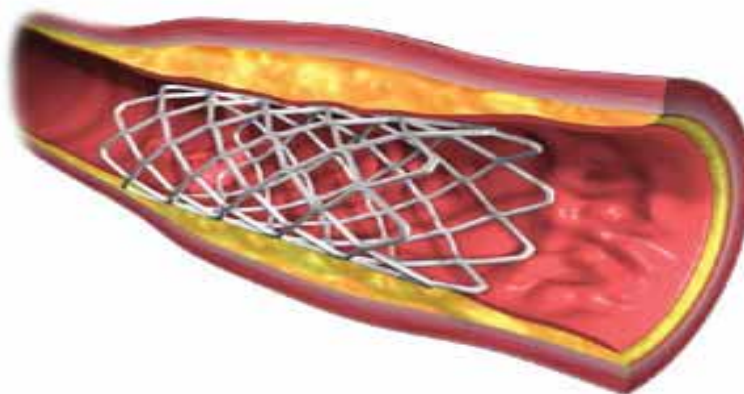
Contudo, o balão causa uma injúria na camada íntima do vaso, levando à reestenose, que pode chegar a 60% em certos grupos de pacientes. A reestenose é uma resposta da parede do vaso a injúria provocada pelo balão e é caracterizada pela proliferação da camada íntima (neo intimal) e a retração elástica da parede do vaso como ilustrado na figura 10 [HUNTER, 2006].



**Figura 10: Reestenose coronária.**

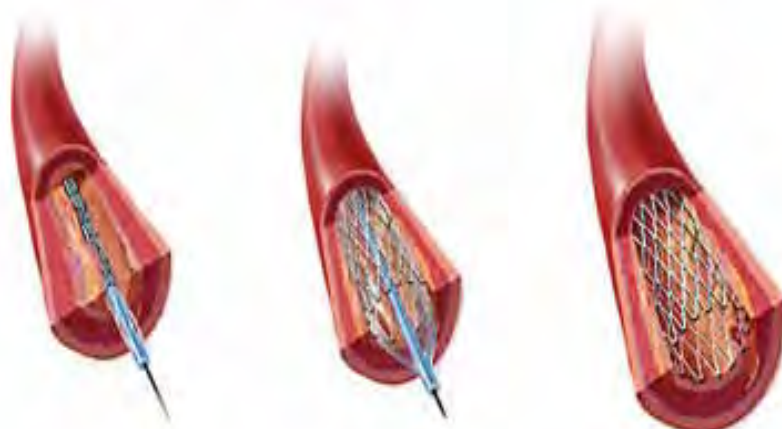
A aplicação de stents, em conjunto com a técnica de angioplastia foi iniciada na década de 90 e revolucionou o tratamento da doença arterial coronária. Stents são

dispositivos destinados à inserção nas veias e artérias com o objetivo de desobstruí-las, para que o sangue volte a fluir normalmente, esta prótese tem a função de prevenir a reestenose coronária, que ocorre de maneira pronunciada com o seu uso (50%), através da eliminação da retração elástica [MANI, 2007 e KIPSHIDZE, 2004].



**Figura 11: STENT Coronário [MELDAU, 2011].**

Os principais tipos de stents vendidos no mercado são feitos geralmente a base de nitinol (48 – 60% Ni e o restante de Ti), aço inoxidável 316L e ligas de cobalto cromo [CHAMIÉ e ABIZAID, 2009]. O processo de inserção do stent é muito parecido com a angioplastia, só que neste caso quando o cateter e o balão deixam a artéria permanece no local da lesão o dispositivo eliminando a retração elástica. A figura 12 ilustra o processo de inserção de um stent.



**Figura 12: Processo de inserção do STENT Coronário.**

Apesar da diminuição nos casos de estenose, a colocação do *stent* também provoca microinjúrias na camada íntima do vaso resultando em um processo inflamatório-cicatrizial e finalmente na reestenose *intra-stent* [KIPSHIDZE, 2004]. Os medicamentos administrados por via sistêmica, na tentativa de inibir o processo de proliferação da camada íntima, não conseguiram atingir concentrações ideais no local da lesão sem provocar efeitos colaterais significativos que suplantassem o benefício do método, partindo desse princípio, começou-se a utilizar o conceito de liberação controlada de fármacos na parede do vaso. Assim, atualmente, a superfície dos *stents* metálicos é modificada não só com a finalidade de melhorar sua biocompatibilidade, mas também para funcionar como plataforma de liberação controlada de fármacos [COSTA, 2005 e MANI, 2007].

A maioria dos *stents* farmacológicos comerciais é revestida com polímeros, constituindo uma plataforma para liberação de fármacos. Contudo, a estes materiais são atribuídas reações inflamatórias resultantes da resposta imunológica de seus produtos de degradação e compostos monoméricos não reagidos, já que esses materiais assim que liberados caem na corrente sanguínea podem se dirigir para locais indesejados dentro do organismo. O recobrimento com substâncias inorgânicas tem sido uma alternativa encontrada para minimizar esses resultados indesejáveis, já que essas, além de serem biocompatíveis, também podem ser utilizadas como matriz para liberação de fármacos em *stents*, reduzindo a resposta toxicológica, ou seja as apatitas possuem grande potencial de utilização [HUNTER, 2006 e MANI, 2007].

Fosfatos de cálcio têm sido utilizados como recobrimentos de implantes metálicos ortopédicos e odontológicos promovendo a estabilização do implante em curto e longo prazo no qual o tipo de interação que prevalece entre metal e apatita é eletrostática [ORÉFICE, 2006].

## *CAPÍTULO II*

---

### **2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

As biocerâmicas possuem ampla faixa de utilização na área de biomateriais satisfazendo diversas aplicações no corpo humano, a esse grupo pertencem às apatitas (biocerâmicas de fosfatos de cálcio) que se apresentam hoje entre os principais materiais estudados e empregados como biomateriais. As fases de apatitas de maior importância biológica são: Hidroxiapatita – HA, Fosfato de Cálcio Amorfo – ACP, Fosfato Octacálcico – OCP, Fosfato Tricálcico – TCP, pois ocorrem com maior frequência nos organismos vivos. As principais propriedades que favorecem a utilização desses compostos na área biomédica são: excelente biocompatibilidade e bioatividade.

A utilização de stents em conjunto com a técnica de angioplastia no tratamento da doença coronária arterial foi um avanço na área cardiológica através da eliminação da retração elástica do vaso sanguíneo. Apesar da diminuição nos casos de reestenose a colocação do stent provoca uma injúria na camada íntima do vaso ocasionando um processo inflamatório o qual resulta em reestenose intra stent. Por esse motivo vem crescendo nos últimos anos o interesse na modificação da superfície desses dispositivos com o intuito de melhorar sua biocompatibilidade, surgindo assim stents eluidores de fármacos no mercado, com a presença de polímeros como plataforma de liberação.

A utilização de stents farmacológicos com a presença de polímeros em contato com a parede vascular tem sido associada à intensa resposta inflamatória local, e uma vez liberados na corrente sanguínea os produtos de degradação desses compostos podem se deslocar para qualquer local dentro do nosso organismo podendo acarretar resultados indesejáveis. Nesse sentido, tem havido crescente interesse no desenvolvimento de novos stents farmacológicos, com diferentes tecnologias para liberação do fármaco sem a presença do polímero.

Uma alternativa para solução desses problemas relacionados à utilização de stents pode ser o emprego de apatitas no lugar dos polímeros já que essas possuem

excelente biocompatibilidade e estudos vêm mostrando que podem ser utilizadas como matriz para liberação controlada de fármacos. Para isso é de extrema importância entender o processo de degradação desses compostos dentro do corpo humano, já que a velocidade de degradação da droga depende da velocidade de degradação da matriz.

Assim o objetivo do presente projeto de pesquisa é analisar o perfil da dissolução *in vitro* das principais fases de apatitas em meios de interesse biológico tais como: água, soro fisiológico e SBF (simulated body fluid - uma solução que simula os fluídos corpóreos), conseguindo assim informações importantes sobre o tempo de degradação desses compostos que podem ajudar a prever o comportamento *in vivo* das apatitas.



# CAPÍTULO III

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Preparação da apatitas.

Para a obtenção das diferentes fases de apatitas utilizou-se um método por via úmida, que se baseia na reação direta entre soluções contendo íons  $\text{PO}_4^{-3}$  (ácido fosfórico) e íons  $\text{Ca}^{+2}$  (hidróxido de cálcio ou carbonato de cálcio). Esse método foi escolhido devido à simplicidade, onde os reagentes possuem grau de pureza adequado. Além disso, o subproduto desta reação é a água, não causando maiores problemas quanto à sua utilização como biomaterial. Cada fase de apatita foi obtida modificando-se a proporção dos reagentes de acordo com a razão Ca/P do fosfato de cálcio de interesse e controlando alguns parâmetros como temperatura, pH e tratamento térmico.

#### 3.1.1 Síntese: ACP/HA/TCP

Para a síntese das fases ACP, HA e  $\beta$ -TCP (fase alotrópica mais comum utilizada como biomaterial), a solução de hidróxido de cálcio foi submetida a aquecimento a 80°C, em seguida, adicionou-se lentamente a solução ácido fosfórico numa quantidade para satisfazer a relação Ca/P=1,6 (uma razão média Ca/P dos três compostos) sob agitação constante. Durante todo o processo a reação se deu em recipiente fechado por um vidro de relógio, possibilitando uma lenta evaporação da água, sendo este aberto somente durante o período necessário para a adição da solução de ácido. Cessada a mistura dos reagentes, o produto foi mantido em aquecimento e agitação até a secagem, e em seguida mantido em estufa por 24h a 60°C. Parte produto obtido foi submetido a tratamento térmico a 800°C por 3 horas, com taxa de aquecimento e resfriamento de 5°C/min, obtendo assim dois pós, um antes e um após o tratamento térmico [RIGO, 2007]. A figura 13 ilustra esse procedimento:

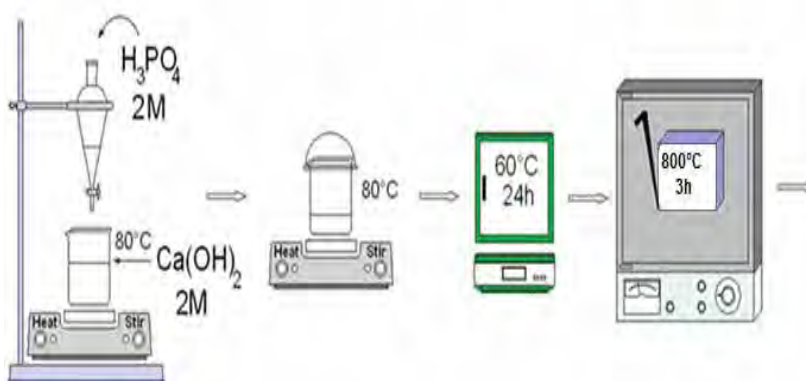


Figura 13: Procedimento experimental para síntese de ACP/HA/TCP.

### 3.1.2 Síntese OCP

A fase de apatita OCP também foi obtida por via úmida. Uma solução de carbonato de cálcio 2,0 mol/L foi submetida a aquecimento a 60°C sob agitação. Estabilizada a temperatura, uma solução de ácido fosfórico 0,3 mol/L foi adicionada gota a gota, numa quantidade para satisfazer a proporção Ca/P em 1,33. Cessada a adição, a mistura resultante foi mantida sob agitação a 60°C. O pH da solução foi mantido em torno de 5,0 com a adição de HNO<sub>3</sub> 1 mol/L. A mistura permaneceu sob agitação constante por 2 horas a 60°C. Terminado esse período, a solução resultante permaneceu em repouso por 24 horas. O produto obtido, depois de filtrado a vácuo, foi seco em estufa a 40° C por 24h [ISHIHARA, 2009]. A figura 14 ilustra esse procedimento.

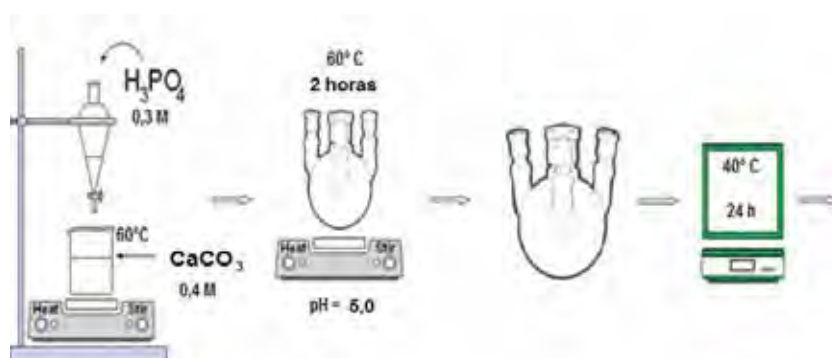


Figura 14: Procedimento experimental para síntese de OCP.

A caracterização das biocerâmicas obtidas foi realizada empregando-se os métodos de Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV, Difratomia de raios X - DRX, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR, e a quantificação de cada fase obtida pelo método de Rietveld.

### **3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV**

A microscopia eletrônica de varredura – MEV é a técnica de caracterização microestrutural mais versátil hoje disponível, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento como engenharia, ciência dos materiais, geociências e ciências biológicas. A interação de um feixe fino de elétrons focalizado sobre a área ou o microvolume a ser analisado gera uma série de sinais que podem ser utilizados para caracterizar a amostra [GOLDSTEIN, 1992].

O microscópio eletrônico de varredura consiste basicamente de uma coluna óptico-eletrônica, da câmara para a amostra, sistema de vácuo, controle eletrônico e sistema de imagem. As imagens no MEV são construídas ponto a ponto, de modo similar à formação de uma imagem de televisão. Um feixe de elétrons de alta energia é focalizado num ponto da amostra, o que causa emissão de elétrons com grande espalhamento de energia, que são coletados e amplificados para fornecer um sinal elétrico. Este sinal é utilizado para modular a intensidade de um feixe de elétrons num tubo de raios catódicos (TRC). Para construir a imagem completa, o feixe de elétrons é varrido sobre uma área da superfície da amostra enquanto que um feixe no TRC é varrido sincronicamente sobre um lastro geometricamente similar, o MEV possibilita a observação e registro de imagens tridimensionais [CHINAGLIA, 1999].

No presente trabalho a Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada em um microscópio JEOL-JSM, modelo T-330 A. Na preparação das amostras em questão foi feito o recobrimento delas com ouro.

### **3.3 Difratomia de raios X – DRX**

A técnica de difração de raios X é muito utilizada na caracterização de materiais cristalinos, tais como metais, compostos intermetálicos, cerâmicas, minerais, polímeros, plásticos ou outros compostos orgânicos ou inorgânicos. A difração de

raios X representa o fenômeno de interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material.

A técnica consiste na incidência da radiação rotacionada por um ângulo  $T$  em uma amostra e na detecção dos fótons, que constituem o feixe difratado, por um detector que está rotacionado por um ângulo  $2T$ .

A intensidade do feixe difratado é normalmente expressa através dos picos que se destacam na linha de base registrados num espectro pela intensidade no ângulo  $2T$ . Desta forma, o padrão difratométrico representa uma coleção de picos, reflexões individuais, cada qual com sua altura, área integrada, posição angular, largura e caudas que decaem gradualmente à medida que se distanciam da posição de altura máxima do pico. Cada composto cristalino apresenta um difratograma característico [GIACOVAZZO, 1994].

A difratometria de raios X – DRX foi realizada utilizando um difratômetro RIGAKU RINT2000 com varredura angular entre  $2$  e  $70^\circ$  com passo de  $0,02$  ( $2\theta$ ), sendo que o tempo de passo foi de  $1.0$  segundo para cada amostra. A interpretação dos dados foi realizada comparando-os com fichas padrões presentes na base de dados mantidas pelo Joint Committee for Powder Diffraction Studies.

**Tabela 5: Número das fichas padrões da base de dados JCPDS utilizadas para identificação das fases de apatita [JCPDS, 2003].**

<b>Fases de apatita</b>	<b>Número das fichas padrões</b>
Hidroxiapatita - HA	74-0565
Hidroxiapatita deficiente em cálcio - HA <sub>D</sub>	86-0740
Fosfato de cálcio amorfo – ACP	18-0303
Fosfato octacálcico – OCP	26-1056
$\beta$ Fosfato tricálcico - $\beta$ TCP	70-2065
DCPD	72-1240
Apatita carbonatada do tipo A	35-0180
Apatita carbonatada do tipo B	19-0272

### **3.4 Método de Rietveld**

Em 1969, Rietveld apresentou um método de refinamento de estrutura cristalina que hoje é usado para resolver diversos problemas permitindo realizar, simultaneamente, refinamento de cela unitária, refinamento de estrutura cristalina e análise quantitativa de fases [RIETVELD, 1969].

O método de Rietveld tem como característica fundamental o ajuste de um difratograma a um padrão difratométrico permitindo assim extrair informações da estrutura cristalina e informações analíticas dos materiais. O padrão difratométrico de um material cristalino pode ser entendido como um conjunto de picos individuais cujas características dos picos: altura, posição, largura, forma e área são dependentes do tipo de átomos e de sua posição no agrupamento atômico repetitivo que forma um cristal [DREELE, 1993].

Diversos métodos são utilizados na Análise Quantitativa de Fase (AQF) por difração de raios X, tendo como premissa básica o fato de utilizarem as intensidades integradas através de comparações entre picos. Entre esses métodos o mais utilizado é o método do padrão interno, nele as intensidades de picos característicos das fases componentes da amostra são relacionadas com picos do padrão interno que em condições ideais deve ter um ou mais picos individualizados, sem sobreposição com quaisquer outros picos.

A teoria envolvida na descrição da Análise Quantitativa de Fases (AQF) pelo método de Rietveld é semelhante às teorias aplicadas nas análises por métodos tradicionais. Este método consiste no ajuste do difratograma experimental a um perfil, o perfil é ajustado, ponto a ponto, ao obtido experimentalmente através do refinamento de vários parâmetros (largura a meia altura dos picos, fator de escala, posições atômicas, radiação de fundo, etc...).

### **3.5 Espectroscopia no infravermelho com transformata de Fourier – FTIR**

A espectrometria no Infravermelho detecta as frequências das vibrações das ligações químicas covalentes dando informações complementares às obtidas por difração de raios X. A radiação infravermelha provoca vibração de átomos ou grupos de átomos de um composto em torno das ligações covalentes que une os átomos, ou grupos de átomos.

A caracterização empregando-se espectrometria no infravermelho envolve a radiação infravermelha que promove transições na molécula, entre os níveis de energia rotacional e vibracional, a partir do menor estado de energia atômica. Em uma molécula diatômica tem-se  $3n$  graus de liberdade, sendo: 3 rotacionais, 3 translacionais e  $3n-6$  vibracionais. Cada grau tem uma banda de frequência fundamental característica e cada modo vibracional dividi-se em dois tipos distintos: vibrações e deformações [SILVERSTEIN, 2006].

Examinam-se geralmente os sólidos na forma de pastilhas com KBr, essa técnica é possível porque o KBr seco e pulverizado (ou outro halogeneto de metal alcalino) pode ser prensado a vácuo para formar discos transparentes, A amostra (0,5 mg a 1,0 mg) é misturada intimamente com cerca de 100 mg do KBr seco pulverizado, a mistura é prensada até formar um disco transparente. Faz se passar um feixe de luz infravermelha pela amostra mistura KBr - amostra e mede a quantidade do feixe absorvido ou transmitido [SILVERSTEIN, 2006].

As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro Perkin Elmer, FT-IR Spectrometer-Spectrum 2000, de reflectância difusa Drift Collector do Instituto de Química –Unesp Araraquara-SP.

**Tabela 6: Frequências de absorção no IV características dos fosfatos [SILVERSTEIN, 1994].**

Grupos	Número de Ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\text{PO}_4^{3-}$	474, 562, 580, 600, 640 e 960-1200.
P-OH	527, 870 e 910-1040.
$\text{CO}_3^{2-}$ (substituição do tipo A)	880, 1450 e 1514.
$\text{CO}_3^{2-}$ (substituição do tipo B)	870, 1412 e 1465.
$\text{OH}^-$ (livre)	630 e 3569.
$\text{OH}^-$ ( $\text{H}_2\text{O}$ )	1600-1650 e 3000-3700.

### 3.6 Estudos de dissolução “*in vitro*”.

As diferentes fases de apatitas foram submetidas aos experimentos de dissolução “*in vitro*”. Foram preparadas pastilhas das biocerâmicas com 1 cm de diâmetro utilizando 0,4g de pó em prensa de cinco toneladas (menor pressão que as pastilhas se estabilizaram na solução sem se dissolver ou rachar). O perfil das curvas foi construído por meio da determinação da liberação de cálcio em função do tempo, a cada 24 horas, para cada pastilha de apatita, em contato com cerca de 150 mL da solução de interesse biológico escolhida (água deionizada, NaCl, SBF) num béquer e sob agitação.

### 3.7 Quantificação de cálcio.

A quantidade de cálcio liberado pelas pastilhas foi medida por duas técnicas diferentes a fim de se aumentar a confiabilidade nos resultados obtidos, comparando os dados nos dois casos.

#### 3.7.1 Titulação complexométrica.

A titulação de cálcio nesse caso foi realizada pelo método clássico com EDTA. O EDTA, ácido etilenodiaminotetracético, tem quatro grupos carboxila e dois grupos amina que podem atuar como doadores de pares de elétrons, ou bases de Lewis. A habilidade do EDTA em doar estes seis pares de elétrons para a formação de ligações covalentes coordenadas a cátions metálicos faz do EDTA um "ligante hexadentado". Entretanto, na prática o EDTA é somente parcialmente ionizado, e então ele forma menos que seis ligações covalentes coordenadas com cátions metálicos. O EDTA dissódico, comumente usado na padronização de soluções aquosas de cátions metálicos de transição, somente forma quatro ligações covalentes a cátions metálicos em valores de pH menores ou iguais a 12. Como nesta faixa de valores de pH os grupos amina mantem-se protonados e então inábeis para doar elétrons para a formação de ligações covalentes coordenadas.

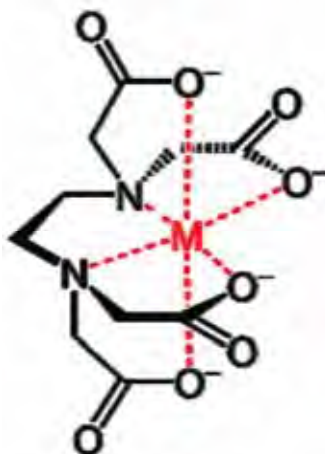
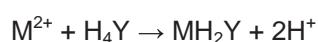


Figura 14: Estrutura do EDTA complexando com o metal.

Em química analítica a abreviatura " $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ " é tipicamente usada para designar EDTA dissódico. Esta abreviatura pode ser usada para denominar qualquer espécie de EDTA. O "Y" representa a molécula de EDTA, e o " $\text{H}_n$ " designa o número de prótons ácidos ligados à molécula de EDTA.

O EDTA forma um complexo octaédrico com a maioria dos cátions metálicos,  $\text{M}^{2+}$ , em solução aquosa. A principal razão pela qual o EDTA é usado tão extensivamente em padronização de cátions metálicos é que a constante de formação para muitos complexos de cátion metálico-EDTA é muito alta, mantendo o equilíbrio da seguinte reação para a direita:



Realizar a reação em uma solução tampão básica remove  $\text{H}^+$  assim que ele é formado, o que favorece a formação de complexo EDTA-cátion metálico como produto da reação. Para a maioria dos propósitos pode ser considerado que a formação do complexo EDTA-cátion metálico chegará ao término, e isto é o principal motivo pelo qual EDTA é usado em titulações / padronização deste tipo [SKOOG, 1992].



### **3.7.2 Eletrodo íon seletivo.**

Os eletrodos seletivos para íons tem sido muito utilizados em análises químicas, consiste basicamente de uma pequena câmara, contendo um eletrodo inerte, envolto num eletrólito e que se comunica com a solução externa (que será medida), por uma membrana que permite a passagem apenas do íon que será analisado. Estas membranas podem ser de plástico especial (por exemplo, para medir oxigênio dissolvido ou CO<sub>2</sub>), de vidro especial (pH), ou de cristais especiais (cloreto, fluoreto, etc). Usado em conjunto de um eletrodo de referência.

O eletrodo íon seletivo é um transdutor que converte a atividade de um determinado íon dissolvido em uma solução em um potencial elétrico que pode ser medido por um voltímetro ou medidor de pH [BAKKER, 2006].

A medida da quantidade de cálcio em solução durante a dissolução *in vitro* das apatitas será realizada utilizando um eletrodo de íon seletivo da marca 4star da Hexis.

## **3.8 Soluções de interesse biológico.**

### **3.8.1 Água deionizada.**

A importância biológica dessa solução é que se trata do principal constituinte do sangue e do corpo humano em geral, a água deionizada é um solvente neutro isento de outros íons que possam acelerar o processo de dissolução afetando a liberação de cálcio.

### **3.8.2 Soro fisiológico.**

A importância biológica do soro fisiológico é que se trata de uma solução isotônica de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> em relação aos líquidos corporais que contém 0,9% em massa de NaCl em água destilada. A solução apresenta um pH=6,0 levemente ácido.

### 3.8.3 Simulated Body Fluid - SBF.

A sigla SBF vem do nome em inglês Simulated Body Fluid, ou seja, é uma solução desenvolvida por Kokubo que simula os líquidos corpóreos reproduzindo a concentração dos íons presentes nesse. A composição dessa solução é apresentada na tabela seguinte:

**Tabela 7: Concentrações iônicas da solução SBF ( $\text{mmol.dm}^{-3}$ ) [KOKUBO, 1998].**

	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Cl}^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{HCO}_3^-$
<b>SBF</b>	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	1.0	0.5	4.2

A ordem de adição dos sais apresentada a seguir deve ser do mais para o menos solúvel evitando assim que ocorra precipitação [APARECIDA, 2006].

**Tabela 8: Seqüência de adição dos sais para preparação da solução SBF.**

Ordem	Substância	Quantidade
1	NaCl	8,003g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,335g
3	KCl	0,224g
4	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,174g
5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071g
6	HCl 1M	40,0mL
7	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,368g
8	MgCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,305g
9	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6,057g

# CAPÍTULO IV

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### 4.1 Caracterização das amostras

#### 4.1.1 Caracterização da síntese: ACP/HA/TCP

##### Caracterização do pó antes do tratamento térmico:

A biocerâmica obtida antes do tratamento térmico na figura 15 apresentou uma morfologia flocular como num aglomerado de partículas tamanho na faixa de 10  $\mu\text{m}$ , característica do ACP. A análise do DRX na figura 16 indicou a presença de ACP, hidroxiapatita deficiente em cálcio - HAd de fórmula química  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ , compostos que são equivalentes em composição química já que os átomos de cálcio e fósforo mantêm a mesma estequiometria, além ainda de fosfato octacálcio – OCP e apatita carbonatada tipo B (substituição de  $\text{CO}_3^{-2}$  proveniente de  $\text{CO}_2$  do ar no grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  da apatita). Os espectros de FTIR indicaram na figura 17 bandas de  $\text{PO}_4^{-3}$  (560, 595 e 965  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{OH}^-$  da água (1650 e 3450  $\text{cm}^{-1}$ ), POH (865, 1035  $\text{cm}^{-1}$ ), indicando presença de ACP juntamente com a HAd além ainda de uma banda característica de apatita carbonatada tipo B (1430  $\text{cm}^{-1}$ ), bandas que confirmam os resultados obtidos no difratograma. A formação do carbonato incorporado se dá pela seguinte reação:



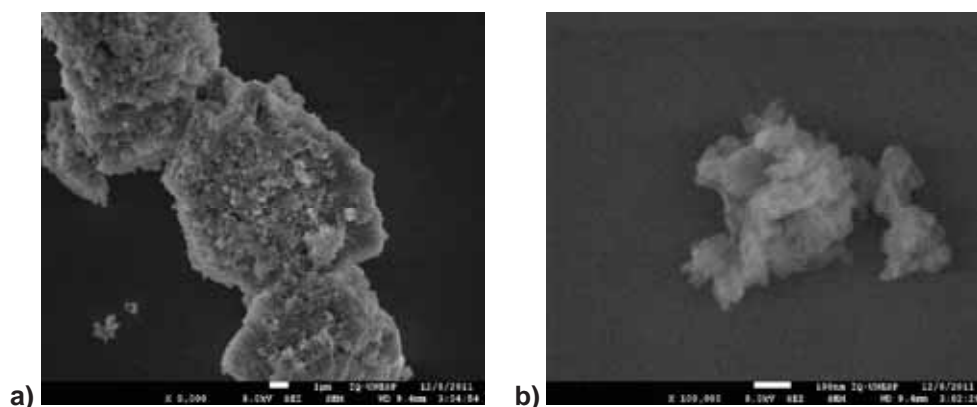


Figura 15: Caracterização da biocerâmica obtida antes do tratamento térmico: a) MEV 5000X, b) MEV 100000X.

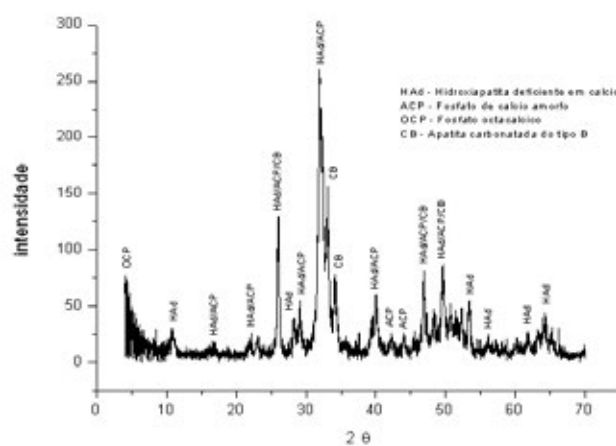


Fig. 16: Difratoograma de raios X da biocerâmica obtida antes do tratamento térmico.

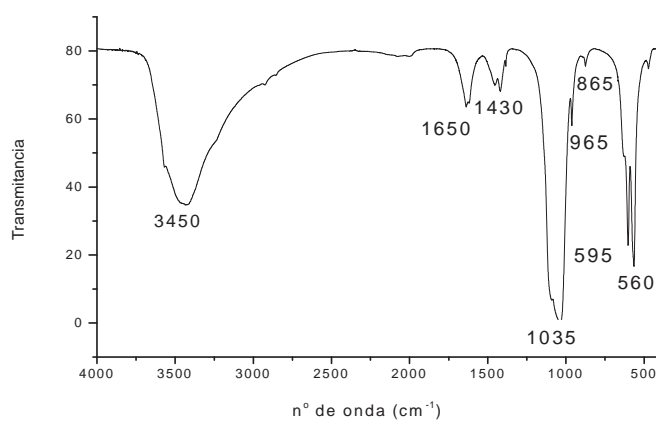


Figura 17: Espectro de Infravermelho da biocerâmica obtida antes do tratamento térmico.

A formação de  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$  - HAd, correspondente em composição química ao ACP, antes do tratamento térmico ocorreu devido à seguinte reação [KANAZAWA, 1989]:



**\*Não foi possível realizar essa quantificação devido à presença da fase amorfa.**

Mesmo não sendo possível realizar a quantificação concluiu-se que as fases ACP e HAd são majoritárias, isso porque a outra apatita presente na amostra o OCP possui um grupo  $\text{H}_2\text{PO}_4$  em sua amostra ou seja um grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  protonado sendo estável apenas em meio ácido e nessa síntese ao final da adição do ácido na base o pH do meio ainda é básico.

### **Caracterização do pó obtido após o tratamento térmico**

A morfologia apresentada pela biocerâmica obtida após o tratamento térmico na figura 18 mostrou um aglomerado de pequenas partículas floculares, parecido com a morfologia encontrada das partículas antes do tratamento térmico com tamanho na faixa de 5  $\mu\text{m}$  ou seja menos quando comparada com o pó antes do tratamento térmico. A análise do DRX na figura 19 indicou a presença de HA,  $\beta$ -TCP (uma das formas alotrópicas do fosfato tricálcico), além de apatitas carbonatadas dos tipos A e B. Os espectros de FTIR na figura 20 indicaram bandas características dos grupos  $\text{PO}_4^{-3}$  (em 570, 600 e 965  $\text{cm}^{-1}$ ), P-OH (em 1035 e 1080  $\text{cm}^{-1}$ ), do grupo  $\text{OH}^-$  livre da HA (em 636 e 3575  $\text{cm}^{-1}$ ). As bandas em 1625 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  são devido à presença de moléculas de água. Além dessas, bandas características de apatita carbonatada do tipo A (1430  $\text{cm}^{-1}$ ) e do tipo B (1405 1456  $\text{cm}^{-1}$ ) apareceram, confirmando o resultado encontrado no difratograma.

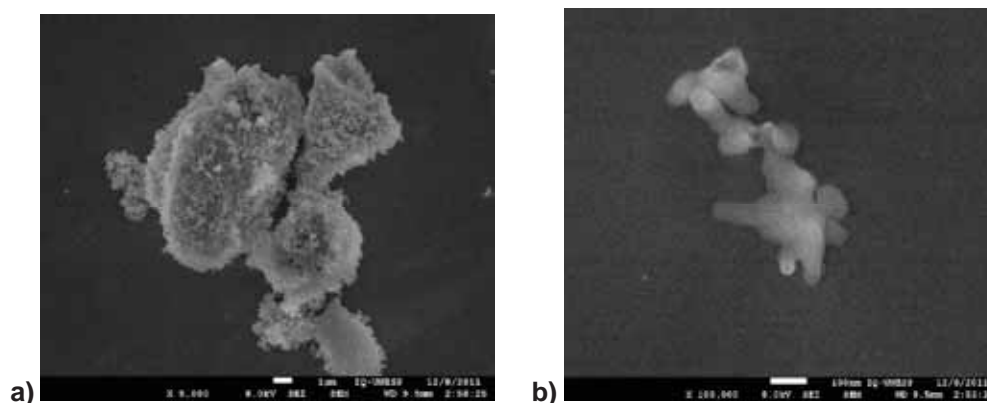


Figura 18: Caracterização da biocerâmica obtida após o tratamento térmico: a) MEV 5000X, b) MEV 100000X.

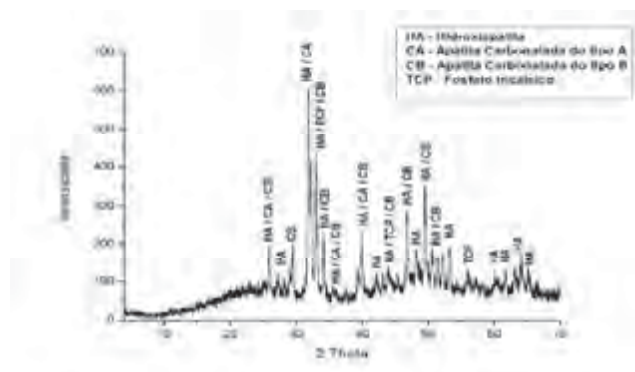


Figura 19: Difratoograma de raios X da biocerâmica obtida após o tratamento térmico.

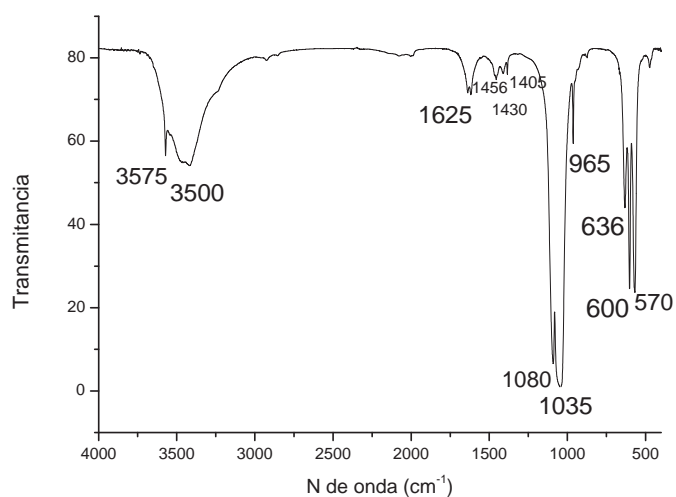


Figura 20: Espectro de Infravermelho da biocerâmica obtida após tratamento térmico.

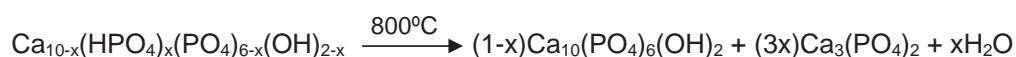
**Tabela 9: Porcentagem das fases de apatitas obtidas, após realização do método de Rietveld para biocerâmica obtida após o tratamento térmico.**

Fases	Apatita (%)
HA	70,09
TCP	21,22
Carbonatada (A)	4,63
Carbonatada (B)	4,06

O tratamento térmico a 800°C de uma hidroxiapatita deficiente em cálcio leva à formação de uma mistura de estruturas cristalinas correspondentes à HA e β-TCP, passando por um intermediário instável o OCP de acordo com as seguintes reações [KANAZAWA, 1989]:



A equação geral da transformação de ACP em HA + β-TCP é:



O tratamento térmico possibilitou a completa cristalização do ACP se convertendo em OCP e posteriormente a HA e β-TCP.

#### 4.1.2 Caracterização da síntese: OCP

A biocerâmica obtida na figura 21 apresentou morfologia no formato de “placas” característica de DCPD com pequenas partículas no formato de agulhas característica do OCP como indicou Komlev com tamanhos de partícula da ordem de 1 μm. A análise do DRX na figura 22 mostra a presença de OCP, DCPD (CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), além de apatita carbonatada tipo B. Os espectros de FTIR na figura 23 apresentaram bandas características dos grupos PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (em 570, 600, 980, 1120 e 1195 cm<sup>-1</sup>), OH<sup>-</sup> de água (1640 e 3500 cm<sup>-1</sup>), POH (530, 875 e 1035 cm<sup>-1</sup>), as quais confirmam presença de OCP, e uma banda de CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> indicando a presença de

apatita carbonatada tipo B ( $1440, 1395 \text{ cm}^{-1}$ ), ou seja, substituição de  $\text{CO}_3^{2-}$  no grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ .

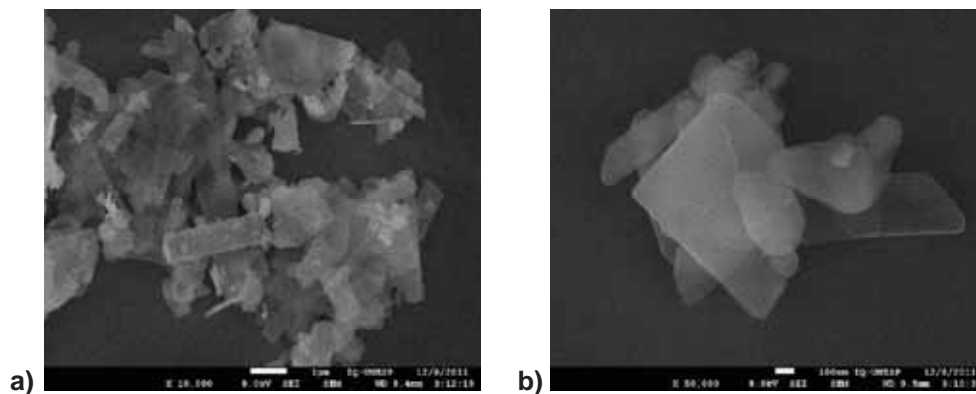


Figura 21: Caracterização da biocerâmica obtida na síntese de OCP: a) MEV 10000X, b) MEV 50000X.

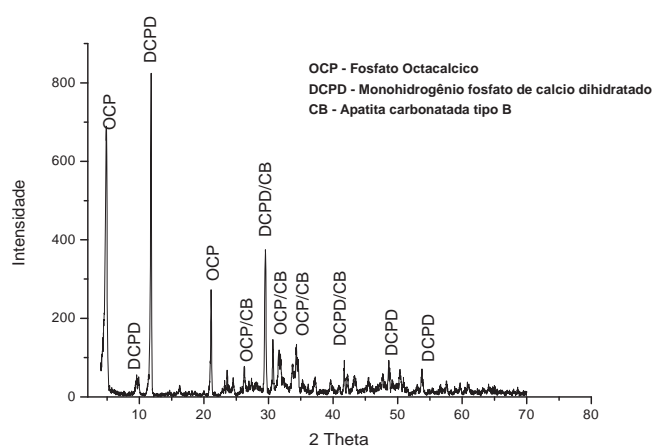


Figura 22: Difratoograma de raios X da amostra OCP.

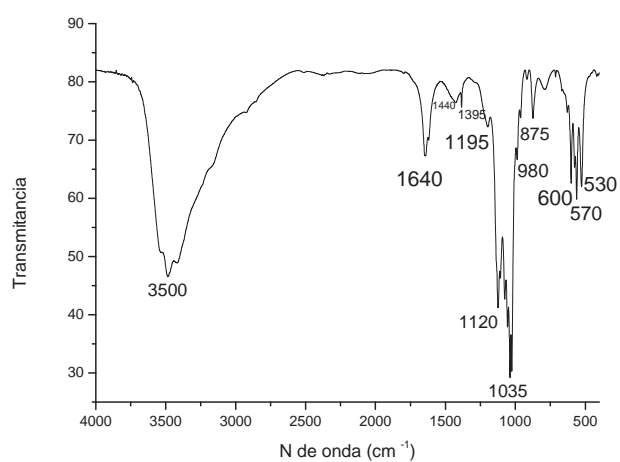


Fig. 23: Espectro de infravermelho da amostra OCP.



**Tabela 10: Porcentagem das fases de apatitas obtidas na síntese do OCP.**

Fases	Apatita (%)
DCPD	54,22
OCP	35,11
Carbonatada (B)	10,63

A formação de OCP ocorre a partir do ACP, apresentando DCPD como intermediário de acordo com a seguinte reação [KANAZAWA, 1989]:



A equação geral da transformação de DCPD em OCP é:



A formação da fase de apatita DCPD ocorreu, pois em valores abaixo de pH 6,6  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  forma-se no lugar de ACP sendo gradualmente convertido o OCP ou HAd.

## 4.2 Estudos de dissolução “*in vitro*”.

As diferentes fases de apatitas (pastilhas) foram submetidas aos experimentos de dissolução “*in vitro*”, empregando-se soluções de interesse biológico (água deionizada, soro fisiológico e SBF). O perfil das curvas foi construído por meio da determinação da liberação de cálcio da pastilha em função do tempo, e as medidas realizadas a cada 24 horas.

A quantificação foi feita por dois métodos diferentes: um método clássico, com EDTA e um método instrumental, com eletrodo de íons seletivo para cálcio.

Em todos os meios estudados o perfil das curvas de solubilidade foi parecido com o apresentado a seguir:

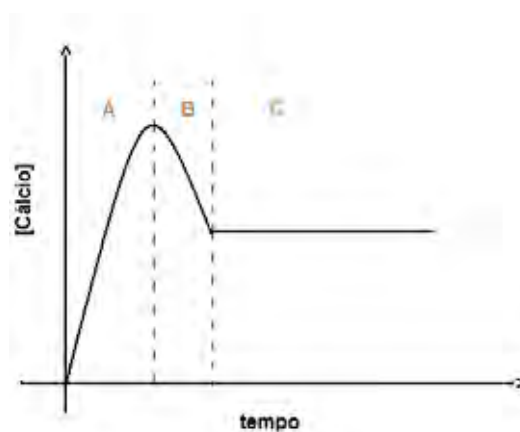


Fig. 24: Curva de solubilidade de apatitas medida em função do cálcio.

O gráfico pode ser dividido em três regiões, denominadas **A**, **B** e **C**. Na região **A**, o cálcio é liberado da superfície da pastilha, aumentando assim sua concentração em solução, podendo ocorrer ao mesmo tempo deposição, por exemplo, se a análise esta sendo feita em solução de soro fisiológico, temos íons  $\text{Cl}^-$  em solução ocorrendo atração de cargas desses com o  $\text{Ca}^{+2}$  liberado formando assim  $\text{CaCl}_2$  que se deposita, porém em pequena quantidade, por isso observa-se a região crescente no gráfico. Após isso na região **B** a concentração decresce isso acontece por que o processo de deposição passa a ocorrer em maior quantidade que a liberação, aparecendo assim uma curva descendente no gráfico. Na região **C** o gráfico torna-se uma reta, momento em que ambos os processos entram em equilíbrio químico, esse

estado é dinâmico, as reações direta e inversa ocorrem na mesma velocidade, não causando mudança aparente no gráfico.

O cálculo da velocidade de dissolução para as diferentes fases de apatitas foi obtido interpolando-se uma reta entre dois pontos na região A da figura 24.

Em cada caso as fases de apatitas apresentaram diferentes tempos de liberação, essa diferença pode ser explicada em termos dos produtos de solubilidade ( $K_{ps}$ ) dos compostos envolvidos. Depois que o processo de liberação entra em equilíbrio químico, se forem mantidas a pressão e a temperatura constantes a Energia livre de Gibbs é igual a zero ( $\Delta G=0$ ), esse parâmetro se relaciona com o produto de solubilidade ( $K_{ps}$ ) através da seguinte equação:

$$\Delta G = - 2,3.R.T. \log K_{ps}$$

Assim como R e T são constantes quanto maior o valor de  $-\log K_{ps}$  maior o valor de  $\Delta G$ , e quanto maior esse valor mais tempo leva para chegar à zero atingindo o equilíbrio.

A seguir são apresentadas e discutidas as curvas de solubilidade para as três amostras de apatitas nos meios de interesse biológico, o tempo de liberação foi analisado primeiro por apenas 15 dias com EDTA, pois se partiu da premissa que ocorria liberação apenas na região crescente do gráfico, depois se observou que a liberação continuava até o momento em que o equilíbrio químico era atingido, portanto o tempo de 15 dias era insuficiente em alguns casos, assim na segunda análise realizada com eletrodo íon seletivo para cálcio o tempo adotado foi maior, 30 dias.

#### 4.2.1 ACP/HAd em água deionizada.

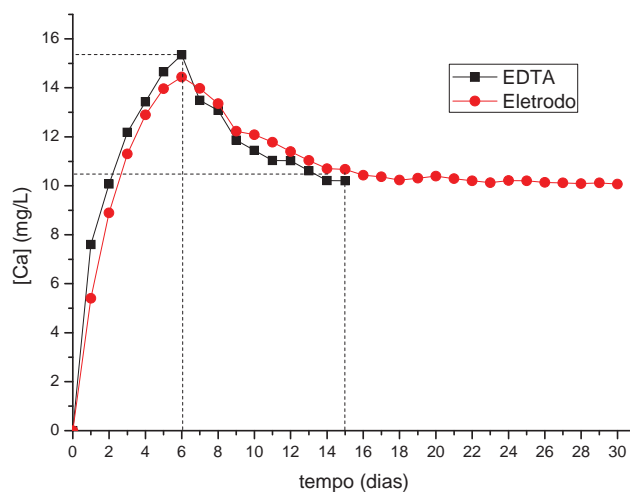


Figura 25: Curva de solubilidade de ACP/HAd em água.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura ACP/HAd em água deionizada sob o pH neutro a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico até o 6º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 15,2 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 15º dia, momento em que ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura ACP/HAd apresenta liberação de cálcio em água deionizada até o 15º dia, nota-se também a concordância nos resultados obtidos nos dois tipos de quantificação. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em  $t=1$  e  $t=5$ .

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{13,8 - 5,3}{8} = 2,1 \text{ mg/dia}$$

#### 4.2.2 Dissolução *in vitro* de HA/TCP em água deionizada.

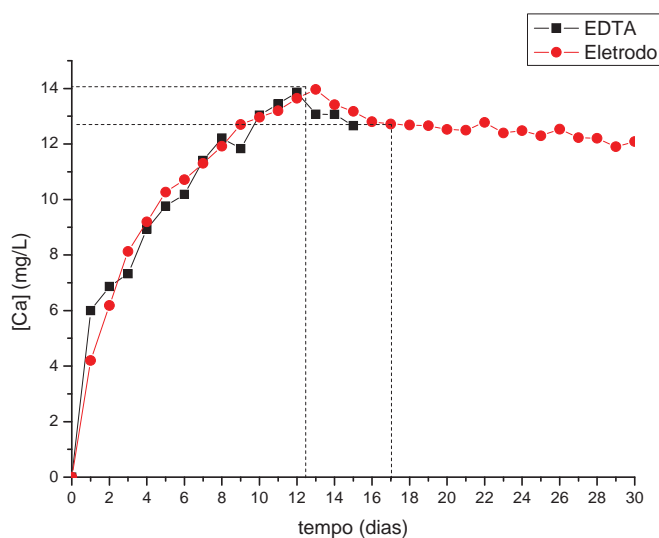


Figura 26: Curva de solubilidade de HA/TCP em água.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura HA/TCP em água deionizada sob o pH neutro a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico até o 12º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 14,1 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 17º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura HA/TCP apresenta liberação de cálcio em água deionizada até o 17º dia, nota-se também a concordância nos resultados obtidos nos dois tipos de quantificação. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em t=4 e t=10.

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{13,2 - 8,9}{10 - 4} = 0,7 \text{ mg/dia}$$

#### 4.2.3 Dissolução *in vitro* de OCP/DCPD em água deionizada.

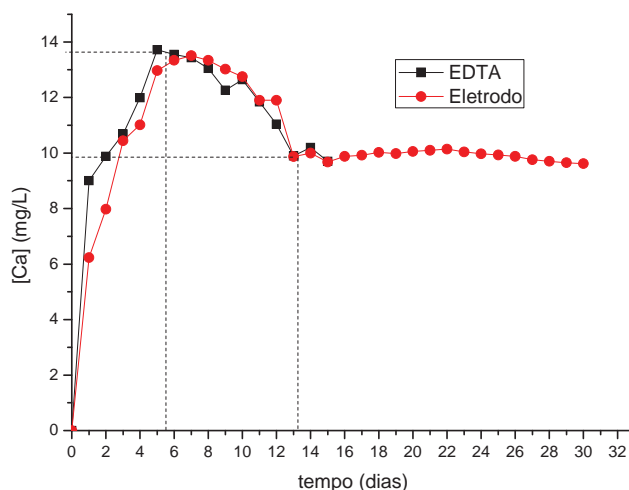


Figura 27: Curva de solubilidade de OCP/DCPD em água.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura OCP/DCPD em água deionizada sob o pH neutro a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico entre o 5º e o 6º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 13,7 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 13º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura OCP/DCPD apresenta liberação de cálcio em água deionizada até o 13º dia, nota-se também a concordância nos resultados obtidos nos dois tipos de quantificação. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em  $t=1$  e  $t=5$ .

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{13,7 - 7,0}{5 - 1} = 1,9 \text{ mg/dia}$$

Analisando-se todos os resultados de dissolução *in vitro* das apatitas em água nota-se os seguintes tempos de liberação:

**ACP/HAd** – 15 dias

**HA/TCP** – 17 dias

**OCP/DCPD** – 13 dias

Assim a ordem dos tempos de liberação em água é dada por:

$$\mathbf{HA/TCP > ACP/HAd > OCP/DCPD}$$

Depois que a liberação entra em equilíbrio químico, se mantivermos pressão e temperatura constantes a Energia livre de Gibbs é igual a zero ( $\Delta G=0$ ), esse parâmetro se relaciona com o produto de solubilidade (Kps) através da seguinte equação:

$$\mathbf{\Delta G = - 2,3.R.T. \log Kps}$$

Quanto maior o valor de  $-\log Kps$ , maior será  $\Delta G$ , e quanto maior esse valor mais tempo leva para chegar à zero atingindo o equilíbrio.

Apesar de o OCP possuir um valor de Kps baixo ( $-\log Kps = 95,9$ ) a fase DCPD possui um valor maior ( $-\log Kps = 6,63$ ) onde este é o componente majoritário na mistura OCP/DCPD, sendo assim o fator decisivo para o menor tempo de liberação apresentado. A mistura que liberou por mais tempo foi HA/TCP o que é explicado pelo fato de dentre todas as fases de apatitas obtidas a Hidroxiapatita é a que tem menor Kps ( $-\log Kps = 117,2$ ) onde essa está presente em maior quantidade que o  $\beta$ -TCP. E por fim a mistura ACP/HAd apresentou tempo de liberação intermediário, isso porque ambas as fases majoritárias dessa mistura possuem um valor de Kps intermediário entre HA e DCPD Kps (ACP) ( $-\log Kps = 25,7$ ) e Kps (HAd) ( $-\log Kps = 85,1$ ).

#### 4.2.4 Dissolução *in vitro* de ACP/HAD em soro fisiológico.

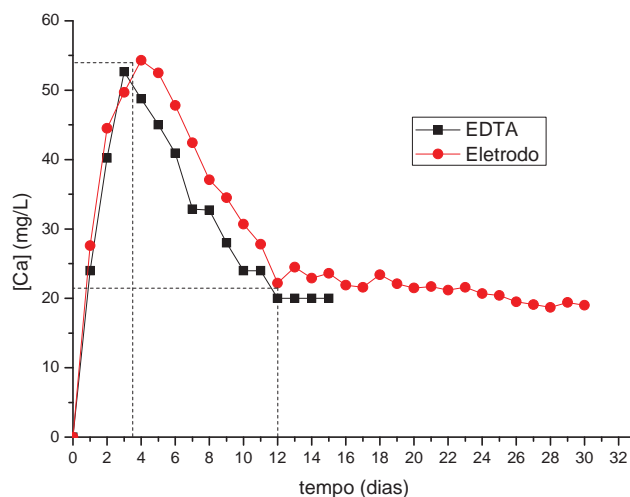


Figura 28: Curva de solubilidade de ACP/HAD em soro fisiológico.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura ACP/HAD em soro fisiológico sob o pH=6,0 a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico até o 3º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 54,0 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 12º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura ACP/HAD apresenta liberação de cálcio em soro fisiológico até o 12º dia, nota-se também a concordância nos resultados obtidos nos dois tipos de quantificação. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em t=1 e t=3.

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{51,2 - 26,7}{3 - 1} = 24,5 \text{ mg/dia}$$



#### 4.2.5 Dissolução *in vitro* de HA/TCP em soro fisiológico.

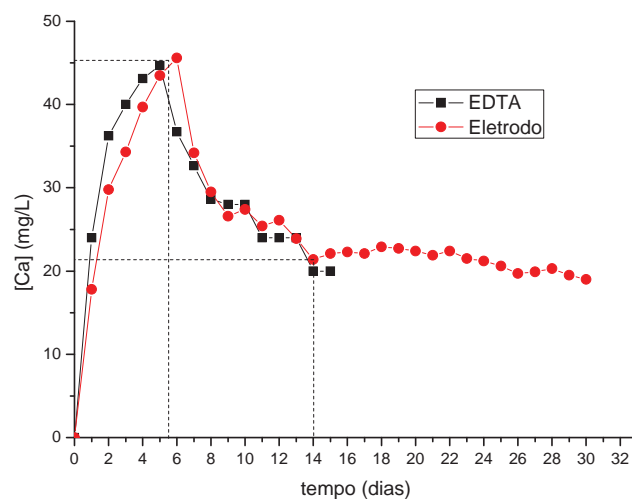


Figura 29: Curva de solubilidade de HA/TCP em água.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura HA/TCP em soro fisiológico sob o pH=6,0 a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico entre o 5º e o 6º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 46,0 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 14º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura ACP/HAd apresenta liberação de cálcio em soro fisiológico até o 14º dia, nota-se também a concordância nos resultados obtidos nos dois tipos de quantificação. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em t=1 e t=5.

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{45,1 - 17,9}{5 - 1} = 6,8 \text{ mg/dia}$$

#### 4.2.6 Dissolução *in vitro* de OCP/DCPD em soro fisiológico.

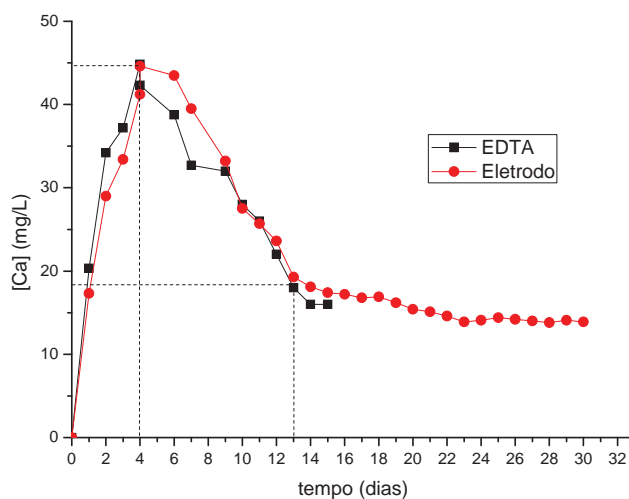


Figura 30: Curva de solubilidade de OCP/DCPD em soro fisiológico.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura OCP/DCPD em soro fisiológico sob o  $\text{pH}=6,0$  a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico até o 4º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de  $44,0\text{ mg L}^{-1}$ . Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 13º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura OCP/DCPD apresenta liberação de cálcio em soro fisiológico até o 13º dia, nota-se também a concordância nos resultados obtidos nos dois tipos de quantificação. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em  $t=1$  e  $t=4$ .

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{44,1 - 18,8}{4 - 1} = 8,4\text{ mg/dia}$$

Analisando-se todos os resultados de dissolução *in vitro* das apatitas em soro fisiológico nota-se os seguintes tempos de liberação:

**ACP/HAd** – 12 dias

**HA/TCP** – 14 dias

**OCP/DCPD** – 13 dias

Assim a ordem de solubilidade em soro fisiológico é dada por:

**HA/TCP > OCP/DCPD > ACP/HAd**

Nesse caso diferente da dissolução em água a mistura ACP/HAd mostrou tempo de liberação menor que a mistura OCP/DCPD isso pode ser explicada devido a transformações que são favorecidas pelo meio ácido da solução:



Como na primeira amostra ocorre à formação de DCPD era esperado que a mistura apresentasse menor tempo de dissolução já que o composto apresenta maior Kps ( $-\log Kps = 6,63$ ) e na mistura original OCP/DCPD parte do DCPD se transforma gradualmente em OCP composto que possui baixo Kps ( $-\log Kps = 95,9$ ) e mesmo assim esse valor é menor que o da hidroxiapatita ( $-\log Kps = 117,2$ ), essa presente em maior quantidade na mistura HA/TCP fez com que a mistura apresentasse maior tempo de liberação.

#### 4.2.7 Dissolução *in vitro* de ACP/HAd em SBF.

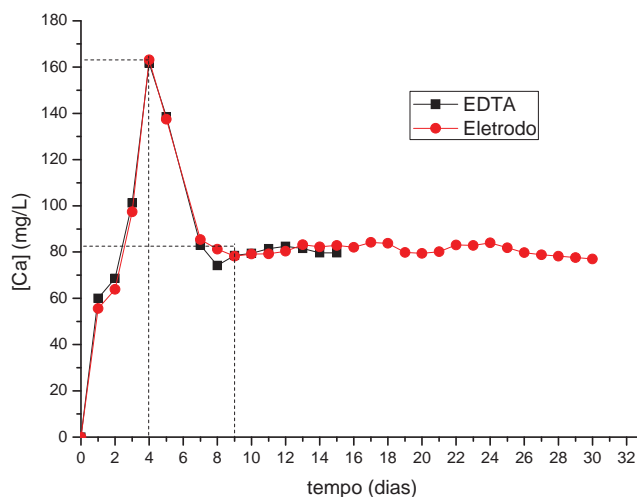


Figura 31: Curva de solubilidade de ACP/HAd em SBF.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura ACP/HAd em solução SBF sob o pH neutro a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico até o 4º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 164,0 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 9º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura ACP/HAd apresenta liberação de cálcio em SBF até o 9º dia, nota-se também a concordância nos resultados obtidos nos dois tipos de quantificação. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em t=0 e t=4.

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{164,0 - 0}{4 - 0} = 41,0 \text{ mg/dia}$$

#### 4.2.8 Dissolução *in vitro* de HA/TCP em SBF.

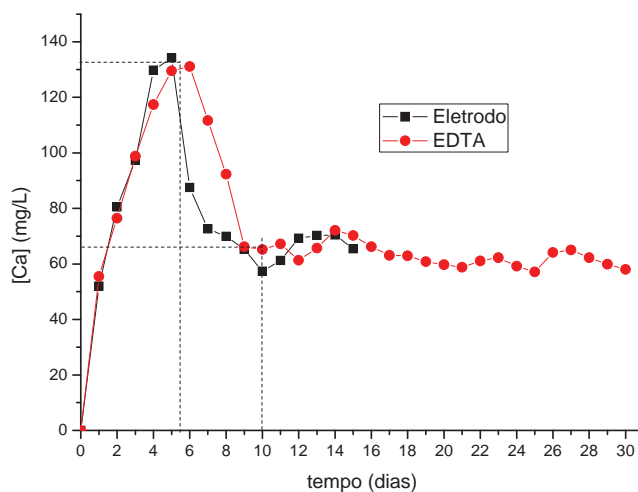


Figura 32: Curva de solubilidade de HA/TCP em SBF.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura HA/TCP em solução SBF sob o pH neutro a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico até o 5º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 133,0 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 10º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura HA/TCP apresenta liberação de cálcio em SBF até o 10º dia. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em t=0 e t=5.

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{133,0 - 0}{5 - 0} = 26,6 \text{ mg/dia}$$

#### 4.2.9 Dissolução *in vitro* de OCP/DCPD em SBF.

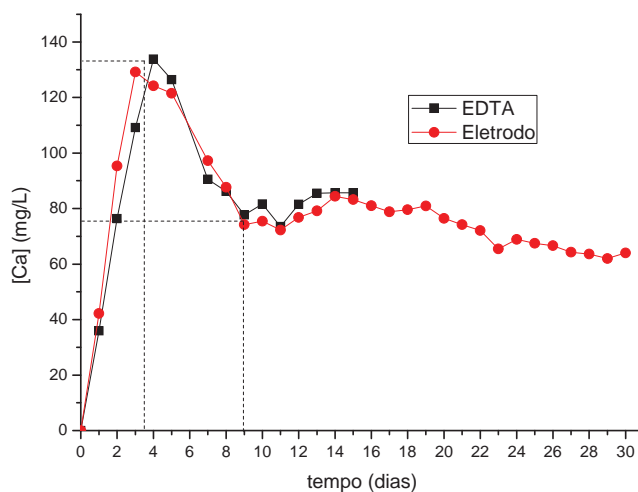


Figura 33: Curva de solubilidade de OCP/DCPD em SBF.

Analisando-se as curvas de dissolução da mistura OCP/DCPD em solução SBF sob o pH neutro a 37 °C, ao longo de 15 dias com EDTA e 30 dias com eletrodo íon seletivo, observa-se uma região crescente no gráfico até o 4º dia, com a concentração máxima atingindo cerca de 132,0 mg L<sup>-1</sup>. Após esse período, a dissolução continua, porém em quantidade menor que a deposição até o 9º dia, onde ambos os processos entram em equilíbrio químico ( $\Delta G=0$ ). Dessa forma, a mistura OCP/DCPD apresenta liberação de cálcio em SBF até o 9º dia. Calculando-se a velocidade de dissolução, pegando-se os pontos em t=0 e t=4.

$$v = \frac{\Delta[\text{Ca}]}{\Delta t}$$

$$v = \frac{132,0 - 0}{4 - 0} = 33 \text{ mg/dia}$$

Analisando-se todos os resultados de dissolução *in vitro* das apatitas em SBF nota-se os seguintes tempos de liberação:

**ACP/HAd** – 9 dias

**HA/TCP** – 10 dias

**OCP/DCPD** – 9 dias

Assim a ordem de solubilidade em água é dada por:

$$\text{HA/TCP} > \text{OCP/DCPD} = \text{ACP/HAd}$$

Novamente a mistura HA/TCP apresentou maior tempo de liberação, devido ao baixo Kps da hidroxiapatita. (-log Kps = 117,2) componente majoritária. Ambas as misturas OCP/DCPD e ACP/HAd apresentaram tempo de liberação de 9 dias, apesar de possuírem diferentes produtos de solubilidade existe alta influência dos íons em solução o que acelera o processo de dissolução não havendo diferença significativa nos tempos dessas duas amostras quando as medidas são feitas em intervalos de 24 horas.

A seguir são apresentadas duas tabelas comparando-se os tempos e as velocidades de dissolução em todos os meios estudados.

**Tabela 11: Tempo para o processo de dissolução das apatitas atingir equilíbrio químico.**

	Água deionizada	Soro fisiológico	SBF
<b>ACP/HAd</b>	15 dias	12 dias	9 dias
<b>HA/TCP (70/20%)*</b>	17 dias	14 dias	10 dias
<b>OCP/DCPD (35/54%)*</b>	13 dias	13 dias	9 dias

\*a porcentagem restante pertence às fases correspondentes as apatitas carbonatadas.

Tabela 12: Velocidade e tempo de dissolução das apatitas nos meios de interesse biológico.

	Água deionizada		Soro fisiológico		SBF	
	Velocidade	dias	Velocidade	dias	Velocidade	dias
ACP/HAd	2,1 mg/dia	6	24,5 mg/dia	3	41 mg/dia	4
OCP/DCPD (35/54%)*	1,9 mg/dia	5-6	8,4 mg/dia	4	33 mg/dia	4
HA/TCP (70/20%)*	0,7 mg/dia	12	6,8 mg/dia	5-6	26,6mg/dia	6

\*a porcentagem restante pertence às fases minoritárias correspondentes as apatitas carbonatadas.

De forma geral, em meios com pH ácido todas as fases de apatita apresentam elevada solubilidade, assim, observa-se que o menor valor de pH da solução de soro fisiológico (pH=6,0) e a presença de íons  $\text{Cl}^-$  em solução levaram a uma dissolução das diferentes fases de apatita em períodos inferiores e quantidades maiores aos observados utilizando-se em água deionizada já que o  $\text{Cl}^-$  com sua carga negativa tende a forçar o desprendimento de  $\text{Ca}^{+2}$  com sua carga positiva da superfície da pastilha para solução.

Na solução SBF apesar do pH neutro a presença de grande quantidade de íons em solução como por exemplo ânions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  ou cátions como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  aceleraram o processo de dissolução dos fosfatos de cálcio devido à alta afinidade iônica que esses possuem com os íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$  presentes nas apatitas, assim, por exemplo, um íon sulfato com carga negativa, atrai fortemente o cálcio com carga positiva na superfície, onde a interação de cargas opostas força o desprendimento de  $\text{Ca}^{+2}$  para a solução. Nesse caso, a presença de grande quantidade de íons auxiliou numa liberação maior de cálcio e períodos inferiores do que nas outras soluções.

Analisando ainda a tabela 12 consegue-se relacionar a velocidade de dissolução com o tempo para concentração atingir seu valor máximo, ou seja, quanto maior a velocidade mais rapidamente a dissolução atinge, com exceção das amostras ACP/HAd e OCP/DCPD em SBF. Mesmo apresentando diferentes velocidades observaram-se tempos iguais em SBF, isso devido a alta influência dos íons em solução que aceleram esse processo e fez com que um intervalo de medida de 24



horas fosse insuficiente para diferenciar os dois casos, por exemplo se as medidas estivessem sendo feitas a cada duas horas a amostra ACP/HAd apresentaria menor tempo.

Assim dependendo da aplicação uma determinada fase pode ser escolhida, por exemplo, se quiser uma liberação mais rápida escolho uma fase com velocidade de dissolução maior, se preferir liberação mais lenta escolhe-se uma fase que se dissolva mais lentamente.

# CAPÍTULO V

## 5. CONCLUSÕES

As principais fases que se depositaram no início da reação direta de soluções contendo íons  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $\text{Ca}^{+2}$  foram fosfato de cálcio amorfo – ACP e hidroxiapatita deficiente em cálcio HAd, compostos que podem ser considerados equivalentes em composição química devido a estequiometria em átomos de Cálcio e Fósforo que eles possuem entre si.

O tratamento térmico da amostra contendo ACP e HAd possibilitou a formação de outras apatitas que são a Hidroxiapatita - HA, e uma das fases alotrópicas do fosfato tri cálcico o  $\beta$ -TCP.

Após a precipitação de ACP e HAd um meio ácido propiciou a formação de DCPD e uma suave agitação levou ainda a transformação desse para OCP. Nessa e em todas as outras sínteses aparecem também apatitas carbonatadas.

Observou-se, que em todos os meios estudados as diferentes fases de apatitas apresentaram ordem de degradação *in vitro* de acordo com o esperado, ou seja, quanto menor o produto de solubilidade do composto, menor será a solubilidade e tempo de liberação.

Em água deionizada, meio neutro, a quantidade de cálcio liberada foi menor do que nas outras soluções, onde a ordem de dissolução *in vitro* foi: HA/TCP > ACP/HAd > OCP/DCPD.

Em soro fisiológico (NaCl 0,9%) pH=6,0, a quantidade de cálcio liberada foi maior que em água deionizada, onde a ordem de dissolução foi: ACP/HAd > OCP/DCPD > HA/TCP. O meio ácido propiciou a transformação de ACP para DCPD, e de DCPD para OCP.

Em solução SBF a quantidade de cálcio liberada foi à maior dentre os três testes devido à presença de muitos íons em solução, onde a ordem de dissolução encontrada foi: HA/TCP > OCP/DCPD = ACP/HAd. Em todos os meio estudados a

amostra contendo hidroxiapatita como componente majoritária apresentou maior tempo de liberação.

## **6. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.**

- Incorporar o fármaco na apatita;
- Estudar a cinética de liberação do fármaco na matriz inorgânica;
- Depositar o sistema apatita/fármaco em superfícies de stents;

## Referências

---

- AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokyo: Takayama Press System Center, 1991. 230 p.
- APARECIDA, A. H. **Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético**: estudo da influência dos ions  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $HCO_3^-$  na formação das fases cristalinas da HA. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.
- ATKINS, P. W. **Físico-química**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. v. 2, p. 382.
- BAKKER, E.; QIN, Y. Electrochemical sensors. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3965-3984, 2006.
- BOSCHI, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? In: CONGRESSO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE METELURGIA, 50., 1996, São Pedro, 1995. **Anais...** São Paulo: ABM, 1996. v. 6, p. 43-53.
- CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais**: uma introdução. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 266.
- CAO, W.; HENCH, L. Bioactive materials. **Ceramics International**, v. 22, n. 6, p. 493-507, 1996.
- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Materiais avançados no Brasil 2010-2022**. Brasília,DF, 2010. p. 297.
- CHAMIÉ, D.; ABIZAID, A. Stent cronus: chegou o momento de adotarmos um stent nacional? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 17, n. 3, p. 300-304, 2009.
- CHINAGLIA, C. R. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura e microanálise**. São Carlos: Ed. UFSCar, 1999. Cap. 1, p 1-31.
- COSTA, M. A.; SIMON, D. I. Molecular basis of restenosis and drug eluting stents. **Circulation**, v. 111, p. 2257-2273, 2005.
- DEKKER, R. J. et al. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. **Biomaterials**, v. 26, n. 25, p. 5231-5239, Sept. 2005.

- DOROZHKIN, S. V. A review on the dissolution models of calcium apatites. **Progress in Crystal Growth and Characterization**, v. 44, p. 45-61, 2002.
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**, v. 2, p. 404-411, 2009.
- DREELE, R. B. V. Combined X – ray and neutron Rietveld refinement. In: YOUNG, R. A. (Ed.). **The Rietveld method**. Oxford: International Union of Crystallography, 1995. Cap. 12. (IUCr Monographs on Crystallography, 5).
- ELTOHAMY, M. et al. Electrospayed tricalcium phosphate spherical microcaps and antibiotic drug delivery. **Materials Letters**, v. 65, p. 2043-2046, Apr. 2011.
- FELTRE, R. **Físico química**. 6. ed. São Paulo: Moderna, 2004. v. 2.
- FERNÁNDEZ, E. et al. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, p. 169-176, 1999.
- GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of crystallography**. Oxford: Oxford University Press, 1994. 432 p.
- GIARDINA, M. A.; FANIVICH, M. A. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  assisted by ultrasonic irradiation. **Ceramics International**, v. 36, p. 1961-1969, Apr. 2010.
- GOLDSTEIN, J.; NEWBURY, D. E. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis** : a text for biologist, materials scientist and geologists. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1992. 661 p.
- HENCH, L. L.; WILSON, J. **An introduction to bioceramics**. London: World Scientific, 1993. v. 1, 386 p.
- HILL, R. J.; HOWARD, C. J. Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld Method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 20, p. 467-474, 1987.
- HUNTER, W. L. Drug eluting stents: beyond the hyperbole. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 347-349, 2006.
- ISHIHARA, T. et al. New concept bioceramics composed of octacalcium phosphate (OCP) and dicarboxylic acid-intercalated OCP via hydrothermal hot-pressing. **Material Science and Engineering C**, v. 29, p. 1885-1888, 2009.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARD. **ISO 10993**: biological evaluation of medical devices. Disponível em:  
<<http://www.iso.org/iso/en/ISOOnline.frontpage>>. Acesso em: 13 fev. 2011.
- JOINT COMMITTEE POWDER DIFFRACTION STANDARD. **Diffraction data base**. Newton Square: International for Diffraction Data, 2003. 1 CD-ROM.

JULIEN, M. et al. Physico-chemical–mechanical and *in vitro* biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. **Biomaterials**, v. 28, p. 956-965, Feb. 2007.

KANAZAWA, T. **Inorganic phosphate materials**. 2nd ed. Tokyo: Kodansha, 1989. p. 79-98.

KIPSHIDZE, N. et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, p. 733-739, 2004.

KOMLEV, V. S. et al. Synthesis of octacalcium phosphate by precipitation from solution. **Chemical Technology**, v. 432, n. 6, p. 782-786, Feb. 2010.

KOKUBO, T. Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. **Acta Materialia**, v. 46, n. 7, p. 2519-2527, 1998.

LAURENCE, C. C. Development of self-setting calcium phosphate cements. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 99, n. 10, p. 954-964, 1991.

LEGEROS, J. P. Dense hydroxyapatite. In: HENCH, L. L.; WILSON, J. (Ed.). **An introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific, 1993. p. 139-180.

MADSEN, H. E. L. Influence of foreign metal ion on crystal growth and morphology of brushite ( $\text{CaPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and its transformation to octacalcium phosphate and apatite. **Journal of Crystal Growth**, v. 310, p. 2602-2612, Jan. 2008.

MANI, G. et al. Coronary stents: a materials perspective. **Biomaterials**, v. 28, p. 1689-1710, 2007.

MATSUMOTO, N. et al. Thermal stability of  $\beta$ -tricalcium phosphate doped with monovalent ions. **Materials Research Bulletin**, v. 44, p. 1889-1894, May 2009.

McDOWELL, H.; GREGORY, T. M.; BROWN, W. E. Solubility of  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  in the system  $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  at 5, 15, 25, and 37 degree. **Journal of Research of the National Bureau of Standards, Section A: Physics and Chemistry**, v. 81, p. 273-281, 1977.

MELDAU, D. C. **Stent cardíaco**. 2011. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/medicina/stent-cardiaco>>. Acesso em: 14 set. 2011.

OKADA, M.; FURUZONO, T. Hydroxyapatite nanocrystal coating on biodegradable microspheres. **Materials Science and Engineering B**, v. 173, p. 199-203, Dec. 2009.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.

PARK, J. B.; LAKES, R. S. **Biomaterials**: an introduction. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1992. p. 79.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science**: an introduction to materials in medicine. 2nd ed. Washington: Elsevier, 2004. p. 181.

RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 2, p. 65-71, 1969.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBORINARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Dental Press Periodontia Implantol**, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994. 460 p.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles of instrumental analysis**. 4th ed. New York: Saunders, 1992. p. 995.

SUN, R.; CHEN, K.; LU, Y. Fabrication and dissolution behavior of hollow hydroxyapatite microspheres intended for controlled drug release. **Materials Research Bulletin**, v. 44, p. 1939-1942, July 2009.

VALLET-REGI, M. Introduction to the world of biomaterials. **Anales de Quimica International Edition**, v. 93, p. 6-14, 1997.

WILLIAMS, D. F. **Concise encyclopedia of medical and dental materials**. Oxford: Pergamon Press, 1991. 52 p.

YIN, X.; STOTT, M. J. Biological calcium phosphates and Posner's cluster. **Journal of chemical physics**, v. 118, n. 8, p. 3717-3713, Feb. 2003.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.