



UNICAMP



1150060842



IQ
T/UNICAMP B461s

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Físico-Química

Solubilidade de fosfatos de cálcio em fluido corpóreo simulado. Biocompatibilidade e propriedades da interface fosfato de cálcio/solução.

Dissertação de Mestrado

Aluno: Sérgio Bertazzo

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

Campinas fevereiro de 2004

UNIDADE	I Q
Nº CHAMADA	T/VN 557
	B461s
V	EX
TOMBO BC	60942
PROC.	16.117.04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,000
DATA	18.11.04
Nº CPD	

3h Id 332013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

B461s

Bertazzo, Sérgio.

Solubilidade de fosfatos de cálcio em fluido corpóreo simulado: biocompatibilidade e propriedades da interface fosfato cálcio/solução / Sérgio Bertazzo. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientador: Celso Aparecido Bertran

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biocerâmica. 2. Osso. 3. Interface.
4. Fase óssea. I. Bertran, Celso Aparecido.
II. Universidade Estadual de Campinas. III Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho a quem praticamente se tornou uma química – Ju.

Agradecimentos

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

A Oxieteno do Brasil pelo fornecimento de reagentes para a síntese dos fosfatos de cálcio.

Aos colegas de Laboratório.

Sumula Curricular

Formação Acadêmica

- Bacharelado em Química (1998-2001)

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Conclusão - dezembro/2001

Experiência em Pesquisa

- Iniciação Científica – Bolsa CNPq (2000-2001)

Orientador: Prof. Dr.Celso Aparecido Bertran.

Título: “Cinética de Dissolução de Fosfatos de Cálcio Miméticos da Matriz Óssea.”
(2000-2001).

- Iniciação Científica – Bolsa CNPq (1999-2000)

Orientador: Prof. Dr.Celso Aparecido Bertran.

Título: “Propriedades de Interface e Equilíbrio nos Sistemas Fosfato de Cálcio/Soluções Aquosas.”(1999-2000).

Publicações

Trabalhos Apresentados em Congressos Científicos, Simpósios e Reuniões Científicas Nacionais.

- S. Bertazzo, C. A. Bertran, Cinética de Dissolução de Fosfatos de Cálcio Miméticos da Fase Inorgânica dos Ossos. 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, Poços de Caldas - MG, Maio de 2002.

Trabalhos Submetidos a Periódicos Internacionais.

- S. Bertazzo, C. A. Bertran, Dissolution Kinetics of Nanoparticulate Calcium Phosphates and Inorganic Bone Phase. Colloid and Surface B. Biointerfaces. Novembro/2003
- S. Bertazzo, C. A. Bertran, Bone Characterization. Chemical and physical aspects of the inorganic bone phase from femurs and craniums of rats of different ages. Calcified Tissue International. Novembro/2003
- S. Bertazzo, C. A. Bertran, A. V. S. Souza, C. C. Osawa, C. Z. Cludi, L. J. M. Allegretti, Sistema de baixo custo utilizado para resfriamento. Uma alternativa aos banhos termostatizados. Química Nova. Novembro/2003

Experiência em Ensino

Programa de Estágio Docente

- Disciplina: Físico-Química Experimental I (Segundo semestre de 2003).

Local: Instituto de Química – UNICAMP – Campinas – SP.

Resumo

Os fosfatos de cálcio, representados por uma série de compostos inorgânicos, são de grande importância para o homem. Além do uso como fertilizantes na agricultura, estes compostos são os principais constituintes inorgânicos dos tecidos duros, os ossos e dentes.

As modificações que ocorrem na superfície dos fosfatos de cálcio, têm sido consideradas como um dos fatores determinantes na interação dos sistemas vivos com estes materiais. Essas interações ocorrem, quer em processos de osteogênese quer em processos que levam à adsorção e adesão de células e proteínas sobre a superfície de implantes constituídos ou revestidos com estes fosfatos.

Com o intuito de melhorar o entendimento da dissolução dos fosfatos de cálcio, o modelo da camada de cálcio para a dissolução dos fosfatos foi adaptado para tratar como parâmetro experimental à variação da concentração de íons cálcio presentes na solução em função do tempo. Este parâmetro experimental foi determinado por medidas com eletrodo de íon seletivo para cálcio.

O número de sítios disponíveis para a adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio (n_s), foi determinado neste trabalho. A determinação de n_s nas cinéticas de dissolução realizadas em Fluido Corpóreo Simulado (FCS), em vários pH, com os fosfatos de cálcio estudados, mostra que apesar da diferença de pH onde os fosfatos de cálcio são dissolvidos, o valor de n_s praticamente não se altera ao final da cinética de dissolução.

O trabalho desenvolvido permitiu também determinar valores numéricos para os parâmetros K , relacionado com a força da adsorção de íons cálcio na superfície do fosfato. Ao obter os valores de n_s e K , este trabalho expande e generaliza o modelo inicialmente proposto, ajudando de forma significativa a melhorar o entendimento sobre a dissolução dos fosfatos de cálcio.

SOLUBILITY OF CALCIUM PHOSPHATES IN SIMULATED BODY FLUID BIOCOMPATIBILITY AND PROPERTIES OF THE INTERFACE CALCIUM PHOSPHATE/SOLUTION.

The changes that occur at the surface of calcium phosphates along the dissolution process have been considered as one of the key factors in the interaction between living systems and these materials. This is true for osteogenesis as well as for processes that lead to the adsorption and adhesion of cells and proteins to the surface of implants composed of or coated with these phosphates.

With a view to improving comprehension of the dissolution process of calcium phosphates, the calcium layer model for the dissolution of calcium phosphates was adapted to treat the variation of the calcium ion concentration in the solution as an experimental parameter. This parameter was determined by a calcium ion selective electrode.

The determination of n_s , number of sites available for adsorption at the surface of the phosphates, in Simulated Body Fluid (SBF) for the phosphates studied, indicate that in spite of the difference in medium (pH) where the phosphate is dissolved and the differences existing among the calcium phosphates, the value of n_s is similar for all the calcium phosphates at the end of the dissolution process, indicating the formation of a similar surface for the different calcium phosphates.

In this work, numeric values for the parameters K , related to the adsorption of calcium ions on the surface of the phosphate, and n_s values were determined without previous knowledge either of the stoichiometry of the calcium phosphate, or of the pH of the solution used in the dissolution of the materials. This work expands and generalizes the initially proposed model by obtaining the values of n_s and K , which help to improve the understanding of the dissolution of calcium phosphates.

The conclusions presented in this work are remarkable when compared with the results of the literature, most of which are merely qualitative.

<i>1 - Introdução</i>	<u>1</u>
1.1 – Estudo dos Fosfatos de Cálcio.	<u>3</u>
1.2 – Modelos da Dissolução dos Fosfatos de Cálcio.	<u>5</u>
1.3 – Modelo da Camada de Cálcio.	<u>8</u>
1.4 – Fase Óssea Inorgânica.	<u>11</u>
1.5 – Osteogênese e Propriedades do Sistema de Dissolução dos Fosfatos de Cálcio.	<u>12</u>
<i>2 – Objetivos.</i>	<u>14</u>
<i>3 – Materiais.</i>	<u>15</u>
3.1 – Materiais e Equipamentos Utilizados.	<u>15</u>
3.2 - Materiais Estudados.	<u>17</u>
3.2.1-Soluções Utilizadas nas Cinéticas de Dissolução (Fluido Corpóreo Simulado (FCS) e KCl 0,08 mol.L ⁻¹). <u>17</u>
3.2.2 - Fosfatos de cálcio.	<u>18</u>
3.2.2.1 - Fosfato Sintetizado por Precipitação.	<u>18</u>
3.2.2.2 - Fosfatos Sintetizados em Sistemas Organizados.	<u>18</u>
3.2.2.3 - Fase Óssea Inorgânica.	<u>19</u>
<i>4 – Procedimentos.</i>	<u>20</u>
4.1- Síntese.	<u>20</u>
4.1.1- Síntese de Hidroxiapatita.	<u>20</u>
4.1.2- Precipitação em Sistemas Organizados.	<u>21</u>
4.2- Obtenção da Fase Óssea Inorgânica.¹³	<u>22</u>
4.3 - Cinética de Dissolução e Solubilidade.	<u>23</u>

4.4 – Avaliação dos Dados Experimentais.....	26
4.5- Calibração do Eletrodo de Íon Seletivo para Cálcio.	27
4.6- Tratamentos de Dados.....	27
4.7 – Caracterização dos Fosfatos de Cálcio e da Fase Óssea Inorgânica.....	27
4.7.1 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).	27
4.7.2– Difratomia de Raios-X.....	28
4.7.3– Determinação de Área Superficial por BET.....	28
4.7.4- Microscopia Eletrônica.	28
4.7.5- Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICP/OES).....	29
4.7.6- Caracterização do Material Sólido Restante ao Final da Cinética de Dissolução.....	29
5- Resultados e Discussão.	30
5.1- Caracterização dos Fosfatos de Cálcio.....	31
5.1.1- Espectroscopia FTIR.....	31
5.1.2- Difratomia de Raios-X.	36
5.1.3- Microscopia Eletrônica.	43
5.1.4- Determinação da Razão Ca/P por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICP/OES).....	46
5.1.5- Determinação da Área Superficial por BET.....	47
5.1.6 - Desproteínação da Fase Óssea Inorgânica.....	48

5.1.7- Caracterização da Hidroxiapatita após Cinética de Dissolução.	50
5.2 – Cinética de Dissolução e Solubilidade.	52
5.2.1 - Determinação da Cinética de Dissolução.	52
5.2.1.1 – Ensaio Preliminares e Determinação de Condições de Medidas para a Cinética de Dissolução.	53
5.2.2- Determinação da Concentração de Ca^{+2} Durante a Cinética de Dissolução com o Eletrodo de Íon Seletivo.	54
5.2.3- Tampão de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ para Controle do pH Durante a Cinética de Dissolução.	55
5.2.4- Velocidade de Agitação e Temperatura.	56
5.2.5- Calibração do Eletrodo.	56
5.2.6- Modelo para Tratamento dos Dados da Cinética de Dissolução.	58
5.2.7- Resultados da Cinética de Dissolução dos Fosfatos de Cálcio a 37 °C.	59
5.2.8- Tratamento Matemático para o Modelo de Gramain.	70
5.2.9- Determinação dos Parâmetros: C_s (Concentração de Íons Cálcio na Camada de Nerst adjacente à superfície dos fosfatos de cálcio) e n_s (Número de Sítios Disponíveis Para Adsorção).	73
5.2.10- Determinação de n_s .	87
5.2.11- Avaliação da Área Superficial da Fase Óssea Inorgânica Relacionada com a Cinética de Dissolução.	93

6- <i>Avaliação do Modelo de Dissolução de Fosfatos de Cálcio Proposto por A. A. Baig</i> ^{8, 9, 10, 11, 15, 24} <i>a Partir do Modelo de Equilíbrio Meta Estável.</i>	97
7- <i>Comparação e Correlação dos Resultados de Cinética de Dissolução dos Fosfatos de Cálcio com os Resultados de Estudos in Vitros e in Vivo Reportados.</i>	99
7.1- Estudos <i>In Vitro</i> dos Fosfatos de Cálcio.	99
7.2- Área Superficial e Dissolução.	99
7.3 - Cristalinidade.	100
7.4 - Formação da Camada de Cálcio na Superfície dos Fosfatos de Cálcio.	101
7.5- Camada Positiva Adsorvida na Superfície dos Fosfatos de Cálcio e Atividade Celular na Superfície dos Materiais.	102
7.6- Velocidade de Dissolução.	104
8 – <i>Conclusão</i>	105
8.1 - Caracterização dos Fosfatos de Cálcio.	105
8.2 - Cinética de Dissolução.	106
8.3 - Modelos Propostos para a Dissolução dos Fosfatos de Cálcio.	107
<i>Referências Bibliográficas</i>	107

Abreviaturas

Siglas utilizadas	Significado e características dos fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados.
Me	Identifica os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados formados por microemulsão de água em óleo assim como os resultados experimentais e gráficos referentes a este fosfato.
Cl	Identifica os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados formados por cristal líquido assim como os resultados experimentais e gráficos referentes a este fosfato.
Ew	Identifica os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados formados por emulsão água em óleo assim como os resultados experimentais e gráficos referentes a este fosfato.
HA	Identifica o fosfato de cálcio precipitada na forma de hidroxyapatita assim como os resultados experimentais e gráficos referentes a este fosfato.
Fêmur	Identifica o fosfato de cálcio da fase óssea inorgânica proveniente da matriz óssea fêmur assim como os resultados experimentais e gráficos referentes a este fosfato.
Crânio	Identifica o fosfato de cálcio da fase óssea inorgânica proveniente da matriz óssea crânio assim como os resultados experimentais e gráficos referentes a este fosfato.

KCl	Identifica a solução de KCl 0,008 Mol/L utilizada nas cinéticas de dissolução assim como os resultados experimentais e gráficos a ela referentes.
FCS	Identifica a solução de Fluido Corpóreo Simulado utilizada nas cinéticas de dissolução assim como os resultados experimentais e gráficos a ela referentes.
PH 6,35	Identifica o pH utilizado nas cinéticas de dissolução de fosfatos de cálcio realizados em pH 6,35.
PH 7,00	Identifica o pH utilizado nas cinéticas de dissolução de fosfatos de cálcio realizados em pH 7,00.
PH 7,40	Identifica o pH utilizado nas cinéticas de dissolução de fosfatos de cálcio realizados em pH 7,40.
MES	Equilíbrio Meta Estável.
<i>A</i>	Área superficial do fosfato de cálcio utilizado na cinética de dissolução.
<i>g</i>	Massa utilizada de fosfato de cálcio na cinética de dissolução.
<i>V</i>	Volume de solução utilizada nas cinéticas de dissolução.
<i>Cr</i>	Concentração de íons Ca^{+2} corrigida (mol.cm^{-2}).
<i>Cb</i>	Concentração de íons Ca^{+2} determinada experimentalmente (mol.L^{-1}).
<i>Cs</i>	Concentração de cálcio na camada de Nernst (mol.L^{-1}).

J_{Ca}	Fluxo de íons Ca^{+2} da superfície do fosfato de cálcio para a solução ($mol.cm^{-2}.s^{-1}$).
j_{Ca}	Fluxo de íons Ca^{+2} da superfície do fosfato de cálcio para a solução ($mol.g^{-1}.s^{-1}$).
D_{Ca}	Coefficiente de difusão para os íons Ca.
K	Constante relativa a isoterma de adsorção de Langmuir.
N	Número de íons adsorvidos na superfície do fosfato.
N_A	Número de Avogrado.
ns	Número de de sítios disponíveis para a adsorção de íons cálcio.
C_a	Concentração de íons cálcio na superfície do material.
$f(t)$	Representa a fração da superfície disponível para a adsorção.
S	Área total da superfície da massa de fosfato de cálcio utilizada na cinética de dissolução.
L_D	Raio dos discos que recobrem a superfície do material.
S	Área total da superfície da massa de fosfato utilizada na cinética.
Z	Fator que representa varias constantes.

Tabelas

Tabela 1: Composição inorgânica do Fluido Corpóreo Simulado.....	17
Tabela 2: Siglas que representam os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados e seu respectivo significado.	19
Tabela 3: Atribuição dos picos dos espectros de FTIR.....	35
Tabela 4: Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio obtidos pela técnica de ICP/OES.....	46
Tabela 5: Resultado da área superficial B.E.T dos fosfatos de cálcio sintéticos.....	47
Tabela 6: Resultados da área superficial BET para as fases ósseas inorgânicas provenientes de ratos com idade de um mês e um ano.	47
Tabela 7: Siglas utilizadas nos gráficos apresentados ao longo da discussão da cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio.	40
Tabela 8: Massa dos fosfatos de cálcio utilizada na cinética de dissolução em FCS.	71
Tabela 9: Massa dos fosfatos de cálcio utilizada na cinética de dissolução em solução de KCl.....	72
Tabela 10: Valores de K para as cinéticas de dissolução dos diversos fosfatos de cálcio em FCS	84
Tabela 11: Valores de K para as cinéticas de dissolução em KCl.....	84
Tabela 12 Valores de K para os diversos fosfatos de cálcio obtidos a partir do ajuste efetuado pelo programa Origin 5.0.....	87
Tabela 13: Valores de ns e K para cinética de dissolução utilizando a fase óssea inorgânica com área superficial de 97 m ² /g.	95

Figuras

- Figura 1: Modelo da camada de cálcio proposto por Gramain para a dissolução de hidroxiapatita que representa um determinado instante da cinética de dissolução, onde temos uma camada de adsorção seguida da camada de Nerst. A linha inclinada representa a variação da concentração de íons cálcio ao longo desta camada de Nerst.8
- Figura 2: Diagrama mostrando os eventos que ocorrem na interface fosfato de cálcio/ meio biológico. ⁶12
- Figura 3: Sistema utilizado nas medidas das dissoluções dos vários fosfatos de cálcio.23
- Figura 4: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de ratos com um mês de idade.31
- Figura 5: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de ratos com um mês de idade.32
- Figura 6: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de ratos com um ano de idade.32
- Figura 7: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de ratos com um ano de idade.33
- Figura 8: Espectros de FTIR dos fosfatos de cálcio sintéticos.34
- Figura 9: Difrátogramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes da calota craniana de ratos com um mês de idade.37
- Figura 10: Difrátogramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes do fêmur de ratos com um mês de idade.37
- Figura 11: Difrátogramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes da calota craniana de ratos com um ano de idade.38

Figura 12: Difratomogramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes do fêmur de ratos com um ano de idade.....	38
Figura 13: Difratomogramas de Raios-X de quatro amostras de fase óssea inorgânica focalizando um pico específico. Os difratogramas foram obtidos com varredura 0,002° /min.....	40
Figura 14: Difratomogramas de Raios-X para o fosfato de cálcio HA.....	41
Figura 15: Difratomogramas de Raios-X para o fosfato de cálcio ME.....	41
Figura 16: Difratomogramas de Raios-X para o fosfato de cálcio CL.....	42
Figura 17: Difratomogramas de Raios-X para o fosfato de cálcio EW.....	42
Figura 18: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada antes da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de rato com um ano de idade.....	44
Figura 19: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada depois da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de rato com um ano de idade.....	44
Figura 20: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada antes da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com um ano de idade.....	45
Figura 21: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada depois da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com um ano de idade.....	45
Figura 22 : Espectros de IV da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com idade de um mês: (a) após uma desproteinação e (b) após duas desproteinações.....	49
Figura 23: Espectros de IV da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com um ano de idade: (a) após uma desproteinação e (b) após duas desproteinações.....	49

Figura 24: Espectros de FTIR de hidroxiapatita antes (a) e após (b) a cinética de dissolução.	50
Figura 25: Gráficos apresentando as medidas independentes para a dissolução da fase óssea inorgânica do crânio em pH 7,00, sem correção de unidades (a) e com correção de unidades (b).	55
Figura 26: Calibrações realizadas ao longo da cinética de dissolução da HA, em pH 6,35 (a), 7,00 (b) e 7,40 (c). As barras representam o desvio padrão das medidas.	57
Figura 27: Concentrações determinadas em função do tempo na cinética de dissolução de EW- KCl (a) e CL-KCl (b).	61
Figura 28: Resultados das cinéticas de dissolução dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f), em solução de FCS em pH 6,35.	62
Figura 29: Resultados das cinéticas de dissolução dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f), em solução de FCS em pH 7,00.	63
Figura 30: Resultados das cinéticas de dissolução dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f), em solução de FCS em pH 7,40.	64
Figura 31: Gráficos da cinética de dissolução para pH 6,35. Curvas ajustadas pelo programa Origin às médias das medidas experimentais para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f).	67
Figura 32: Gráficos da cinética de dissolução para pH 7,00. Curvas ajustadas pelo programa Origin às médias das medidas experimentais para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f).	68

Figura 33: Gráficos da cinética de dissolução para pH 7,40. Curvas ajustadas pelo programa Origin às médias das medidas experimentais para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f).....	69
Figura 34: Gráficos apresentando as concentrações corrigidas em função do tempo para EW-KCl (a) e CL-KCl (b)	72
Figura 35: Os gráficos representam as derivadas da curva ajustada aos pontos experimentais de $[Ca^{+2}]$ transformados para concentração corrigida para EW-KCl (a) e CL-KCl (b).....	73
Figura 36: As figuras mostram a variação de Cs (concentração de íons cálcio na camada de Nerst) em função do tempo para CL-KCl (a) e EW-KCl (b).....	74
Figura 37: Variação de Cs (concentração de íons cálcio na camada de Nerst) em função do tempo para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 6,35	75
Figura 38: Variação de Cs (concentração de íons cálcio na camada de Nerst) em função do tempo para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,00.....	76
Figura 39: Variação de Cs (concentração de íons cálcio na camada de Nerst) em função do tempo para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,40.....	77
Figura 40: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/C_s$ ao longo da dissolução para os fosfatos CL-KCl (a) e EW-FCS (b).....	80
Figura 41: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/C_s$ para os fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 6,35.....	81
Figura 42: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/C_s$ para os fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,00.....	82
Figura 43: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/C_s$ para os fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,40.....	83

Figura 44: Gráficos de Cs em função do tempo ajustados utilizando a equação de Langmuir fornecida pelo programa Origin 5.0 para os fosfatos de cálcio HA pH 6,35 (a), Crânio pH 6,35 (b), ME pH 6,35 (c) e Crânio pH 7,00 (d).85

Figura 45: Gráficos de Cs em função do tempo ajustados utilizando a equação de Langmuir fornecida pelo programa Origin 5.0 para os fosfatos de cálcio nas HA pH 7,00 (a), Crânio pH 7,40 (b), ME pH 7,40 (c) e ME pH 7,40 (d).86

Figura 46: Gráficos de ns (número de sítios disponíveis para a adsorção) determinados para os fosfatos de cálcio em função do tempo para os pH 6,35 (a) e 7,00 (b)91

Figura 47: Gráficos de ns (número de sítios disponíveis para a adsorção) determinados para os fosfatos de cálcio em função do tempo para o pH 7,40. 91

Figura 48: Gráficos da média dos valores de ns dos fosfatos de cálcio, determinados nos pH 6,35, 7,00 e 7,40 em função do tempo.92

Figura 49: Cinética de dissolução (pH 6,35) com fase óssea inorgânica proveniente do fêmur com área superficial de (a) 17 m²/g e de (b) 97 m²/g.94

Figura 50: Cinética de dissolução com fase óssea inorgânica proveniente do fêmur com área superficial de 97 cm²/g, com concentração mol/cm².95

Figura 51: Esquema representando o ciclo de remodelagem dos ossos. 103

1 - Introdução

Os fosfatos de cálcio, representados por uma série de compostos, são de grande importância para o homem. Além do uso como fertilizantes na agricultura, estes compostos são os principais constituintes inorgânicos dos tecidos duros, os ossos e dentes.

A estrutura óssea humana está sujeita a diversas enfermidades, entre elas a osteoporose, e outras situações que resultam em perda da massa óssea. O aumento da expectativa de vida, como consequência dos avanços da medicina, da maior preocupação com a alimentação e do conforto gerado pela assim denominada “vida moderna”, têm resultado no aumento da população de idosos e conseqüentemente, das doenças relacionadas à velhice. Porém, os problemas de estrutura óssea não são apenas “doença de velhos”, atingem também indivíduos jovens em sua fase mais produtiva principalmente em decorrência de acidentes automobilísticos e de trabalho.

A magnitude dos problemas de saúde junto à população delineados acima têm levado pesquisadores à procura de materiais que possam substituir de forma adequada ossos danificados.

O interesse médico pelos fosfatos de cálcio data de 1926¹, quando De Jong observou a semelhança entre os padrões de difração de raios-X da fase óssea inorgânica e da hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Apesar da fase inorgânica dos ossos não apresentar composição totalmente constante, ocorrem variações de acordo com a idade e maturação dos tecidos e sua estrutura cristalina. A razão Ca/P assemelha-se à da hidroxiapatita, apresentando ainda a presença dos íons Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , citratos etc..²

A partir das publicações pioneiras De Jong e De Groot ^{1,2} tratando das propriedades dos fosfatos de cálcio, principalmente a hidroxiapatita, o número de trabalhos tratando da síntese e propriedades destes materiais cresceu bastante, permitindo afirmar que os fosfatos de cálcio representam hoje um dos materiais inorgânicos mais estudados. Pode-se ter a dimensão do número de publicações sobre este material, por exemplo, através do livro “Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates” de J.C Elliott contendo 1059 referências ³ a maioria delas situadas no período entre 1960 e 1990.

É importante salientar que embora as metodologias empregadas para estudar o comportamento de fosfatos de cálcio em equilíbrio com diversas soluções estejam bem descritas na literatura, elas não foram aplicadas para fosfatos com as características dos materiais estudados neste trabalho e tampouco para soluções com composição semelhante à do fluido biológico, onde os íons presentes no tampão hidrogenocarbonato/ácido carbônico, que controla o pH do fluido, podem produzir modificações importantes na superfície dos fosfatos de cálcio.

1.1 – Estudo dos Fosfatos de Cálcio.

De forma geral, as biocerâmicas de fosfato de cálcio têm sido estudadas segundo os seguintes aspectos: comportamento em estudos “*in vivo*” e comportamento da interface fosfato de cálcio/soluções iônicas. Estes estudos têm por objetivo investigar o comportamento destes materiais quando em contato com os fluidos presentes no organismo humano e finalmente, aspectos relacionados às variações da estrutura cristalina e da composição destes materiais, representados principalmente pela razão Ca/P, cristalinidade e presença de outros íons além dos íons cálcio e fosfato.

Nos estudos “*in vivo*”, corpos cerâmicos porosos ou densos formados por estes materiais são implantados em animais e efeitos relacionados à resposta osteogênica do material são avaliados. Neste conjunto também podemos incluir os estudos feitos com culturas de células.⁴⁻⁶

Como resultado destes estudos, o uso de alguns fosfatos de cálcio, principalmente hidroxiapatita, em determinados procedimentos ortopédicos e odontológicos está bem estabelecido e o material está disponível comercialmente.⁷

Outros estudos têm sido realizados com a finalidade principal de estabelecer modelos que permitam compreender o comportamento destes materiais no corpo humano. No caso dos implantes, pretende-se estabelecer os fatores que determinam o seu sucesso. No caso do material presente naturalmente nos dentes e ossos, são estudados os fatores que levam ao aparecimento de cáries, perda de massa óssea, osteoporose, consolidação óssea após fraturas ou intervenções cirúrgicas, etc.

Dada a complexidade dos processos naturais relacionados com os fosfatos de cálcio, os estudos envolvendo o comportamento da interface fosfato de cálcio/fluido corpóreo têm sido realizados em sistemas simples. Assim, com grande freqüência, são estudados fosfatos de cálcio com razão Ca/P próxima de 1,67 (valor

correspondente à hidroxiapatita estequiométrica), com uma cristalinidade geralmente maior do que a típica da fase óssea inorgânica e formados por partículas maiores do que as presentes na fase óssea inorgânica. Quanto à solução em contato com os fosfatos, têm sido freqüentemente empregadas soluções de Ca^{+2} e de íons fosfato (HPO_4^{-2} , PO_4^{-3}). Estas investigações se concentram particularmente na dissolução destes fosfatos em meios ácidos, com o objetivo de entender os processos de degradação e regeneração que estes materiais sofrem nos organismos vivos.

Nos sistemas vivos o processo de degradação e regeneração é dinâmico, onde constantemente ocorre a modelagem dos ossos, na qual os ossos removidos pelos osteoclastos são substituídos pelo tecido ósseo produzido pelos osteoblastos.⁸ No nível celular, a reabsorção ocorre quando os componentes minerais dos ossos (fosfatos de cálcio) são dissolvidos por uma produção de ácido localizada, proveniente de uma célula osteoclástica ligada ao osso.⁹⁻¹¹

1.2 – Modelos da Dissolução dos Fosfatos de Cálcio.

Hidroxiapatita, fluorapatita, e apatitas carbonatadas apresentam o fenômeno denominado “Equilíbrio Metaestável de Solubilidade” (MES) caracterizado pela não concordância do valor do produto de solubilidade iônica (K_{ps}),¹² com o valor do produto das atividades iônicas para os íons presentes em uma solução mantida em contato com o sólido por um longo período. As discrepâncias entre o valor de K_{ps} teórico e experimental, têm sido tratadas como função da quantidade de sólido que se dissolve até que o equilíbrio metaestável seja alcançado, do pH da solução e também da concentração inicial de Ca^{+2} , íons fosfatos e outros íons presentes na solução.¹³⁻¹⁵

A solubilidade atípica de alguns fosfatos de cálcio segundo o seu comportamento têm sido atribuída a diversas causas. Uma destas causas têm sido as modificações na superfície destes fosfatos, que ocorrem pela ação da solução sobre a superfície destes.^{16-24,13,14}

Para investigar a ocorrência do MES e as modificações causadas pela solução na superfície dos fosfatos de cálcio, dois parâmetros têm sido determinados: as concentrações e as respectivas atividades dos íons presentes na solução em equilíbrio com o sólido e a quantidade de sólido que se dissolve até que o MES seja alcançado. De forma sucinta, a metodologia utilizada para estes estudos pode ser descrita por: uma massa reduzida do fosfato de cálcio sólido é suspensa em um tampão contendo íon Ca^{+2} e HPO_4^{-2} . Após um período suficiente para o equilíbrio ser alcançado, as concentrações de Ca^{+2} e PO_4 são determinadas por métodos analíticos clássicos.

O modelo do equilíbrio meta estável, considera que a solubilidade dos fosfatos é controlada pela competição entre a velocidade de dissolução e a velocidade de cristalização de fosfato de cálcio na superfície, até que esses dois

fenômenos ocorram com velocidades iguais. No caso dos fosfatos de cálcio, esse equilíbrio ocorre antes que seja atingido o K_{ps} teórico.^{13, 14, 24}

Outra possibilidade que têm sido considerada para explicar a dissolução dos fosfatos de cálcio é a adsorção de íons Ca^{+2} e H^+ na superfície dos fosfatos de cálcio, dependendo do pH e da composição da solução em contato com o sólido. Como consequência da formação deste “filme de íons adsorvidos”, os processos de difusão dos íons, tanto do sólido para a solução quanto da solução para o sólido, seriam modificados.²⁵⁻³⁰

Os trabalhos que tratam da adsorção de íons na superfície do fosfato sólido têm sido conduzidos sob um enfoque cinético, investigando os processos que ocorrem durante a dissolução do sólido.³¹⁻³⁹

Nos estudos de cinética de dissolução, os fluxos iônicos que se estabelecem entre a superfície do sólido e a solução até que o equilíbrio seja atingido têm sido obtidos pela determinação do fluxo de H^+ . O Fluxo de Ca^{+2} tem sido determinado indiretamente, a partir da estequiometria do sólido que se dissolve. Nestes estudos, o pH do sistema é mantido constante pela utilização de um sistema denominado “pHstato”, que injeta uma quantidade de HCl conhecida para compensar o consumo de H^+ ao longo da dissolução do fosfato de cálcio.²⁷⁻³⁰

Os resultados dos estudos de cinética de dissolução têm permitido entender as diferentes etapas de hidratação e de dissolução dos íons superficiais e propor modelos de adsorção para o processo de formação da camada de Ca^{+2} , assim como estabelecer o mecanismo de dissolução dos fosfatos de cálcio.^{31, 32, 39}

O estabelecimento do MES resultante da ação da solução sobre a superfície do fosfato de cálcio provoca uma modificação das características desta superfície. Estas modificações têm sido consideradas como um dos fatores determinantes na interação dos sistemas vivos com estes materiais, quer em processos de osteogênese, quer em processos que levam à adsorção e adesão de células e

proteínas sobre a superfície de implantes constituídos ou revestidos com fosfatos.^{40, 41, 5} Contudo, apesar da importância dos fenômenos que ocorrem nas superfícies destes materiais, um modelo adequado para o fenômeno do MES e da dissolução ainda não foi bem estabelecido.⁴²⁻⁴⁶

Além dos fatores acima relatados, recentemente tem-se investigado as relações entre propriedades da superfície dos fosfatos de cálcio sólidos e o seu comportamento como Biomaterial.^{47, 48} Os resultados destes estudos mostram que as características da superfície dos fosfatos de cálcio são uns dos principais fatores que determinam o sucesso ou falha dos implantes formados por estes materiais.⁶

Tem-se estudado também a influência da composição destes fosfatos sobre o seu comportamento tanto *in vitro* como *in vivo*. Assim: cristalinidade, razão Ca/P, morfologia, porosidade, tamanho das partículas e a presença de íons como pirofosfato, carbonato, fluoreto etc, têm sido relacionados ao comportamento dos fosfatos de cálcio tanto em estudos "*in vitro*" como em estudos "*in vivo*".^{4, 5}

A partir do que foi exposto, é clara a dependência das propriedades relacionadas à biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio e o comportamento da superfície destes materiais sob a ação dos fluidos biológicos. Avançar, portanto, na compreensão deste comportamento representa a possibilidade de controlá-lo e de estender este controle para amenizar situações adversas, como a cárie e a osteoporose ou estimular processos desejáveis, como a osteogênese.

1.3 – Modelo da Camada de Cálcio.

Um dos principais modelos de dissolução para os fosfatos de cálcio é o modelo da camada de cálcio. Este modelo tem por objetivo explicar a dissolução dos fosfatos de cálcio, e têm o mérito de ser um dos poucos modelos matemáticos que, além de descrever a dissolução destes materiais, chega a resultados quantitativos relacionados à solubilidade e cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio.

Este modelo, desenvolvido a partir de modelos matemáticos que descrevem a adsorção de íons em superfícies e modelos para superfícies, considera que ao longo da dissolução dos fosfatos de cálcio ocorre a adsorção de íons cálcio na superfície destes fosfatos, impedindo que a dissolução dos fosfatos de cálcio continue a ocorrer ao final do processo.

A Figura 1 representa a premissa básica do modelo proposto por Gramain.

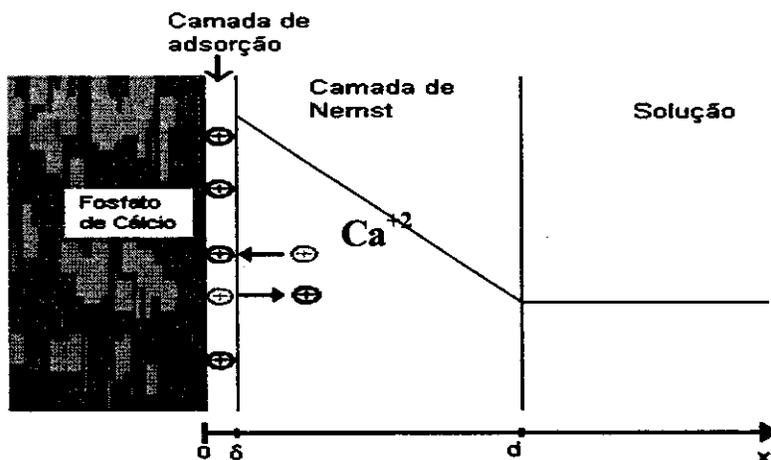


Figura 1: Modelo da camada de cálcio proposto por Gramain para a dissolução de hidroxiapatita que representa um determinado instante da cinética de dissolução, onde temos uma camada de adsorção seguida da camada de Nernst. A linha inclinada representa a variação da concentração de íons cálcio ao longo desta camada de Nernst.

A Figura 1 representa um instante qualquer ao longo da cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio. Na Figura 1 são mostradas a interface fosfato de cálcio e solução circundante, e a superfície do fosfato de cálcio com íons cálcio adsorvidos. Adjacente à camada de adsorção existe a camada de Nerst, na qual ocorre a variação da concentração de íons cálcio ao longo da distância em relação à superfície do fosfato de cálcio. Como é possível observar na Figura 1, a concentração de íons cálcio diminui à medida que a distância da superfície do fosfato de cálcio aumenta.

O modelo da camada de cálcio considera que, à medida que o fosfato se dissolve, há um aumento da concentração de Ca^{+2} na solução e simultaneamente ocorre a formação de uma camada de Ca^{2+} adsorvida na superfície do material. Por nossa vez, recorrendo às medidas da concentração de cálcio na solução, buscamos implementar algumas simplificações nas aproximações utilizadas por Gramain no desenvolvimento do seu modelo para a dissolução da hidroxiapatita, que realizou todas as determinações experimentais a partir de medidas de pH.

No modelo da camada de cálcio é imposto que a adsorção de íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio deve ocorrer de acordo com uma camada de adsorção de Langmuir. Assim, a adsorção dos íons Ca^{+2} na superfície dos fosfatos de cálcio ocorre formando uma monocamada e não existem sítios de adsorção preferenciais, ou seja, todos os sítios de adsorção são iguais. A imposição do modelo da adsorção de Langmuir é um artifício utilizado para tornar possível o tratamento dos dados da cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio.

O modelo também desconsidera a formação da dupla camada elétrica na superfície dos fosfatos de cálcio, e também admite que não ocorre a formação de um gradiente de potencial elétrico nessa superfície (para tornar válidas estas condições, as medidas são realizadas em sistemas onde a força iônica é alta).

Com a imposição do modelo da isoterma de Langmuir, é possível determinar quantitativamente o número de íons cálcio adsorvidos "N", assim como a constante relativa à isoterma de adsorção "K", relacionada à intensidade da interação entre o adsorbato (íons cálcio) e o adsorvente (íons fosfato, protonados ou não, existentes na superfície do sólido que está se dissolvendo).

1.4 – Fase Óssea Inorgânica.

Ossos são formados predominantemente por duas fases distintas: a fase orgânica, composta principalmente por colágeno, e a fase inorgânica, composta principalmente por fosfato de cálcio. A fase inorgânica dos ossos juntamente com a fase orgânica, formando um compósito, é responsável pela dureza e características mecânicas e estruturais dos ossos.

As primeiras tentativas de caracterização de ossos foram realizadas determinando-se a razão entre a fase orgânica e a fase inorgânica neles presentes. A determinação desta fração foi realizada a partir das cinzas provenientes de ossos calcinados.⁴⁹⁻⁵⁴

Recentemente, novos estudos de caracterização dos ossos têm sido realizados não apenas com o objetivo de caracterizar a composição elementar, principalmente a razão Ca/P. Nestes estudos têm-se procurado caracterizar os ossos quanto à cristalinidade e composição iônica através de técnicas como difratometria de raios-X, espectroscopia de Infravermelho e Ramn com transformada de Fourier.⁵⁵⁻⁵⁸

Estes novos estudos também têm a preocupação de caracterizar os ossos da forma como são encontrados nos organismos vivos, sem alterações causadas pelos procedimentos analíticos. Para realizar tais caracterizações, novas técnicas foram desenvolvidas para a remoção da fase orgânica dos ossos. Entre estas várias técnicas, a desproteinação com hidrazina é uma das mais utilizadas e também a que tem apresentado melhores resultados.⁵⁹

Apesar dos novos trabalhos caracterizando a fase óssea inorgânica dos ossos, ainda hoje nenhum trabalho realizou caracterizações químicas e físicas quantitativas definitivas da fase óssea inorgânica de ossos saudáveis, nos quais foram comparados indivíduos com diferentes idades.

1.5 – Osteogênese e Propriedades do Sistema de Dissolução dos Fosfatos de Cálcio.

A osteogênese se refere à formação dos ossos nos organismos vivos. Esses ossos podem ser formados na fase embrionária do organismo e ao longo da vida, através de um processo conhecido como modelagem, onde os ossos passam por sucessivas etapas de formação e absorção ao longo do tempo. Nos organismos vivos a osteogênese pode ser estimulada por diversos fatores, entre estes, o implante de próteses que podem ser formadas por fosfatos de cálcio.

Assim, quando implantes formados por fosfatos de cálcio são realizados, vários processos passam a ocorrer na superfície deste implante e no organismo hospedeiro.

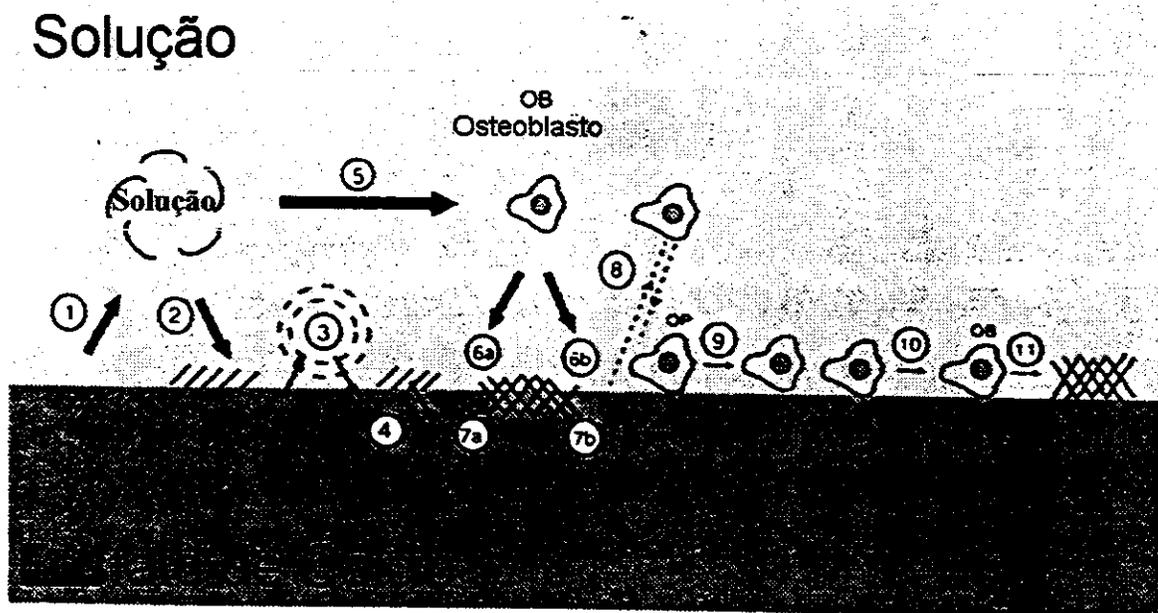


Figura 2: Diagrama mostrando os eventos que ocorrem na interface fosfato de cálcio/ meio biológico. ⁶

A Figura 2⁶ representa de forma esquemática os eventos que ocorrem na interface fosfato de cálcio e meio biológico após o implante em organismos de vertebrados. De acordo com o diagrama, ocorrem os seguintes eventos: (1) dissolução do fosfato de cálcio; (2) precipitação do fosfato de cálcio na superfície do implante a partir da solução circundante; (3) troca iônica da superfície com a solução e rearranjo estrutural do fosfato de cálcio na interface deste com a solução; (4) difusão da superfície da interface para o interior da matriz de fosfato de cálcio; (5) efeitos na atividade celular causados pela solução com fosfato de cálcio dissolvido; (6) deposição da fase mineral (a), ou deposição da fase orgânica, que são integradas à superfície do fosfato de cálcio (b); (7) deposição com integração na superfície do fosfato (7a e 7b); (8) quimiotaxia na superfície do fosfato; (9) adesão de células na superfície do fosfato e proliferação destas; (10) diferenciação celular; (11) formação de uma matriz extracelular.

Como mostrado no diagrama na Figura 2, os processos que ocorrem nos implantes em contato com o meio biológico estão intimamente relacionados⁶ com as propriedades de dissolução destes implantes e particularmente com as propriedades da sua superfície.

2 – Objetivos.

Esta Dissertação de Mestrado teve por objetivos:

Obter e caracterizar a fase óssea inorgânica de fêmures e crânios de ratos Wistar com diferentes idades, determinando para estas fases: cristalinidade, razão Ca/P, morfologia e área superficial.

Sintetizar e caracterizar fosfatos de cálcio em sistemas organizados e por precipitação em solução aquosa, caracterizando-os quanto a: cristalinidade, razão Ca/P, morfologia e área superficial.

Realizar medidas de solubilidade e cinética de dissolução de fosfatos de cálcio sintéticos e da fase óssea inorgânica, em solução de fluido corpóreo simulado, em pH 6,35; 7,00 e 7,40 a 37°C.

Tratar os resultados da cinética de dissolução segundo modelo proposto^{25, 26}, e desenvolvido como parte deste trabalho para obter os parâmetros “números de sítios disponíveis para adsorção de íons cálcio na superfície do fosfato de cálcio” (ns) e “K” relativos à isoterma de adsorção de íons cálcio sobre a superfície dos vários tipos de fosfato de cálcio sólido.

Os resultados permitiram:

Avaliar os modelos propostos para a dissolução de fosfatos de cálcio.

Correlacionar e avaliar os modelos propostos por Gramain e por Baig para a dissolução e solubilização dos fosfatos de cálcio.

Relacionar os estudos realizados com os fosfatos de cálcio com resultados de trabalhos publicados na literatura realizados com fosfatos de cálcio *in vivo*.

3 – *Materiais.*

3.1 – Materiais e Equipamentos Utilizados.

- pHmetro Digimed DM20
- pHmetro Digital PG2000 – Gehaka
- Eletrodo de Íon Seletivo para Cálcio – Cole-Parmer 27502-08-09
- Eletrodo de Vidro Digimed
- Eletrodo de referência
- Termo-compensador
- Almofariz e pistilo
- Agitador mecânico – Fisatom
- Agitador magnético
- Banho Ultratermostático – Cientec
- Vidraria
- Difratorômetro Shimadzu DRX-6000
- Espectrofotômetro FT-IR Bomem da série MB-100
- Sistema para determinação de área superficial Micromeritics Flow Sorb II 2300 conectado a um controlador de fluxo (BET)
- Fase Óssea Inorgânica de ratos Wistar provenientes de fêmur e calota craniana
- Fosfatos de cálcio – Sintetizados em nosso grupo de pesquisa
- KH_2PO_4 – Synth
- HCl – Nuclear

- Hidrazina – doada pela faculdade de engenharia elétrica da UNICAMP (concentração desconhecida)
- Hidrazina – Aldrich 64%
- Hidrazina – Vetec 25%
- Etanol – Synth
- Bicarbonato de Sódio – Nuclear
- KCl – Carlo Erba
- Cilindro de CO₂ – White Martins
- Cilindro de N₂ – White Martins
- NaOH – Merck
- Na₂HPO₄.2H₂O – Synth
- CaCl₂.2H₂O – Mallinckrodt
- NH₄OH – Merck
- K₂H₂PO₄ – Cinética Química
- NaCl – Mallinckrodt
- H₃PO₄ – Synth

3.2 - Materiais Estudados.

3.2.1-Soluções Utilizadas nas Cinéticas de Dissolução (Fluido Corpóreo Simulado (FCS) e KCl 0,08 mol.L⁻¹).

As medidas de dissolução foram realizadas em duas soluções, uma solução de FCS e uma solução de KCl mol.L⁻¹.

O Fluido Corpóreo Simulado (FCS) tem por objetivo simular a composição iônica do fluido extracelular dos organismos vivos. No organismo, o fluido apresenta, além da composição iônica, uma composição orgânica formada por proteínas e outras substâncias.

Na Tabela 1 é dada a composição inorgânica do fluido corpóreo simulado.

Tabela 1: Composição inorgânica do Fluido Corpóreo Simulado.

FCS	
Íon	Concentração (m.mol.L ⁻¹)
Na ⁺	145
K ⁺	5
Cl ⁻	118
HCO ₃ ⁻	30
HPO ₄ ⁻²	1

3.2.2 - Fosfatos de cálcio.

Os fosfatos de cálcio estudados podem ser divididos em três classes: fosfatos obtidos por precipitação partindo de soluções aquosas de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} a diversos pH e temperaturas, fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados compostos por micelas reversas tais como microemulsão, emulsões ou cristal líquido e fosfatos de cálcio constituintes da fase óssea inorgânica, obtidos a partir de ossos de rato Wistar com idade controlada.

3.2.2.1 - Fosfato Sintetizado por Precipitação.

O fosfato hidroxiapatita foi sintetizado por precipitação partindo das soluções aquosas de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} .

HA: hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$];

O procedimento de síntese está descrito na referência 60.

3.2.2.2 - Fosfatos Sintetizados em Sistemas Organizados.

Os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados apresentam partículas com tamanho da ordem de nanômetros, cristalinidade reduzida, apresentando morfologia acicular, globular ou na forma de filme e com razão Ca/P entre 1,3 e 1,8.

As siglas utilizadas para identificar os fosfatos a partir do tipo de sistema utilizado para síntese destes são indicadas na Tabela 2.

Tabela 2: Siglas que representam os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados e seu respectivo significado.

Siglas utilizadas	Significado das Siglas.
ME	Fosfato de cálcio obtido a partir de microemulsão de água em óleo.
CL	Fosfato de cálcio obtido a partir de cristal líquido.
EW	Fosfato de cálcio obtido a partir de emulsão água em óleo.

3.2.2.3 - Fase Óssea Inorgânica.

A fase óssea inorgânica foi obtida a partir do fêmur e da calota craniana de ratos da raça Wistar, divididos em dois grupos. O primeiro grupo era formado por 5 ratos com idade de 1 mês e o segundo grupo por 5 ratos com idade de 1 ano.

Os ossos foram obtidos em parceria com o Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP e tratados com hidrazina para eliminação dos tecidos residuais e da matriz orgânica (principalmente colágeno), restando após o tratamento apenas os fosfatos de cálcio, constituintes da fase óssea inorgânica.¹³

4 – Procedimentos.

4.1- Síntese.

4.1.1- Síntese de Hidroxiapatita.

A hidroxiapatita (HA) foi sintetizada por precipitação a partir de uma suspensão de hidróxido de cálcio e uma solução de ácido fosfórico segundo a reação:



A síntese de HA descrita na referência 47 pode ser resumida por: a uma solução de H_3PO_4 $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ foi adicionada uma suspensão contendo $0,5 \text{ mol}$ de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ disperso em um litro de água, a uma velocidade de aproximadamente 7 mL/min , sob agitação magnética e temperatura reacional de 60°C . O pH da reação foi mantido em torno de 8 com adição de NH_4OH . Terminada a adição, a suspensão foi mantida sob agitação a 60°C por um dia. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 60°C . Após seca, a hidroxiapatita foi então calcinada a 300°C . O material foi então triturado.

4.1.2- Precipitação em Sistemas Organizados. ⁶⁰

Os materiais sintetizados em sistemas organizados utilizados nas medidas de cinética foram, no caso do CL (cristal líquido) e EW (emulsão reversa), obtidos em outros projetos do nosso grupo de pesquisa. Para este projeto de tese foi necessário, portanto, sintetizar apenas o material ME (micro emulsão reversa).

Os fosfatos foram sintetizados em sistemas formados por microemulsões reversas, compostas pelo sistema trifásico: Renex 100[®], Cicloexano e solução aquosa contendo ou íons Ca^{+2} e HPO_4^{-2} ou amônia dissolvida.

Após a mistura dos três componentes, a mistura foi estocada por 10 dias sendo mantida a temperatura de 2°C. Após este período, a mistura foi retirada da geladeira e após atingir a temperatura ambiente, centrifugada a 2500 rpm. Ao sistema foi acrescentado etanol, para a diminuição da viscosidade e assim obter uma maior eficiência da centrifugação. O material foi lavado com etanol, seco ao ar e triturado. Para eliminação de resíduos da mistura de solvente e surfactante, o material foi submetido à extração com acetona quente em extrator sohxlet.

Ao fim do processo de extração, os espectros de FTIR dos materiais ainda indicavam a presença do surfactante usado para preparar os sistemas organizados no material.

4.2- Obtenção da Fase Óssea Inorgânica.¹³

Para a obtenção da fase óssea inorgânica foi realizado o seguinte procedimento. Foram extraídos os ossos de cinco ratos com a idade de um mês e cinco ratos com idade de um ano. Os ossos “*in natura*” foram mergulhados em nitrogênio líquido e partidos em pequenos pedaços. Os fragmentos foram cobertos com hidrazina (concentração de 25%) permanecendo em repouso por 1 hora. A solução foi decantada e mais hidrazina foi acrescentada, permanecendo em repouso por mais 2 horas. A solução foi novamente decantada e a hidrazina foi novamente trocada. Após a troca da hidrazina, o frasco foi mergulhado em banho Maria a 60°C por 48 horas. Após esse período, o material restante foi lavado com soluções de 50, 75, 80 e 100% de etanol e água e seco em estufa. O material foi então tratado novamente, utilizando-se o mesmo procedimento, porém utilizando-se a hidrazina a 64 %.

A hidrazina usada na obtenção da fase óssea inorgânica rompe as ligações peptídicas das proteínas, hidrolizando-as. A mesma reação é geralmente utilizada para determinar a carboxila do aminoácido terminal em cadeias de peptídicas.⁶¹

A fase óssea inorgânica resultante foi triturada ao final do procedimento.

4.3 - Cinética de Dissolução e Solubilidade.

Para a determinação da cinética de dissolução foi montado o sistema representado na Figura 3. O sistema era constituído por uma camisa térmica onde foram fixados um eletrodo de vidro, um termocompensador, um tubo de vidro ligado a um cilindro de CO₂, um agitador mecânico com controle de velocidade de agitação e 250 ml de uma solução de FCS ou KCl 0,08 mol.L⁻¹. Ao longo da cinética, em intervalos de tempo regulares, foram inseridos na camisa térmica um eletrodo de referência e o eletrodo de íon seletivo para cálcio.

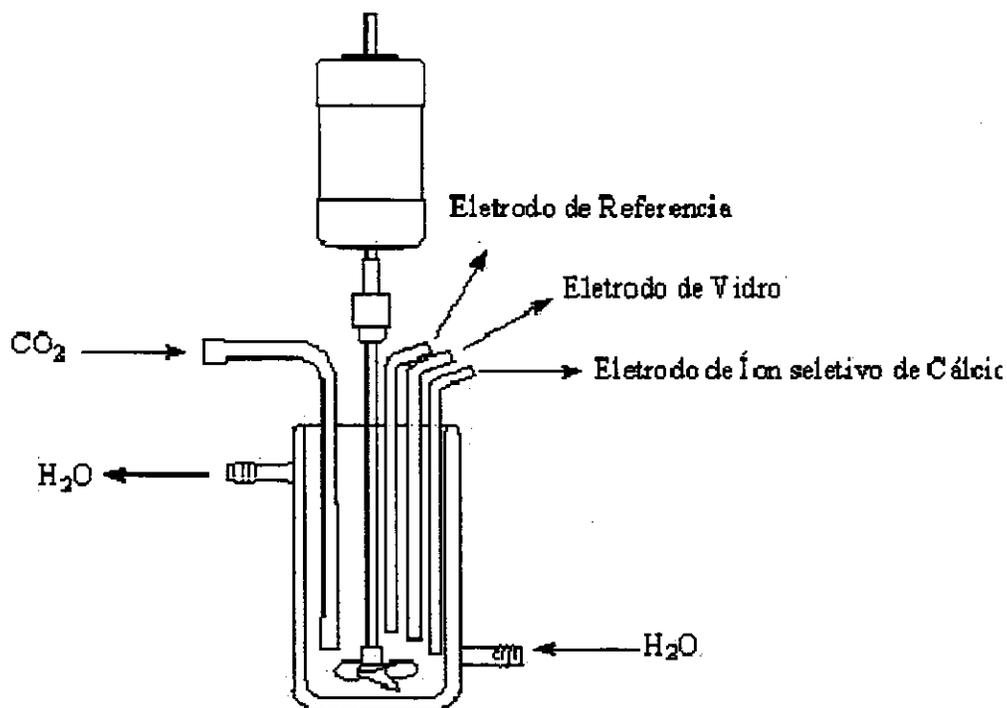


Figura 3: Sistema utilizado nas medidas das dissoluções dos vários fosfatos de cálcio.

Depois de montado, o sistema foi termostatizado a 37° C. Em seguida, a agitação foi regulada para a velocidade de 2100 rpm, o valor da velocidade de rotação que faz com que a espessura camada de Nerst na superfície do fosfato de cálcio seja constante, apresentando o valor de 10^{-3} cm^{25, 26}. A espessura da camada de Nerst é um fator de grande importância para o tratamento dos dados a partir do modelo da camada de cálcio.

O valor de pH no qual a cinética seria realizada foi ajustado mediante a adequação do fluxo de gás CO₂ para o controle do pH.

A termostatização em separado dos eletrodos, que foram inseridos no sistema em intervalos regulares de tempo, principalmente no caso do eletrodo de íon seletivo de cálcio, mostrou-se muito importante para permitir respostas rápidas durante as medidas.

Quando necessário, foi adicionado hidrogenocarbonato de sódio à solução para um maior controle do pH. Os experimentos foram conduzidos a pH 6,35, 7,00 e 7,40. Para a realização dos experimentos em pH 7,00 e 7,40, foi adicionado um borbulhador ligado a um cilindro de N₂ dentro da camisa térmica. Para o ajuste dos pH, a vazão do gás (N₂) foi controlada, utilizando-se um controlador de fluxo.

Para a realização da medida, o seguinte procedimento foi adotado. Com o pH e velocidade de rotação estabilizada a 2100 rpm foi adicionada ao sistema uma massa conhecida de fosfato de cálcio. Após cerca de 1 minuto, a rotação do agitador foi reduzida para 390 rpm, o eletrodo de referência e o eletrodo de íon seletivo previamente termostatizado foram introduzidos no sistema e foi então feita a leitura.

Após a leitura, os eletrodos de referência e de íon seletivo foram rapidamente retirados do sistema e a agitação retornada a 2100 rpm. Após um intervalo de tempo determinado, a velocidade de agitação foi novamente reduzida e o procedimento de medida foi sucessivamente refeito.

Para cada material estudado as medidas foram realizadas no mínimo em duplicata.

4.4 – Avaliação dos Dados Experimentais.

Para uma avaliação da qualidade das medidas e das respostas do eletrodo de íon seletivo para cálcio, foram realizadas medidas nas quais o eletrodo de íon seletivo para cálcio foi lavado e deixado a temperatura ambiente entre as medidas da concentração de cálcio.

O teste das medidas consistiu em realizar a cinética de dissolução conforme descrito em 4.3, coletando-se dados de concentração de cálcio na solução em apenas três momentos da cinética de dissolução, com intervalos de tempo da ordem de aproximadamente 3 horas entre as medidas.

No intervalo entre as medidas, o eletrodo de cálcio foi lavado e estocado em uma solução de CaCl_2 10^{-2} Mol/L e o eletrodo de referência, mantido em uma solução de KCl saturada (ambos procedimentos realizados conforme recomendado pelo manual do fabricante). Antes das medidas serem realizadas, os eletrodos eram novamente termostatizados.

Os valores de concentração de Ca^{+2} , coletados nos três instantes diferentes da cinética foram comparados com os dados de concentração de Ca^{+2} determinados nos mesmos instantes de tempo para a cinética de dissolução realizada segundo o tópico 4.3.

4.5- Calibração do Eletrodo de Íon Seletivo para Cálcio.

A calibração do eletrodo de íon seletivo para cálcio utilizada nas medidas das cinéticas de dissolução em pH 6,35, foram realizadas utilizando-se soluções de 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} Mol/L. Antes da calibração, todas as soluções foram termostatizadas a 37° C. A calibração foi realizada antes do início da cinética e repetida ao longo dela a cada 1,5h.

Para as medidas em pH 7,00 e 7,40 a calibração do eletrodo foi realizada com soluções de 1, 6, 9,9, 2,9, 48 e 66 x 10^{-6} , mol.L⁻¹ de Ca⁺². Antes da calibração, todas as soluções foram termostatizadas a 37°C, segundo o mesmo procedimento usado para cinética a pH 6,35.

4.6- Tratamentos de Dados.

Foi utilizado para o tratamento de dados e criação dos gráficos, o programa Origin nas versões 5.0 e 6.1.

4.7 – Caracterização dos Fosfatos de Cálcio e da Fase Óssea Inorgânica.

4.7.1 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros de I.V. foram obtidos a partir de pastilhas de KBr, contendo o fosfato de cálcio disperso na proporção de 100 partes de KBr para uma de fosfato.

Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} após 32 acumulações e com resolução de 4 cm^{-1} .

4.7.2– Difratometria de Raios-X.

Os difratogramas de Raios-X, em modo de varredura para as amostras na forma de pó, foram obtidos em Difratometro Shimadzu, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), filtro de níquel, voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA para o tubo de Raios-X e velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$ em 2θ .

4.7.3– Determinação de Área Superficial por BET.

Os materiais, após trituração e secagem, tiveram sua área superficial determinada por BET com multipontos em um equipamento Micromeritics Flow Sorb II 2300, conectado a um controlador de fluxo.

4.7.4- Microscopia Eletrônica.

As micrografias foram obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura. A condição de operação do microscópio foi a utilização de voltagem de aceleração de 20kV. As amostras, metalizadas com carbono, utilizando-se um metalizador Bal-Tec Med 020, foram presas ao porta-amostra empregando-se fita de carbono. As micrografias foram obtidas a partir da superfície da fratura da fase óssea inorgânica.

4.7.5- Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICP/OES).

As razões Ca/P para os fosfatos de cálcio foram obtidas, pela análise com Espectrômetro de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido.

Para a obtenção da razão Ca/P, os fosfatos foram secos e dissolvidos em aproximadamente 100 ml de água com a adição de um volume de HCl (36%) até a dissolução destes.

As curvas de calibração necessárias para a determinação da razão Ca/P foram feitas a partir de soluções que continham simultaneamente os íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} .

4.7.6- Caracterização do Material Sólido Restante ao Final da Cinética de Dissolução.

Após o final da cinética de dissolução, a solução presente no sistema de medida foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O sólido residual foi caracterizado por espectroscopia de FTIR.

5- Resultados e Discussão.

Neste trabalho foram realizados estudos das cinéticas de dissolução de fosfatos de cálcio com as mais variadas características. Desta forma, foram estudados fosfatos de cálcio sintéticos obtidos por precipitação em solução aquosa e em meio organizado, assim como fases ósseas inorgânicas provenientes de fêmur e calota craniana de ratos Wistar.

Para uma comparação dos resultados a partir dos experimentos realizados com estes materiais e para que seja possível uma avaliação dos fenômenos que ocorrem nos organismos vivos que possa ser relacionada com o processo de dissolução, uma caracterização detalhada destes materiais se faz necessária.

5.1- Caracterização dos Fosfatos de Cálcio.

5.1.1- Espectroscopia FTIR

Os espectros de FTIR obtidos para as fases ósseas inorgânicas são apresentados nas Figuras 4 a 7. A semelhança entre eles indica que a composição das fases ósseas inorgânicas provenientes dos diferentes ossos de ratos com idades distintas são similares. Para uma melhor comparação, as bandas e suas respectivas atribuições são apresentadas na Tabela 3.

As numerações atribuídas aos espectros de FTIR correspondem à numeração atribuída a cada rato pertencente a um grupo de cinco ratos com idade de um mês ou a um grupo de cinco ratos com idade de um ano.

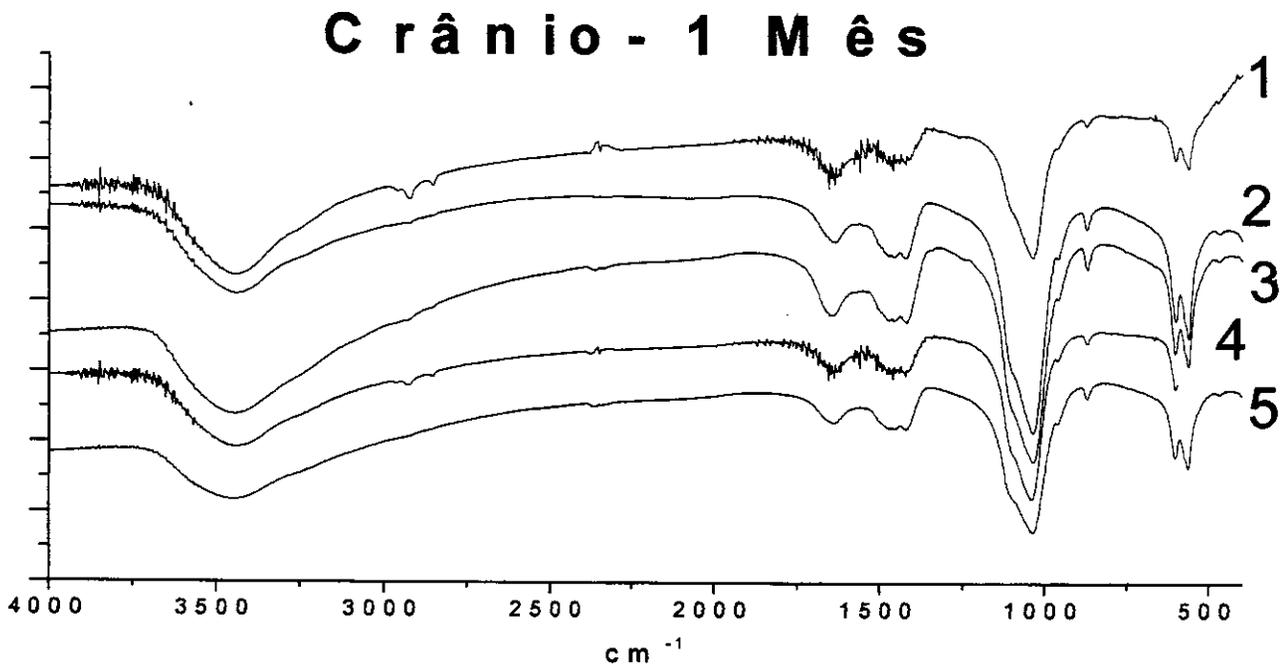


Figura 4: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de ratos com um mês de idade.

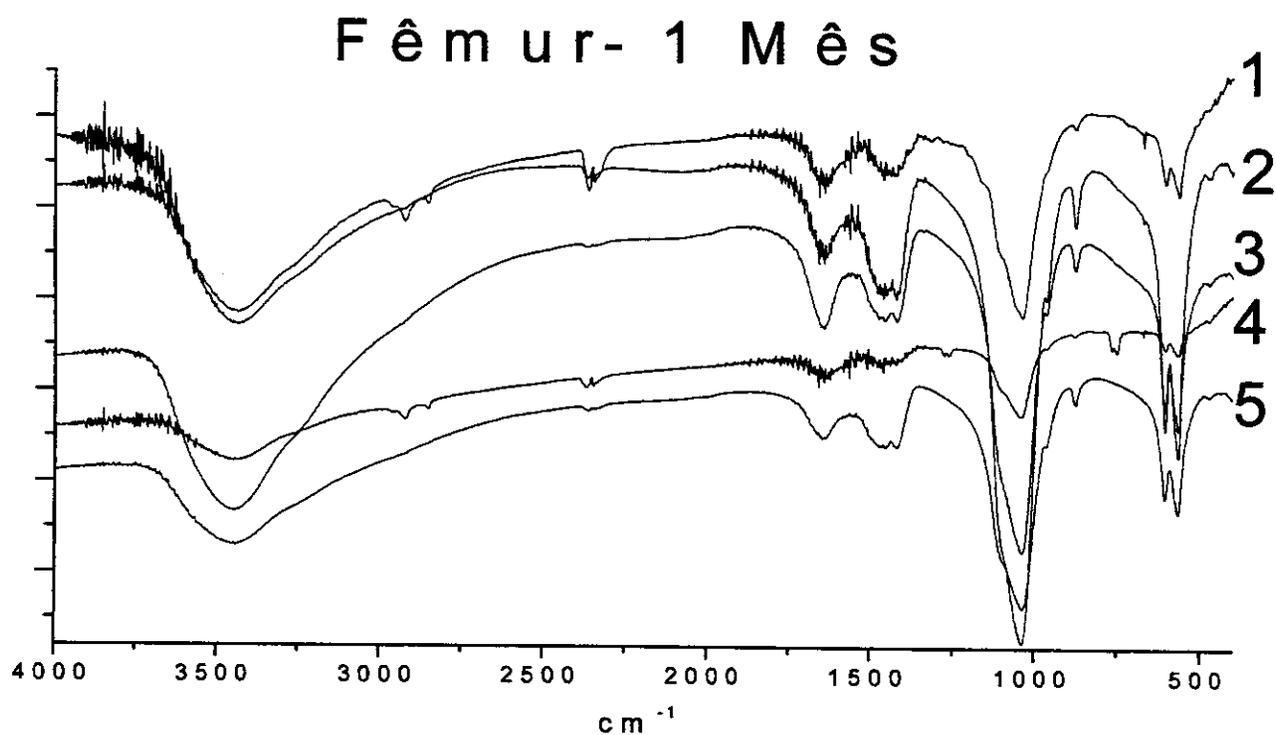


Figura 5: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de ratos com um mês de idade.

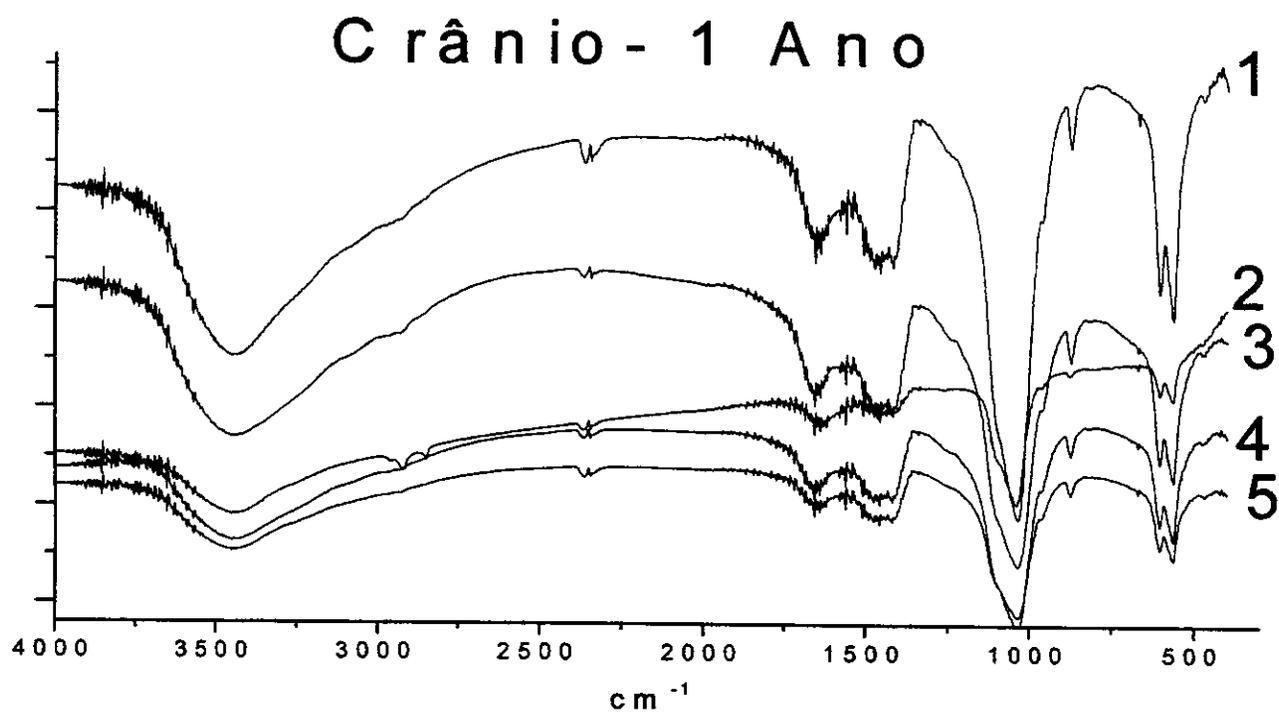


Figura 6: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de ratos com um ano de idade.

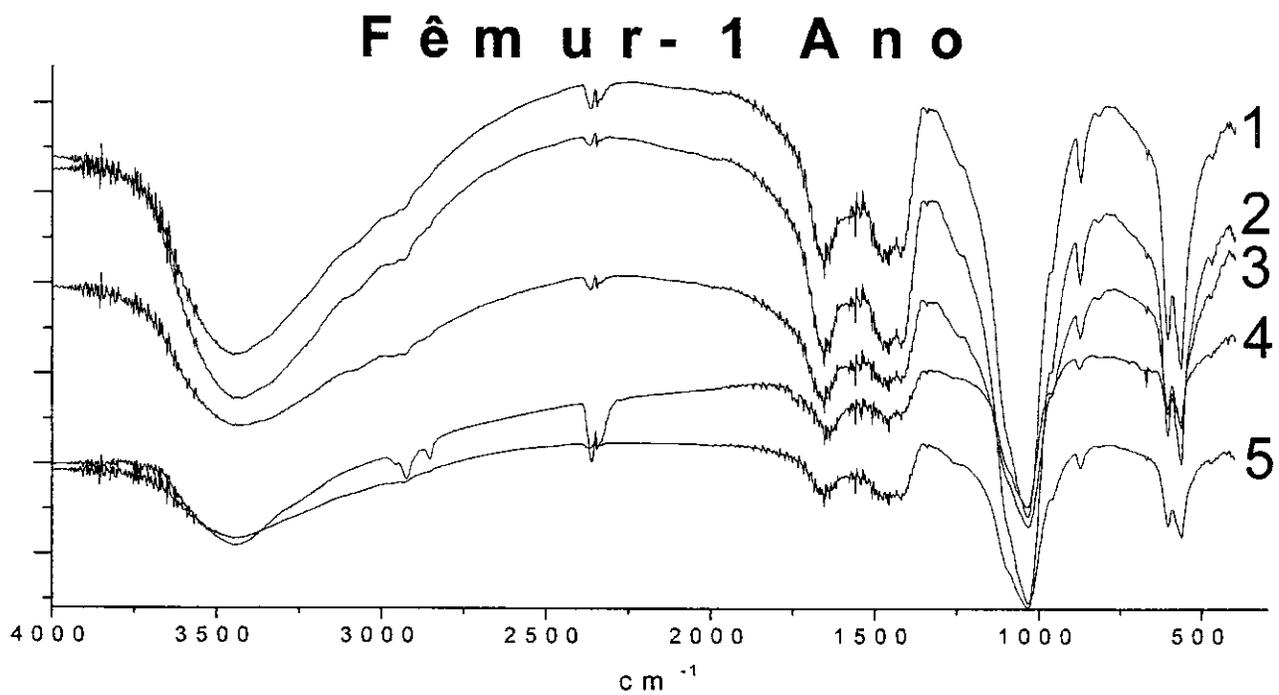


Figura 7: Espectros de FTIR da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de ratos com um ano de idade.

Os espectros de FTIR para os fosfatos de cálcio sintéticos são mostrados na Figura 8.

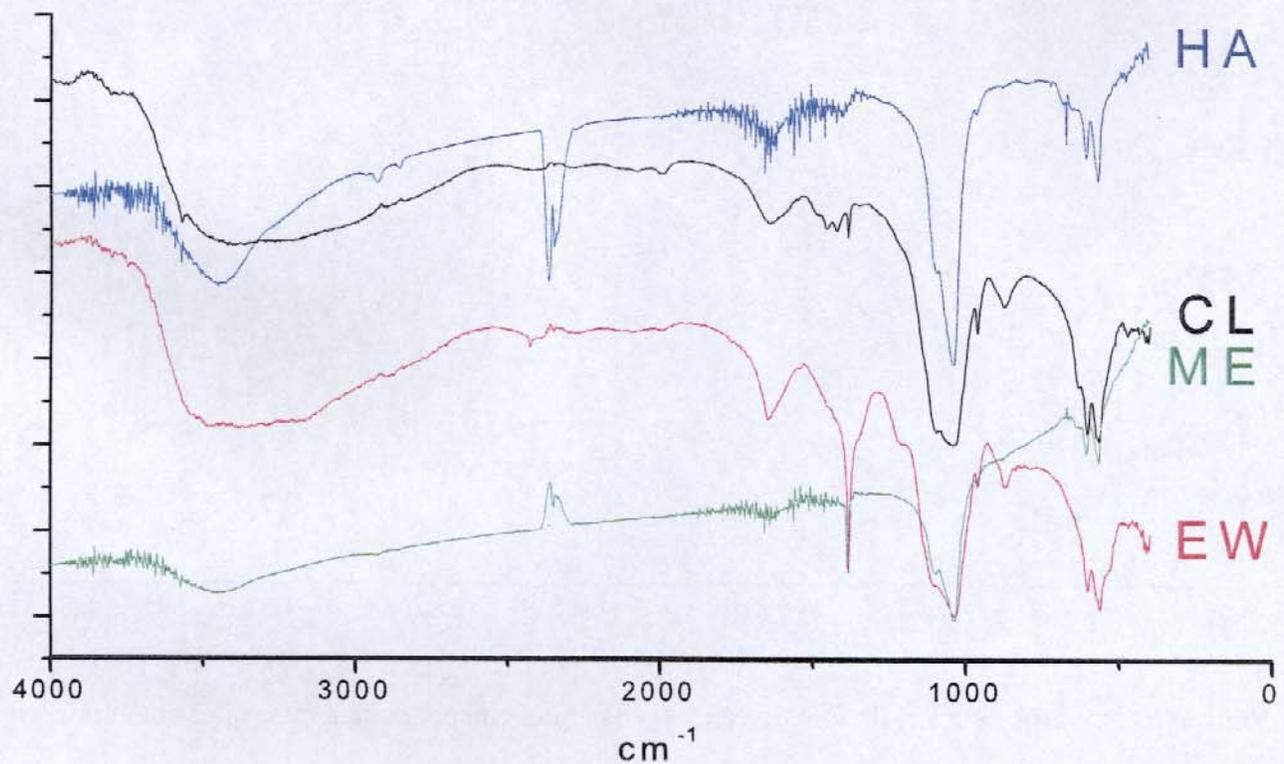


Figura 8: Espectros de FTIR dos fosfatos de cálcio sintéticos.

Os espectros de FTIR de ME, CL e EW apresentam, além das bandas descritas na Tabela 3, bandas referentes a traços do surfactante empregado na síntese destes materiais que não foi completamente eliminado, apesar da prolongada extração com acetona.

Tabela 3: Atribuição dos picos dos espectros de FTIR. ⁶²⁻⁶⁴

Banda / cm⁻¹	Atribuição
3580	ν_s estiramento OH de hidroxila
3400	ν_s estiramento OH de H ₂ O
1645	deformação H-O-H de H ₂ O
1470-1420	ν_1 estiramento simétrico de CO ₃ ²⁻
1384	estiramento NO ₃ ⁻
1128	ν_6 estiramento PO ₃ ⁻ em HPO ₄ ²⁻
1100, 1093, 1047	ν_3 estiramento assimétrico de PO ₄ ³⁻ ou ν_6 estiramento PO ₃ em HPO ₄ ²⁻
965	ν_1 estiramento simétrico PO ₄ ³⁻
918	ν_3 estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻
884	ν_2 estiramento antissimétrico de CO ₃ ²⁻
650	Vibrações OH de hidroxila
616, 581	ν_4 deformação O-P-O em PO ₄ ³⁻ ou ν_4 deformação O-P-O em HPO ₄ ²⁻
535	ν_7 estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻

5.1.2- Difractometria de Raios-X.

Os difratogramas de Raios-X obtidos para as fases ósseas inorgânicas são apresentados nas Figuras 9 a 12. Como pode ser observado, todos os difratogramas são semelhantes entre si, assim como são semelhantes ao difratograma da hidroxiapatita. Todos os difratogramas apresentam picos referentes a apatitas. Os picos presentes nos difratogramas das fases ósseas inorgânicas são largos, o que indica serem formados por cristais de tamanho reduzido. As larguras de meia altura (FWHM) dos picos dos difratogramas são semelhantes para todas as amostras. A numeração dos difratogramas corresponde à identificação do rato a partir do qual a fase óssea inorgânica foi obtida.

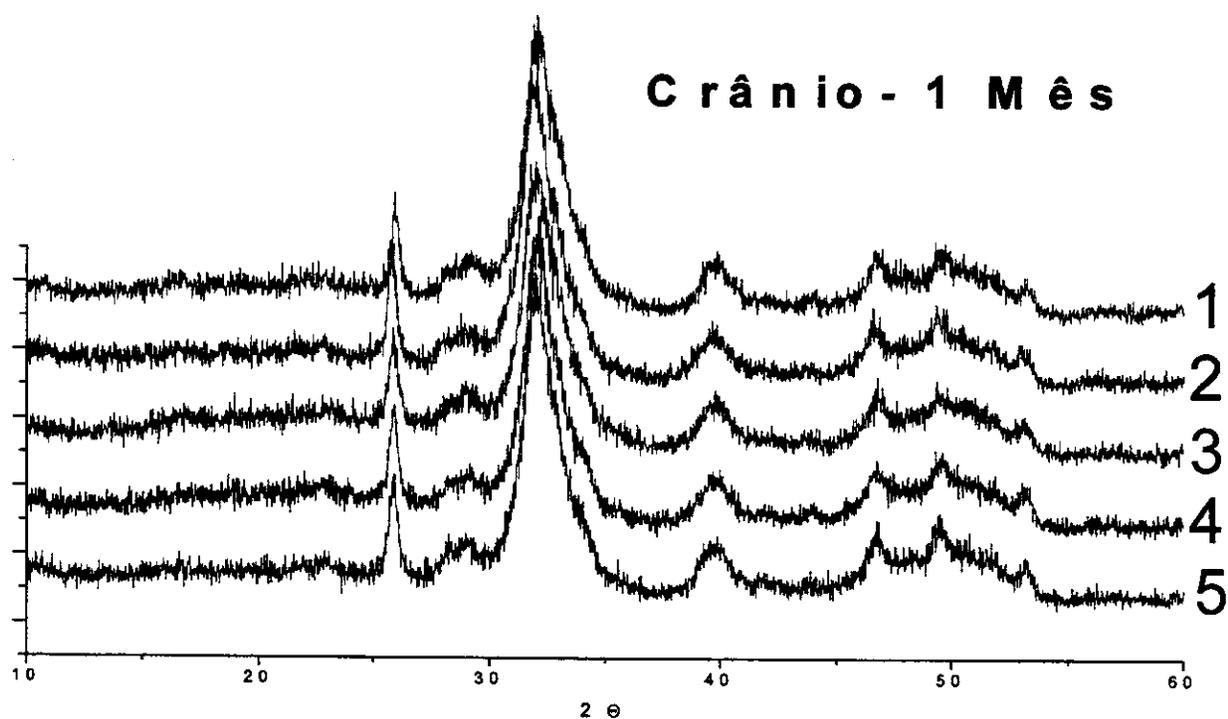


Figura 9: Difratoqramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes da calota craniana de ratos com um mês de idade.

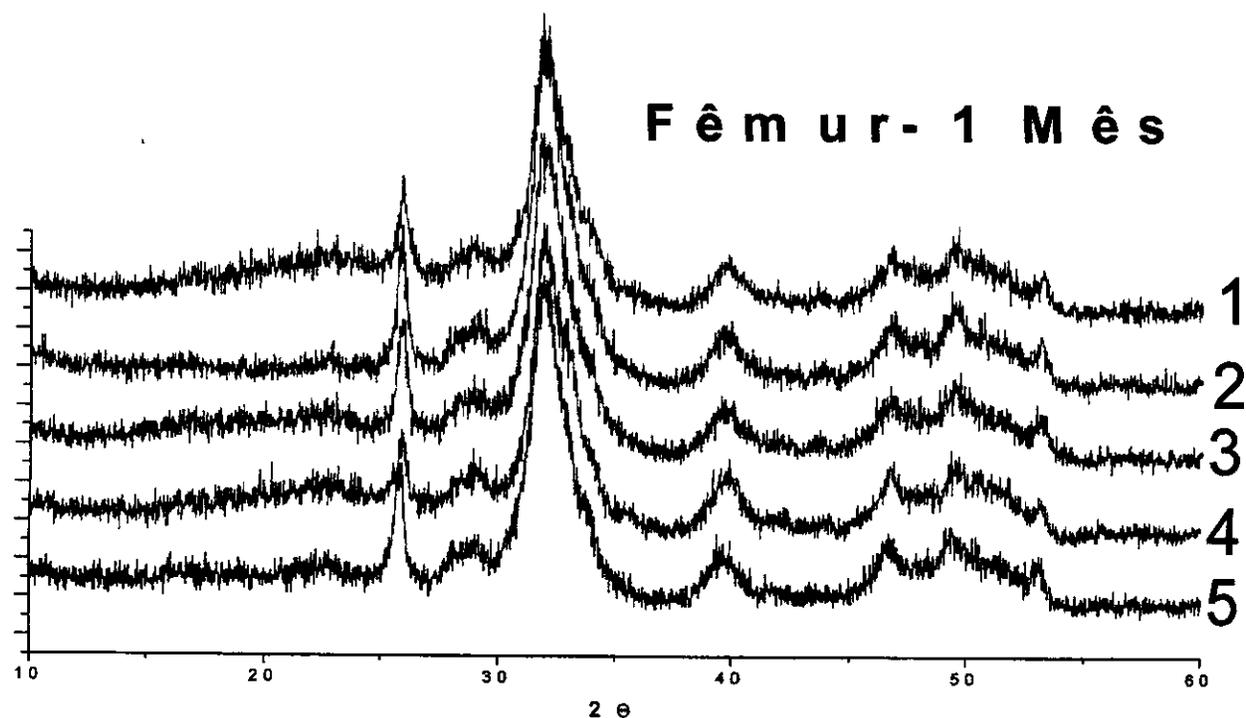


Figura 10: Difratoqramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes do fêmur de ratos com um mês de idade.

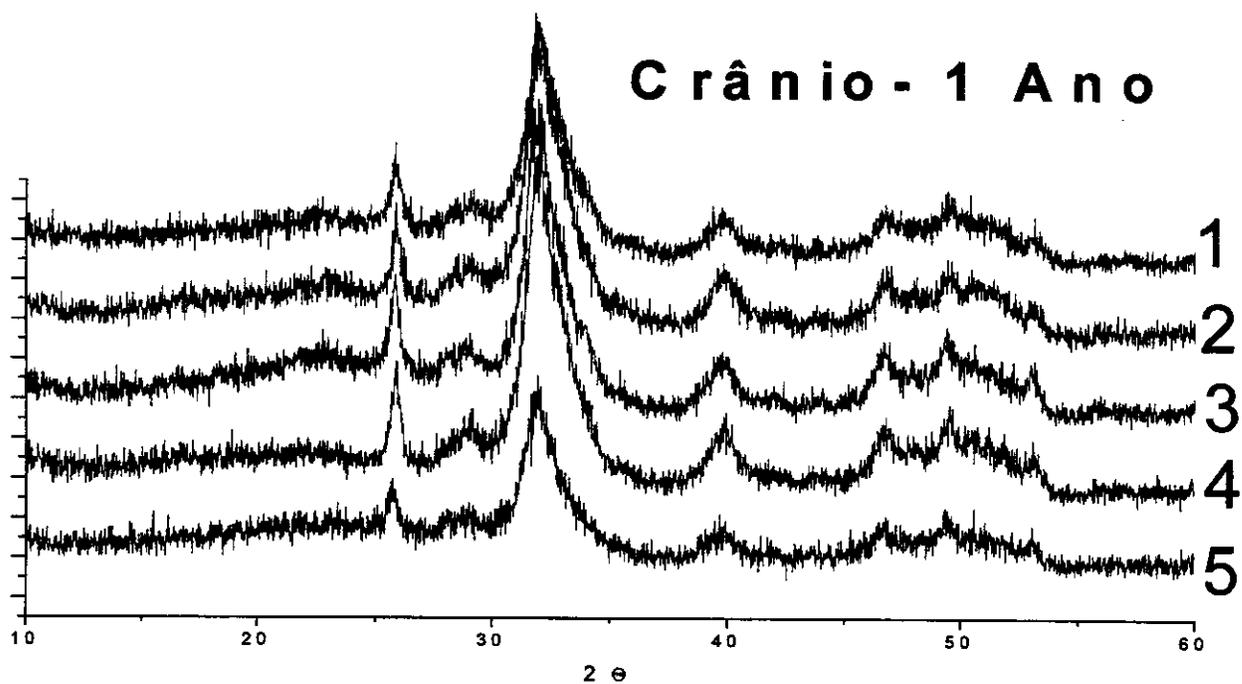


Figura 11: Difratoogramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes da calota craniana de ratos com um ano de idade.

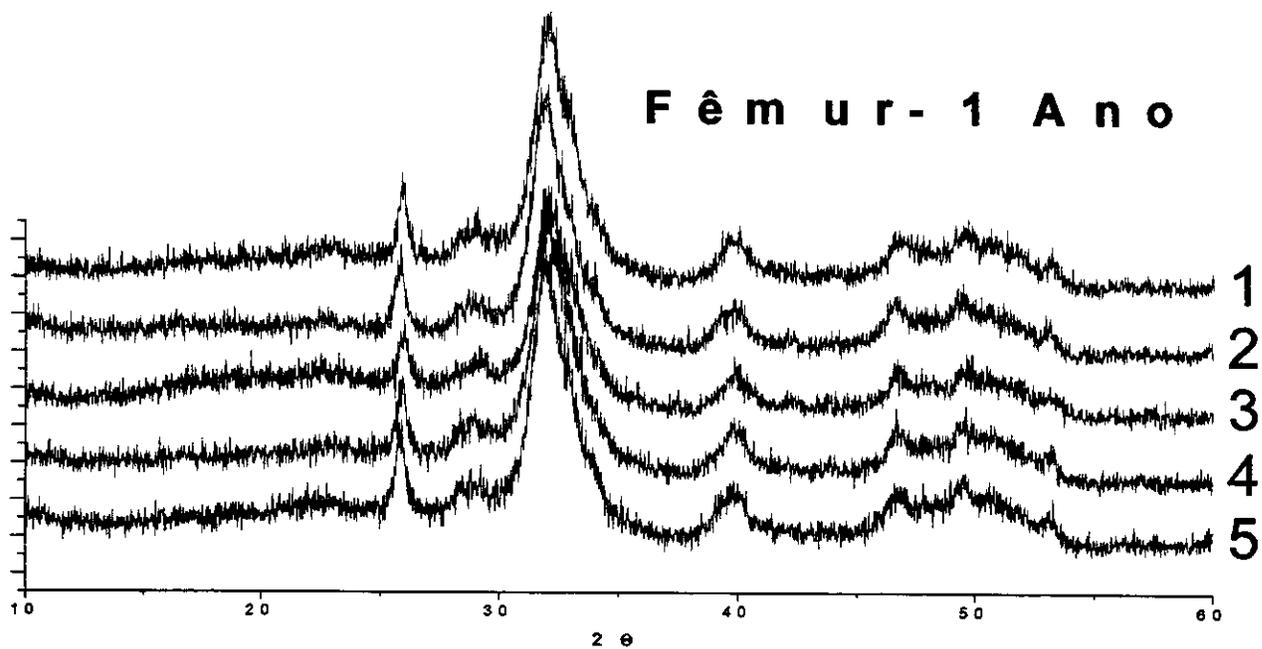


Figura 12: Difratoogramas de Raios-X das fases ósseas inorgânicas provenientes do fêmur de ratos com um ano de idade.

Com o objetivo de obter uma comparação mais detalhada entre os difratogramas de Raios-X das amostras de fase óssea inorgânica, foram realizados difratogramas destes materiais nas condições reportadas por Baig ⁶⁵, nos quais o pico centrado em $26^\circ 2\theta$ foi analisado alterando-se a varredura dos difratogramas para $0,002^\circ/\text{min}$ entre 23° e $29^\circ 2\theta$. Tal procedimento permite uma maior acumulo de contagens por segundo correspondente á intensidade do pico e uma melhor resolução da largura á meia altura. Os difratogramas obtidos são apresentados na Figura 13.

Os difratogramas da Figura 13 apresentam uma variação no ângulo 2θ correspondente aos máximos. Esta variação não pode ser atribuída a diferenças de cristalinidade ou à distância entre os planos cristalinos dos fosfatos de cálcio que constituem a fase óssea inorgânica, devido ao fato de que esta mesma variação é observada entre fases ósseas obtidas do mesmo tipo de osso para ratos diferentes com a mesma idade, como pode ser observado nas Figuras 9 a 12.

Conforme foi descrito, os difratogramas obtidos com maior resolução e maior tempo de acumulação/passos, realizados como proposto por Baig, também não apresentaram diferenças entre as fases ósseas obtidas de ossos diferentes de ratos com idades diferentes.

Desta forma, as diferenças nas propriedades estruturais dos ossos não podem ser atribuídas à diferença de cristalinidade das fases ósseas inorgânicas dos diferentes ossos, fato que contradiz o censo comum de que as diferenças nas propriedades estruturais dos ossos são resultantes de uma diferença de cristalinidade entre as fases ósseas inorgânicas.

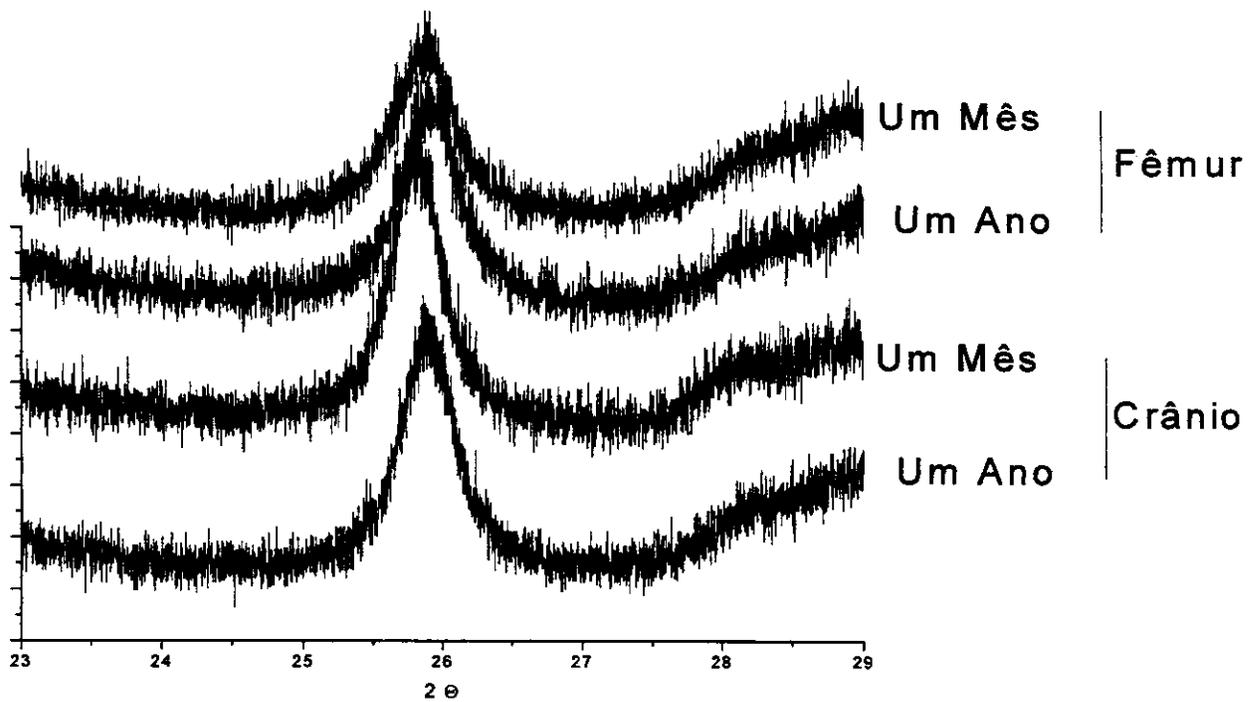


Figura 13: Difratoogramas de Raios-X de quatro amostras de fase óssea inorgânica focalizando um pico específico. Os difratoogramas foram obtidos com varredura $0,002^\circ/\text{min}$.

Os difratoogramas de Raios-X obtidos para os fosfatos de cálcio sintéticos são apresentados nas Figuras 14 a 17.

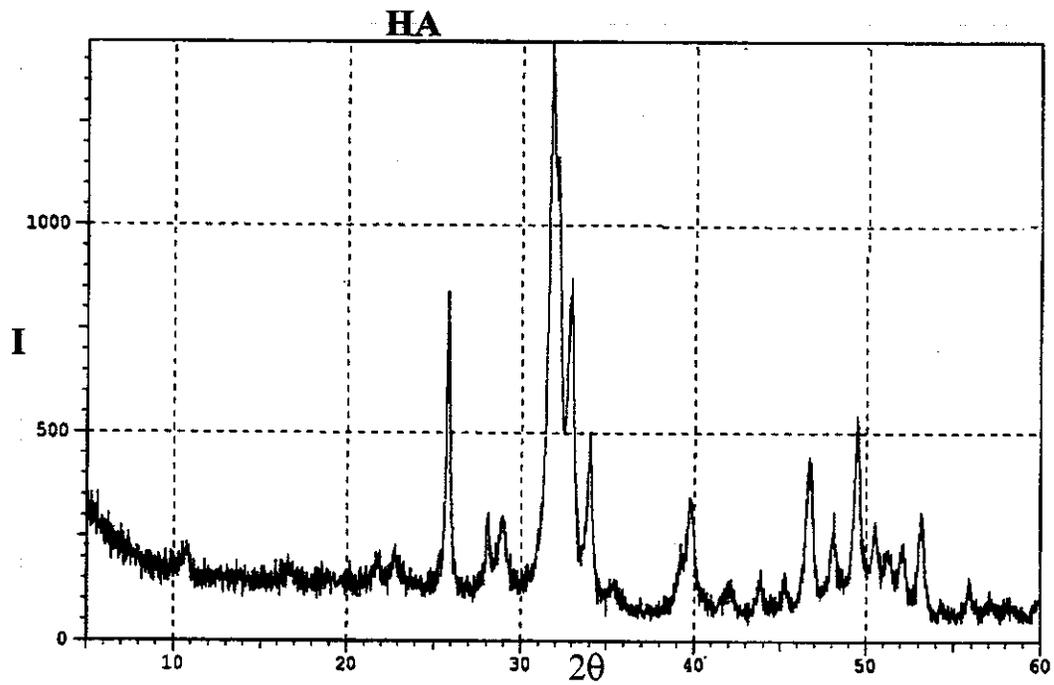


Figura 14: Difratomogramas de Raios-X para o fosfato de cálcio HA.

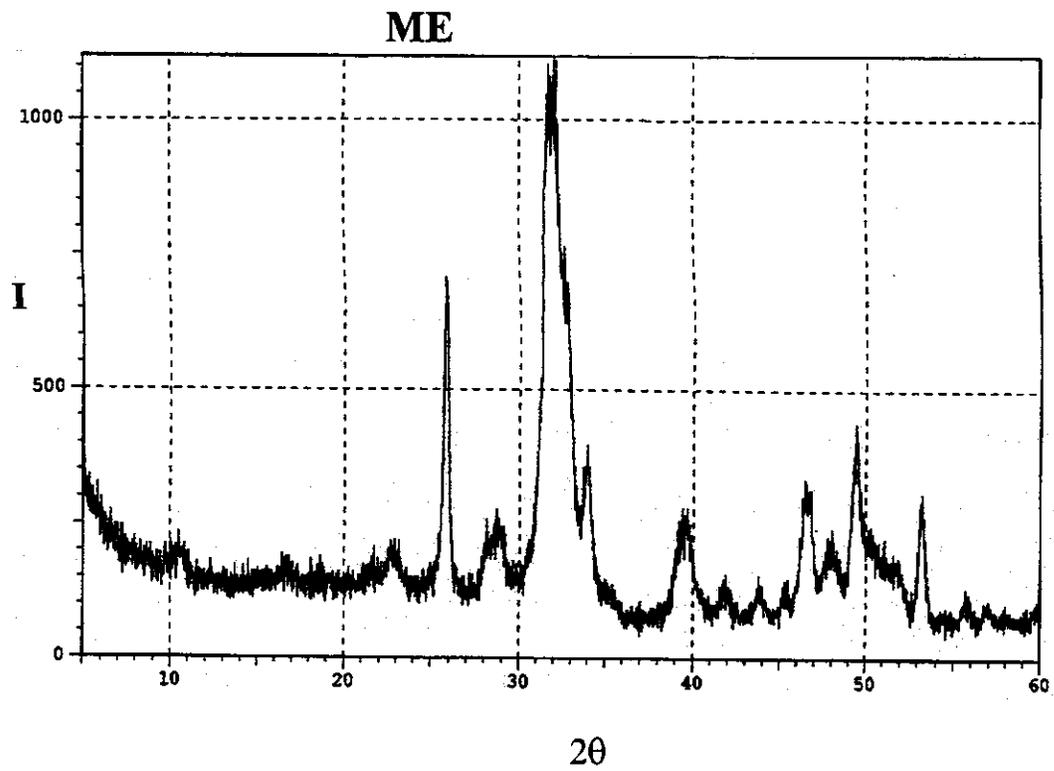


Figura 15: Difratomogramas de Raios-X para o fosfato de cálcio ME.

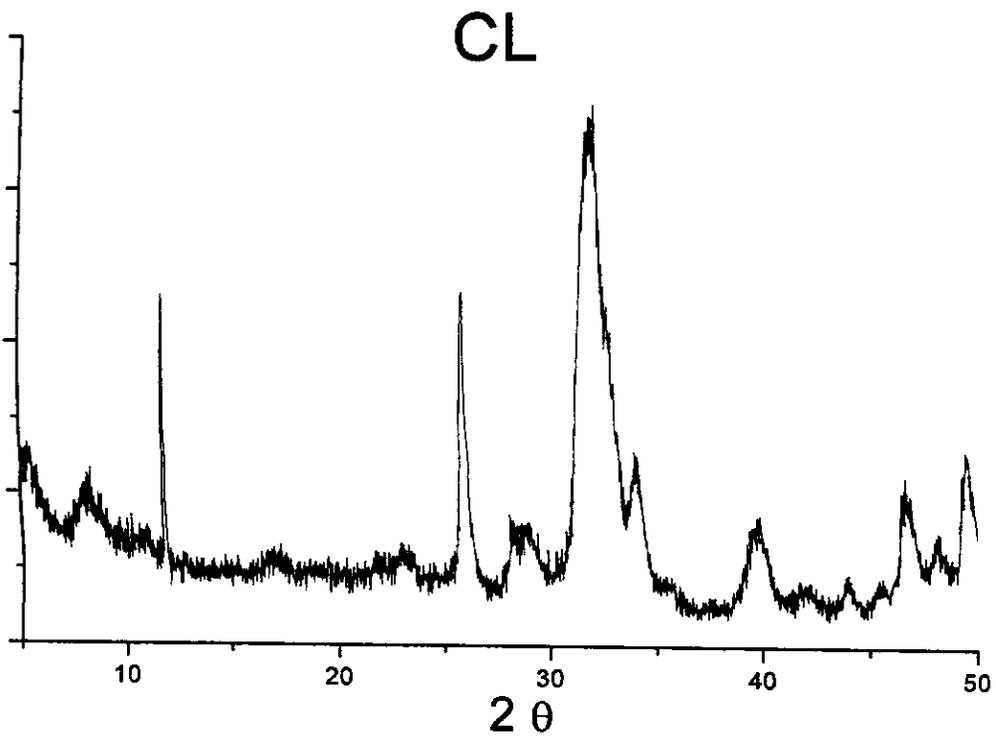


Figura 16: Difratoformas de Raios-X para o fosfato de cálcio CL.

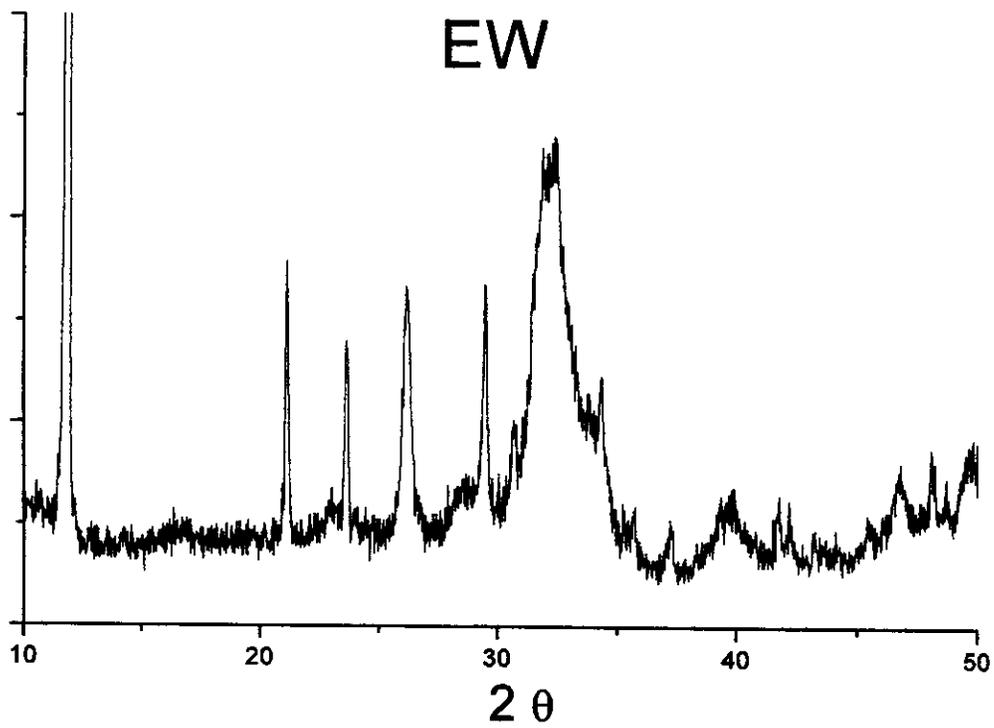


Figura 17: Difratoformas de Raios-X para o fosfato de cálcio EW.

Os difratogramas dos fosfatos de cálcio estudados neste trabalho indicam que eles apresentam um padrão de difração aos Raios-X semelhante ao padrão descrito na literatura como sendo o da hidroxiapatita ³, apesar da cristalinidade reduzida, como é indicado pela largura dos picos.

Os difratogramas dos fosfatos sintetizados em sistemas organizados se assemelham aos difratogramas da fase óssea inorgânica, indicando uma semelhança entre a cristalinidade dos fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados e a cristalinidade da fase óssea inorgânica.

5.1.3- Microscopia Eletrônica.

As Figuras 18 a 21 mostram as micrografias de fase óssea inorgânica obtidas de fraturas de fêmur e de crânio. As figuras mostram que os dois tipos de fase óssea inorgânica são compostos por um material formado por camadas. É possível também notar a presença de pequenas estruturas arredondadas. Essas estruturas estão presentes em outras regiões das amostras e também podem ser encontradas tanto na fase óssea inorgânica do fêmur, quanto na fase óssea inorgânica do crânio obtidas a partir de ratos com um mês de idade.

Comparando-se as microscopias das fases ósseas do fêmur e do crânio que foram fraturados depois da desproteinação é possível observar que apesar de ambos serem formados por camadas, a morfologia destes materiais é diferente.

Nas microscopias, é possível notar que as amostras que passaram pela desproteinação depois de serem fraturadas apresentam uma superfície mais uniforme (Figuras 18 e 20) indicando uma possível lixiviação causada pelo tratamento com a hidrazina.

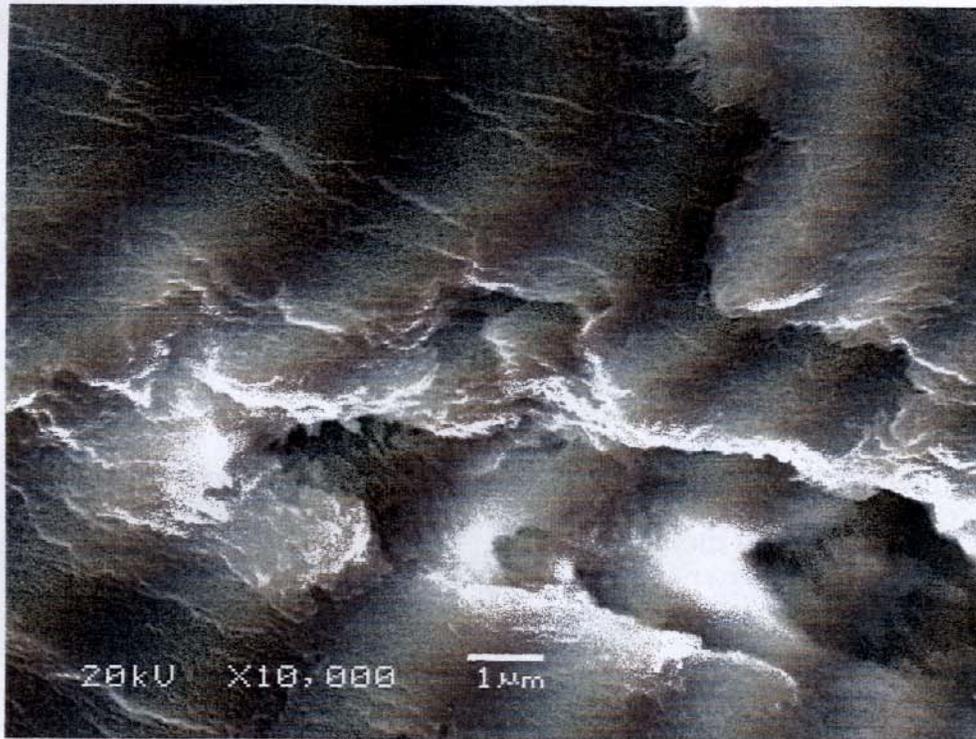


Figura 18: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada antes da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de rato com um ano de idade.

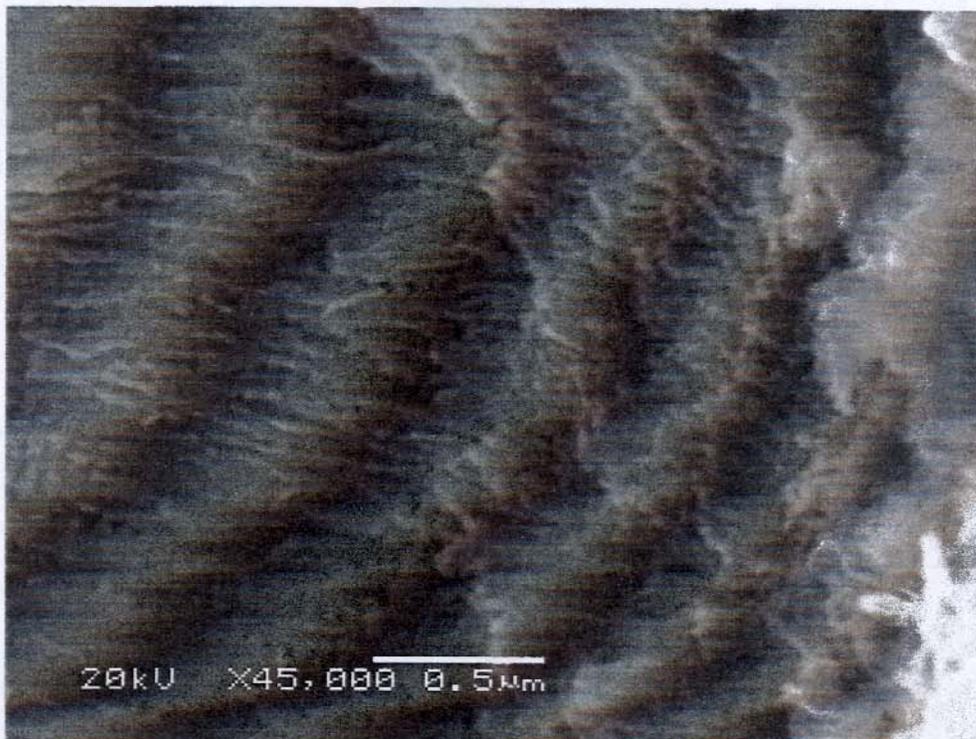


Figura 19: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada depois da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do crânio de rato com um ano de idade.

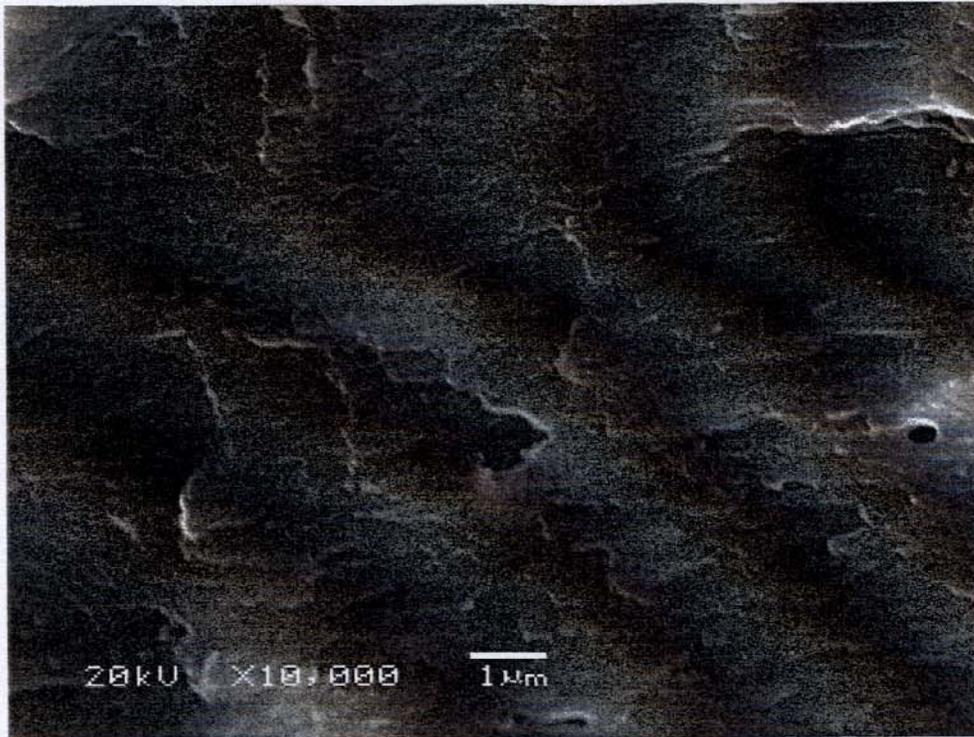


Figura 20: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada antes da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com um ano de idade.

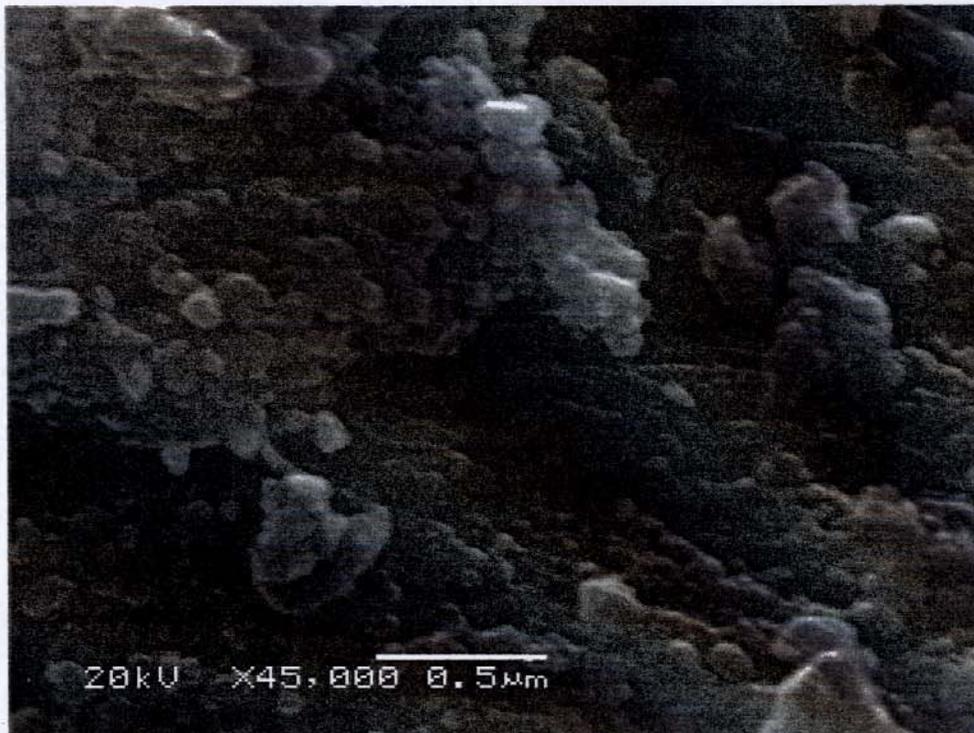


Figura 21: Microscopia de varredura eletrônica da fratura (realizada depois da desproteinação) da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com um ano de idade.

5.1.4- Determinação da Razão Ca/P por Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido (ICP/OES).

As razões Ca/P obtidas pela análise por ICP/OES para os fosfatos de cálcio sintéticos e para a fase óssea inorgânica são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio obtidos pela técnica de ICP/OES.

Fosfato de Cálcio	Razão Ca/P
Fêmur	1,7
Crânio	1,7
HA	1,6
ME	1,5
EW	1,4
CL	1,2

As razões Ca/P apresentadas pelos fosfatos sintéticos e pela fase óssea inorgânica variaram de 1,2 a 1,7. A razão Ca/P pode ser alterada pela presença de carbonatos (também detectada nos espectros de FTIR de alguns dos materiais), pela presença de HPO_4^{-2} , $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ou outros fosfatos. A razão Ca/P indica que os materiais sintetizados e a fase óssea inorgânica apresentam uma mistura de diversos tipos de fosfatos e sua estrutura cristalina pode conter vacâncias ou substituições de grupos, particularmente a fase óssea inorgânica, que pode conter Na^+ e Mg^{2+} .

A razão Ca/P da fase óssea inorgânica é praticamente idêntica para as duas fases ósseas provenientes do crânio e do fêmur, estando muito próxima do valor esperado da razão Ca/P para a hidroxiapatita.

5.1.5- Determinação da Área Superficial por BET.

As áreas superficiais dos fosfatos de cálcio foram determinadas utilizando-se a técnica de BET, cujos resultados são reportados na Tabela 5 e 6.

Tabela 5: Resultado da área superficial B.E.T dos fosfatos de cálcio sintéticos.

Fosfato de Cálcio	CL	EW	HA	ME
Área superficial (m ² /g)	75	96	40	147

Tabela 6: Resultados da área superficial BET para as fases ósseas inorgânicas provenientes de ratos com idade de um mês e um ano.

Ratos	Fêmur um mês					Crânio um mês					Fêmur um ano					Crânio um ano				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Área Superficial (m ² /g)	55	74	62	128	89	83	84	44	102	99	17	97	6	7	31	49	36	165	39	80

Pela Tabela 5 é possível notar que os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados apresentam uma área superficial superior à área da hidroxiapatita, que foi sintetizada por precipitação simples. Isso ocorre porque os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados são formados por partículas com tamanho da ordem de nanômetros e, em sua maioria, são amorfos, diferentemente da hidroxiapatita, que apresenta tamanho de partículas relativamente grande.

Os resultados obtidos pela determinação da área superficial da fase óssea inorgânica proveniente do grupo de cinco ratos não tornaram possível afirmar qual

fase óssea inorgânica apresenta maior ou menor área, já que a dispersão dos resultados apresentados pelas várias amostras foi considerável.

5.1.6 - Desproteinação da Fase Óssea Inorgânica.

Após a obtenção dos ossos de ratos Wistar, esses foram lavados e o procedimento para a desproteinação utilizando hidrazina foi realizado (vide procedimento 4.2). Duas amostras de ossos distintas foram preparadas: uma submetida apenas a um procedimento de desproteinação (utilizando-se hidrazina 25%) e outra amostra na qual duas desproteinações foram realizadas (a primeira utilizando hidrazina 25% e a segunda utilizando hidrazina 64%). Estas amostras foram caracterizadas após a desproteinação por espectroscopia FTIR.

A técnica de FTIR, reconhecidamente sensível a compostos orgânicos, foi escolhida para verificar se os compostos orgânicos formadores da matriz óssea (principalmente colágeno) haviam sido eliminados pelo tratamento com hidrazina.

As Figuras 22 e 23 mostram os espectros de FTIR obtidos a partir da fase óssea inorgânica de fêmures, provenientes de um rato com a idade de um mês e de um rato com idade de um ano, que foram submetidos a uma ou duas desproteinações.

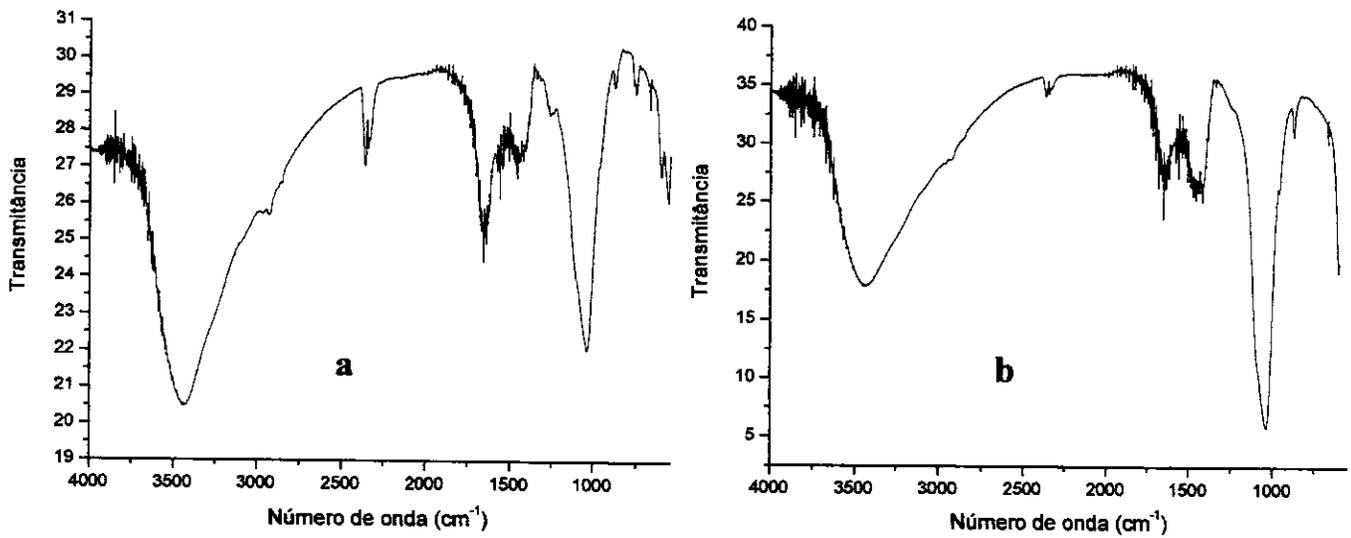


Figura 22 : Espectros de IV da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com idade de um mês: (a) após uma desproteinação e (b) após duas desproteinações.

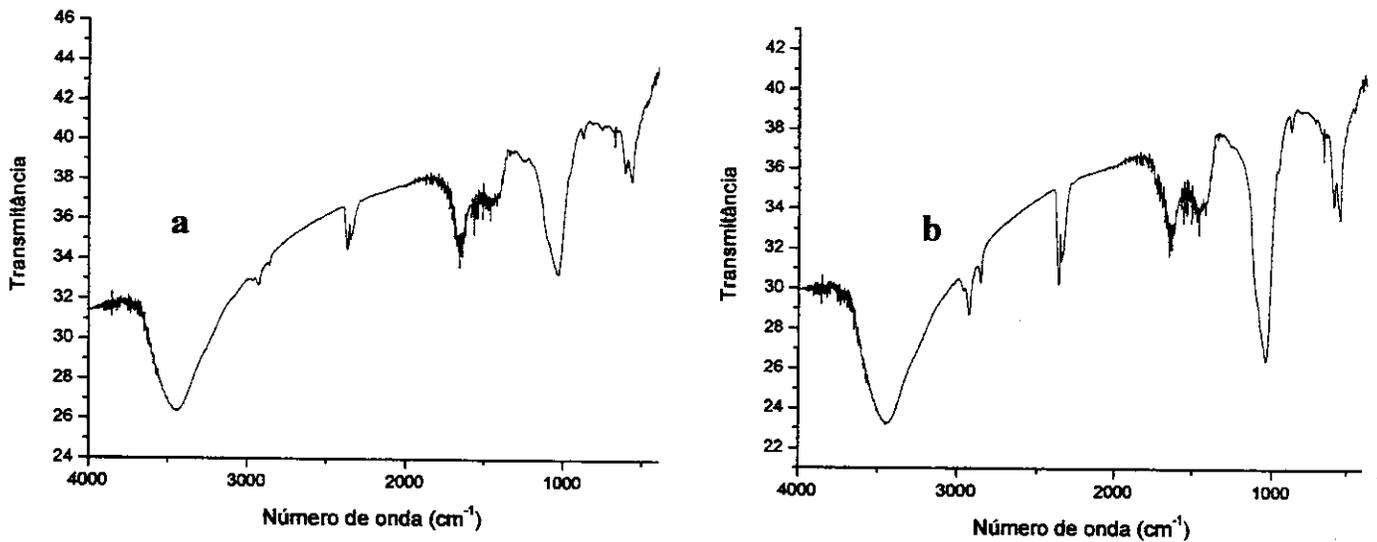


Figura 23: Espectros de IV da fase óssea inorgânica proveniente do fêmur de rato com um ano de idade: (a) após uma desproteinação e (b) após duas desproteinações.

Os espectros de FTIR permitem avaliar a eficiência dos processos de desproteínação. Os espectros correspondentes às fases ósseas inorgânicas resultantes dos ossos submetidos tanto a uma desproteínação, como a duas desproteínações (Figura 21), mostram bandas que podem ser atribuídas à compostos orgânicos que não foram totalmente eliminados. Esses resultados mostram que, dentro da limitação da técnica, a desproteínação foi eficiente. Estes compostos podem ser relacionados às bandas próximas de 2900 cm^{-1} , que corresponde a grupos C-H.

5.1.7- Caracterização da Hidroxiapatita após Cinética de Dissolução.

A Figura 24 mostra os espectros de FTIR obtidos para o pó de hidroxiapatita, antes de ser submetido a medidas de cinética de dissolução e após esse processo.

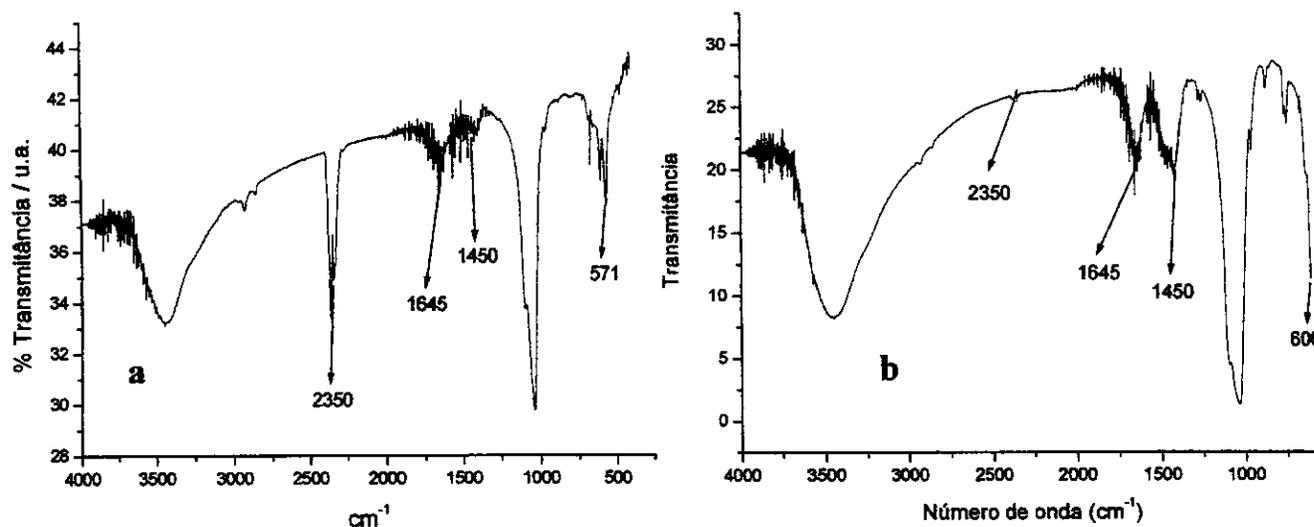


Figura 24: Espectros de FTIR de hidroxiapatita antes (a) e após (b) a cinética de dissolução.

Observando os espectros apresentados na Figura 24 é possível notar que a banda referente a carbonato (1450 cm^{-1}) é mais intensa no espectro de FTIR da amostra após a cinética de dissolução, indicando a formação de carbonatos de

cálcio no fosfato ao longo da cinética de dissolução, o que era de se esperar uma vez que o controle do pH é realizado com o sistema tampão ácido carbônico/bicarbonato.

5.2 – Cinética de Dissolução e Solubilidade.

5.2.1 - Determinação da Cinética de Dissolução.

Para as medidas de cinética de dissolução e de solubilidade (equilíbrio) dos fosfatos de cálcio, foi necessário determinar a quantidade de íons cálcio liberada para a solução ao longo do tempo. Como a cinética de dissolução é lenta, diversas técnicas de análise podem ser utilizadas para esta determinação, tais como: Absorção Atômica, Espectrometria de Emissão, entre outras.

Porém, para a maioria dos métodos de análise, é necessário que sejam retiradas alíquotas ao longo do tempo para posterior determinação. Neste caso as alíquotas devem estar livres de partículas do fosfato de cálcio, que continuariam a se dissolver ao longo do tempo. Os fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados, como os que são objeto de estudo deste projeto, apresentam partículas com tamanho da ordem de nanômetros. Mesmo havendo aglomerados destas partículas, a agitação intensa pode desagregar estes materiais. Devido a estas dimensões apenas microfiltros poderiam ser empregados para realizar este tipo de separação com uma certa eficiência. Assim, técnicas de análise onde é necessária a coleta de alíquotas que estejam livres de partículas ao longo da cinética de dissolução seriam de difícil implementação neste trabalho.

O método utilizado por Gramain ^{25, 26} para determinar a quantidade de cálcio presente na solução ao longo da cinética de dissolução utiliza como parâmetro de cálculo a equação química da dissolução do fosfato de cálcio com estequiometria definida. Com esta equação de dissolução é possível, utilizando a estequiometria do material e sabendo a quantidade de H^+ consumido ao longo da dissolução, determinar a quantidade de cálcio presente na solução.

Como os fosfatos de cálcio de interesse neste projeto não apresentam uma estequiometria fixa, pois são provavelmente misturas de diversos fosfatos, fica inviabilizada a possibilidade da medida do consumo de H^+ . Desta forma, foi feita a opção da determinação da cinética de dissolução pela medida direta da concentração de íons Ca^{+2} através de um eletrodo de íon seletivo para cálcio ao longo do processo de dissolução.

5.2.1.1 – Ensaio Preliminares e Determinação de Condições de Medidas para a Cinética de Dissolução.

Foram realizados alguns testes preliminares para estimar a velocidade de resposta do eletrodo. Como na cinética de dissolução temos respostas em função do tempo, a velocidade de resposta do eletrodo tem grande importância para a confiabilidade das medidas.

O eletrodo foi imerso em água (sob agitação de 390 rpm) e após estabilização da leitura foi adicionada rapidamente uma pequena massa de cloreto de cálcio, determinando-se o tempo para que o eletrodo estabilizasse o seu sinal. Os tempos para a estabilização foram menores do que 20 segundos.

Segundo o manual do eletrodo para íons seletivo para cálcio, a faixa de pH de utilização do eletrodo está compreendida entre pH 3 e pH 9. As medidas realizadas neste trabalho foram realizadas na faixa de pH entre 6,35 a 7,40, faixa que está, portanto, dentro dos limites de utilização do eletrodo.

5.2.2- Determinação da Concentração de Ca^{+2} Durante a Cinética de Dissolução com o Eletrodo de Íon Seletivo.

As medidas da concentração de cálcio na solução, realizadas com o eletrodo de íon seletivo para cálcio durante o processo de dissolução dos fosfatos de cálcio, são apresentadas nas Figuras 27 a 30. Observando as figuras, é possível notar que muitas vezes os resultados apresentados pelo eletrodo de íon seletivo para a primeira medida da concentração de cálcio na solução diferem um pouco dos resultados da duplicata.

Com a finalidade de avaliar a origem destas diferenças, um teste da qualidade das medidas foi realizado (vide item 4.3). Os resultados dessas determinações, apresentados na Figura 24 como “medidas independentes” mostram flutuações que se assemelham às medidas realizadas ao longo da cinética de dissolução, mostrando que as diferenças observadas são inerentes ao método utilizado para a determinação da cinética de dissolução, não podendo ser atribuídas apenas à resposta do eletrodo de íon seletivo.

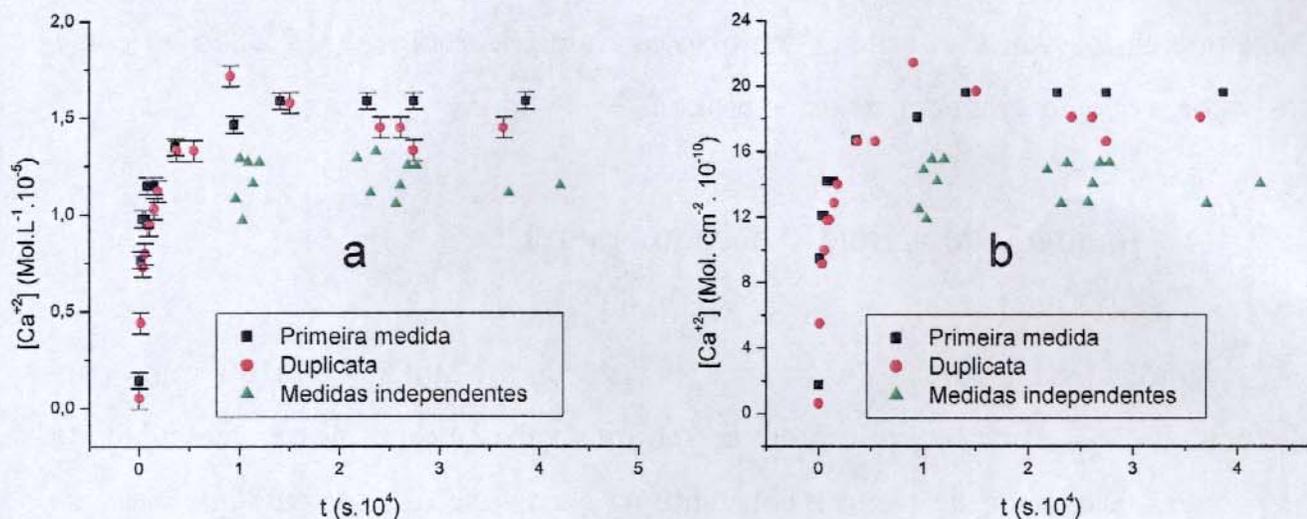


Figura 25: Gráficos apresentando as medidas independentes para a dissolução da fase óssea inorgânica do crânio em pH 7,00, sem correção de unidades (a) e com correção de unidades (b).

5.2.3- Tampão de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ para Controle do pH Durante a Cinética de Dissolução.

Entre as formas de controle de pH dos fluidos biológicos nos vertebrados, o tampão $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ é importante. Variações de pH em torno de 7,0 podem ser obtidas variando-se a concentração de CO_2 dissolvido nos fluidos presentes nestes organismos. Devido a essa característica, este tampão foi escolhido para o controle de pH nos estudos de cinética de dissolução.

O sistema $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$ tem $\text{pK}=6,35$. Neste valor de pH ocorre a capacidade máxima de tamponamento da solução, razão pela qual foi escolhido para ser o pH inicial das medidas de dissolução. Além do pH 6,35, foram escolhidos para a realização da cinética de dissolução os pH 7,00 e 7,40. Estes valores foram escolhidos por serem os pH compatíveis com os sistemas dos vertebrados, principalmente o dos mamíferos, que se situa entre 6,50 e 7,40. Os pH escolhidos para o estudo de cinética de dissolução de todos os fosfatos de cálcio

contemplam os valores normais dos pH dos fluidos corpóreos ($\approx 7,2$) assim como os valores que ocorrem em casos de trauma. ⁶

5.2.4- Velocidade de Agitação e Temperatura.

Durante as medidas de cinética o sistema foi agitado a 2100 rpm. Esta velocidade de agitação foi escolhida porque sabe-se que nesta velocidade a espessura da camada de Nerst é constante na superfície dos fosfatos que estão se dissolvendo ^{26, 27}. A determinação da espessura da camada de Nerst foi realizada em trabalhos de Gramain ^{26, 27}, que observou a relação entre a espessura desta camada e a velocidade de agitação no sistema onde é realizada a dissolução do fosfato de cálcio. Gramain observou que a partir de uma velocidade de agitação de 1860 rpm a camada de Nerst permanece constante na superfície do fosfato de cálcio com o valor de 10^{-3} cm ^{25, 26}.

A temperatura de 37° C é semelhante à temperatura dos organismos vivos, e para uma melhor comparação entre testes *in vivo* e testes *in vitro*, esta temperatura foi a escolhida para serem realizadas as medidas de solubilidade e cinética.

5.2.5- Calibração do Eletrodo.

A Figura 26 apresenta exemplos de calibrações realizadas ao longo das medidas de cinética de dissolução de hidroxiapatita para pH 6,35, 7,00 e 7,40. Os valores representados nos gráficos são as médias das calibrações realizadas ao longo da cinética de dissolução dos diversos fosfatos de cálcio nos respectivos pH.

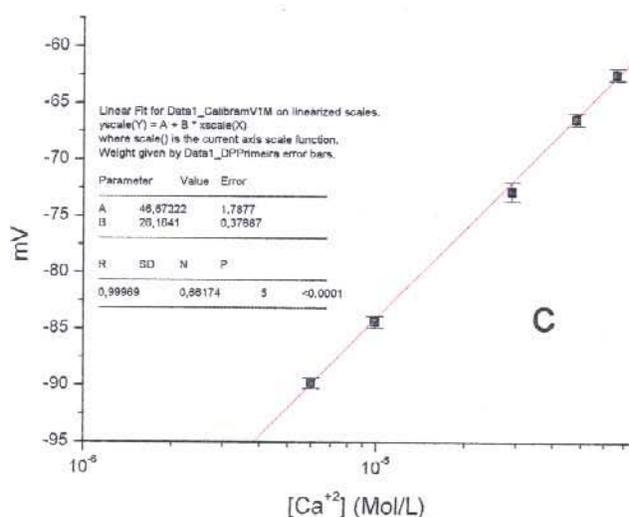
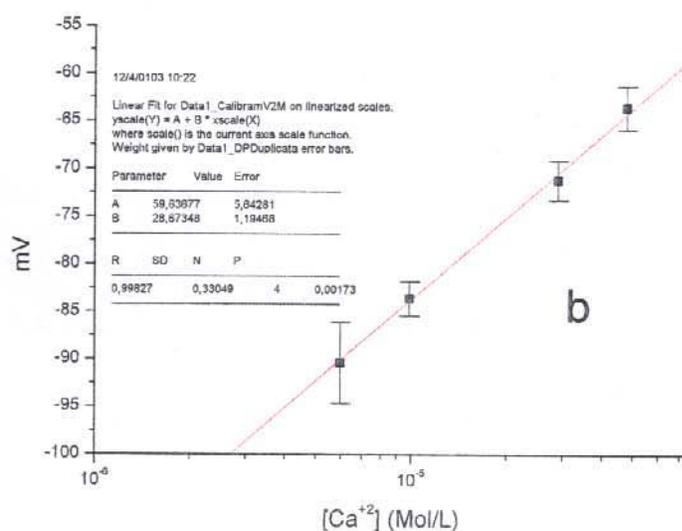
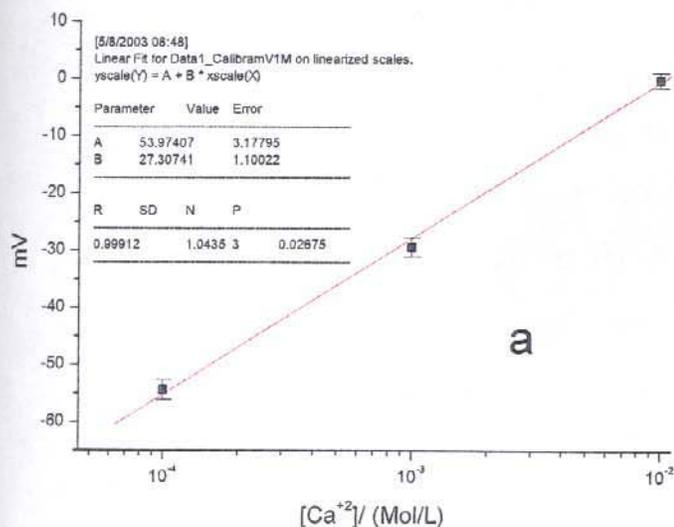


Figura 26: Calibrações realizadas ao longo da cinética de dissolução da HA, em pH 6,35 (a), 7,00 (b) e 7,40 (c). As barras representam o desvio padrão das medidas.

A solubilidade dos fosfatos de cálcio é maior quanto menor for o pH da solução onde este fosfato está se dissolvendo. Essa dissolução é mais pronunciada em pH baixos, pois quanto menor o pH ocorre um maior ataque de H^+ à superfície do fosfato.

A faixa de concentração de Ca^{+2} à qual o eletrodo responde, segundo o manual, é de 10^{-6} a 10^{-2} mol.L⁻¹. A partir dos gráficos, pode-se concluir que a

resposta dentro deste intervalo de concentração é bastante linear.

Para a determinação do desvio padrão das medidas na cinética de dissolução, foi utilizado o desvio padrão da calibração em mV. Este erro foi transformado em mol.L⁻¹, utilizando-se a mesma curva de calibração das medidas. A variação em mol.L⁻¹ foi então atribuída como sendo o desvio padrão para os pontos da cinética.

De forma geral, os maiores erros apresentados pelas medidas de concentração de Ca⁺² ao longo da cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio ocorreram em concentrações próximas ao limite inferior de detecção do eletrodo (por volta de 10⁻⁶ mol.L⁻¹).

Com base nos gráficos apresentados os erros não são preocupantes, principalmente se for considerado que estes erros foram obtidos ao longo da cinética de dissolução, que tem duração de 10 horas, e as medidas foram feitas utilizando-se calibração ponto a ponto ao longo da cinética de dissolução.

5.2.6- Modelo para Tratamento dos Dados da Cinética de Dissolução.

O modelo para a cinética de dissolução de fosfatos de cálcio ^{25, 26} foi originalmente desenvolvido para explicar especificamente a dissolução de hidroxiapatita, um dos fosfatos de cálcio mais estudados.

No modelo proposto e usado por Gramain e seu grupo, a dissolução de hidroxiapatita é determinada por medidas de pH e volumes de ácido e base, adicionados ao sistema para manter o pH constante durante a dissolução do fosfato. ³⁸ Para a transformação da quantidade de H⁺ adicionado em função do tempo para a quantidade de fosfato de cálcio que se dissolve, é necessário conhecer a estequiometria do material, sendo este um dos motivos do estudo ter sido realizado apenas com fosfatos como a hidroxiapatita, cuja composição estequiométrica é bem determinada.

O modelo considera que à medida que o fosfato se dissolve, há um aumento da concentração de Ca^{+2} na solução e simultaneamente ocorre a formação de uma camada de Ca^{2+} adsorvida na superfície do material. Por nossa vez, recorrendo às medidas da concentração de cálcio na solução, buscamos implementar algumas simplificações nas aproximações utilizadas por Gramain no desenvolvimento do seu modelo para a dissolução da hidroxiapatita.

5.2.7- Resultados da Cinética de Dissolução dos Fosfatos de Cálcio a 37 °C.

As Figuras 27 a 30 mostram a variação da concentração de cálcio em função do tempo de dissolução a vários pH, para os fosfatos de cálcio estudados. Nos gráficos, os pontos vermelhos e pretos correspondem aos valores das medidas feitas em duplicata, sendo que os pontos pretos correspondem aos valores do conjunto de medidas que foi feito primeiro.

Para uma melhor comparação entre os gráficos da variação da concentração de cálcio em função do tempo, os gráficos foram padronizados em relação aos eixos x e y mantendo-se para eles a mesma escala. Também para facilitar a visualização e descrição dos gráficos, a Tabela 7 apresenta as siglas utilizadas para identificação dos fosfatos correspondentes à cada gráfico.

Tabela 7: Siglas utilizadas nos gráficos apresentados ao longo da discussão da cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio.

Siglas utilizadas	Significado e características dos fosfatos de cálcio sintetizados em sistemas organizados.
ME	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS que utilizou o fosfato de cálcio sintetizado em sistemas organizados formados por microemulsão de água em óleo.
CL	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS que utilizou o fosfato de cálcio sintetizado em sistemas organizados formados por cristal líquido.
EW	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS que utilizou o fosfato de cálcio sintetizado em sistemas organizados formados por emulsão água em óleo.
HA	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS que utilizou a hidroxiapatita.
Fêmur	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS que utilizou o fosfato de cálcio proveniente da fase óssea inorgânica extraída da matriz óssea do fêmur.
Crânio	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS que utilizou o fosfato de cálcio proveniente da fase óssea inorgânica extraída da matriz óssea do crânio.

KCl	Gráficos referentes a cinéticas de dissolução realizadas em solução de KCl 0,08 Mol/L
pH 6,35	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS dos fosfatos de cálcio realizado em pH 6,35.
pH 7,00	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS dos fosfatos de cálcio realizado em pH 7,00.
pH 7,40	Gráficos referentes ao experimento de cinética de dissolução em FCS dos fosfatos de cálcio realizado em pH 7,40.

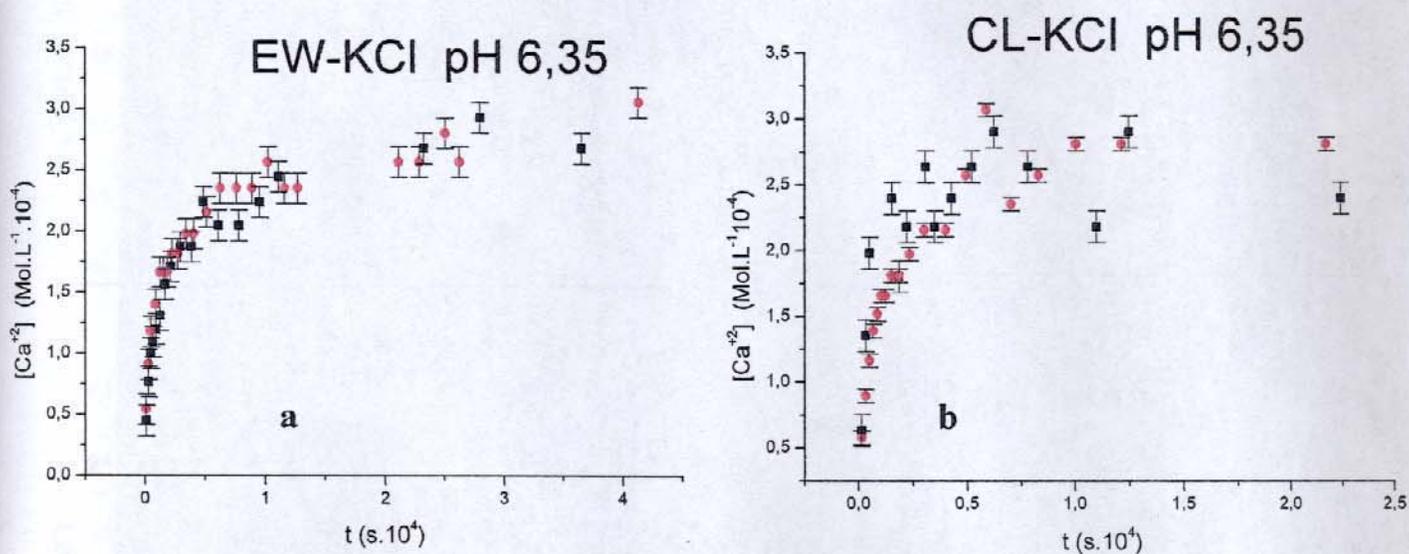


Figura 27: Concentrações determinadas em função do tempo na cinética de dissolução de EW-KCl (a) e CL-KCl (b).

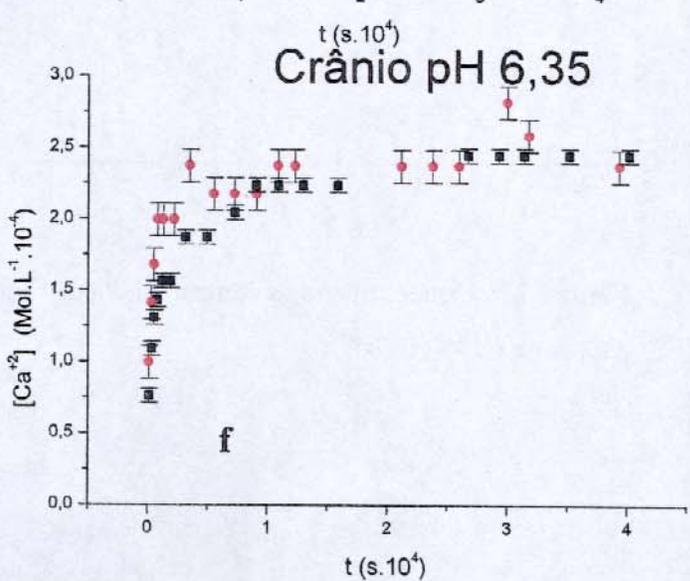
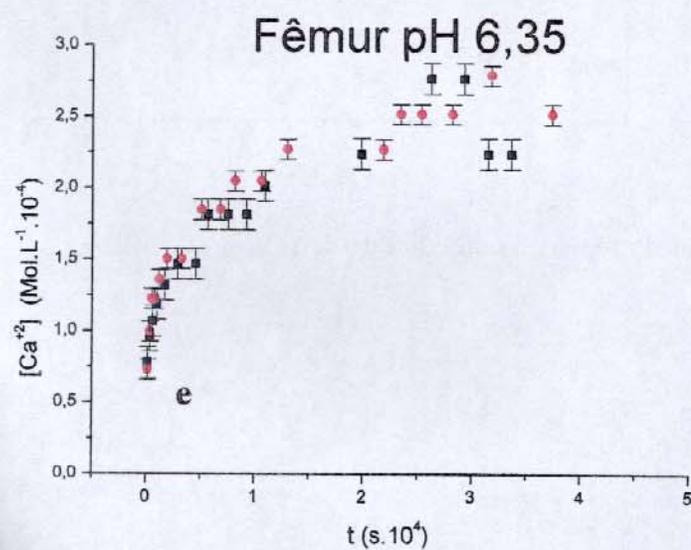
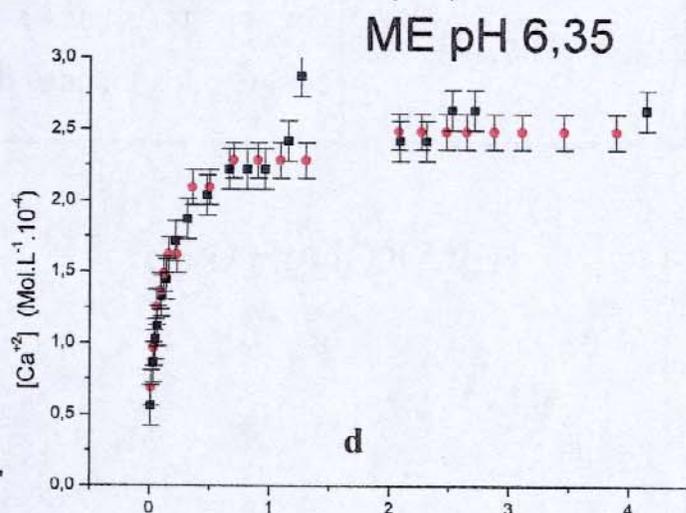
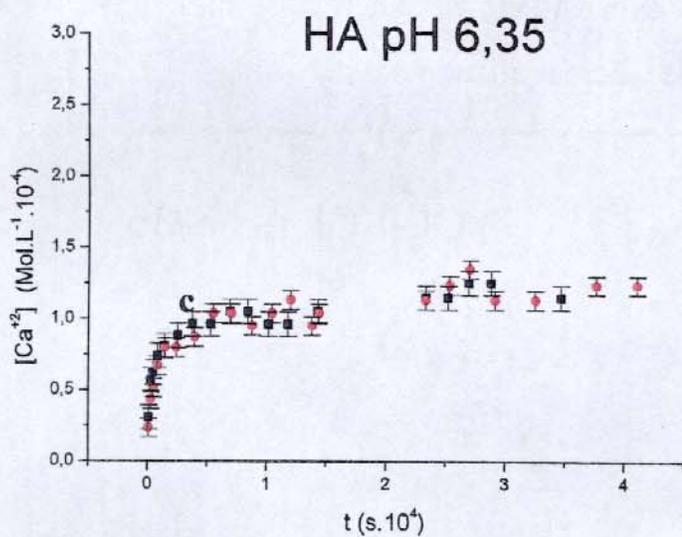
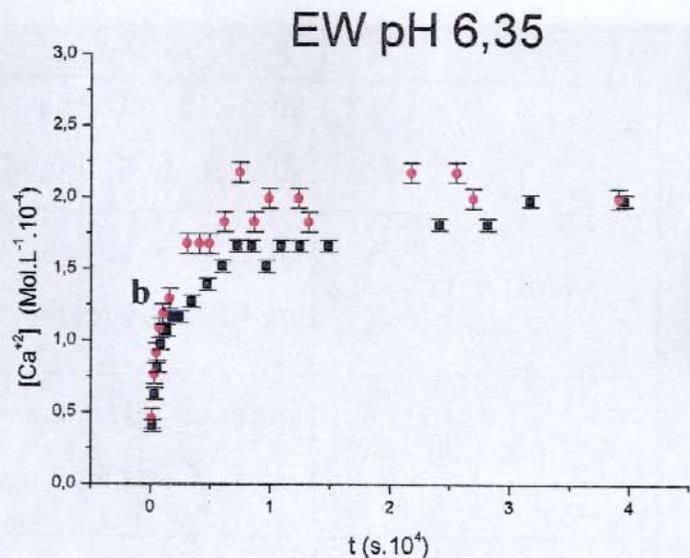
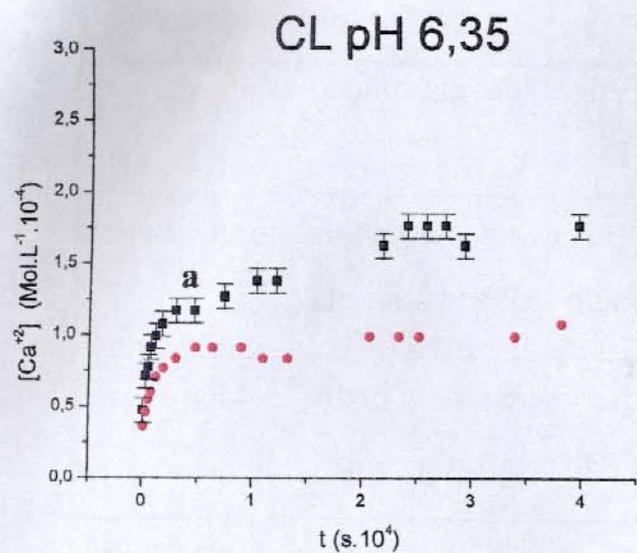


Figura 28: Resultados das cinéticas de dissolução dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f), em solução de FCS em pH 6,35.

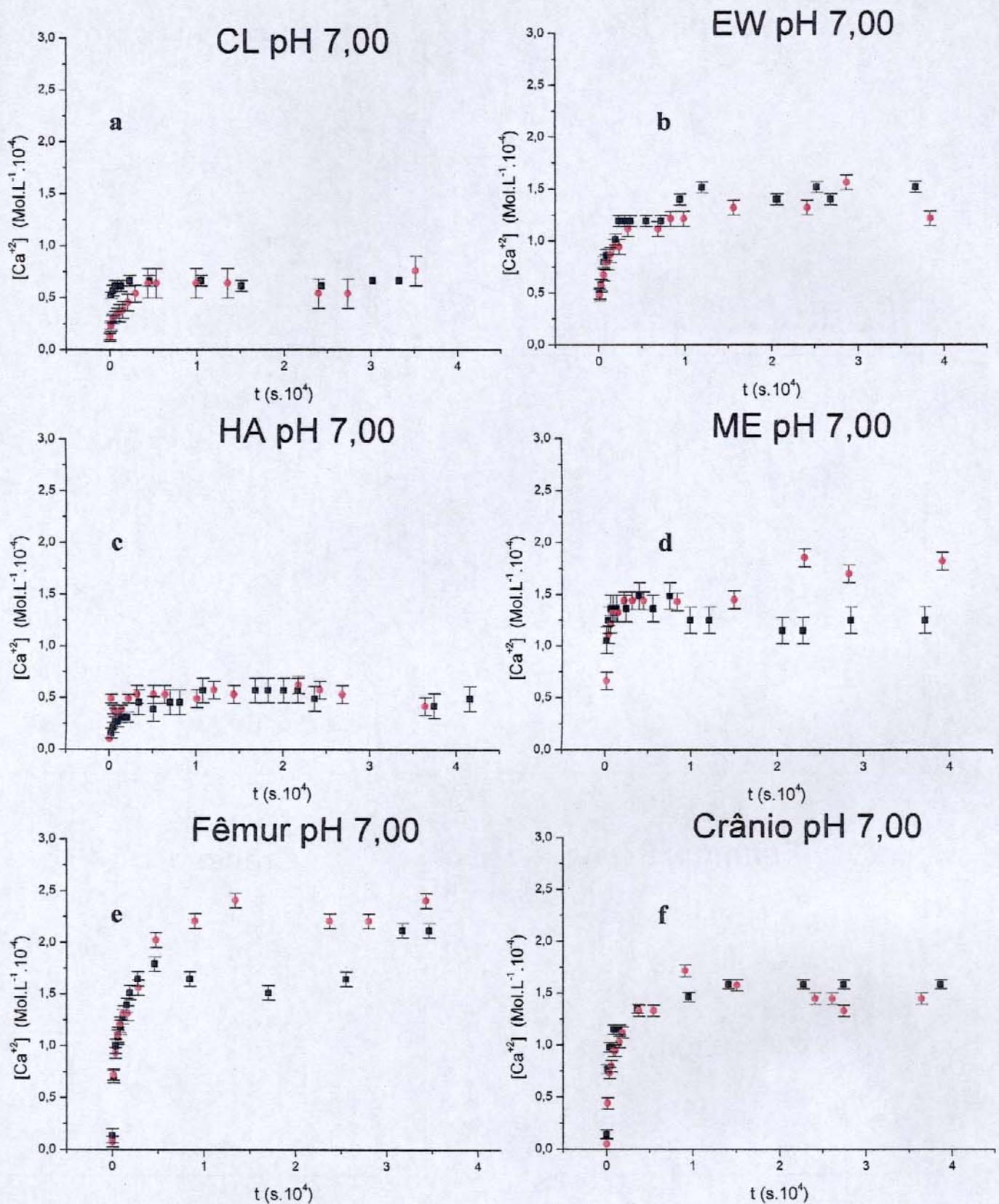


Figura 29: Resultados das cinéticas de dissolução dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f), em solução de FCS em pH 7,00.

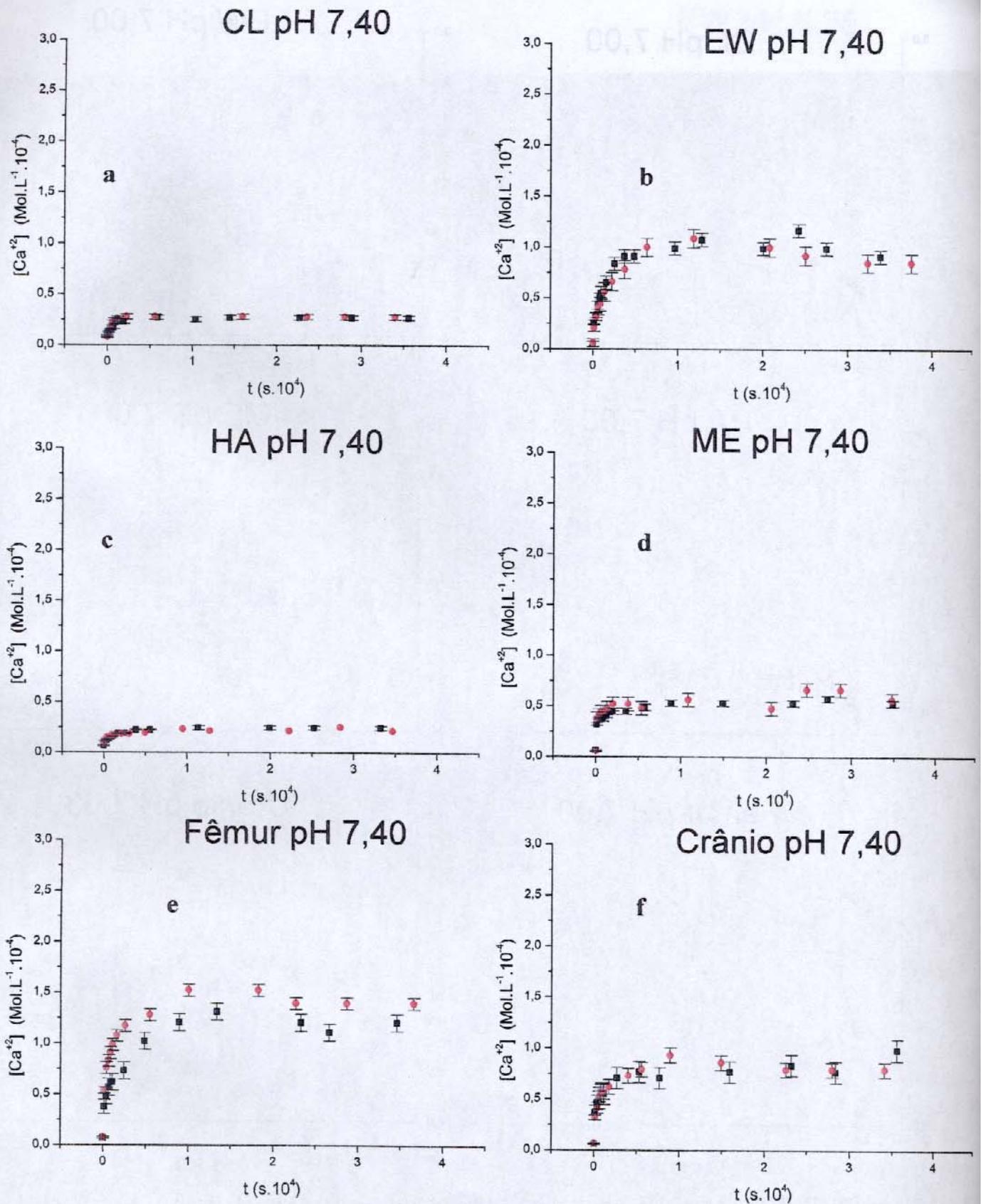


Figura 30: Resultados das cinéticas de dissolução dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f), em solução de FCS em pH 7,40.

Os gráficos mostram que a velocidade de dissolução no início da cinética é grande, diminuindo no final do processo. Podemos notar, ao compararmos os diversos gráficos de cinética de dissolução, que existe uma variação considerável na concentração de Ca^{+2} presente na solução ao final da dissolução para as diversas cinéticas realizadas com os diversos fosfatos estudados. Além das diferenças nas concentrações próximas do equilíbrio, pode-se notar também diferenças significativas entre as formas apresentadas pelos gráficos que ilustram o comportamento cinético da dissolução dos fosfatos de cálcio.

Comparando-se a solubilidade dos fosfatos de cálcio nos diferentes pH pode-se notar que a solubilidade destes fosfatos diminui ao se aumentar o valor do pH, porém os fosfatos que apresentam maior solubilidade no pH 6,35 continuam sendo os fosfatos mais solúveis nos pH 7,00 e 7,40.

É interessante também notar que os fosfatos com características semelhantes (área superficial, difratograma de Raios-X e espectro FTIR), apresentam semelhanças no comportamento de cinética de dissolução. Assim, as fases ósseas inorgânicas e ME apresentam características semelhantes entre si, sendo os fosfatos que apresentam maior solubilidade em todos os pH. Por fim temos os fosfatos CL e HA, que possuem características semelhantes e apresentam solubilidade semelhante.

Também nas Figuras 27 a 30 é possível observar que as concentrações de Ca^{+2} medidas ao final dos experimentos são diferentes para o mesmo material, em cinéticas de dissolução realizadas em soluções diferentes (KCl e FCS).

Em função da dispersão das medidas feitas em duplicata observadas para alguns dos fosfatos, os valores foram transformados em médias e ajustados por uma curva utilizando-se o programa Origin 5.0. A curva ajustada foi utilizada para determinar os valores de concentração de cálcio nos cálculos da grandeza C_s (concentração de íons Ca^{+2} na camada de Nernst, camada imediatamente adjacente

à superfície do fosfato sólido) como será tratado no item 5.2.8. A média dos valores medidos e a curva ajustada são mostradas nas Figuras 31 a 33.

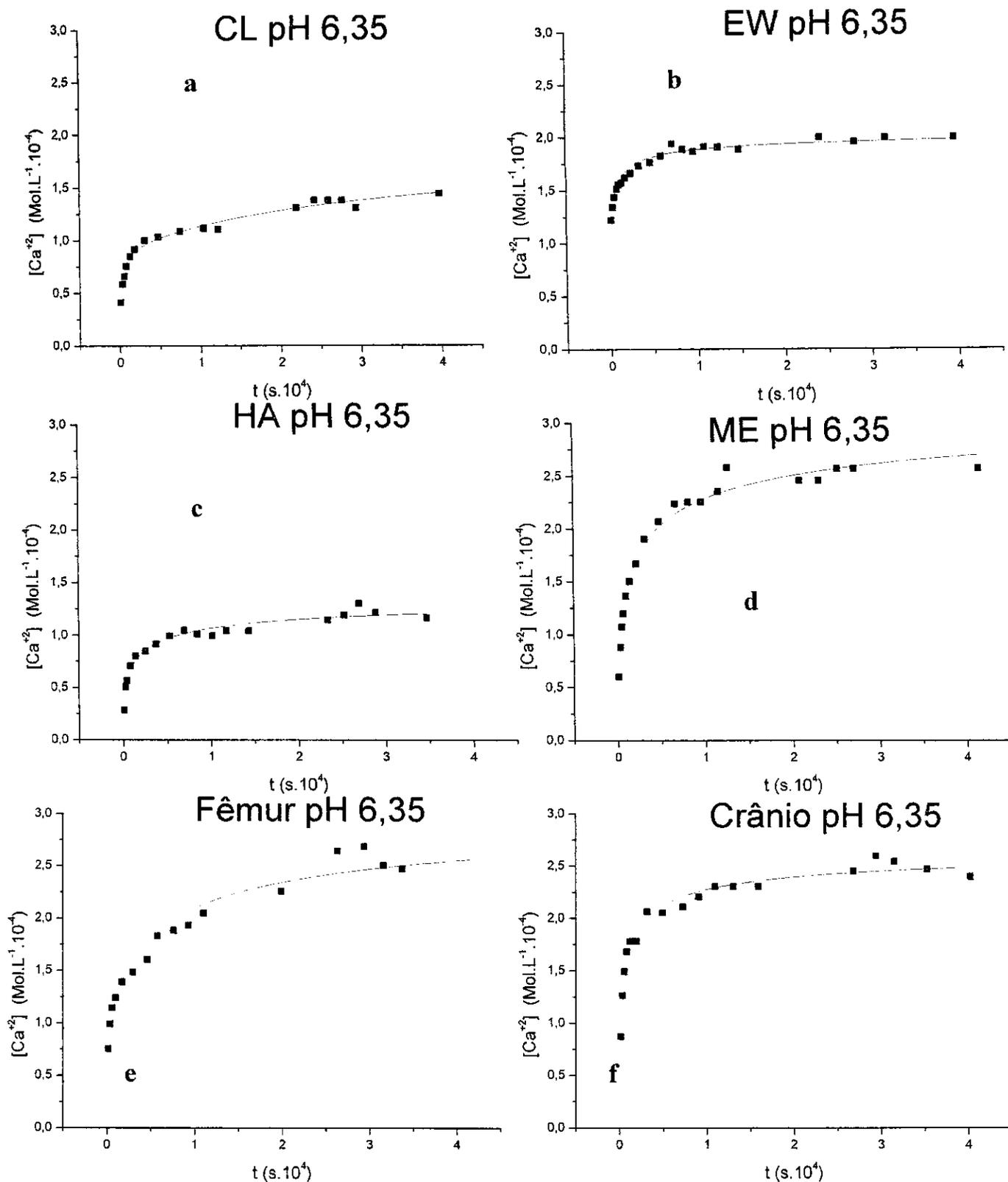


Figura 31: Gráficos da cinética de dissolução para pH 6,35. Curvas ajustadas pelo programa Origin às médias das medidas experimentais para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f).

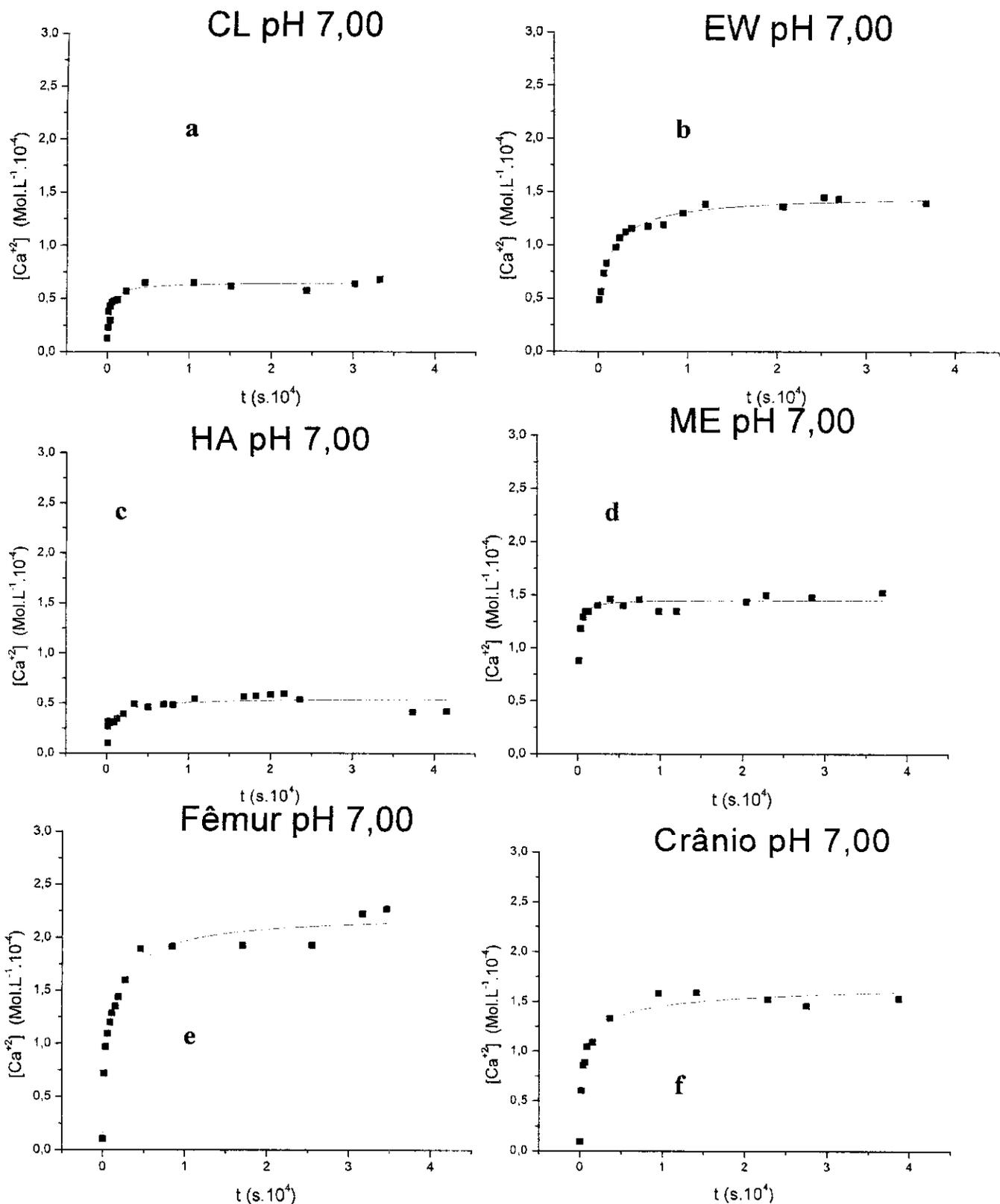


Figura 32: Gráficos da cinética de dissolução para pH 7,00. Curvas ajustadas pelo programa Origin às médias das medidas experimentais para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f).

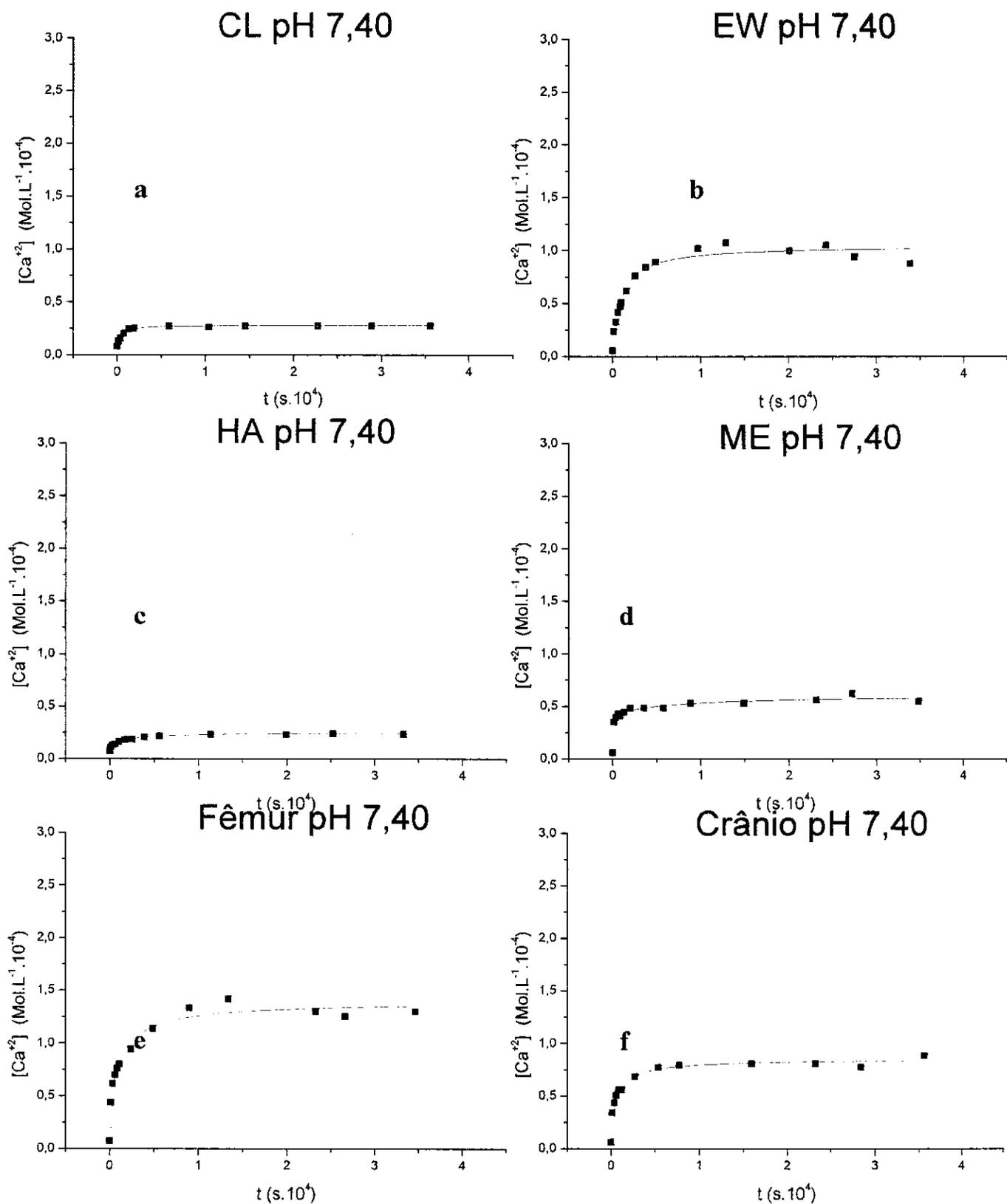


Figura 33: Gráficos da cinética de dissolução para pH 7,40. Curvas ajustadas pelo programa Origin às médias das medidas experimentais para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f).

5.2.8- Tratamento Matemático para o Modelo de Gramain.

O tratamento dos dados da cinética de dissolução foi aplicado de forma idêntica a todos os fosfatos de cálcio e suas respectivas cinéticas de dissolução a diferentes pH, alterando-se apenas os dados intrínsecos de cada material e experimento: área superficial e massa de fosfato de cálcio.

O modelo de Gramain requer que os gráficos das curvas da cinética de dissolução, determinadas em mol.L⁻¹ em função do tempo, sejam transformadas em curvas de variação de mol.cm⁻² em função do tempo. Esta mudança de variáveis de concentração é obtida pela aplicação da Equação 1.

$$\frac{C_{b(t)} \cdot V}{g \cdot A} = C_{r(t)} \quad (1)$$

Onde C_b é a concentração determinada em moles.L⁻¹ medida experimentalmente, C_r é a concentração corrigida em mol.cm⁻², V é o volume de solução (o volume utilizado foi de 250 mL), g é a massa utilizada do fosfato e A a área superficial. Os valores das massas dos fosfatos estudados são apresentados nas Tabela 8 e 9 e as áreas superficiais reportadas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 8: Massa dos fosfatos de cálcio utilizada na cinética de dissolução em FCS.

	PH	CL/g	Crânio/g	Fêmur/g	EW/g	HA/g	ME/g
Primeira medida	6,35	0,0208	0,0206	0,0192	0,0207	0,0225	0,0205
Duplicata	6,35	0,0208	0,0250	0,0208	0,0224	0,0207	0,0217
Primeira medida	7,00	0,0197	0,0193	0,0200	0,0196	0,0203	0,0199
Duplicata	7,00	0,0198	0,0191	0,0209	0,0197	0,0218	0,0204
Primeira medida	7,40	0,0197	0,0208	0,0191	0,0201	0,0217	0,0193
Duplicata	7,40	0,0205	0,0204	0,0253	0,0194	0,0194	0,0209

Tabela 9: Massa dos fosfatos de cálcio utilizada na cinética de dissolução em solução de KCl.

pH 6,35	CL-KCl / g	EW-KCl / g
Primeira medida	0,0198	0,0222
Duplicata	0,0193	0,0204

A conversão de unidades resulta em gráficos como os representados na Figura 34 para a cinética de dissolução do EW em KCl e CL em KCl.

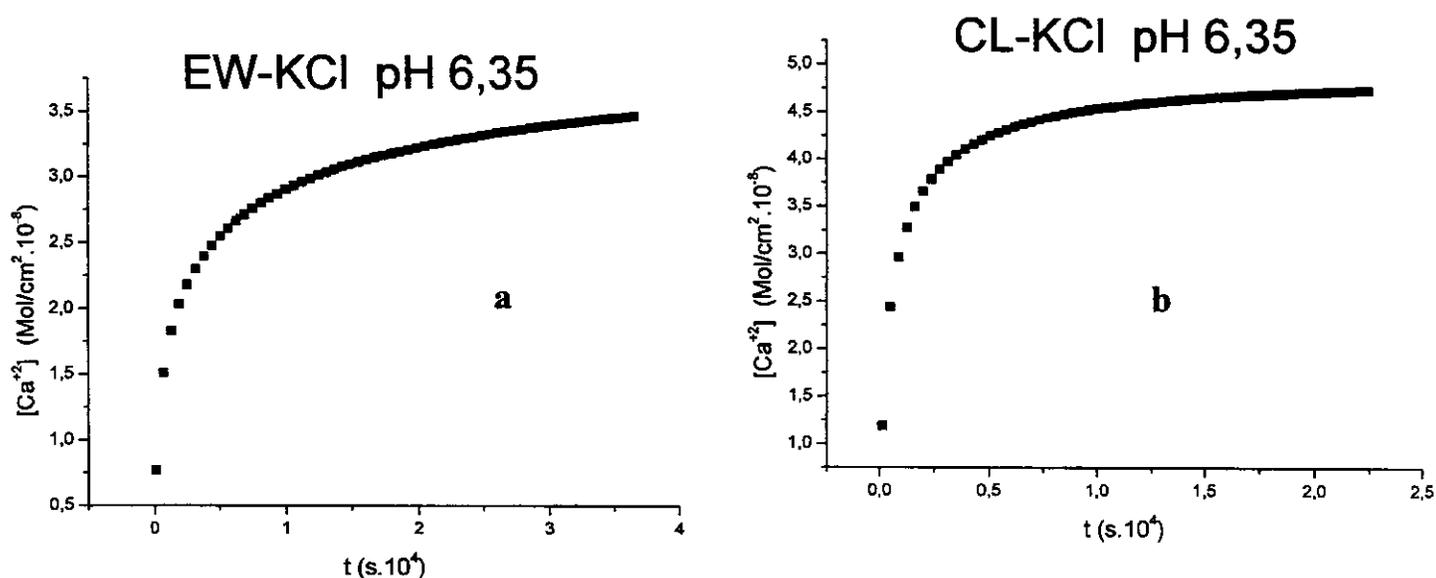


Figura 34: Gráficos apresentando as concentrações corrigidas em função do tempo para EW-KCl (a) e CL-KCl (b) .

Aos gráficos Cr em função do tempo, mostrados na Figura 34, também foram ajustadas curvas utilizando-se o programa Origin 5.0. O ajuste destas curvas permitiu atribuir a cada gráfico uma função contínua, a qual foi utilizada para a determinação do parâmetro J_{Ca} (fluxo de íons cálcio da superfície do fosfato de cálcio para a solução) através da derivada da variação de Cr em função do tempo

dCr/dt , conforme será mostrado no item 5.2.9 e exemplificado na Figura 35 para a cinética de dissolução de EW em KCl e CL em KCl.

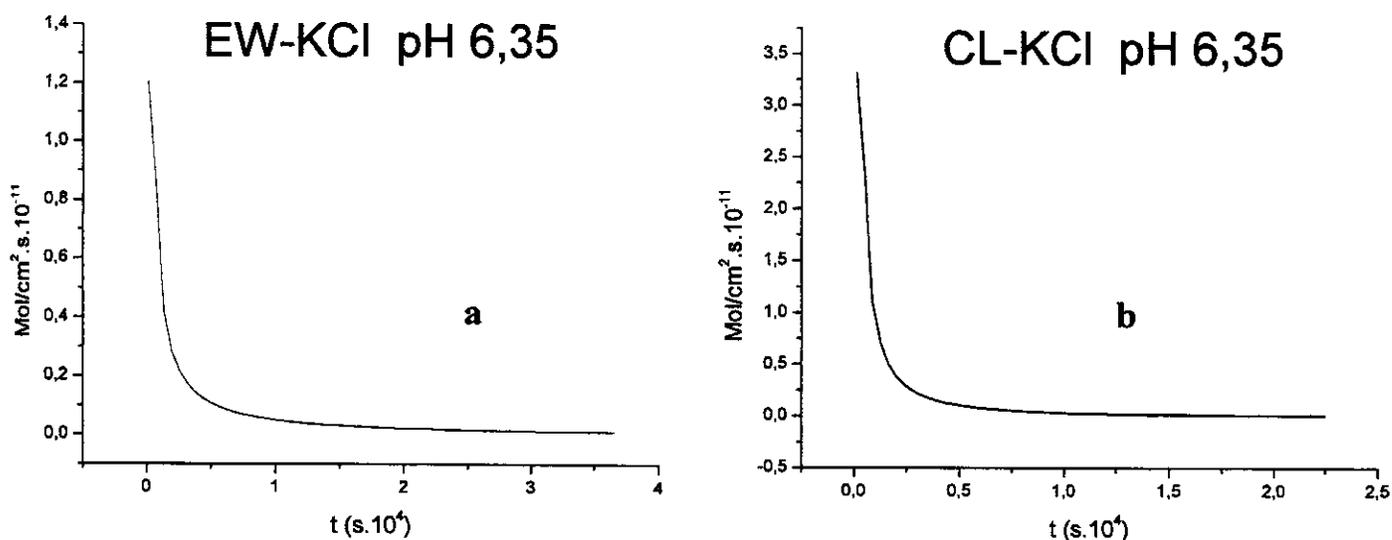


Figura 35: Os gráficos representam as derivadas da curva ajustada aos pontos experimentais de $[Ca^{2+}]$ transformados para concentração corrigida para EW-KCl (a) e CL-KCl (b).

5.2.9- Determinação dos Parâmetros: C_s (Concentração de Íons Cálcio na Camada de Nerst adjacente à superfície dos fosfatos de cálcio) e n_s (Número de Sítios Disponíveis Para Adsorção).

Conforme mostrado no item 5.2.6, o modelo da dissolução proposto por Gramain trata da formação de uma camada de cálcio adsorvida na superfície dos fosfatos de cálcio que impede a dissolução destes, evitando que íons H^+ ataquem a superfície. Portanto, um dos principais parâmetros do modelo é a determinação da quantidade de sítios disponíveis para a adsorção de íons cálcio na superfície do fosfato. Para a determinação da quantidade de sítios disponíveis para a adsorção de íons Ca^{2+} na superfície dos fosfatos (n_s) é necessária a determinação de parâmetros referentes ao sistema formado por solução/ fosfatos de cálcio sólido como: a

concentração de íons cálcio na solução (C_b) e na camada de Nerst (C_s), a espessura da camada de Nerst (d), o coeficiente de difusão de íons cálcio (D_{Ca}) e o fluxo de íons cálcio para a solução (J_{Ca}), entre outros parâmetros apresentados ao longo da discussão do modelo.

A concentração de íons cálcio adsorvidos na superfície do fosfato pode ser determinada pela Equação 2.

$$\frac{J_{Ca(t)} \cdot 10^3 \cdot d}{D_{Ca}} + C_{b(t)} = C_{s(t)} \quad (2)$$

Onde J_{Ca} é o fluxo de íons cálcio para a solução obtido diretamente das Figuras que representam dC_r/dt (Figura 35), D_{Ca} é o coeficiente de difusão para os íons Ca igual a aproximadamente $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ^{25, 26}, e d nas condições de temperatura e agitação do experimento é igual a 10^{-3} cm ^{25, 26}.

Utilizando-se a Equação 2 foram determinados os valores de C_s em função do tempo para as várias cinéticas de dissolução dos fosfatos. As Figuras 36 a 39 mostram a variação dos valores de C_s em função do tempo para as cinéticas de dissolução dos vários fosfatos de cálcio.

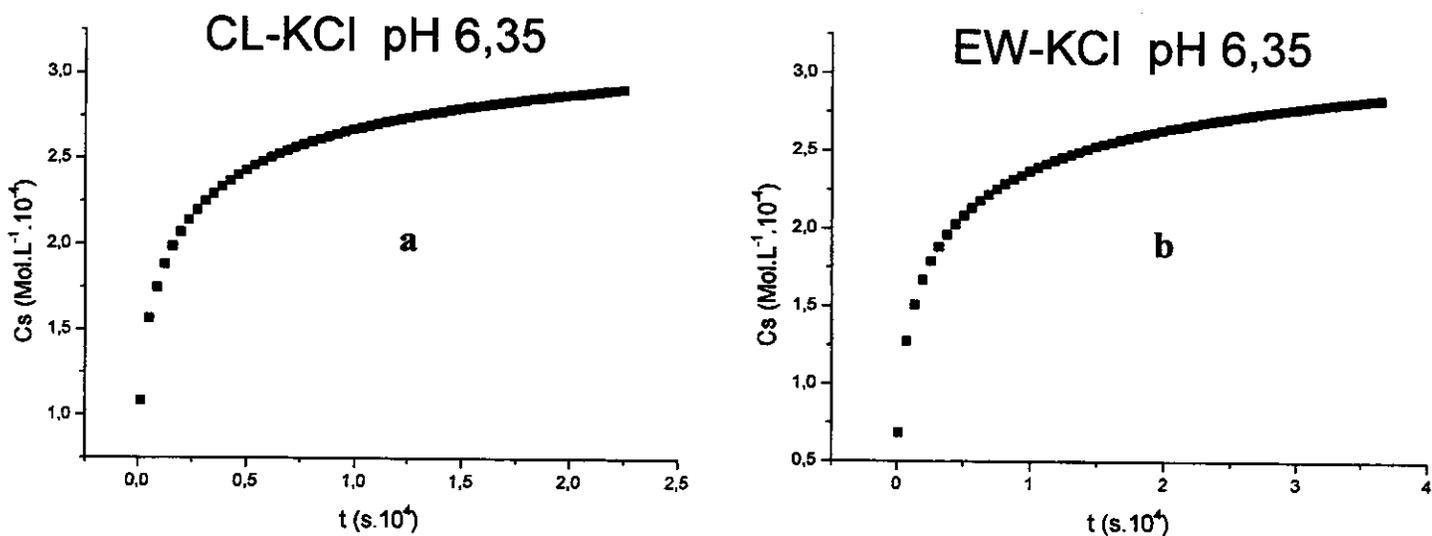


Figura 36: As figuras mostram a variação de C_s (concentração de íons cálcio na camada de Nerst) em função do tempo para CL-KCl (a) e EW-KCl (b).

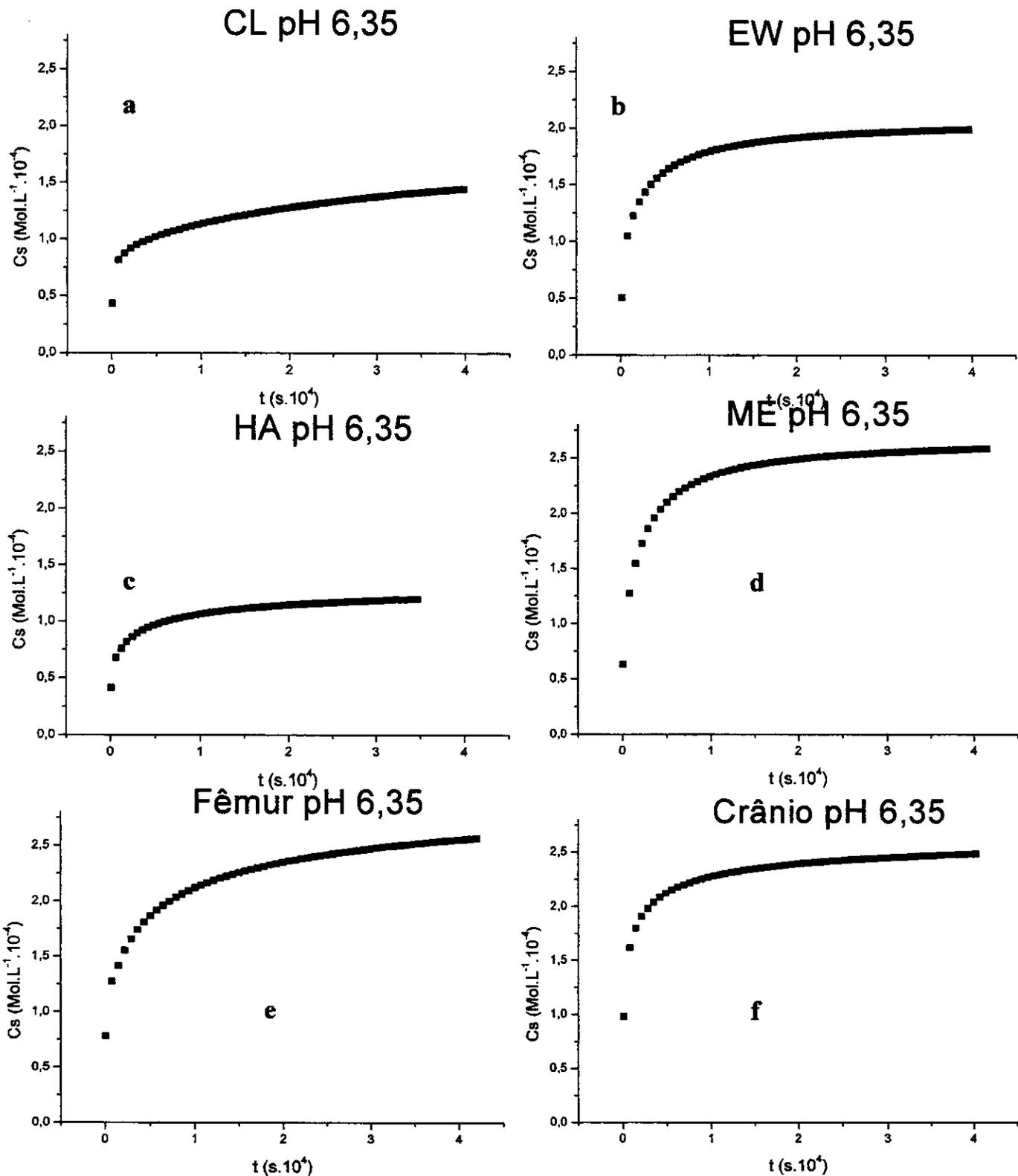


Figura 37: Variação de Cs (concentração de íons cálcio na camada de Nernst) em função do tempo para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 6,35 .

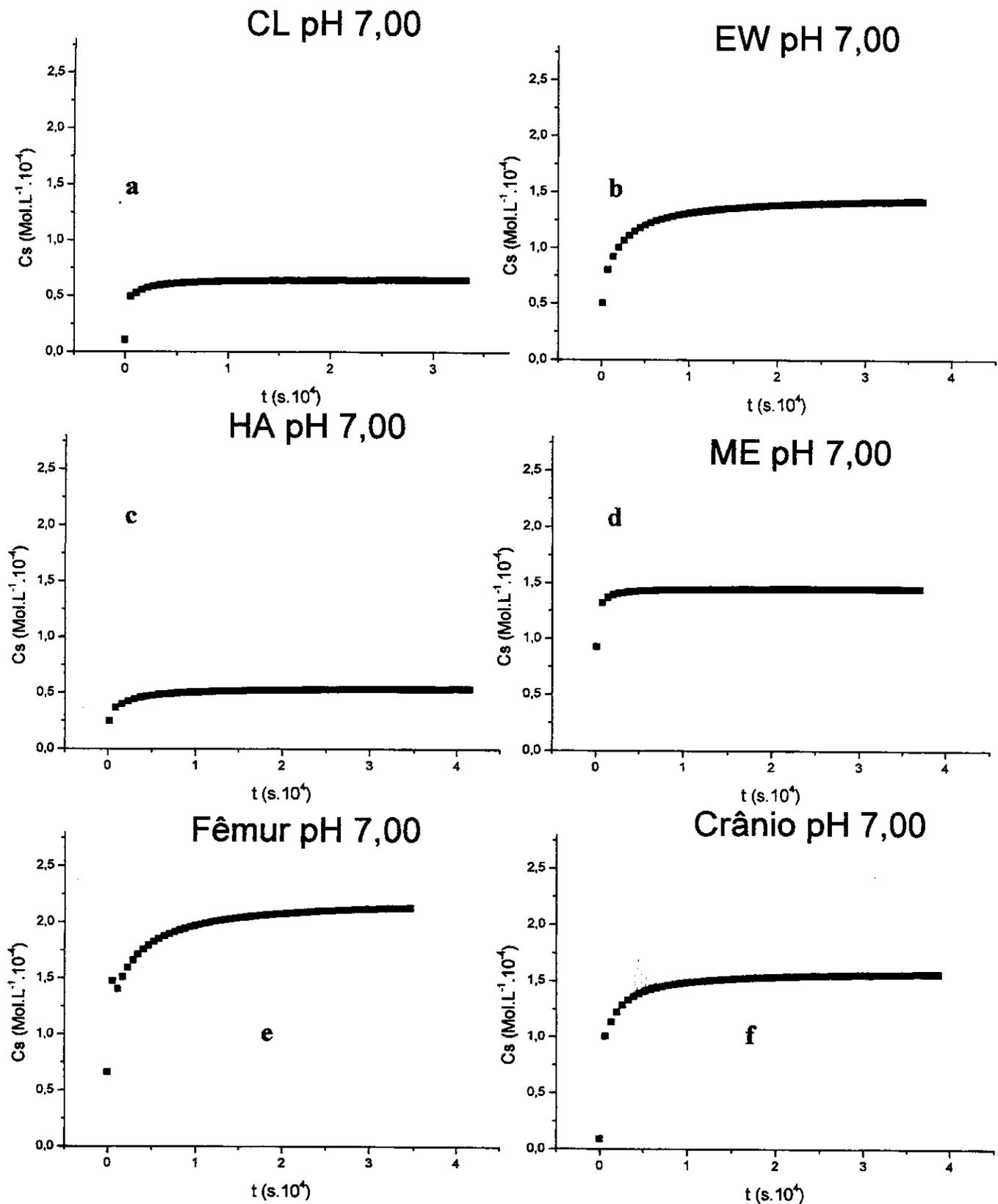


Figura 38: Variação de Cs (concentração de íons cálcio na camada de Nernst) em função do tempo para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,00.

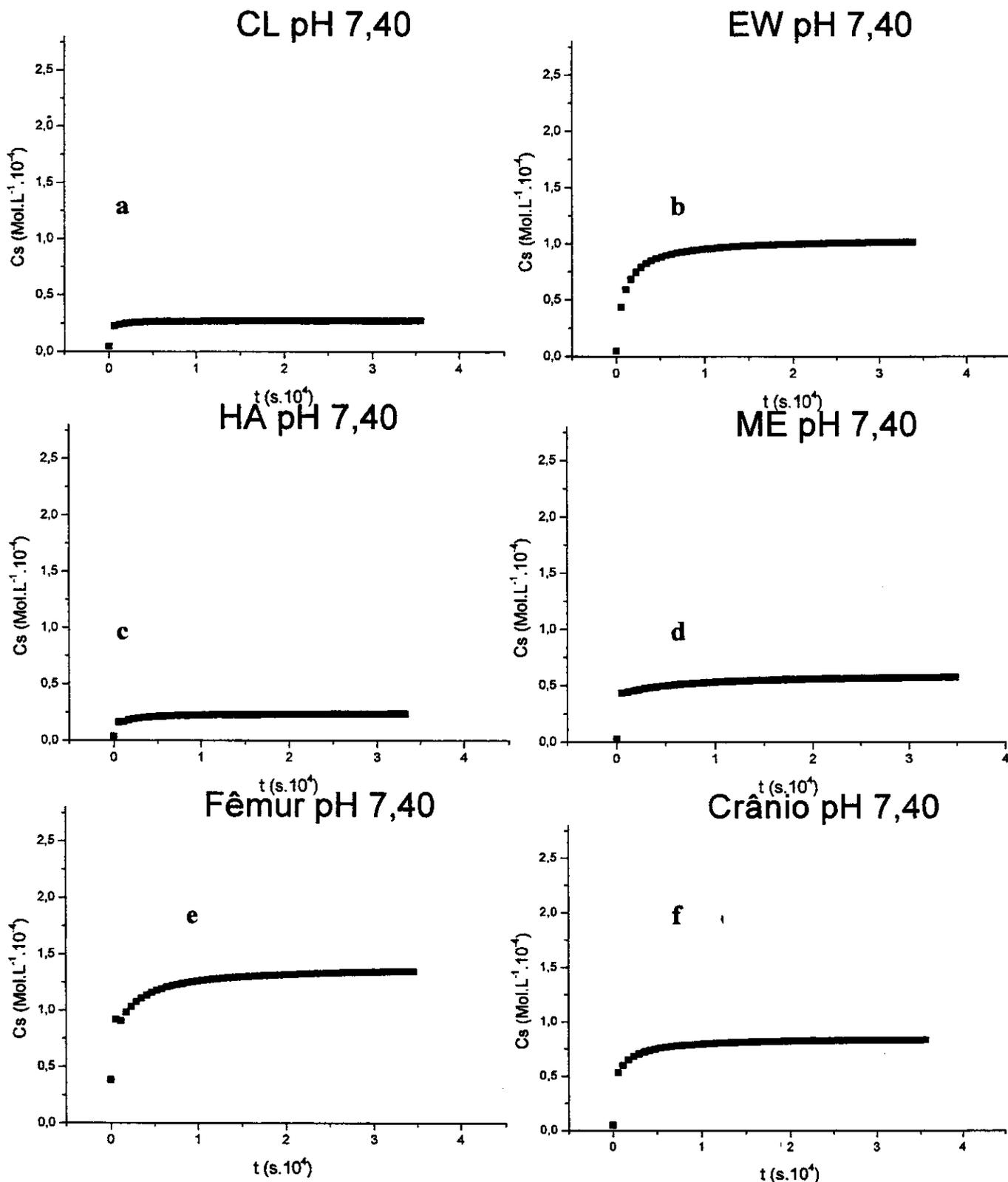


Figura 39: Variação de Cs (concentração de íons cálcio na camada de Nernst) em função do tempo para a cinética dos fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,40.

Comparando os valores da variação da concentração de cálcio na solução C_b (Figuras 27 a 30) com os valores da variação de C_s ao longo do tempo (Figuras 36 a 39) é possível notar que os valores de C_s são semelhantes aos valores de C_b . Isso ocorre porque a Equação 2 é formada por dois parâmetros: um relativo à difusão de íons cálcio da superfície do material para a solução ($J_{Ca(t)} \cdot 1000 \cdot d / D_{Ca}$) e outro que representa a concentração de cálcio na solução (C_b).

Nas condições experimentais utilizadas na cinética de dissolução, o primeiro parâmetro (relativo à difusão de íons) apresenta um valor da ordem de 10^{-6} . Este valor, somado ao valor de C_b da ordem de 10^{-4} , resulta em um valor de C_s muito semelhante ao valor da concentração de cálcio na solução.

A semelhança entre os valores de C_b e C_s permite concluir que, sob as condições experimentais utilizadas, a difusão de íons cálcio da camada de Nernst para a solução ocorre muito rapidamente, o que faz com que a concentração da solução esteja praticamente em equilíbrio com a concentração da camada de Nernst durante todo o processo de dissolução. Este fato mostra que o limitante da dissolução não é a difusão dos íons pela camada de Nernst, e sim a difusão dos íons da superfície do sólido para esta camada. Se esta difusão de íons da superfície do material para a camada de Nernst não é muito rápida ou é fortemente impedida ao longo da dissolução, a velocidade de dissolução do sólido diminui lentamente. Esse fato aparentemente ocorre com os fosfatos de cálcio que após um determinado tempo não mais se dissolvem, apesar do produto das atividades iônicas dos íons em solução ser menor que o K_{ps} para o equilíbrio sólido/solução^{25,26}.

A determinação da concentração de Ca^{+2} na camada de Nerst (C_s) e a aproximação proposta por Gramain, considerando que durante a dissolução é mantido o equilíbrio de adsorção entre a superfície do sólido e os íons na camada de Nerst, permite o uso da equação da isoterma de Langmuir para a determinação de K . No modelo de adsorção de Langmuir²⁹ temos que K é a razão de K_a por K_d ,

onde K_a é a constante de velocidade da “reação de adsorção ($v = K_a[Ca^{2+}]$)” e K_d é a constante de velocidade da “reação de desadsorção ($v = K_d [CaS]$)”, Ca^{+2} é a concentração de íons na solução e CaS é a concentração de íons absorvidos na superfície. Desta forma, a Equação para uma isoterma de Langmuir pode ser reescrita como:

$$1/\theta = \{(1/K) \times (1/C_s)\} + 1 \quad (3)$$

A aproximação proposta no modelo de Gramain, considerando que a camada de cálcio adsorvida está em equilíbrio com a camada de Nerst durante toda a dissolução, permite afirmar que todos os sítios de adsorção ao final da dissolução estão ocupados, enquanto que no início da dissolução todos os sítios estão desocupados. A normalização dos valores de C_s pela razão $C_{s(t)}/C_{s_f}$, onde C_{s_f} representa o valor da concentração de íons cálcio ao final do processo de dissolução, torna possível determinar a variação de sítios ocupados ao longo da dissolução (θ).

A Equação 3 permite determinar o valor de K através de um gráfico de $1/\theta$ versus $1/C_s$, como mostrado nas Figuras 40 a 43, a partir das quais os valores de K foram obtidos.

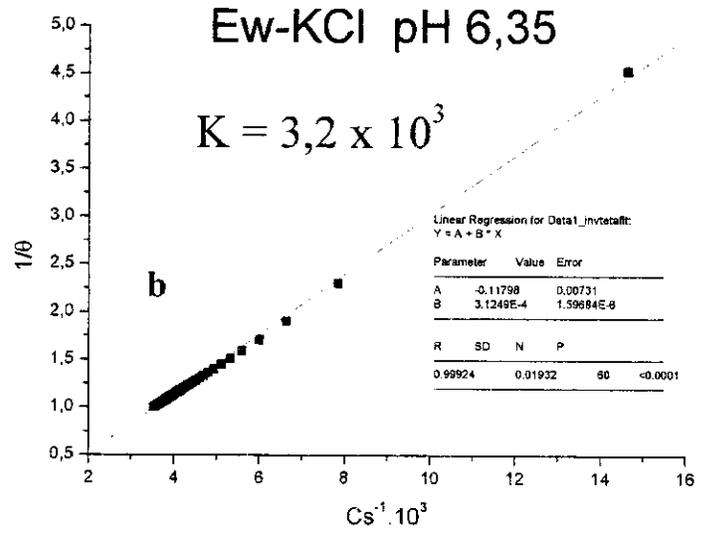
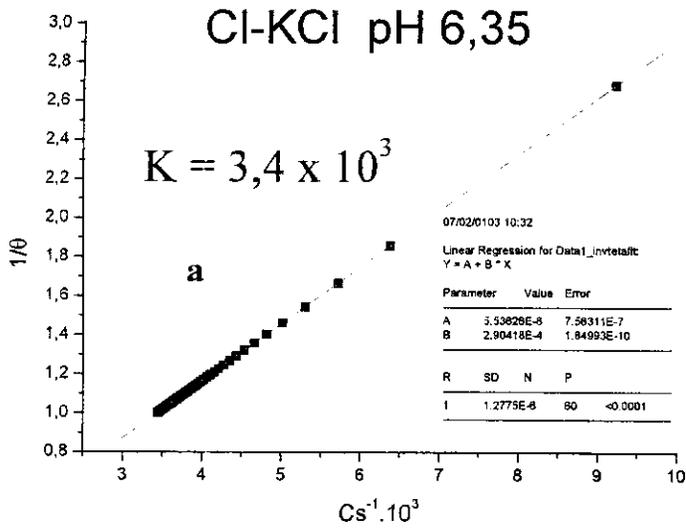


Figura 40: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/C_s$ ao longo da dissolução para os fosfatos CL-KCl (a) e EW-FCS (b).

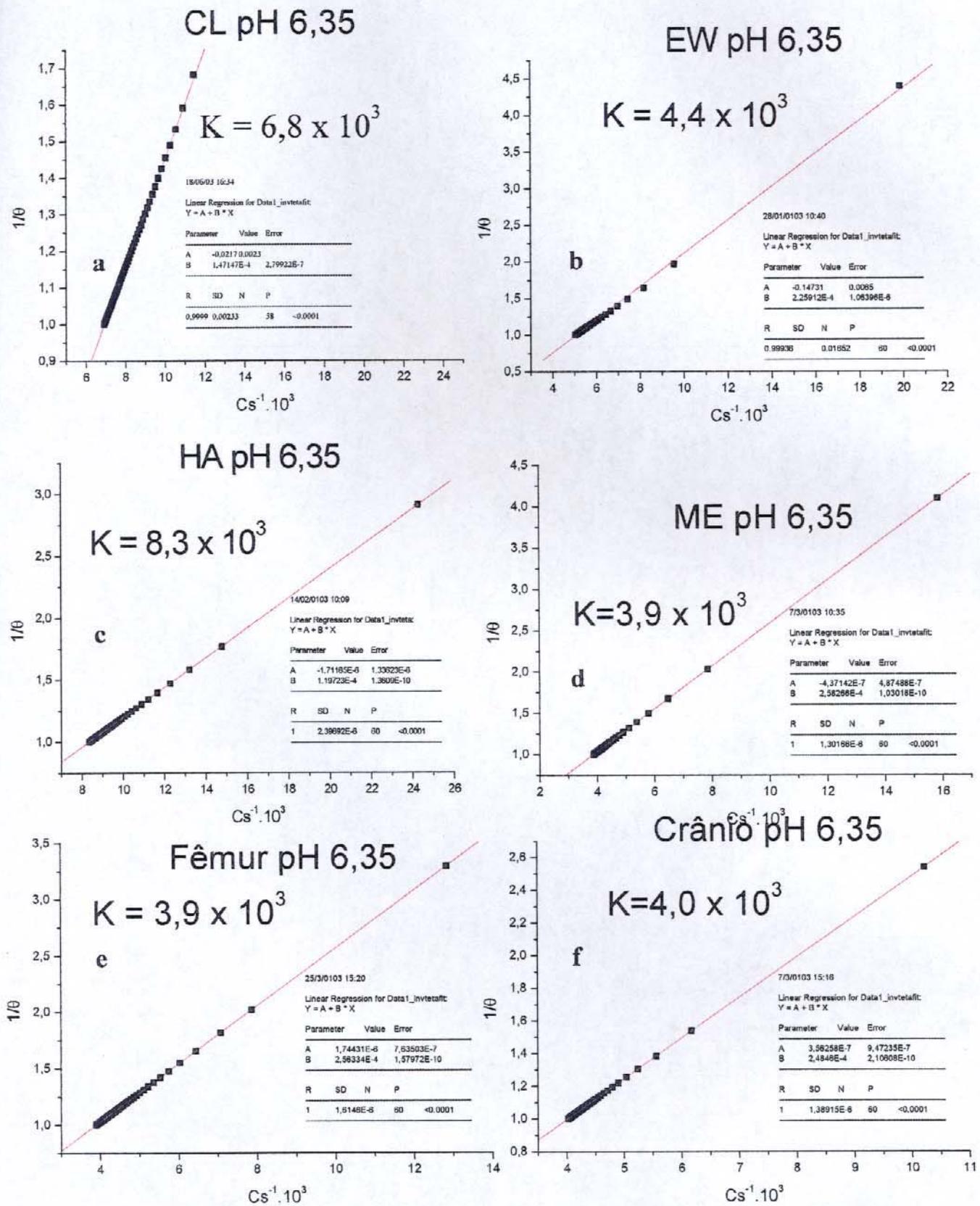


Figura 41: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/Cs$ para os fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f), em pH 6,35.

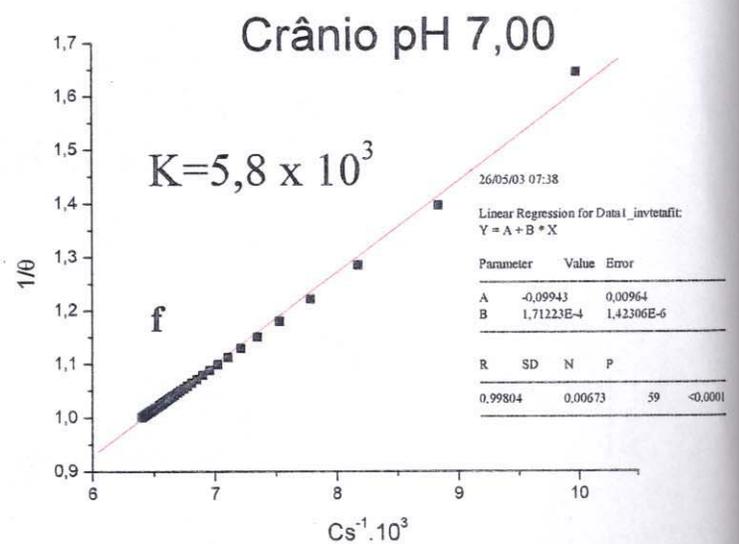
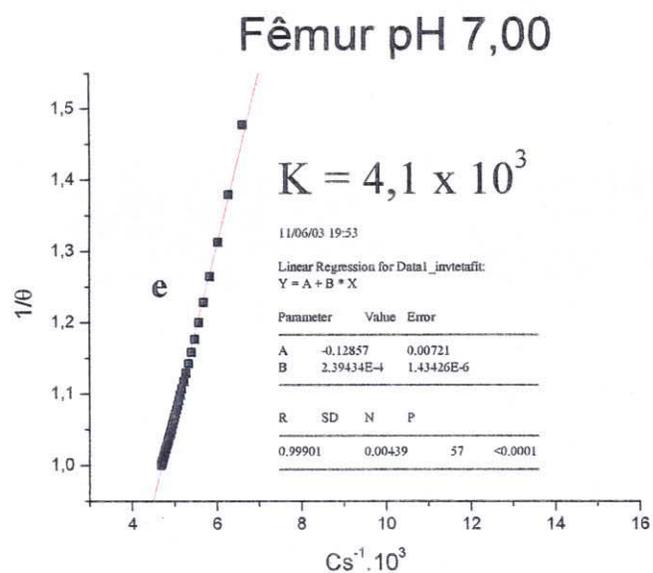
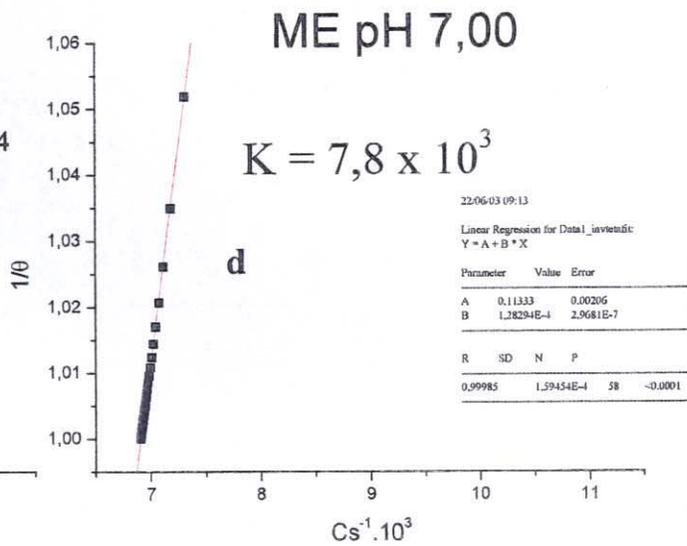
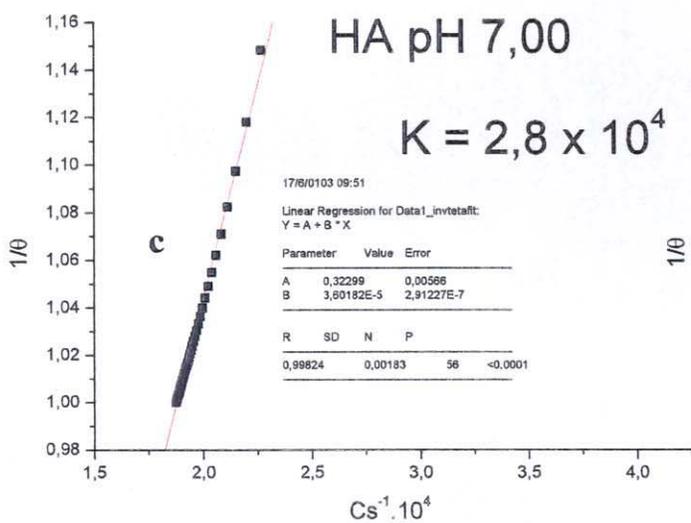
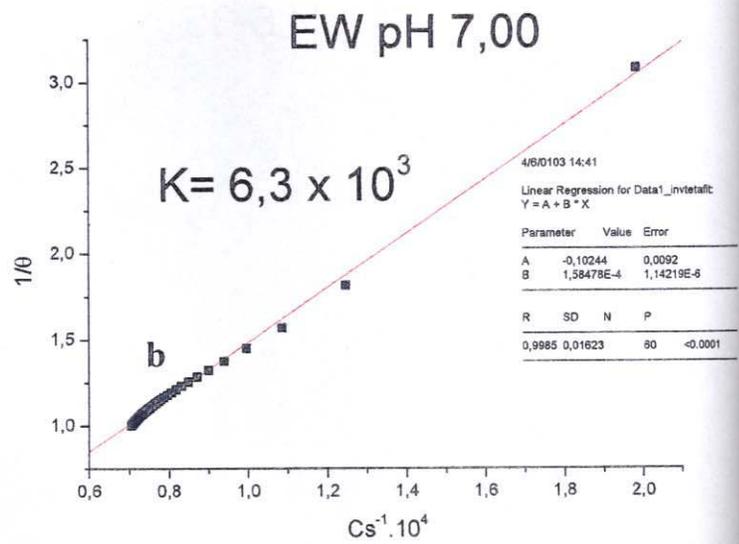
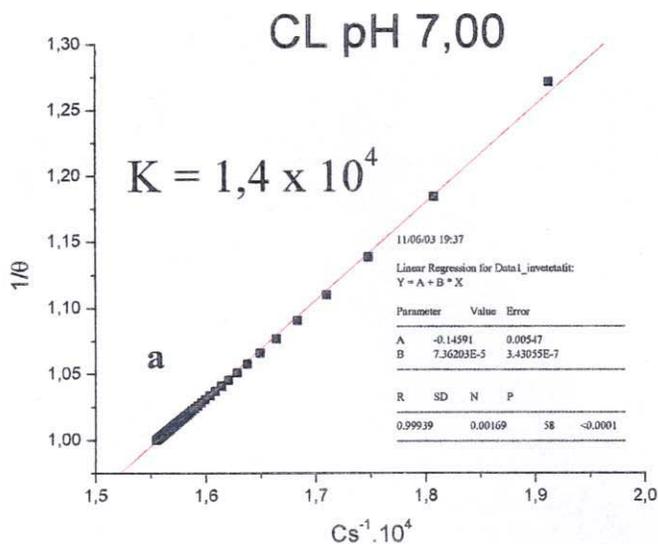


Figura 42: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/Cs$ para os fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,00.

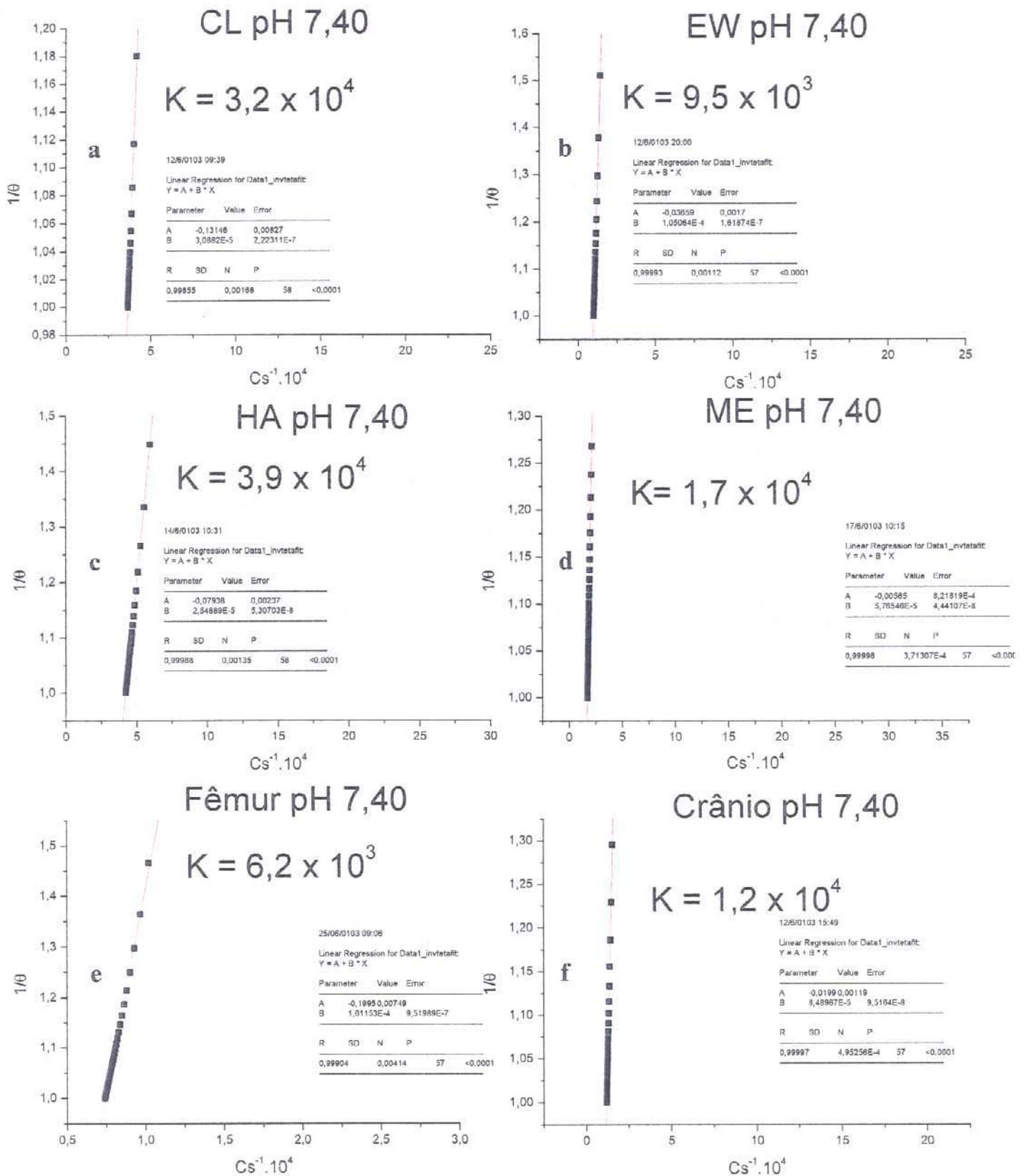


Figura 43: Gráficos de $1/\theta$ em função de $1/Cs$ para os fosfatos de cálcio CL (a), EW (b), HA (c), ME (d), Fêmur (e) e Crânio (f) em pH 7,40.

Os valores de K para os vários fosfatos estudados nas diversas condições de pH são apresentados na Tabela 10 e 11.

Tabela 10: Valores de K para as cinéticas de dissolução dos diversos fosfatos de cálcio em FCS .

	pH	CL/10 ³	Crânio/10 ³	Fêmur/10 ³	EW/10 ³	HA/10 ³	ME/10 ³
K	6,35	6,8	4,0	3,9	4,4	8,4	3,9
	7,00	1,4 x 10	5,8	4,2	6,3	2,8 x 10	7,8
	7,40	3,2 x 10	1,2 x 10	6,2	9,5	3,9 x 10	1,7 x 10

Tabela 11: Valores de K para as cinéticas de dissolução em KCl.

	CL-KCl	EW-KCl
K	3,4 x 10 ³	3,2 x 10 ³

Considerando que K está relacionado com a interação entre íons Ca⁺² e os sítios de adsorção, as Tabelas 10 e 11 mostram que a interação entre os íons Ca⁺² e a superfície dos fosfatos aumentam com o aumento do pH, o que pode ser correlacionado com a diminuição da protonação dos grupos fosfatos presentes na superfície (H₂PO₄⁻ e HPO₄⁻²).

Para uma avaliação do modelo do Gramain usado para descrever a dissolução dos fosfatos estudados, curvas de Langmuir foram ajustadas pelo programa Origin diretamente nos gráficos correspondentes à variação de Cs em função do tempo, portanto sem a normalização pelo valor de Cs_f.

Os resultados dos ajustes são mostrados nas Figuras 44 e 45 e os valores de K calculados pela função de Langmuir, são tabelados na Tabela 13.

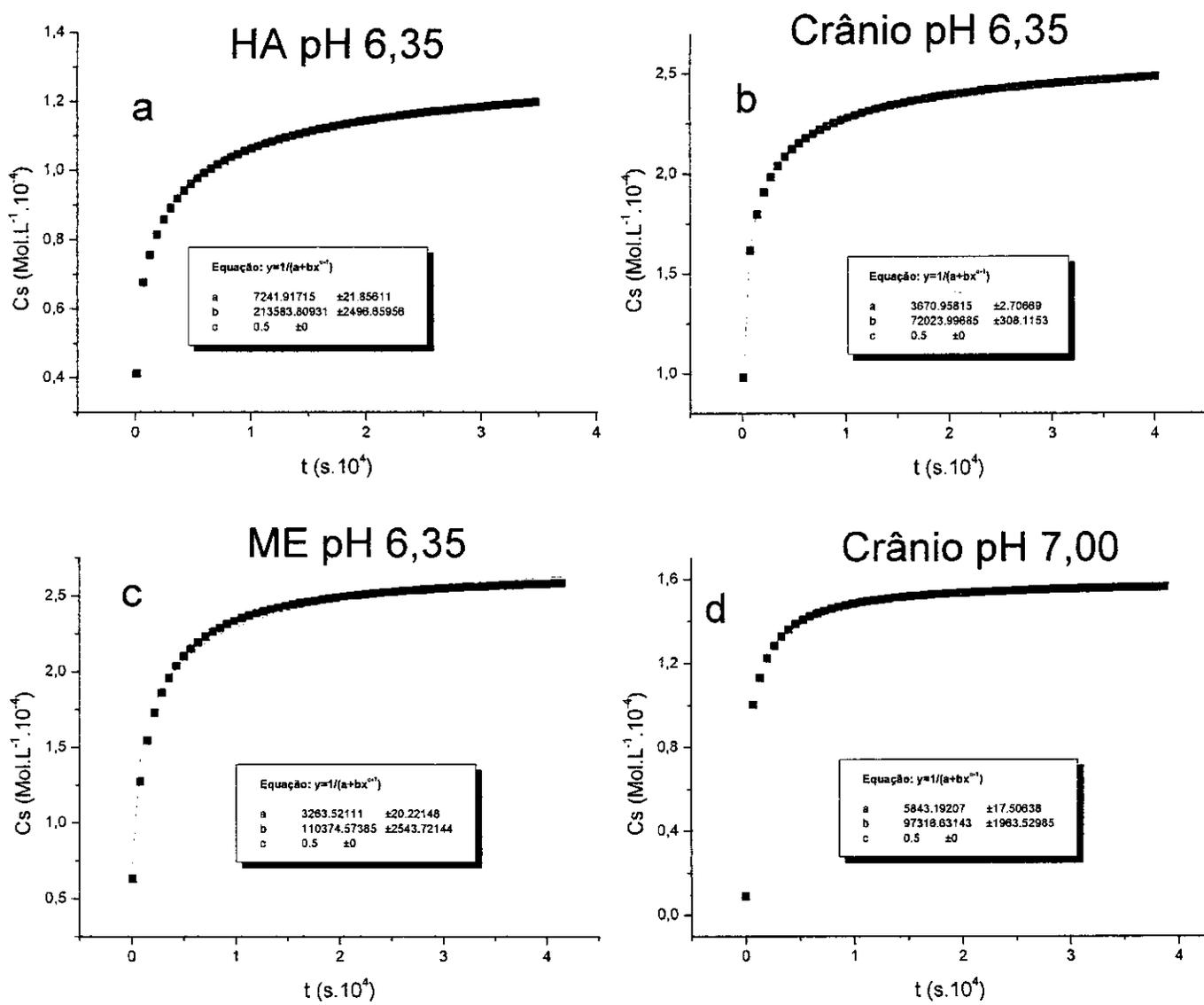


Figura 44: Gráficos de Cs em função do tempo ajustados utilizando a equação de Langmuir fornecida pelo programa Origin 5.0 para os fosfatos de cálcio HA pH 6,35 (a), Crânio pH 6,35 (b), ME pH 6,35 (c) e Crânio pH 7,00 (d).

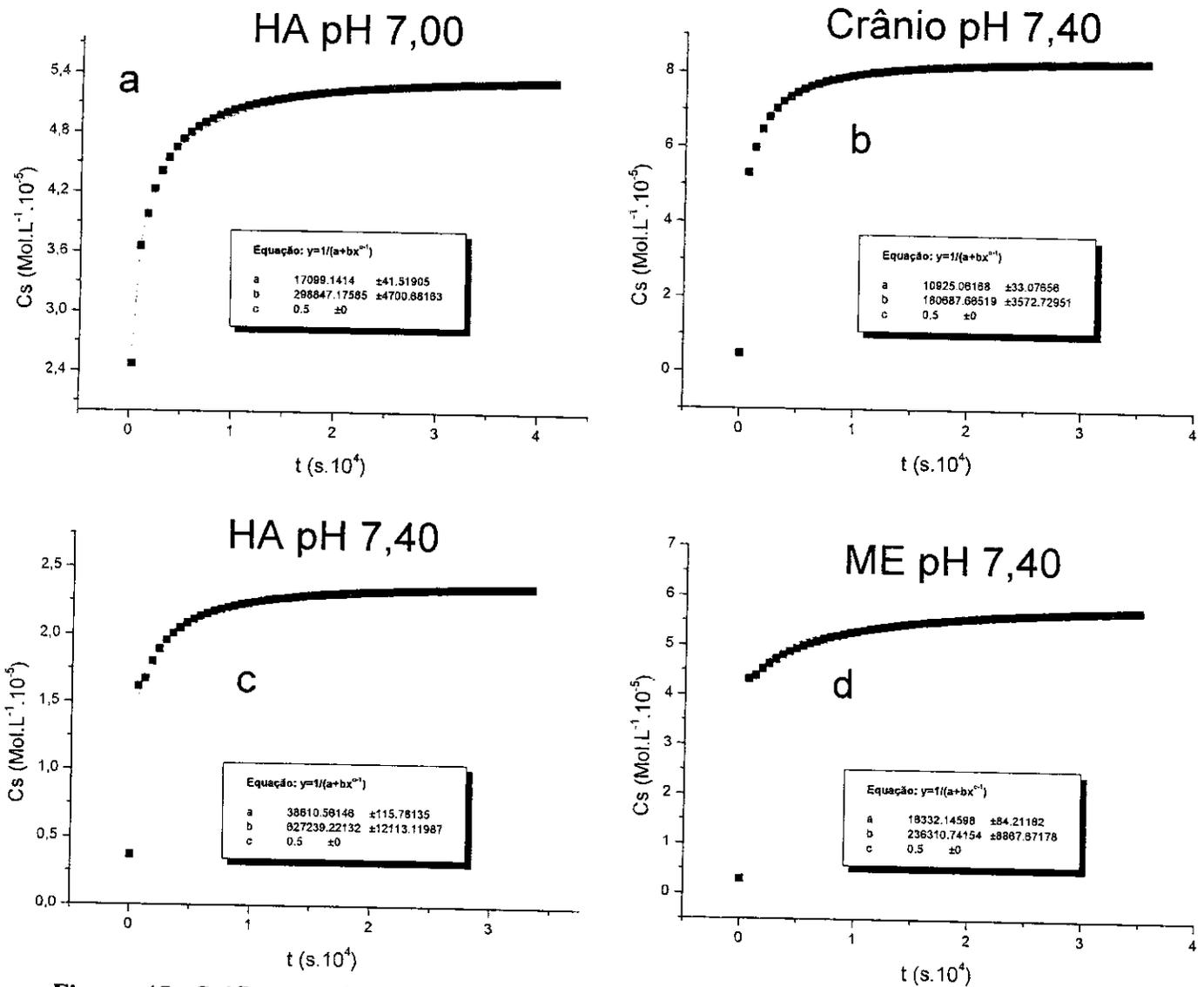


Figura 45: Gráficos de Cs em função do tempo ajustados utilizando a equação de Langmuir fornecida pelo programa Origin 5.0 para os fosfatos de cálcio nas HA pH 7,00 (a), Crânio pH 7,40 (b), ME pH 7,40 (c) e ME pH 7,40 (d).

Tabela 12 Valores de K para os diversos fosfatos de cálcio obtidos a partir do ajuste efetuado pelo programa Origin 5.0.

	pH	Crânio/10 ³	HA/10 ³	ME/10 ³
	6,35	3,7	7,2	3,3
K	7,00	5,8	1,7 x 10	7,8
	7,40	1,1 x 10	3,9 x 10	1,6 x 10

Comparando os valores de K obtidos com o ajuste do programas (Tabela 11) e os valores obtidos a partir dos gráficos de $1/\theta$ em função de $1/C_s$ (Tabela 12), pode-se notar que os valores concordam razoavelmente entre si. Esta concordância indica que o modelo de Gramain, que pressupõe um equilíbrio de adsorção entre os íons cálcio adsorvidos na superfície e os íons na camada de Nernst durante o processo de dissolução, é uma aproximação razoável.

5.2.10- Determinação de ns.

A estimativa do número de íons adsorvidos na superfície do fosfato (N) pode ser determinada pela Equação 4.^{25, 26}

$$N_{(t)} = N_A \cdot S \cdot C_{a(t)} \quad (4)$$

Onde N_A é o número de Avogrado, S é a área total da superfície da massa de fosfato utilizada na cinética e C_a é a concentração de íons cálcio na superfície do material.

A partir do modelo de Langmuir para a adsorção e da expressão que representa a Isoterma, C_a pode ser expresso em função de C_s resultando na

Equação 5:

$$N_{(t)} = N_A \cdot S \cdot [ns_{(t)} \cdot K \cdot Cs_{(t)} / (1 + K \cdot Cs_{(t)})] \quad (5)$$

Para determinar a área disponível para a adsorção dos íons cálcio, pode-se utilizar o modelo das esferas rígidas ^{25, 26}, que trata os íons cálcio como esferas rígidas que ao adsorverem na superfície do fosfato, impedem que os íons H⁺ reajam com a superfície do mesmo. A partir do modelo dos discos rígidos, pode-se obter a seguinte relação:

$$S/S_{0(t)} = (1 - f_{(t)}) \cdot \exp\{- (3-2) \cdot f_{(t)}/(1 - f_{(t)})^2\} \quad (6)$$

Onde:

$$f_{(t)} = \pi \cdot L_D^2 \cdot N_{(t)}/S \quad (7)$$

Na Equação 7, $f_{(t)}$ representa a fração da superfície disponível para a adsorção e L_D é o raio dos discos que recobrem a superfície do material ^{25, 26}. A partir do trabalho de Gramain, no qual os íons Ca⁺² são considerados como adsorbatos, L_D pode ser considerado igual a 11 Å.

Substituindo N (Equação 5), na Equação 7:

$$f = \frac{\pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot ns_{(t)} \cdot K \cdot Cs_{(t)}}{1 + K \cdot Cs_{(t)}} \quad (8)$$

Para determinar o número de sítios de adsorção por centímetro quadrado (ns), substitui-se na Equação 6 a expressão para f (Equação 8). Portanto:

$$S/S_{0(t)} = (1 - \pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot n_{s(t)} \cdot K \cdot C_{S(t)} / (1 + K \cdot C_{S(t)}) \cdot \exp \{ - (3 - 2) \pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot n_{s(t)} \cdot (K \cdot C_{S(t)} / (1 + K \cdot C_{S(t)})) / (1 - \pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot n_{s(t)} \cdot K \cdot C_{S(t)} / (1 + K \cdot C_{S(t)}))^2 \} \quad (9)$$

A razão S/S_0 representa a razão entre a área superficial total e a superfície disponível para a reação com H^+ (S_0).

Para a determinação da área disponível para a adsorção de íons cálcio, foi determinado o fluxo de íons cálcio que deixam a superfície por unidade de massa do fosfato em função do tempo ($\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), que foi denominado de j_{Ca} . O parâmetro j_{Ca} relaciona-se com o fluxo de íons cálcio (J_{Ca}) que deixam a superfície do fosfato por unidade de área em função do tempo (em unidades de $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) segundo a expressão:

$$j_{Ca(t)} = J_{Ca(t)} \times S_0 \quad (10)$$

Substituindo a Equação 2 na Equação 10 e multiplicando a equação resultante por S/S_0 obtêm-se:

$$j_{Ca(t)} = (S_{0(t)}/S) \cdot \{ D_{Ca} \cdot [(C_{S(t)} - C_{b(t)})/d] \} \cdot S \quad (11)$$

Para a determinação do valor de j_{Ca} podemos substituir o fator (S_0/S) pela Equação 9, obtendo assim:

$$j_{Ca(t)} = [(1 - \pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot n_{s(t)} \cdot K \cdot C_{S(t)} / (1 + K \cdot C_{S(t)}) \cdot \exp \{ - 1 \cdot \pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot n_{s(t)} \cdot (K \cdot C_{S(t)} / (1 + K \cdot C_{S(t)})) / (1 - \pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot n_{s(t)} \cdot K \cdot C_{S(t)} / (1 + K \cdot C_{S(t)}))^2 \}] \times (D_{Ca} \cdot ((C_{S(t)} - C_{b(t)})/d)) \times S \quad (12)$$

Para simplificar, pode-se escrever a Equação 12 na forma da Equação 13:

$$j_{Ca(t)} = [(1 - Z_{(t)}ns_{(t)}) \exp \{ - 1 Z_{(t)}ns_{(t)} / (1 - Z_{(t)}ns_{(t)})^2 \}] \times J_{Ca(t)}S \quad (13)$$

Onde :

$$Z_{(t)} = \pi \cdot L_D^2 \cdot N_A \cdot K \cdot C_{S(t)} / 1 + K \cdot C_{S(t)} \quad (14)$$

Rearranjando a Equação 13 obtém-se:

$$j_{Ca(t)} - [(1 - Z_{(t)} \cdot ns_{(t)}) \cdot \exp \{ - 1 \cdot Z \cdot ns_{(t)} / (1 - Z \cdot ns_{(t)})^2 \}] \times J_{Ca(t)} \cdot S_{(t)} = 0 \quad (15)$$

Para a determinação de ns é necessário encontrar soluções que tornem a Equação 15 verdadeira. Para tanto, pode-se atribuir valores de ns para cada valor correspondente de j_{Ca} até que ela seja satisfeita, obtendo-se desta forma o valor aproximado de ns . As Figuras 46 e 47 apresentam os valores de ns para os diversos fosfatos de cálcio nos diferentes pH em função do tempo.

Comparando-se os valores de ns obtidos ao final da dissolução para todos os fosfatos estudados e em todos os valores de pH nos quais a cinética de dissolução foi realizada, é possível notar uma profunda semelhança nestes valores ao final da cinética de dissolução. Considerando a hipótese da transformação das superfícies dos fosfatos em um fosfato semelhante para todos eles devido à ação da solução durante a dissolução, foi decidido obter uma média dos valores de ns dos gráficos apresentados nas Figuras 46 e 47 nos respectivos pH.

As medidas correspondentes aos valores de ns dos diferentes fosfatos nos diversos pH estudados estão representados na Figura 48.

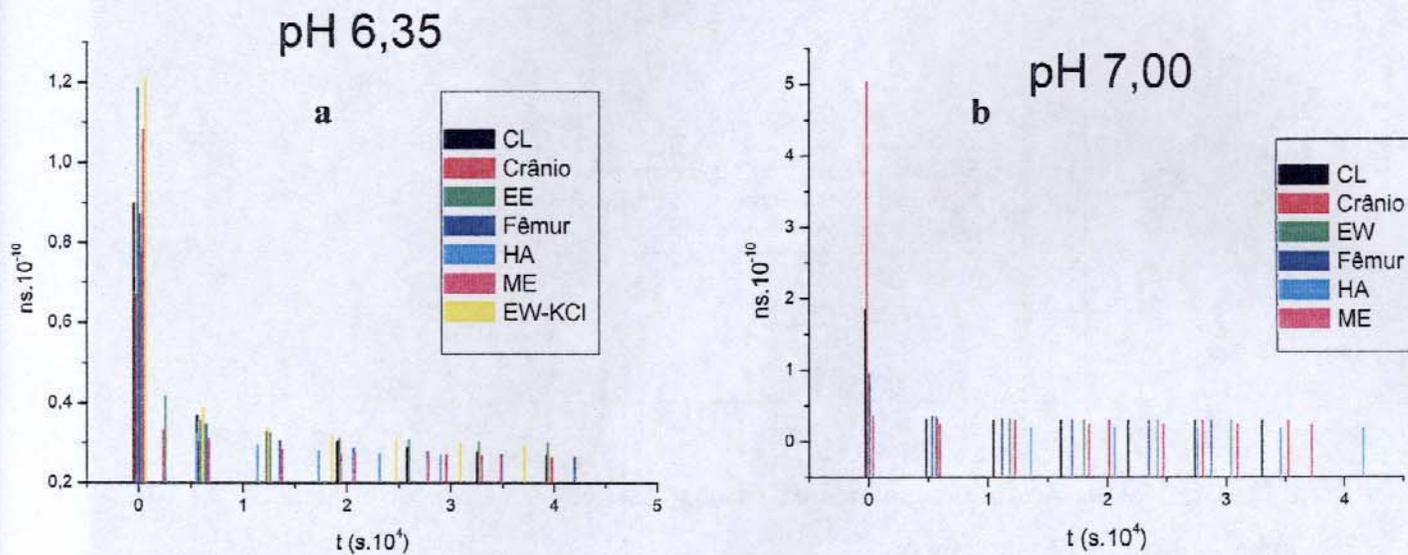


Figura 46: Gráficos de ns (número de sítios disponíveis para a adsorção) determinados para os fosfatos de cálcio em função do tempo para os pH 6,35 (a) e 7,00 (b) .

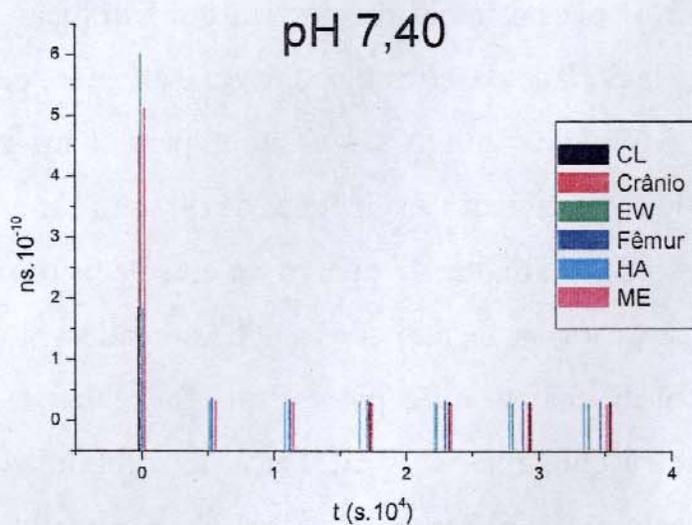


Figura 47: Gráficos de ns (número de sítios disponíveis para a adsorção) determinados para os fosfatos de cálcio em função do tempo para o pH 7,40.

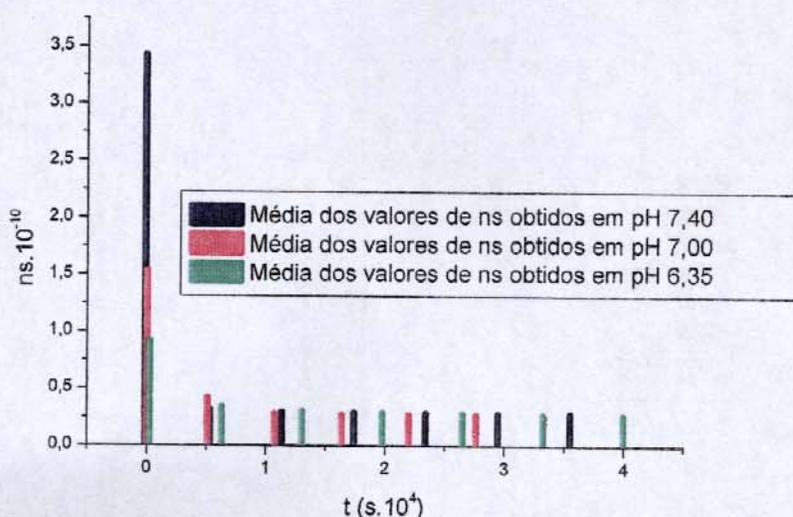


Figura 48: Gráficos da média dos valores de ns dos fosfatos de cálcio, determinados nos pH 6,35, 7,00 e 7,40 em função do tempo.

A Figura 48 mostra que o número de sítios de adsorção para íons cálcio na superfície dos fosfatos de cálcio apresenta uma grande dispersão nos valores apresentados para os vários pH no início da cinética de dissolução. Ao longo da cinética de dissolução a quantidade de sítios disponíveis é alterada, de modo que ao final da dissolução os valores são muito semelhantes para todos os fosfatos de cálcio nos vários pH onde são realizadas as cinéticas de dissolução.

Os resultados mostrados na Figura 48 para os valores de ns próximos do final do processo de dissolução para os fosfatos de cálcio estudados são semelhantes, não importando a origem do fosfato ou o pH em que foi realizada a cinética de dissolução. Este fato indica que, apesar da diferença de solubilidade apresentada pelos vários fosfatos de cálcio e da diferença de solubilidade apresentada nos vários pH (uma variação considerável), as superfícies dos fosfatos ao final da dissolução são muito semelhantes.

Comparando-se os valores de ns obtidos ao final do processo de dissolução neste trabalho, por volta de $2,6 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$, com os valores obtidos por

Gramain para a cinética de dissolução de HA em pH 6,5 em solução salina de KCl $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ (ns igual a $2,6 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2,25,26}$), os resultados mostram-se iguais.

5.2.11- Avaliação da Área Superficial da Fase Óssea Inorgânica Relacionada com a Cinética de Dissolução

A partir da caracterização das fases ósseas inorgânicas, foi observado que entre as amostras estudadas houve variação significativa na área superficial destes materiais. Esta variação pode ser consequência das diferenças existentes entre os ratos constituintes dos grupos, que eram formados por 5 ratos, e a partir dos quais cada tipo de fase óssea inorgânica foi obtida. Outra hipótese que pode ser considerada é que esta variação pode ser causada por diferenças na eficiência da desproteinação dos fragmentos ósseos que formaram cada amostra.

Com o objetivo de avaliar o efeito desta variação, foi realizada uma cinética de dissolução utilizando uma fase óssea inorgânica proveniente do fêmur em que foram realizadas duas desproteinações. A área deste material é de $97 \text{ m}^2/\text{g}$, e a área do material originalmente utilizado (que passou por uma desproteinação) é de $17 \text{ m}^2/\text{g}$. O resultado desta cinética de dissolução realizada em pH 6,35 é mostrado na Figura 49.

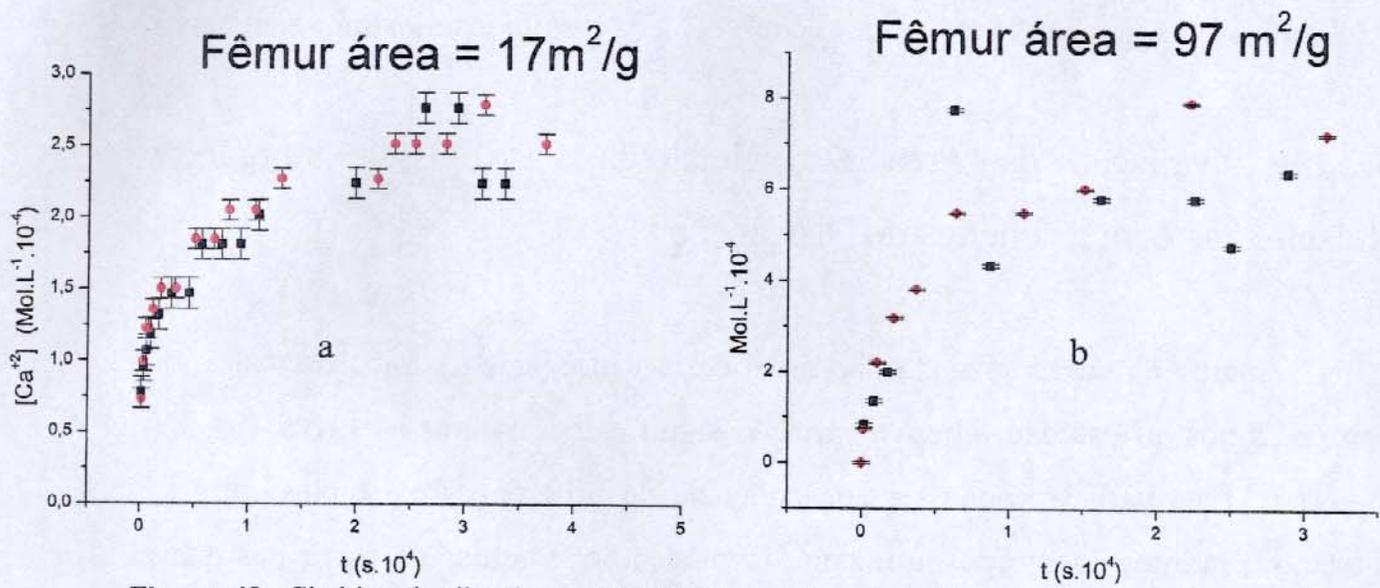


Figura 49: Cinética de dissolução (pH 6,35) com fase óssea inorgânica proveniente do fêmur com área superficial de (a) 17 m²/g e de (b) 97 m²/g.

Comparando as duas cinéticas de dissolução, é possível notar que o material com maior área superficial apresenta também a maior solubilidade.

No modelo proposto por Gramain^{25, 26} a concentração de interesse é de mol.cm⁻². A Figura 50 mostra o gráfico da cinética de dissolução apresentada na Figura 49b com a concentração corrigida.

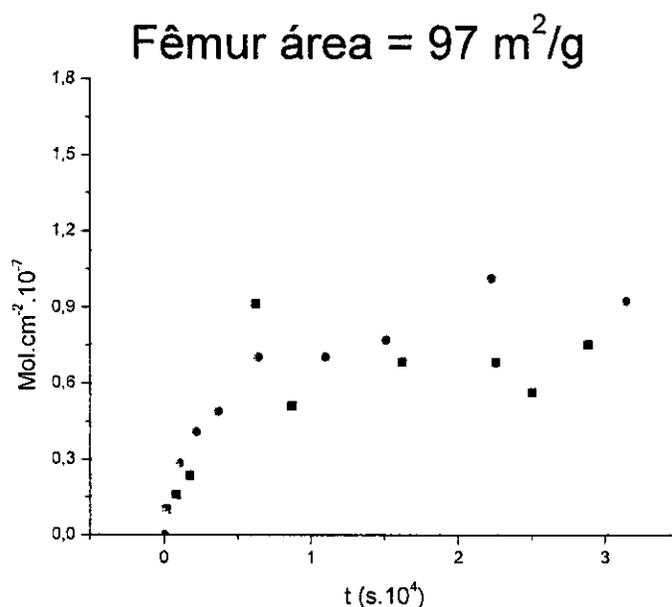


Figura 50: Cinética de dissolução com fase óssea inorgânica proveniente do fêmur com área superficial de 97 cm²/g, com concentração mol/cm².

Foram também determinados os valores de K e ns para a fase óssea inorgânica com área de 97 m²/g. Os valores são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores de ns e K para cinética de dissolução realizada em pH 6,35, utilizando a fase óssea inorgânica com área superficial de 97 m²/g.

Fase óssea inorgânica/ área = 97 m ² /g	
K	1,2 x 10 ³
ns (mol.cm ⁻²)	3,1 x 10 ⁻¹¹

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 49b e 50 é possível notar que a dissolução e a solubilidade dos fosfatos de cálcio são alteradas com a área superficial. Apesar da solubilidade dos fosfatos de cálcio ser alterada com a área

superficial, os dados apresentados na Tabela 13 mostram que os valores de n_s ao final da dissolução praticamente não se alteram.

6- Avaliação do Modelo de Dissolução de Fosfatos de Cálcio Proposto por A. A. Baig^{8-11,15,24} a Partir do Modelo de Equilíbrio Meta Estável.

No Modelo de Equilíbrio Meta Estável (MES) proposto por Baig e colaboradores, o fenômeno MES ocorre quando o valor do produto iônico das atividades dos íons presentes em uma solução, mantida por um longo período em contato com uma substância sólida, difere do valor de K_{ps} calculado termodinamicamente para esta substância.

A razão da ocorrência deste equilíbrio meta estável não está estabelecida, podendo ser atribuída às diferenças nas velocidades de dissolução e precipitação do fosfato de cálcio, entre outras hipóteses.⁶⁶

Os resultados apresentados por Baig mostram que ao se atingir o equilíbrio meta estável no sistema fosfatos de cálcio/solução, ocorre a formação de uma superfície semelhante para todos os fosfatos (aparentemente hidroxiapatita). Esses resultados vêm ao encontro dos resultados apresentados neste trabalho que indicam a formação de uma camada de cálcio, semelhante para todos os fosfatos, ao final da cinética de dissolução. Os resultados apresentados mostram que todos os materiais estudados, ao final da cinética de dissolução, apresentam o mesmo número de sítios disponíveis para a adsorção na superfície. Esse fato é independente do pH estudado, da composição e da cristalinidade do fosfato de cálcio. Além disso, esse resultado indica que a superfície dos fosfatos de cálcio se altera à medida que estes vão se dissolvendo, o que constitui uma explicação plausível para a semelhança das superfícies ao final da dissolução como consequência da existência de uma camada de cálcio na superfície destes materiais. Os trabalhos de Baig indicam que esta superfície é possivelmente formada por hidroxiapatita ou pelo mesmo material que

se forma na superfície da hidroxiapatita, quando esta entra em equilíbrio com uma solução.

A aplicação do modelo proposto por Baig para descrever a cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio apresenta resultados que também confirmam os resultados apresentados neste trabalho. Baig utiliza o modelo do MES para descrever o início da cinética de dissolução para períodos da ordem de 60 minutos e pH da ordem de 4,5. Neste intervalo de tempo e pH, a cinética de dissolução possui um comportamento linear entre a variação da concentração de Ca^{+2} e o tempo. A análise dos resultados reportados nesta Dissertação mostra que este também é o comportamento da cinética de dissolução dos fosfatos estudados, no período inicial da dissolução.

É bem provável que no início da dissolução dos fosfatos de cálcio a dissolução se ajuste de forma satisfatória a um modelo que não considere a formação de uma camada de cálcio na superfície do material. Isso porque no início da dissolução dos fosfatos de cálcio, é provável que ainda não haja uma concentração de cálcio suficiente, presente na solução, para a formação de uma camada de cálcio na superfície do fosfato que impeça a dissolução deste.

Portanto, os resultados de Baig e Gramain se complementam e apontam em uma mesma direção que pode ser resumida da seguinte forma:

Os fosfatos de cálcio apresentam o fenômeno conhecido como equilíbrio meta estável. Ao final da cinética de dissolução, não importando a solução e a origem do fosfato de cálcio, uma superfície semelhante é formada para todos os fosfatos de cálcio.

7- Comparação e Correlação dos Resultados de Cinética de Dissolução dos Fosfatos de Cálcio com os Resultados de Estudos in Vitros e in Vivo Reportados.

7.1- Estudos *In Vitro* dos Fosfatos de Cálcio.

Os resultados dos estudos das cinéticas de dissolução dos fosfatos de cálcio realizados neste trabalho mostram que: fosfatos de cálcio formados por cristais menores (picos mais largos presentes nos difratogramas) apresentam uma velocidade de dissolução maior; fosfatos de cálcio com uma maior cristalinidade e menor área superficial apresentam uma menor solubilidade. Por fim, os resultados da cinética de dissolução, o tratamento dos dados a partir do modelo de Gramain e o estudo do modelo de Baig mostram que ao final da dissolução dos fosfatos de cálcio temos a formação de uma superfície semelhante para todos os tipos de fosfatos de cálcio.

7.2- Área Superficial e Dissolução.

Os implantes realizados por Kawachi com hidroxiapatita densa e porosa vêm ao encontro de resultados apresentados por outros pesquisadores, mostrando que a porosidade, tamanho de partículas ⁶⁷ e área superficial dos materiais implantados são importantes para a dissolução, processo pelo qual esses materiais passam nos organismos nos quais são implantados. A partir dos estudos de cinética de dissolução apresentados neste trabalho, é possível dizer que o fator predominante para a boa biodegradação destes implantes é a área superficial.

Materiais com maior área superficial apresentam maior dissolução e solubilidade. É sabido que os organismos degradam os fosfatos de cálcio implantados através da absorção realizada pelos osteoblastos, que para essa absorção (dissolução) se utilizam de HCl ⁶. Assim quanto maior a área superficial, maior será a facilidade de dissolução dos fosfatos de cálcio, o que representa uma maior biodegradação. Portanto, fatores como porosidade, tamanho de partículas e compactação, que muitas vezes são referidos como sendo fatores importantes para a determinação do sucesso de um implante ósseo, nada mais são que formas indiretas de avaliar a área superficial do fosfato de cálcio a ser implantado.

7.3 - Cristalinidade.

Como mostram os resultados da cinética de dissolução, o tamanho dos cristais dos fosfatos de cálcio é de grande importância para a dissolução e solubilidade dos mesmos. Assim, fosfatos de cálcio formados por cristais menores apresentam maior solubilidade. Estudos realizados *in vivo* mostram que fosfatos de cálcio formados por cristais menores são absorvidos e degradados de forma rápida pelo organismo hospedeiro ^{6, 68}. Novamente aqui o fator de maior importância é a solubilidade do fosfato de cálcio, que neste caso é relacionado com o tamanho dos cristais do material.

7.4 - Formação da Camada de Cálcio na Superfície dos Fosfatos de Cálcio.

Estudos realizados *in vivo* com diferentes fosfatos de cálcio ⁶ mostram que ao serem implantados, estes materiais passam por várias reações de dissolução, reprecipitação e troca de íons, principalmente na sua interface com os fluidos biológicos presentes no organismo. Ao final destes processos a superfície do fosfato de cálcio encontra-se alterada, sendo formada uma superfície conhecida como “apatita biológica” ⁶, que apresenta uma composição semelhante à da hidroxiapatita. Este resultado vem ao encontro dos resultados de Baig, que sugerem que a superfície formada ao final da dissolução dos fosfatos de cálcio é formada por hidroxiapatita.

O resultado mais interessante destes estudos sobre a superfície formada nos implantes é que as superfícies são semelhantes para todos os tipos de implantes ósseos, de biovidros a fosfatos de cálcio ⁶.

Os resultados das cinéticas de dissolução obtidos neste trabalho e os resultados reportados pelos estudos realizados por Baig mostram que ao final da dissolução dos fosfatos de cálcio estes apresentam uma superfície semelhante, não importando o tipo de fosfato nem o meio em que este material é dissolvido.

Outro resultado importante apresentado por estudos realizados com implantes é a descoberta de que um dos fatores determinantes para a osteogênese dos materiais implantados é a formação da camada de apatita biológica ⁶. Assim, materiais que apresentem dificuldade para a formação desta superfície de apatita biológica podem apresentar dificuldades de integração ao organismo em que foram implantados.

7.5- Camada Positiva Adsorvida na Superfície dos Fosfatos de Cálcio e Atividade Celular na Superfície dos Materiais.

A Figura 51 ⁶⁹, mostra um esquema representando o ciclo de remodelagem dos ossos. Pelo esquema é possível observar que as células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), aderem à superfície mineral dos ossos através de proteínas (a e b).

As cargas geradas na interface fase mineral/solução biológica seriam responsáveis pela adesão destas proteínas e por suas vez, pela adesão das células ósseas como os osteoblastos e osteoclastos.

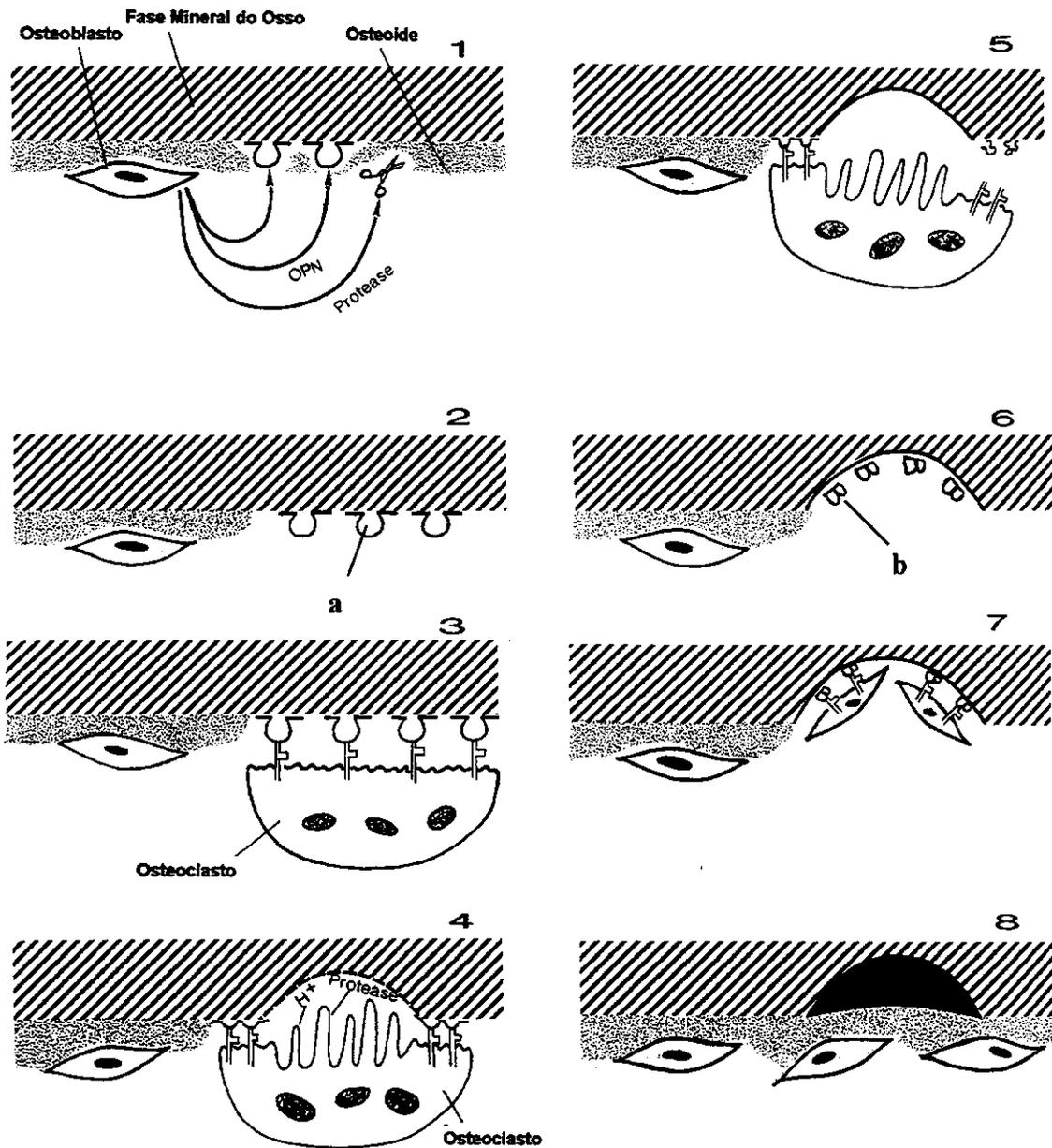


Figura 51: Esquema representando o ciclo de remodelagem dos ossos.

O modelo do Gramain para a cinética de dissolução, bem como resultados de outros trabalhos sobre dissolução^{44, 70-72}, mostram que após um pequeno período de dissolução é possível observar a formação de cargas positivas na superfície dos fosfatos de cálcio.

A formação destas cargas positivas provavelmente ocorre também na superfície da fase óssea inorgânica dos organismos vivos e dos implantes sintéticos formados por fosfatos de cálcio. Estas cargas positivas têm papel fundamental para que um implante apresente propriedades biocompatíveis, pois a partir da formação destas cargas é que ocorre de fato a interação entre a superfície dos fosfatos de cálcio e as células ósseas. ⁶

7.6- Velocidade de Dissolução.

Como visto nos itens anteriores, a solubilidade dos fosfatos de cálcio é de grande importância para o sucesso de implantes ósseos realizados com estes materiais. Além da solubilidade, a velocidade de dissolução parece ter grande importância no sucesso dos implantes de fosfatos de cálcio.

Alguns trabalhos ⁶ mostram que implantes de fosfatos de cálcio que apresentam grande velocidade de dissolução entram em equilíbrio com os fluidos biológicos de forma rápida, e assim a precipitação da “apatita biológica” na superfície do implante ocorre de forma rápida, competindo cineticamente com outros processos que interferem no processo de biointegração. Fosfatos de cálcio com velocidade de dissolução baixa levam um longo tempo para entrar em equilíbrio com o fluido biológico. Devido a esse tempo maior, processos paralelos à reação de dissolução e precipitação da apatita biológica podem se tornar importantes.

Implantes formados por fosfatos cristalinos ou compactados não apresentam boa biocompatibilidade, pois possuem baixa solubilidade e velocidade de dissolução reduzida ⁶.

8 – Conclusão

8.1 - Caracterização dos Fosfatos de Cálcio.

Os fosfatos de cálcio estudados (sintéticos e a fase óssea inorgânica) mostram semelhanças na composição e cristalinidade quando comparados entre si.

Os resultados da caracterização das fases ósseas inorgânicas mostram que estas não apresentam diferenças significativas quanto ao tamanho de cristais, morfologia e composição, mesmo quando são obtidas de ossos diferentes de ratos com diferentes idades.

Os resultados da caracterização por BET, difratometria de Raios-X e microscopia eletrônica indicam que os ossos podem ser considerados como nanocompósitos, compostos por uma matriz inorgânica conectada por uma matriz orgânica.

Os resultados de difratometria de Raios-X mostram que os ossos são formados por uma fase óssea inorgânica que não é formada por cristais grandes que apresentam organização a longas distâncias, como é típica de fosfatos de cálcio cristalinos.

Os testes para avaliação da desproteinação das fases ósseas com hidrazina mostram que a metodologia proposta neste trabalho para a desproteinação conseguiu realizar a eliminação dos compostos orgânicos da matriz óssea de forma satisfatória.

8.2 - Cinética de Dissolução.

O sistema construído para as medidas de cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio em solução de fluido corpóreo simulado, assim como a metodologia desenvolvida, mostraram-se eficientes e reprodutíveis.

Os testes realizados para avaliar a qualidade das medidas mostram que, apesar da determinação da concentração de cálcio utilizando-se o eletrodo de íon seletivo para cálcio apresentar variações entre as medidas realizadas (primeira medida e duplicata), estas variações não comprometem a qualidade e a confiabilidade dos resultados.

Os resultados preliminares da caracterização da hidroxiapatita após a cinética de dissolução indicam que ocorrem algumas transformações nesse fosfato. Uma maior caracterização dos fosfatos de cálcio após a cinética de dissolução se faz necessária e levará a um melhor entendimento deste processo.

Os testes realizados para avaliar o modelo empregado (modelo da camada de cálcio), mostram que ele descreve a cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio de forma bem adequada.

A determinação dos valores de n_s para os fosfatos estudados mostrou que, apesar da diferença de meio e da diferença apresentada entre os fosfatos de cálcio, os valores de n_s foram praticamente coincidentes ao final da cinética de dissolução, indicando a formação de uma superfície semelhante para os vários fosfatos de cálcio.

8.3 - Modelos Propostos para a Dissolução dos Fosfatos de Cálcio.

A análise do modelo proposto por Baig para o MES frente aos resultados deste trabalho mostrou que ele descreve qualitativamente de forma satisfatória a solubilidade dos fosfatos de cálcio, que resulta para todos eles na formação de uma superfície semelhante ao final da dissolução, não importando a origem nem o meio aquoso em que são dissolvidos.

Convém ressaltar que o tratamento de cinética de dissolução proposto por Baig a partir do modelo de MES descreve apenas uma pequena parte da cinética de dissolução, não podendo ser estendido para todo o processo de dissolução dos fosfatos de cálcio, até que seja atingido o equilíbrio. Apesar desta restrição, os dados obtidos por este modelo para o início da dissolução concordam com os resultados aqui apresentados para a cinética de dissolução dos fosfatos de cálcio.

Por fim, os resultados apresentados nesta Dissertação de Mestrado têm o mérito de contribuir para a generalização do modelo da camada de cálcio, que descreve de forma satisfatória a cinética e dissolução dos fosfatos de cálcio. Além de confirmar o modelo empregado, este trabalho expande e generaliza os resultados apresentados por outros autores sobre a dissolução dos fosfatos de cálcio.

O trabalho desenvolvido também determina valores numéricos para os parâmetros K e n_s sem a necessidade do conhecimento prévio da estequiometria do fosfato de cálcio, nem tão pouco de informações sobre o pH da solução empregada na dissolução destes materiais. Ao obter os valores de n_s e K , este trabalho expande e generaliza o modelo inicialmente proposto tornando-o quantitativo, o que contribui de forma significativa a melhorar o entendimento sobre a dissolução dos fosfatos de cálcio.

A conclusão apresentada no parágrafo anterior se destaca quando comparada com os resultados publicados na literatura, que na sua grande maioria são apenas qualitativos.

Referências Bibliográficas

- 1 . W. F. De Jong (1926) *Rec. Trav. Chim.* 45:445-448.
- 2 . K. De Groot (1980) *Biomat.* 1:47-50.
- 3 . J. C. Elliott (1994) *Studies in Inorganic Chemistry 18 - Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*; Elsevier – Amsterdam – London – New York – Tokyo.
- 4 . J. X. Lu, A. Gallur, B. Flautre, K. Anselme, M. Descamps, B. Thierry, P. Hardouin (1998) *J. Biomed. Mater. Res.* 42:357-367.
- 5 . H. Benhayoune, E. Jallot, P. Laquerriere, G. Balossier, P. Bonhomme, P. Frayssinet (2000) *Biomat.* 21:235-242.
- 6 . P. Ducheyne, Q. Qiu (1999) *Biomat.* 20:2287-2303.
- 7 . Coralina – National center for Scientific Research – Havana City, Cuba.
- 8 . A. B. Baig, A. A. Baig, S. C. Miller, W. I. Higuchi (2002) *Calcif. Tissue Int.* 71:167-171.
- 9 . A. Silver, R. J. Murrils, D. J. Etherington (1988) *Exp. Cell Res.* 175:266-276.
- 10 . R. Baron, L. Neff, D. Louvard, P. J. Courtoy (1985) *J. Cell Biol.* 101:2210-2222.
- 11 . A. Teti, H. C. Blair, S. L. Teitelbaum, A. J. Kahn, C. Koziol, J. Konsek, A. Zambonin-Zallone, P. S. Mafé, J. A. Manzanares, H. Reiss, J. M. Thomann, P. H. Gramain (1992) *J. Phys. Chem.* 96:861-866.
- 12 . S. Chander, D. W. Fuerstenau (1984) *Solubility and interfacial properties of hydroxyapatite: a review; in Misra DN (ed): Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite.* New York, Plenum Press, 129-149.
- 13 . A. A. Baig, J. L. Fox, Z. Wang, W. I. Higuchi, S. C. Miller, A. C. Barry, M. Otsuka (1999) *Calcif. Tissue Int.* 64:329-339.
- 14 . H. Zhuang, A. A. Baig, J. L. Fox, Z. Wang, S. J. Colby, A. Chhetry, W. I. Higuchi (2000) *J. Colloid Int. Sci.* 222:90-96.
- 15 . A. Chhetry, Z. Wang, J. L. Fox, A. A. Baig, H. Zhuang, W. I. Higuchi (1999) *J. Colloid Int. Sci.* 218:47-56.
- 16 . H. M. Rootare, V. R. Deitz, F. G. Carpenter (1962) *J. Colloid Sci.* 17:179.
- 17 . V. K. LaMer (1962) *J. Phys. Chem.* 66:973.
- 18 . W. F. Neuman, B. J. Bareham (1975) *Calcif. Tissue Int.* 18:161.
- 19 . G. J. Levinskas, W. F. Neuman (1955), *J. Phys. Chem.* 59:164.
- 20 . M. D. Francis (1965) *Ann. New York Acad. Sci.* 131:694.

-
- 21 . A. A. Baig, J. L. Fox, R. A. Young, Z. Wang, J. Hsu, W. I. Higuchi, A. Chhetry, H. Zhuang, M. Otsuka (1999) *Calcif. Tissue Int.* 64:437-449.
 - 22 . A. A. Baig, J. L. Fox, J. Hsu, Z. Wang, M. Otsuka, W. I. Higuchi, R. Z. LeGeros (1996) *J. Colloid Int. Sci.* 179:608-617.
 - 23 . J. Hsu, J. L. Fox, G. L. Powell, M. Otsuka, W. I. Higuchi, D. Yu, J. Wong, R. Z. LeGeros (1994) *J. Colloid Int. Sci.* 168:356.
 - 24 . J. Hsu, J. L. Fox, W. I. Higuchi, G. L. Powell, M. Otsuka, A. A. Baig, R. Z. LeGeros (1994) *J. Colloid Int. Sci.* 167:414-423.
 - 25 . S. Mafé, J. A. Manzanares, H. Reiss, J. M. Thomann, P. H. Gramain (1992) *J. Phys. Chem.* 96:861-866.
 - 26 . J. M. Thomann, J. C. Voegel, P. H. Gramain (1993) *J. Colloid Int. Sci.* 157:369-374.
 - 27 . P. H. Gramain, J. C. Voegel, M. Gumpfer, J. M. Thomann (1987) *J. Colloid Int. Sci.* 118:148-157.
 - 28 . J. M. Thomann, J. C. Voegel, M. Gumpfer, P. H. Gramain (1989) *J. Colloid Int. Sci.* 132:403-412.
 - 29 . J. M. Thomann, J. C. Voegel, P. H. Gramain (1991); *Colloids and Surf.* 54:145-159.
 - 30 . P. H. Gramain, J. M. Thomann, M. Gumpfer, J. C. Voegel (1989) *J. Colloid Int. Sci.* 128:370-381.
 - 31 . J. Christoffersen, M. R. Christoffersen, T. Johansen (1996) *J. Crys Grow.* 163:295-303.
 - 32 . M. R. Christoffersen, N. Seierby, T. B. Zunic, J. Christoffersen (1999) *J Crys Grow.* 203:234-243.
 - 33 . K. Hyakuma, T. Yamamuro, Y. Kotoura, M. Oka, T. Nakamura, T. Kitsugi, T. Kokubo, H. Kushitani (1990) *J. Biomed. Mater. Res.* 24:471-488.
 - 34 . T. M. Alam, D. P. Lang (2001) *Chem. Phys. Letters* 336:385-391.
 - 35 . G. H. Nancollas, W. Wu (2000) *J. Crys. Grow.* 211:137-142.
 - 36 . P. Schaad, F. Poumier, J. C. Voegel, P. Gramain (1997) *Colloids Surf. a-Phys. Eng. Asp.* 121:217-228.
 - 37 . F. Poumier, P. Schaad, Y. Haikel, J. C. Voegel, P. H. Gramain (1999) *J. Biomed. Mater. Res.* 45:92-99.
 - 38 . J. M. Thomann, J. C. Voegel, P. H. Gramain (1990) *Calcif. Tissue Int.* 46:121-129.
 - 39 . M. R. Christoffersen, J. Dohrup, J. Christoffersen (1998) *J. Crystal Grow.* 186:283-290.
 - 40 . J. D. Drujijn, C. P. A. T. Klein, K. de Groot, C. A. van Blitterswijk (1992) *J. Biomed. Mater. Res.* 26:1365-1382.

-
- 41 . H. W. Denissen, K. de Groot, P. Ch. Makkes, A. van den Hoof, P. J. Kloppe (1980) *J. Biomed. Mater. Res.* 14:713-721.
 - 42 . A. Barroung, E. Lernoux, J. Lemaitre, P. G. Rouxhet (1998) *J. Colloid Int. Sci.* 208:147-152.
 - 43 . Q. Luo, J. D. Andrade (1998) *J. Colloid Int. Sci.* 200:104.
 - 44 . T. Suzuki, T. Yamamoto, M. Toriyama, K. Nishizawa, Y. Yokogawa, M. R. Mucalo, Y. Kawamoto, F. Nagata, T. Kameyama (1997) *J. Biom. Mater. Res.* 34:507-517.
 - 45 . D. N. Misra (1999) *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 48:848-855.
 - 46 . H. Zeng, K. Krishnan, Chittur, W. R. Lacefield (1999) *Biomater.* 20:377-384.
 - 47 . E. Y. Kawachi (1997) Dissertação de Mestrado, IQ/Unicamp.
 - 48 . E. Y. Kawachi, C. A. Bertran, L. T. Kubota (1998) *Biomater.*, 19:2329-2333.
 - 49 . R. M. Biltz, E. D. Pellegrini (1969) *J. Bone Joint Surg. – Amer. Vol. A* 51:456-&.
 - 50 . A. A. Dietz (1946) *J Bio. Chem.* 165:505-511.
 - 51 . A. A. Dietz (1949) *Arch. Bioch.* 23:211-221.
 - 52 . [Anon] (1955) *Nutr. Rev.* 13:101-102.
 - 53 . C. C. Lai, L. Singer, W. D. Armstrong (1975) *J. Bone Joint Surg. – Amer. Vol A* 57:516-522.
 - 54 . G. N. Hoag, R. G. Brown, M. E. Smart, R. E. Subden (1976) *Growth* 40:3-11.
 - 55 . M. Newton, D. W. L. Hukins, G. Harding (1992) *Phys. Med. Bio.* 37:1339-1347.
 - 56 . C. Rey, H. M. Kim, L. Gerstenfeld, M. J. Glimcher (1996) *Connec. Tis. Res.* 35:397-403.
 - 57 . I. Rehman, R. Smith, L. L. Hench, W. Bonfield (1995) *J Biom. Mat. Res.* 29:1287-1294 .
 - 58 . W. J. Landis (1996) *Connec. Tis. Res.* 35:1-8.
 - 59 . J. D. Termine, E. D. Eanes, D. G. Greenfield, M. U. Nysten (1973) *Calcif. Tis. Int.* 12:73-90.
 - 60 . Kawachi Y. E. – Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em ambientes líquidos confinados – Tese de Doutorado , IQ/Unicamp, 2002.
 - 61 . S. Akabori, K. Ohno, K. Navita (1952) *Bull. Chem. Soc.* 25:214-218.
 - 62 . E. G. Nordström, K. H. Karlsson (1990) *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1:182-184.
 - 63 . K. Kandori, A. Yasukawa, T. Ishikawa (1995) *Chem. Mater.* 7:26-32.
 - 64 . S. J. Gadaleta, E. P. Paschalis, F. Betts, R. Mendelsohn, A.L. Boskey (1996) *Calcif. Tissue Int.* 58:9-16.

-
- 65 . A. B. Barry, A. A. Baig, S. C. Miller, W. I. Higuchi (2002) *Calcif. Tis. Int.* 71:167-171.
- 66 . S. V. Dorozhkin (2002) *Prog. Crys. Grow. Charac. Mater.* 45-61.
- 67 . J. L. Ong, C. A. Hoppe, H. L. Cardenas, R. Cavin, D. L. Carnes, A. Sogal, G. N. Raikar (1998) *J. Biom. Mat. Res.* 39:176-183.
- 68 . Y. L. Chang, D. Lew, J. B. Park, J. C. Keller (1999) *J. Oral Max. Surg.* 57:1096-1108.
- 69 . M. J. Seibel, S. P. Robins, J. P. Bilezikian (1994) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*; Academic Press – California – USA.
- 70 . P. Somasundaran (1968) *J. Colloid Int. Sci.* 27:659-666.
- 71 . P. Somasundaran, G. E. Agar (1967) *J. Colloid Int. Sci.* 24:433-440.
- 72 . T. Suzuki, K. Nishizawa, Y. Yokogawa, F. Nagata, Y. Kawamoto, T. Kameyama (1996) *J. Ferment. Bioengineering.* 81:226-232.