

FIBRAS DE FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO: FASES AMORFAS COAXIAIS ORIENTANDO A BIOATIVIDADE

A.C. Silva^{1,2}, S.R.H. Mello-Castanho², N.B. Lima², F.J.C. Braga²

¹Consulmat Produtos Técnicos, Indústria e Comércio Ltda.

²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo, SP, Brasil

E-mail: dasilva.ac@uol.com.br

RESUMO:

Quatro fatores devem ser considerados no implante de biocerâmicas: a) índice de bioatividade; b) área superficial (reatividade); c) facilidade de manipulação; e, d) formação de “scaffolds” para ancorar células. Para atender tais solicitações foi proposto o biomaterial fosfato de cálcio amorfo (ACP) na forma de fibras entrelaçadas. Tal morfologia promove alta superfície de contato com fluidos corpóreos, é propícia ao ancoramento de células e ainda apresenta facilidade de manipulação durante o procedimento cirúrgico. Esta biocerâmica foi obtida pelo processo Hager-Rosengarth. Formaram-se fases amorfas coaxiais na fibra do biomaterial como consequência do super-resfriamento do líquido precursor. O presente trabalho estuda a relação entre estas fases coaxiais formadas e o comportamento seletivo de dissolução por camadas da fibra de ACP. Realizou-se ensaios de dissolução em fluido corpóreo simulado, citotoxicidade e de caracterização de materiais (MEV, DRX e FT-IR). O controle da bioatividade em função da distribuição coaxial das fases amorfas foi indicado.

Palavras chave: Fibras; ACP; Biomateriais; Fases amorfas.

1.INTRODUÇÃO

O fosfato de cálcio amorfo (ACP) é apontado na literatura como um estágio precursor da hidroxiapatita na formação de tecido ósseo ⁽¹⁾, quando cirurgicamente enxertada em organismos vivos. Este material caracteriza-se por ser a única das formas de fosfatos de cálcio que apresenta ordem de curto alcance, ou amorfa e similar àquela dos vidros. Esta estrutura desordenada torna o ACP uma fase altamente instável que se dissolve em meios aquosos quase instantaneamente (por hidrólise), e passa a precipitar em um processo de crescimento microcristalino,

resultando na formação de fases de fosfato de cálcio termodinamicamente estáveis^(2,3), tais como, por exemplo, a hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato octacálcico e apatita^(2,4). A estrutura morfológica do ACP consiste de partículas esféricas de aproximadamente 9,5 Å de diâmetro⁽⁵⁾ agrupadas em clusters, por vezes nanométricos⁽⁴⁾. Nos interstícios entre as partículas de ACP sintético foi observada 15-20% de água retida na estrutura⁽⁶⁾ a qual facilita a dissolução dos agregados. Desta forma tem sido observada melhor osteocondutividade e índice de bioatividade do ACP em ensaios in vivo que outras fases cristalinas de fosfato de cálcio⁽⁴⁾, sem contudo apresentar citotoxicidade^(1,7) significativa. Adicionalmente, é relatado o aumento da atividade da fosfatase alcalina de mesoblastos, da proliferação celular e promoção da adesão celular com o uso deste material⁽⁸⁾. O comportamento do ACP durante a formação de tecidos mineralizados o torna adequado para finalidades de reparação e regeneração tecidual óssea, com ampla utilização na odontologia e ortopedia.

O ACP pode ser obtido na forma de fibras micrométricas e emaranhadas, resultando em morfologia similar ao algodão natural. Esta morfologia é possível com o uso do processo Hager-Rosengarth, normalmente utilizado para a obtenção de mantas de fibra de vidro para isolamento termo-acústica⁽⁹⁾. A vantagem do biomaterial na forma de fibras emaranhadas é tornar possível o enxerto adaptar-se a qualquer configuração de defeito do tecido ósseo, combinando as funções hemostáticas com as características principais do ACP, isto é, ser biocompatível, ósseointegrável, reabsorvível e auxiliar na remodelação óssea.

No processo Hager-Rosengarth⁽⁹⁾ o líquido precursor é estirado por meio da aceleração centrífuga e resfriado pelo ar ambiente, o qual representa um fluxo em relação à fibra formada, devido à velocidade angular desta⁽¹⁰⁾. As fibras de ACP, são em realidade vidros de fosfato de cálcio, pois são submetidas ao super-resfriamento, adicionalmente, as proporções molares entre CaO e P₂O₅ onde ocorre a formação do ACP, entre 1:1 e 1:1,5 ou 50:50% e 40:60%, são similares àquelas descritas para a formação deste tipo de vidro no sistema binário CaO:P₂O₅⁽¹¹⁾.

A formação de fases coaxiais em fibras cerâmicas de carbeto de silício (SiC) obtidas por processos de deposição de vapor é descrita na literatura^(12,13). Comportamento similar pode ser esperado para fibras obtidas por processos que envolvam o super-resfriamento das mesmas. Em sistemas vítreos, podem ocorrer fases amorfas com características similares às suas contrapartidas cristalinas⁽¹⁴⁾,

contudo, deve-se melhor considerar “regiões” com gradientes composicionais correspondentes às formas cristalinas, formadas coaxialmente devido as diferenças na taxa de resfriamento desde a superfície das fibras (taxa elevada) até o núcleo das mesmas (taxa lenta).

Analisando o diagrama binário CaO:P₂O₅ ⁽¹⁵⁾ (Fig.1) podemos deduzir para o resfriamento do líquido de fosfato de cálcio as possíveis regiões coaxiais formadas durante o super-resfriamento das fibras. A Fig. 1b mostra um diagrama esquemático da possível distribuição destas regiões em um hipotético corte de uma fibra de ACP.

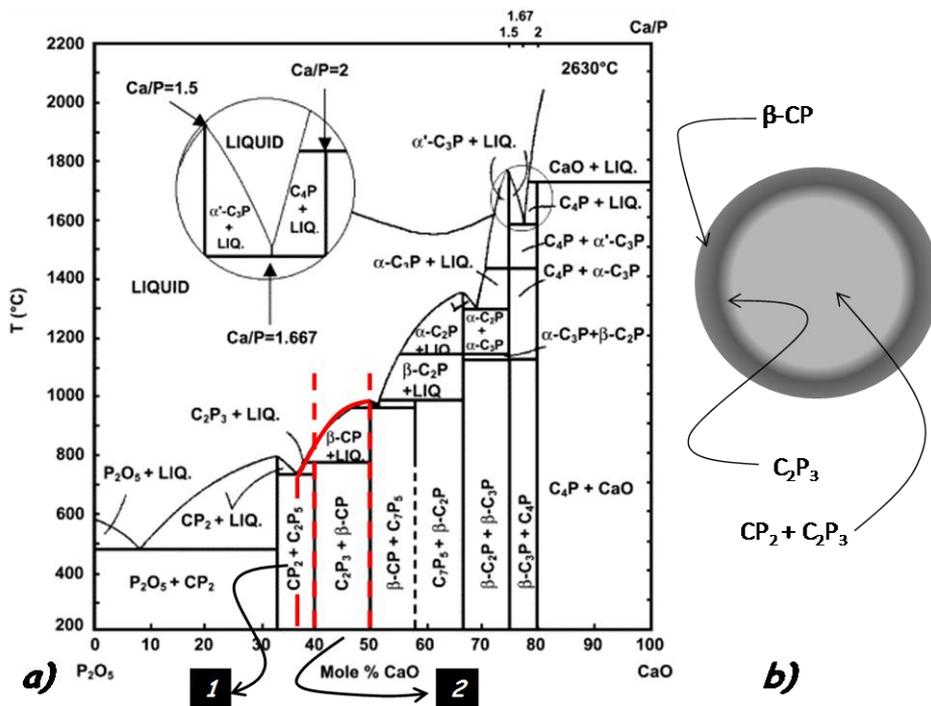


Figura 1 – a) Sistema CaO:P₂O₅: 1) Possível curva de resfriamento durante a formação da fibra de ACP; e, 2) Faixa composicional do líquido. **b)** Esquema em corte transversal da distribuição de fases amorfas coaxiais na fibra segundo a curva de resfriamento considerada

O presente trabalho busca verificar a ocorrência de gradientes composicionais ou “fases amorfas” coaxiais e seus efeitos na bioatividade de fibras de ACP obtidas pelo processo Hager-Rosengarth.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados foram: CaO - Nuclear, 95,0 %em massa e, P₂O₅ Vetec, 97,0% em massa. O material de partida é obtido por reação hidrotérmica de CaO e P₂O₅ em relação molar Ca/P > 1. O material após secagem a 90°C durante 72h foi

pulverizado (65 mesh, < 210µm) e levada a fusão à 1350°C durante 2 horas para refino, fluindo a seguir para a base de rotação do dispositivo de Hager-Rosengarth para formar as fibras, as quais são resfriadas pelo ar ambiente. Este equipamento foi desenvolvido pela empresa Consulmat Produtos Técnicos, Indústria e Comércio Ltda. A caracterização das mesmas foi realizada utilizando as técnicas de Difração de raios-X (DRX – Higaku Multiflex), Espectrometria de infra-vermelho com a transformada de Fourier (FT-IR - Thermo Nicolet - Nexus 870 FT-IR) e, Microscopia eletrônica de varredura (MEV – Hitachi Tabletop TM3000). O teste de dissolução em fluido corporal simulado (SBF) foram realizados durante 48 horas a 37°C conforme a metodologia indicada por Kokubo *et AL* ⁽¹⁶⁾. O ensaio de citotoxicidade realizou-se utilizando o método de incorporação do vermelho neutro, em células da linhagem NCTC 929 do banco de tecidos da ATCC. Foram preparados extratos dos materiais e colocados em contato com a cultura celular e a determinação do índice de citotoxicidade IC_{50%} ⁽¹⁷⁾.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fibras como obtidas pelo processo Hager-Rosengarth são mostradas na Fig. 2. Pode-se observar nesta figura que o diâmetro das mesmas não é homogêneo e varia aproximadamente entre 10 µm a 500 µm.

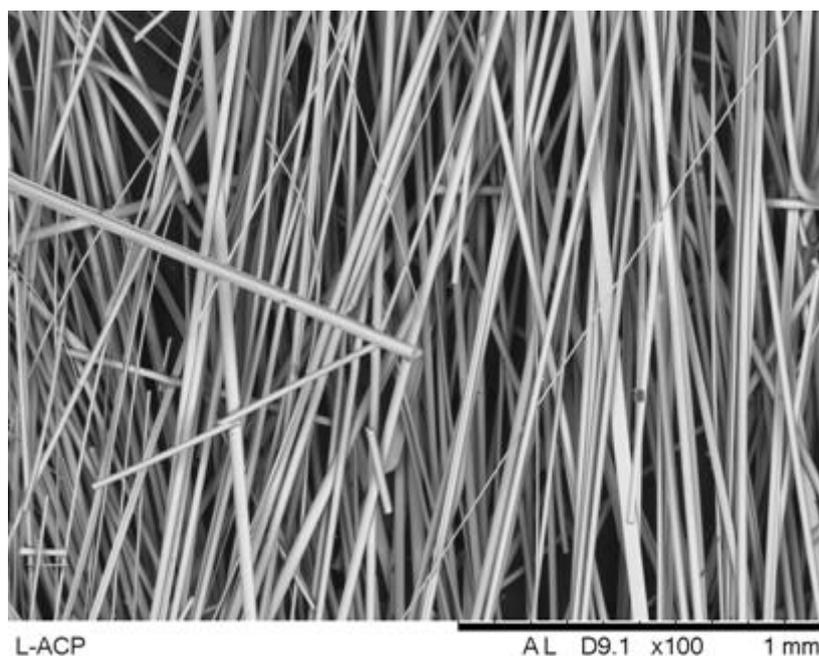


Figura 2 – Micrografia de fibras de ACP obtidas pelo processo Hager-Rosengarth

Na Fig. 3 é mostrado o difratograma correspondente à fibra de ACP.

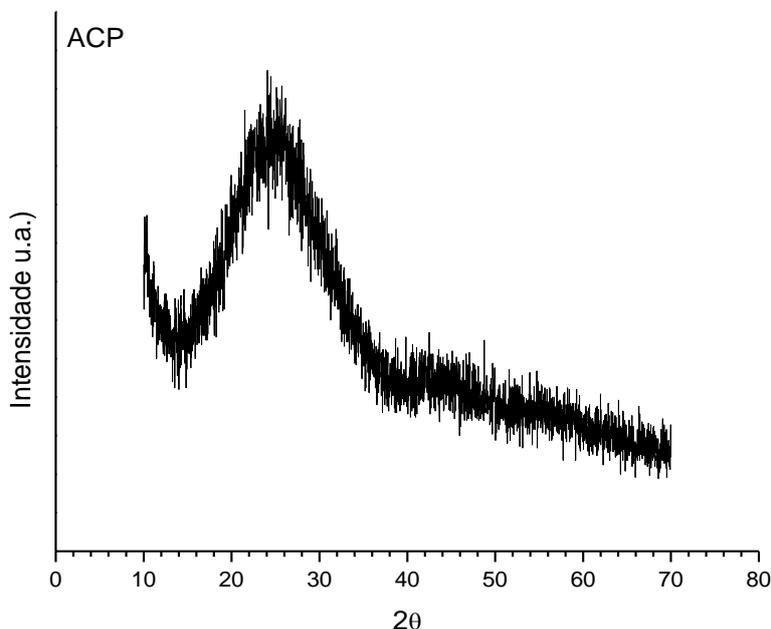


Figura 3 – Difratograma das fibras de ACP como preparadas.

Este difratograma não apresenta picos que indiquem fases cristalinas correspondentes a compostos de fosfato de cálcio, pelo contrário, seu padrão de difração de raios-X é largo e difuso, próprio dos materiais amorfos. Contudo, neste padrão difuso, observa-se um máximo à 25 graus (2θ), característico de estruturas vítreas. Um segundo máximo, de menor intensidade observado à 42 graus (2θ), pode ser indicativo que o material seja composto de pelo menos duas fases vítreas. O espectrograma obtido pelo ensaio por FT-IR das fibras de ACP, é mostrado na Fig. 4. Através da análise dos picos deste espectrograma ⁽¹⁸⁾, observa-se que apesar da clara indicação da presença de ligações do tipo P-O, assinalados por “8” na figura, os picos indicativos típicos destas ligações em compostos de ordem cristalina (“1” na figura), apresentam baixa intensidade. Este resultado está de acordo com os resultados observados na análise por DRX (Fig. 3). Observa-se nos picos relativos às ligações com ânions fosfato (“6” e “7” na figura), a falta de ordem cristalina predominante destes na estrutura da fibra, o que por sua vez está de acordo com a literatura para compostos de ACP ⁽¹⁹⁾, por outro lado, a estrutura do material similar à

do vidro não pode ser confirmada, apesar da presença de pico de pequena intensidade indicando ligações P-O típicas de redes vítreas (“2” na figura).

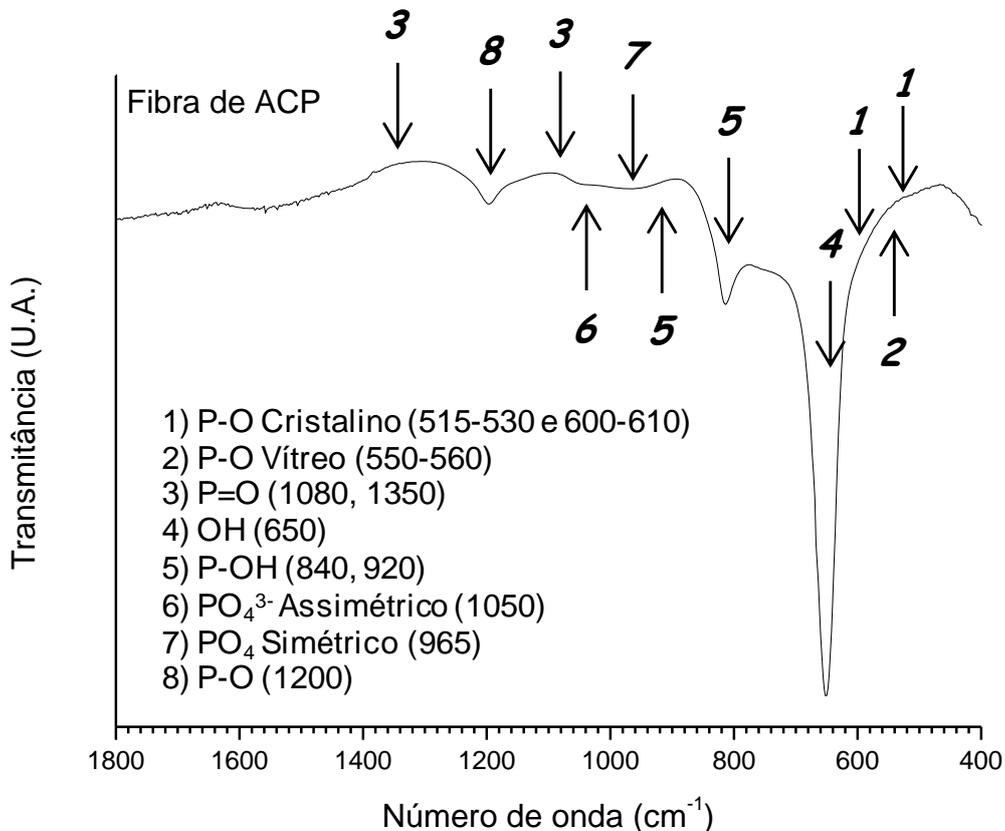


Figura 4 – Espectrograma das fibras de ACP

Ainda analisando o espectro da mesma figura, são importantes as indicações de ligações com grupos hidroxila no material (“4” e “5” na figura), os quais poderiam ser interpretados como resultado de água intersticial nos grânulos antes da fusão, as quais teriam se combinado ao material. Contudo, não sendo originalmente água estrutural, esta hipótese é pouco provável. A presença destes picos, parece melhor indicar a alta reatividade da fibra de ACP com meios aquosos, ou até mesmo à umidade presente no ar.

A Fig. 5 mostra as curvas obtidas no ensaio de citotoxicidade. Nesta figura podemos observar que as fibras de ACP apresentam clara biocompatibilidade, pois a curva de viabilidade está acima de 50% (IC₅₀%). De fato, esta curva aproxima-se do controle negativo. Desta maneira este material é indicado como não citotóxico. Este resultado é importante para materiais destinados à enxertia óssea e demonstra

que o processamento do ACP para fibras não prejudica as propriedades de interesse deste biomaterial.

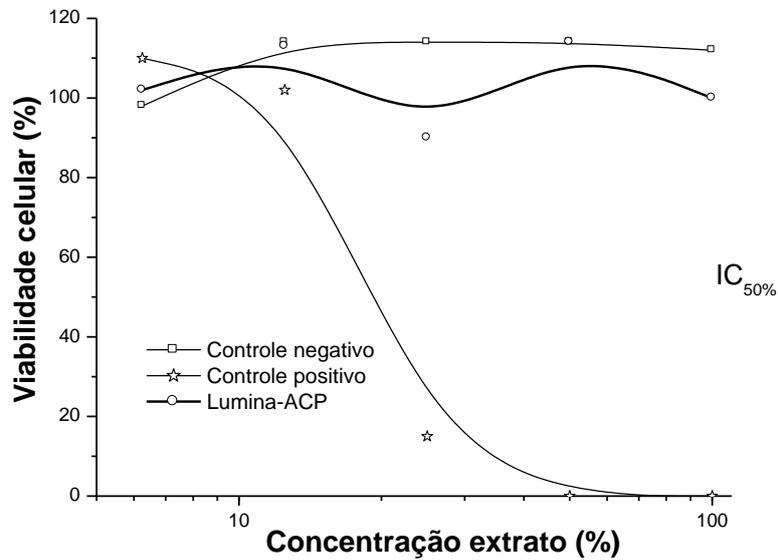


Figura 5 - Curvas obtidas no ensaio de citotoxicidade das fibras de ACP

A Fig.6 mostra uma micrografia da fibra de ACP após ser submetida ao ataque por SBF.

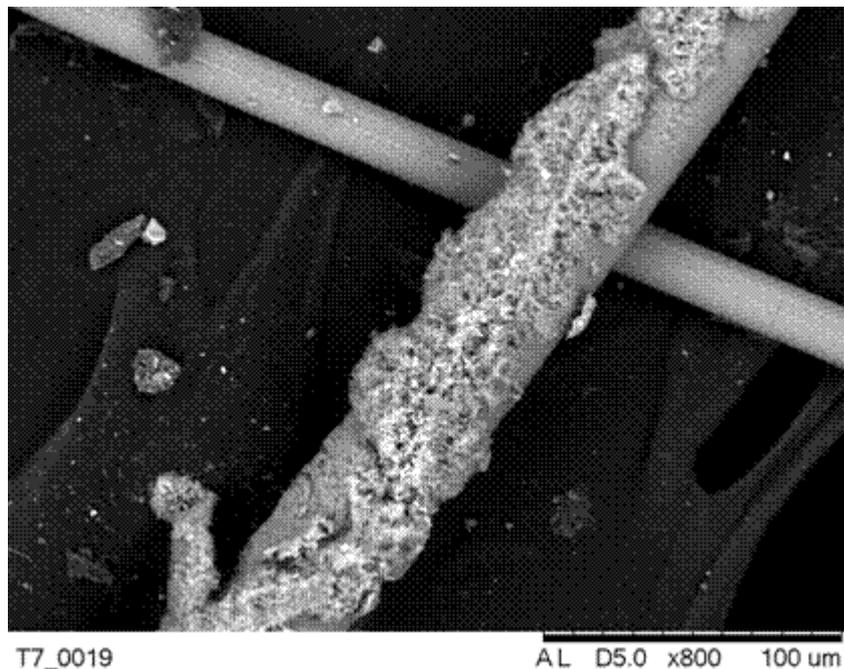


Figura 6 - Micrografia da fibra de ACP após ser submetida ao ataque por SBF durante 48 horas

Na micrografia podemos observar a formação de compostos de fósforo e cálcio, precursores de hidroxiapatita. Este fato indica a bioatividade do material e portanto adequação à utilização proposta.

Após o ataque por SBF, o comportamento de dissolução das fibras também pode ser observado. Aparentemente as mesmas dissolvem-se seletivamente por camadas. A fig. 7 mostra a possível sequência de dissolução destas fibras mediante o efeito do SBF. Na mesma figura é sugerida a possível composição de cada camada, de acordo com o diagrama de equilíbrio de fases binário $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$ (Fig.1).

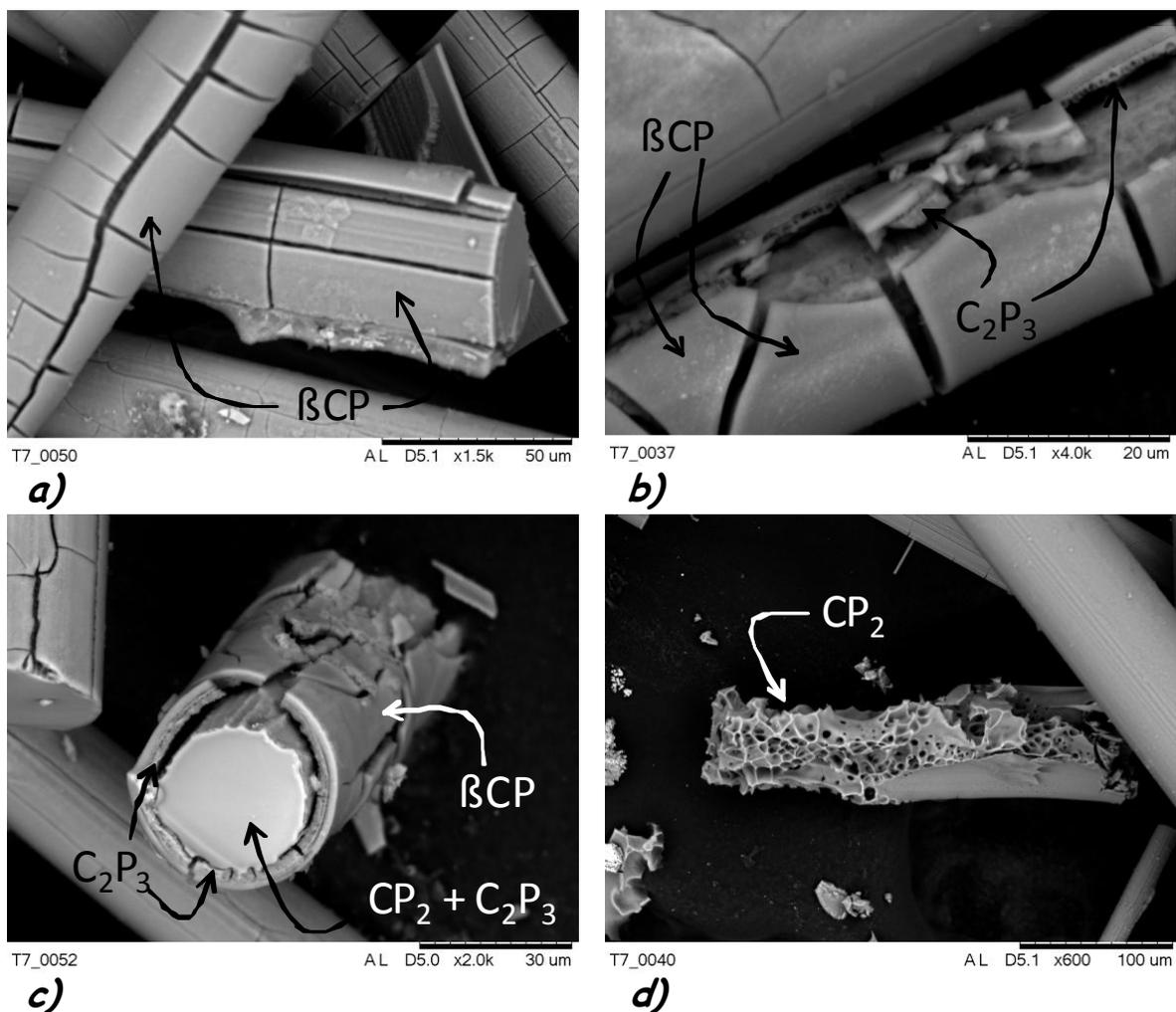


Figura 7 - Micrografias de fibras de ACP após serem submetidas ao ataque por SBF durante 48 horas. Na sequência de imagens é possível observar as etapas do processo de dissolução das mesmas. As composições mineralógicas foram atribuídas após comparação com o diagrama de fases do sistema $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$

Aparentemente ocorre a difusão de íons oriundos da solução através da camada externa, os quais interagem com a camada intermediária, levando à expansão volumétrica desta, fato que resulta em trincas e quebras da camada externa a qual por fim tende a desprender-se (Fig. 7-**a,b** e **c**). Prosseguindo o processo de dissolução, o núcleo da fibra (camada interna) parece apresentar a estrutura similar à típica entre duas fases que se resfriaram até o ponto eutético durante sua solidificação, desde um líquido fundido. Como resultado uma das fases de maior solubilidade foi dissolvida, restando uma estrutura final de morfologia trabecular, a qual apresenta a interesse por poder atuar como “Scaffold” para o ancoramento celular e crescimento de tecidos quando o biomaterial é empregado em enxertia óssea (Fig. 7-**d**).

A fig.8 mostra micrografias de uma fibra de ACP após ataque por SBF. Na mesma estão indicados os pontos onde a composição aproximada foi analisada por MEV-EDX.

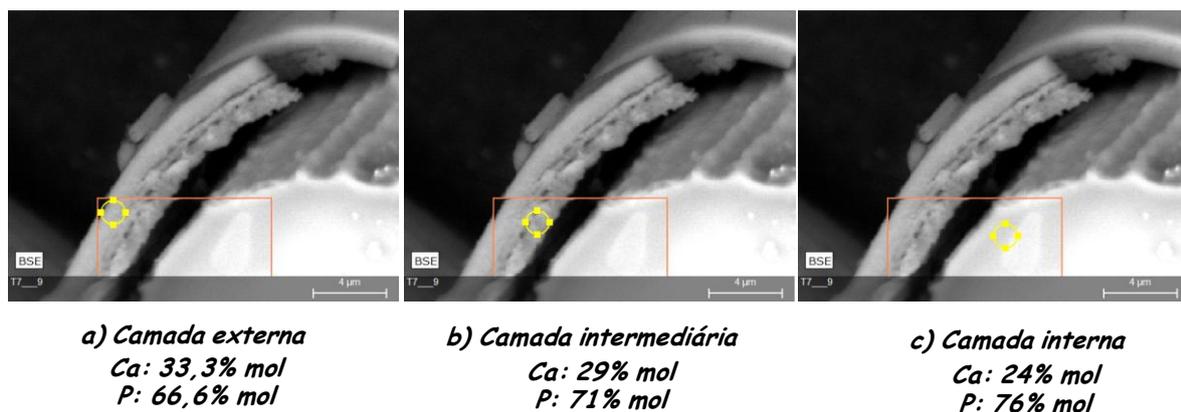


Figura 8 - Micrografia de fibra de ACP após ser submetida ao ataque por SBF durante 48 horas. Os pontos com círculo amarelos

Nos resultados das análises por MEV-EDX, podemos observar que a concentração relativa entre cálcio e fósforo, varia desde a camada externa para o interior da fibra, ou seja, a camada externa contém aproximadamente 33 mol % de cálcio, a intermediária aproximadamente 29 mol% de cálcio e o núcleo aproximadamente 24 mol % de cálcio. Estes resultados são coerentes com a curva de resfriamento proposta na fig.1 e ambos apoiam a distribuição de fases amorfas proposta nas micrografias da Fig. 7.

4. CONCLUSÕES

O potencial do uso de fibras de ACP obtidas pelo processo Hager-Rosengarth para aplicações em enxertia óssea, foi demonstrado.

As fibras obtidas aparentam possuir arranjo vítreo em sua estrutura, distribuídas em regiões coaxiais com gradiente composicional, as quais guardam similaridades com sua contrapartida cristalina.

A distribuição composicional coaxial da fibra rege o mecanismo de dissolução das mesmas, onde a fase residual apresenta morfologia trabecular adequada para promover o ancoramento celular e o crescimento de tecidos.

A interação das fibras com hidroxilas não foi esclarecida, porém provavelmente seja indicativa da alta reatividade do biomaterial.

5. AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem à Capes, CNPq, Fapesp e a diversos departamentos do Ipen pelo auxílio direto ou indireto na realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- 1 – WEINER, S. Transient precursor strategy in mineral formation of bone, **Bone**, v. 39, p. 431–433, 2006.
- 2 - ZHAO, J. LIU, Y. SUN, W. ZHANG, H. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry, **Chemistry Central Journal**, v. 5, p. 40, 2011.
- 3 – BOSKEY, A.L. POSNER, A.S. Magnesium stabilization of amorphous calcium phosphate: A kinetic Study, **Mater. Res. Bull.**, v. 9, p. 907-916, 1974.
- 4 – DOROZHKIN, S.V. Amorphous calcium (ortho) phosphates, **Acta Biomater.**, v. 6, p. 4457-4475, 2010.
- 5 – BLUMENTHAL, N.C. BETTS, F. POSNER, A.S. Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP, **Calcif. Tissue Res.**, v. 23 p. 245-250, 1977.
- 6 – J.D. TERMINE, E.D. EANES, Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations, **Calcif. Tissue Res.**, v. 10, p. 171-197, 1972.

- 7 - A.L. BOSKEY, Amorphous calcium phosphate: the contention of bone, **J. Dent. Res.**, v. 76, p. 1433-1436, 1997.
- 8 - B. VAN-HAYWOOD, Dentine hypersensitivity: bleaching and restorative considerations for successful management, **Int. Dental J.**, v. 52, p. 376–384, 2002).
- 9 – ROSENGARTH, S. HAGER, F. “*Apparatus and method for production of fibers from glass, slag, and the like meltable materials*”, U.S. Patent 2,234,087, 1941
- 10 – NAVARRO, J.M.F. **El Vidrio**, 3ª ed. Madrid, Consejo Superior de Invest. Científicas – Fundación Centro Nacional del Vidrio, 2003.
- 11 - IMAOKA, M. **Advances in Glass Technology**, Part 1, Plenum, N. York .1962.
- 12 – W. Wawner, A. Y. Teng, S. R. Nutt, “Microstructural Characterization of SiC (SCS) Filaments,” **Sample Quarterly**, v. 14, p. 44, 1983.
- 13 - NING, X.J. PIROUZ, P. The microstructure of SCS-6 SiC fiber, **J. Mater. Res.**, v.6 p.2234, 1991.
- 14 – GEDEON, O. LISKA, M. MACHACEK, J. Connectivity of Q-species in binary sodium-silicate glasses.**J. of Non-Cryst. Solids**, v.354, p. 1133–1136, 2008.
- 15 – ROTH, S.R. NEGAS, T. CONN, L.P. **Phase Diagrams for Ceramists**. The American Ceramic Society.
- 16 - KOKUBO, T. KUSHITANI, H. SAKKA, S. KITSUGI, T. YAMAMURO, T., Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 24, p. 721-734, 1990.
- 17 - ROGERO, S. O.; MALMONGE, S.M.; LUGAO, A. B.; IKEDA, T. I.; MIYAMARU, L.; CRUZ, A. S. Biocompatibility study of polymeric biomaterials, **Artificial Organs**, v.27, p. 424-427, 2003.

18 – WJADYMYR, J.B.S. CARDOSO, M.J.B., ALMEIDA, K.V. NASCIMENTO, E.P. FARIAS, K.A.S. FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de compósitos a base de quitosana/fosfato de cálcio. *Rev. Elet. De Mat. e Processos*, v.8, p.136-140, 2013.

19 – EANES, E.D. TERMINE, J.D. NYLEN, M.U. An electron microscopic study of the formation of amorphous calcium phosphate and its transformation to crystalline apatite, *Calcif. Tissue. Res.*, v. 12, p. 143-158, 1973.

AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE FIBERS: COAXIAL AMORPHOUS PHASES DRIVING THE BIOACTIVITY

ABSTRACT

Four main factors must be considered in implant bioceramics: a) level of bioactivity b) surface area (reactivity), c) ease of handling, and d) formation of "scaffolds" to retain cells. The amorphous calcium phosphate (ACP) on entangled fibers morphology was proposed to meet such requests. Such morphology promotes high surface contact with body fluids, it facilitates the anchoring of cells and even features easy handling during the surgical procedure. This bioceramic was obtained by Hager-Rosengarth process. Coaxial amorphous phases in the biomaterial fiber were formed as a result of melted liquid super-cooling. This paper studies the relationship between these formed coaxial phases and selective dissolution behavior of ACP by layers of it's fibers. It were performed the following testes: dissolution in simulated body fluid, cytotoxicity and materials characterization (SEM, XRD and FT-IR). The bioactivity control due to the coaxial distribution of amorphous phases was evaluated.

Keywords: Fiber, Biomaterials, ACP.