



## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA REATIVIDADE DE CERÂMICAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO**

Ribeiro, C<sup>1</sup>.; Rigo, E.C.S.<sup>2</sup>; Sepulveda, P<sup>1</sup>.; Bressiani, J.C.<sup>1</sup>; Bressiani, A.H.A<sup>1</sup>.  
IPEN - Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – 05508-000 - São Paulo - SP  
e-mail : cribeiro@ipen.br

<sup>1</sup>IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CCTM .

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Carlos- DEMa – BioLab.

### RESUMO

*Cerâmicas bioativas e reabsorvíveis possuem aplicações na ortopedia e odontologia, desde como substitutos ósseos simples, até dispositivos complexos para liberação de fármacos. Estudos de reatividade *in vitro* por meio da dissolução de hidroxiapatita e fosfato tricálcico em meio fisiológico simulado são de grande importância para avaliação preliminar, servindo de indicativo sobre a interação destes com o meio biológico. Neste trabalho, cerâmicas de diferentes reatividades foram preparadas utilizando hidroxiapatita e fosfato tricálcico, em diferentes proporções. As amostras sinterizadas foram caracterizadas por DRX e MEV. A dissolução e reatividade *in vitro* foi investigada a partir da imersão dos corpos cerâmicos em SBF, mantidos a 37°C por até 3 semanas. O efeito da dissolução foi acompanhado pela variação de pH das soluções que mantiveram contato com as cerâmicas. A superfície das amostras foi analisada por FTIR e MEV.*

Palavras-chave: bioatividade, dissolução, hidroxiapatita, fosfato tricálcico.

### INTRODUÇÃO

Compósitos cerâmicos constituídos de hidroxiapatita (HAp) e fosfato tricálcico (TCP), também conhecidos como cerâmicas bifásicas representam materiais de grande interesse na área médica, pois são capazes de melhorar a bioatividade, enquanto mantêm a característica de degradabilidade.

A bioatividade destes materiais está associada aos fenômenos que ocorrem na interface sólido/meio simulado ou biológico. Normalmente, ela é definida como a habilidade de um material ligar-se quimicamente ao osso, pela formação de uma



camada de fosfato de cálcio, promovendo uma osteogênese verdadeira, esta camada é conhecida como hidroxiapatita biológica ou hidroxicarbonatoapatita (HCA) (1).

Estudos envolvendo cerâmicas bifásicas de diferentes razões de TCP/HAp já demonstraram que a abundância de cristais de HCA sobre a superfície destas cerâmicas é influenciada pela razão de TCP/HAp; quanto maior a razão TCP/HAp, maior a quantidade de micro-cristais de HCA. Isto se deve a maior propriedade de dissolução do componente TCP, gerando desta forma, um aumento na concentração de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{PO}_4^{-3}$  no meio resultando a precipitação (1).

É possível avaliar a habilidade de ligação de um material ao tecido ósseo, por experimentos *in vitro*. Nestes experimentos, meios fisiológicos simulados de composições próxima a do plasma sanguíneo humano podem ser utilizados, favorecendo a formação da apatita biológica sobre a superfície do material. A solução empregada é constituída de íons numa concentração crítica para exercer uma precipitação quando em contato com materiais bioativos (2).

A resposta fornecida pela imersão de materiais bioativos à solução simulada da parte inorgânica do plasma sanguíneo, torna possível a avaliação preliminar da sua reatividade em meio biológico. Os mecanismos, *in vitro* e *in vivo*, são idênticos no que diz respeito a formação e crescimento da camada de HCA. Os mecanismos atuantes durante este processo envolvem basicamente reações de dissolução e precipitação com a participação efetiva de íons cálcio e fósforo presentes na solução e no material (1).

A dissolução é caracterizada por uma associação de processos: transporte de massa, fenômenos de adsorção/dessorção, reações heterogêneas e transformações químicas sucessivas de fases intermediárias. Estes processos são ainda mais complexos quando a difusão vem acompanhada de transformações químicas que são muito sensíveis a variações de pH. As interações iônicas tendem a aumentar o pH na interface e ocasionar variações de pH na solução, que dependem da distância interfacial sólido/líquido; quanto mais próximo da superfície do sólido, maior o pH (3).

Os modelos apresentados na literatura para dissolução de apatitas não são capazes de esclarecer o seu mecanismo de um modo geral, sendo muitos deles complementares. Uma das maiores dificuldades refere-se ao comportamento instável das soluções, oscilando entre estados de insaturação/supersaturação. Estes



estados podem ser avaliados pela atividade iônica presente nas soluções, sendo monitoradas por meio de leituras de pH. Valores de pH relacionados ao ganho ou perda de massa, transformações de fase e características da superfície do sólido podem servir como uma boa ferramenta para esclarecimento dos mecanismos de dissolução que determinam a reatividade das cerâmicas de fosfatos de cálcio <sup>(3)</sup>.

Neste trabalho, buscou-se um melhor esclarecimento sobre a propriedade de dissolução de cerâmicas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico, possibilitando prever a reatividade em presença de SBF, mantendo mesmas condições experimentais para cerâmicas de diferentes razões, HAp/TCP, com materiais de mesma densidade relativa.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os pós de hidroxiapatita (Strem Chemicals) e  $\beta$ -fosfato tricálcico (Fluka), foram misturados nas seguintes proporções em peso: 100% HAp (H), 87,5%HAp/12,5%TCP (8H), 75%HAp/25%TCP (7H), 62,5%HAp/37,5%TCP (6H), 50%HAp/50%TCP (5H) e 100% TCP (T), e prensados uniaxial e isostaticamente a frio (200MPa) em matriz cilíndrica de 12mm. As áreas de superfície geométrica das amostras foram sempre superiores a 11,5 mm<sup>2</sup>, já que a área mínima exigida para efetuar o teste de bioatividade é de 10 mm<sup>2</sup> <sup>(4)</sup>.

Foram atingidas densidades aproximadas de 95% para todas as amostras, após sinterização, de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro et al. <sup>(5)</sup>.

Para avaliar o comportamento bioativo das cerâmicas obtidas, foi preparado o SBF (Simulated Body Fluid), de acordo com o método proposto por Kokubo <sup>(2)</sup>.

O SBF foi obtido, dissolvendo-se em água deionizada, os seguintes sais: NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, HCl 0,1M, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> 0,05M, para ajuste do SBF até atingir pH de 7,25, mantendo temperatura de 37°C e agitação constantes. Os sais foram adicionados na ordem apresentada e apenas após a dissolução completa do sal, o próximo era adicionado.

Na Tabela I são apresentadas as concentrações correspondentes aos íons presentes na solução SBF adotada e no plasma <sup>(2)</sup>.

Tabela I - Concentrações iônicas das soluções empregadas (mmol.dm<sup>-3</sup>).

Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
-----------------	----------------	------------------	------------------	--------------------------------	-----------------	--------------------------------	-------------------------------



SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	4,2	148,0	1,0	0,5
Plasma	142,0	5,0	2,5	1,5	27,0	103,0	1,0	0,5

Para o ensaio de reatividade e dissolução, as amostras em duplicata, foram separadas por composição e imersas em SBF, sendo mantidas em frascos de polietileno e acondicionados em recipiente com água, para melhor monitoramento da temperatura. O sistema foi mantido em estufa de cultura à temperatura de  $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ .

Os ensaios foram realizados em períodos de até 3 semanas, renovando as soluções a cada 3 dias e mantendo uma razão de área geométrica da cerâmica com relação ao volume de solução, (S/V) de  $0,05 \text{ cm}^{-1}$ .

A avaliação dos resultados da reatividade e dissolução das amostras na presença de SBF, foi feita a partir de leituras de pH das soluções de SBF à  $37^{\circ}\text{C}$  e perda de massa das amostras, em função do tempo. As superfícies das amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e espectrofotometria de infravermelho, por reflexão difusa, adotando intervalo de  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$  para medida, antes e após 3 semanas de imersão em SBF.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de variação da massa em períodos de até 72 horas de contato com a solução SBF, são apresentados na Figura 1.

Foram observadas oscilações nos valores de massa para as diferentes cerâmicas. Este comportamento pode ser explicado pela atuação do processo de dissolução sobre a formação de material mínimo precipitado e ainda não estável nestas condições, sendo ainda sensíveis aos efeitos da dissolução, sobretudo, variações de pH na interface sólido/líquido.

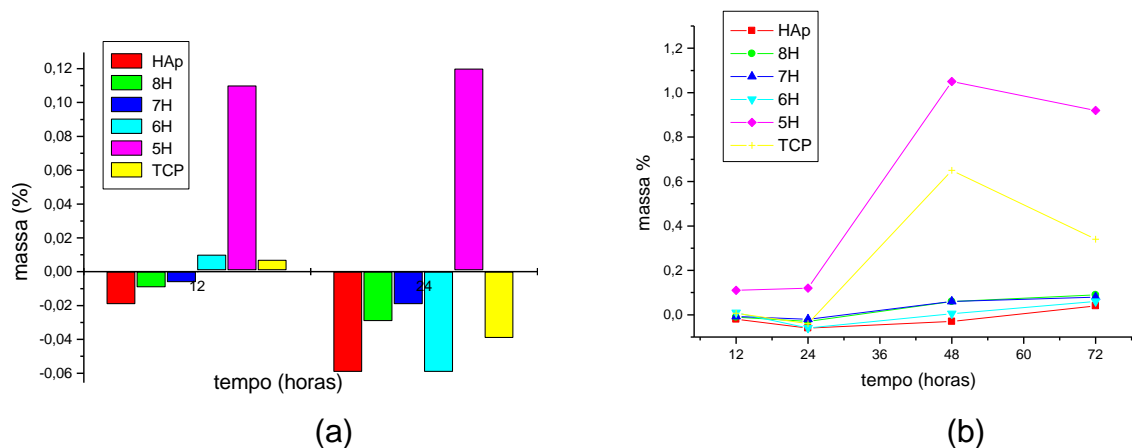


Figura 1 - Variação percentual da massa para as diferentes cerâmicas em função do tempo (a) períodos de 24 horas e (b) período de até 72 horas.

Na Figura 2 são apresentadas os valores de pH das soluções e variação de massa, em períodos de até 3 semanas, medidos a cada 72 horas, tempo correspondente a renovação das soluções.

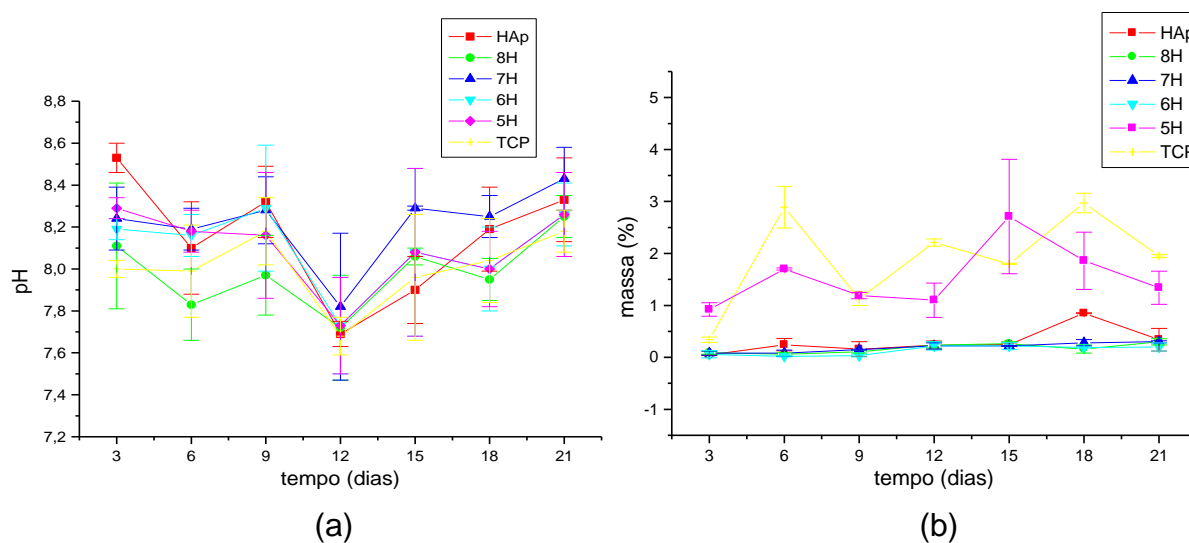


Figura 2 – Medidas de pH a 37°C (a) e massa (b), em função do tempo para as diferentes cerâmicas.

As soluções apresentam valores de pH e de variação de massa bastante dispersos em função do tempo, apesar de se verificar uma tendência similar de comportamento para as diferentes composições nos dois casos.

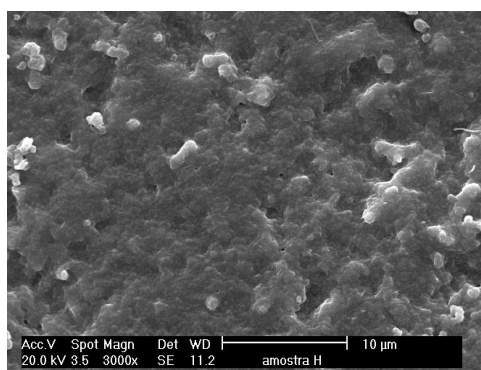
Apesar da dispersão dos valores de pH e de variação de massa, os resultados são condizentes e podem ser relacionados entre si, já que inicialmente é observado

um aumento na saturação das soluções (aumento de pH), resultantes de um processo de dissolução identificado pela redução de massa das amostras.

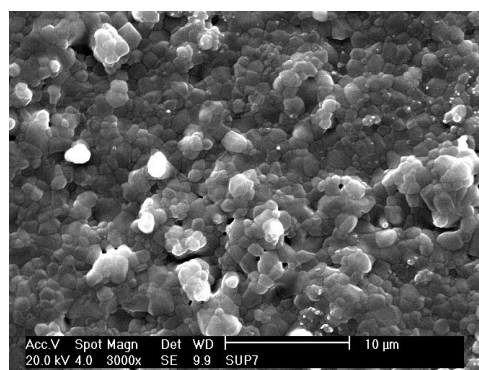
As cerâmicas reabsorvíveis com maiores quantidades de fase TCP apresentam maior desvio nas medidas. Este comportamento pode estar relacionado a cinética de dissolução mais favorável para estas cerâmicas e instabilidade de compostos intermediários, dificultando a obtenção de valores de medida constantes ou próximos.

A velocidade de formação da camada é influenciada significativamente pela supersaturação inicial, estágio no qual a difusão é predominante. Em tempos mais longos, as variações de pH podem resultar em comportamento diferenciado, envolvendo formação de fases intermediárias na solução e fenômenos de adsorção/dessorção, mudança de fase e cristalização no sólido.

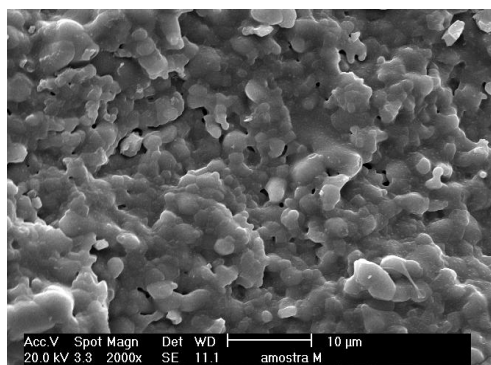
Para verificar a formação da camada resultante dos processos de dissolução e precipitação, as superfícies das cerâmicas foram caracterizadas antes e após imersão em SBF. Micrografias representativas das superfícies são apresentadas na Figura 3.



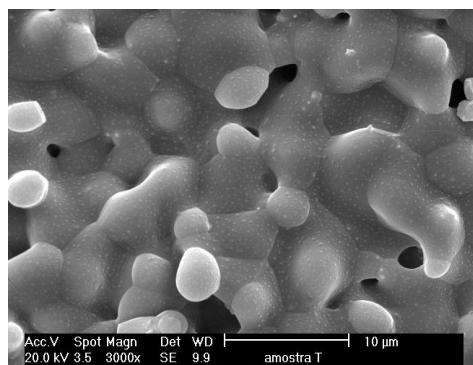
(a)



(b)



(c)

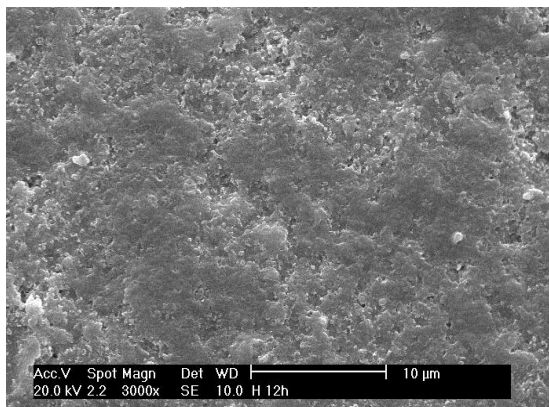


(d)

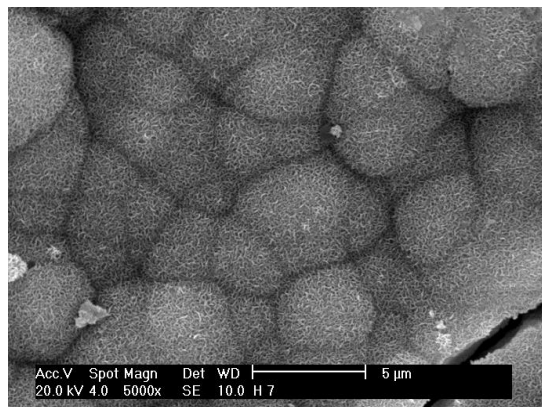
Figura 3 – Micrografias das superfícies das cerâmicas antes da imersão em SBF;  
(a) H, (b) 7H, (c) 5H e (d)T.

As variações de pH das soluções que mantiveram contato com as cerâmicas que apresentam a HAp como fase majoritária não levaram a grandes variações de massa, dificultando a formação de precipitados na superfície no estágio inicial, comportamento que pode ser observado nas micrografias (Figura 4).

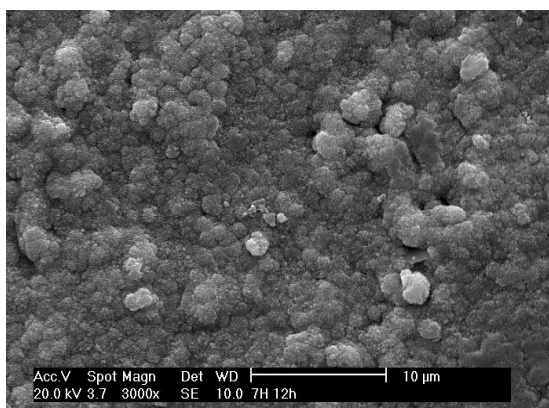




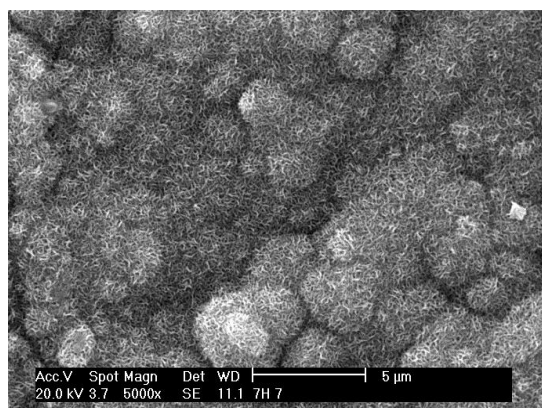
(a)



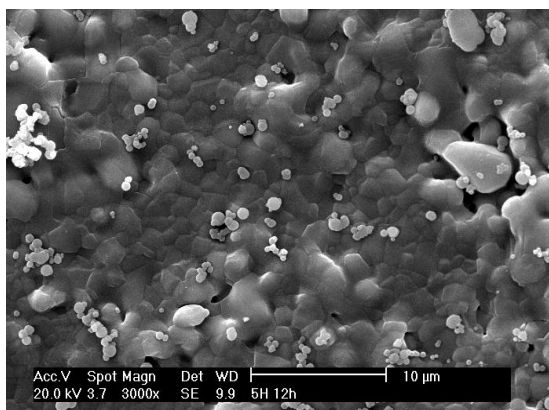
(e)



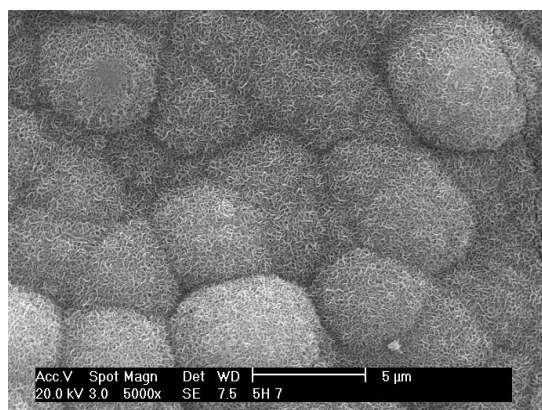
(b)



(f)

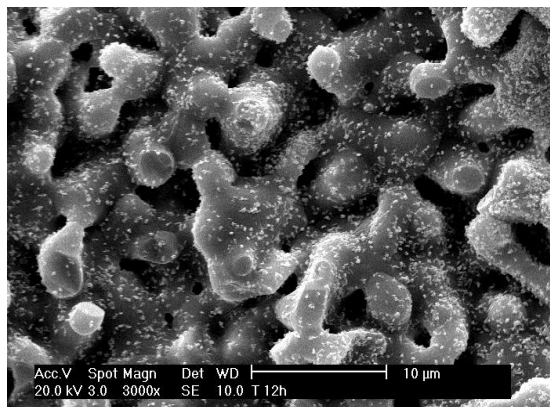


(c)

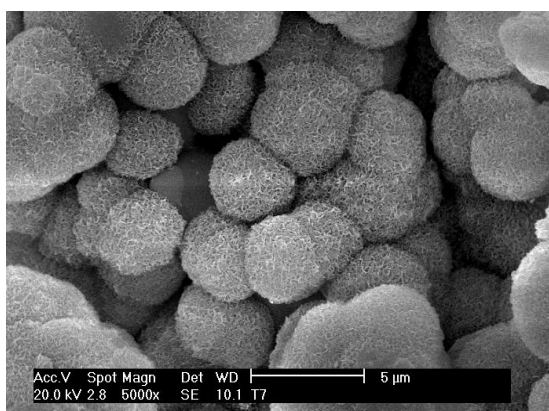


(g)





(d)



(h)



Figura 4 –Micrografias das cerâmicas após imersão em SBF; (a) HAp, (b) 7H, (c) 5H, (d) TCP; em período de 12 horas e, (e)HAp, (f)7H, (g)5H e (h)TCP, após 3 semanas.

Após 3 semanas todas as amostras apresentam formação de uma camada superficial de fosfato de cálcio. As cerâmicas que já apresentam precipitação em 12 horas, são as mesmas que apresentam ganho de massa (TCP, 5H e 6H), na Figura 1.

A cerâmica 5H apresenta comportamento semelhante a cerâmica reabsorvível, TCP, Figuras: 1, 2-(b) e 4. A maior solubilidade desta fase acelera a saturação da solução e conseqüente precipitação sobre a superfície. As composições bifásicas apresentam maior rugosidade que pode atuar como defeitos que servem como núcleos para dissolução <sup>(3,6)</sup>.

A fase depositada sobre as superfícies das cerâmicas, na formação in vitro, é inicialmente amorfa, podendo ser cristalizada sob a forma de HCA em tempos mais longos <sup>(6)</sup>. Os espectros de infravermelho, Figura 5, revelam uma camada de natureza amorfa e de pequena espessura, dificultando a obtenção dos espectros.

Este comportamento indica que a camada formada não apresenta uma microestrutura totalmente definida, sendo permeável aos transportes de massa e também não apresenta completa estabilidade, observada pelas oscilações de pH e massa, Figura 2. Estas características facilitam as transformações de fase, que são muito sensíveis a variações de pH, podendo mudar o aspecto morfológico da camada depositada, mesmo em condições de armazenamento da amostra, após término do ensaio.

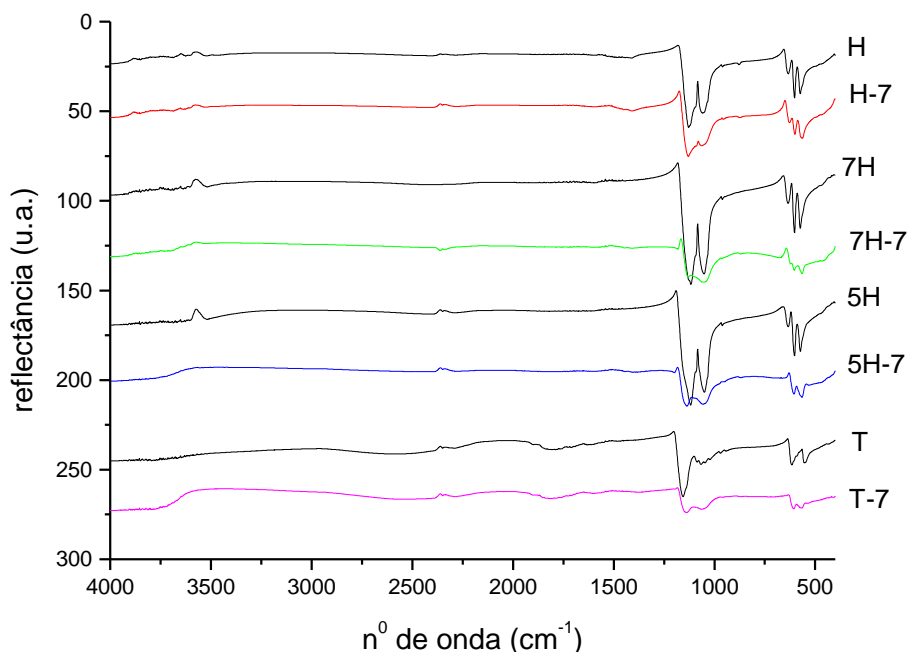


Figura 5 – Espectros de infravermelho das superfícies das cerâmicas, (H, 5H,7H e T) antes da imersão em SBF e (H-7, 5H-7, 7H-7 e T-7 ) após 3 semanas.

Pela morfologia da camada pode ser observado que os precipitados constituem uma camada com porosidade e microestrutura lamelar, permitindo, mesmo após 3 semanas de ensaio, a continuidade para os processos de dissolução/reprecipitação e cristalização. O precipitado amorfo formado em todas as amostras apresenta-se na forma de agregados planos, forma característica dos precipitados de fosfato octacálcico (OCP), que são caracterizados como precursores diretos da hidroxiapatita, nestas condições <sup>(7,8)</sup>.

Os espectros de infravermelho apresentam bandas de difícil distinção, com modos vibracionais ativos em mesma frequência, podendo ser identificados diferentes grupos funcionais em posições idênticas.

A estabilidade da fase TCP pode ter sido comprometida durante o ensaio devido a presença de modos vibracionais característicos da água nas amostras T-7. Alguns autores consideram que o TCP na presença de água ou de soluções aquosas é instável, podendo se converter em hidroxiapatita deficiente em cálcio <sup>(9)</sup>.

A presença de bandas características de grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  (670, 864 e  $1374 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{HPO}_4^{2-}$  (865, 957, 1069,  $1140 \text{ cm}^{-1}$ ), além das bandas características das fases de HAp e TCP, indicam que o mecanismo para formação da camada, segue o modelo



de dissolução incongruente ou não estequiométrico. Fases diferentes da composição inicial das cerâmicas, como: fosfato dicálcico - DCPD ou DCPA (566, 1053, 1137  $\text{cm}^{-1}$ ), fosfato octacálcico - OCP ( 1053, 1131, 1182, 1191  $\text{cm}^{-1}$ ) e apatitas deficientes em cálcio puderam ser identificadas neste período <sup>(3, 10,11)</sup>.

O tempo para formação da camada está associado à composição das amostras e textura das superfícies. Este período foi insuficiente para promover a cristalização total da camada depositada, dificultando a caracterização destas cerâmicas quanto ao comportamento bioativo.

Neste trabalho, uma série de transformações de fases está envolvida na formação da camada de apatita, o que está de acordo com a literatura, sendo as fases presentes, identificadas como precursoras da apatita biológica <sup>(10,11)</sup>.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

As técnicas utilizadas neste trabalho permitiram avaliar a reatividade no que diz respeito ao comportamento de dissolução/precipitação envolvidas na formação da camada de fosfato de cálcio, mas não quanto a bioatividade.

As cerâmicas estudadas apresentam reatividades diferentes na presença de SBF; as com maiores quantidades da fase TCP apresentam cinética de dissolução acelerada, devido a maior solubilidade desta fase, facilitando a precipitação, em períodos de até 12 horas em SBF.

O comportamento oscilante para valores de pH e massa num período de 21 dias corresponde à variações de estados de insaturação/supersaturação das soluções que são decorrentes de processos difusionais e superficiais envolvidos nos mecanismos de dissolução e precipitação.

O tempo para formação da camada depende da taxa de dissolução das cerâmicas, a qual está intimamente associada à composição e textura da superfície.

Durante o período adotado, a camada não é totalmente cristalina e sua microestrutura não está totalmente definida, já que os espectros de infravermelho revelam a formação de uma camada amorfa de apatita não estequiométrica, com presença de poucos grupos  $\text{CO}_3^{-2}$ , não sendo possível ainda caracterizar o comportamento bioativo das cerâmicas.



## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesp pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hench, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
2. T. Kokubo; H. Kushitami, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biom. Mater. Res.*v-24, 721-734, 1990.
3. Dorozhkin, S.V. A Review on the dissolution models of calcium apatites. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Material*. 45-61, 2002.
4. Greenspan, D.C.; Zhong, J.P.; La Torre, G.P. Effect of surface area to volume ratio on in vitro surface reactions os bioactive glass particulates, *Bioceramics*,V.7, edited by Ö. H. Andersson and Yli Urpo, Turku, Filand, jully, p.55-60, 1994.
5. Ribeiro, C.; Sepulveda, P.; Bressiani, J. C.; Bressiani, A. H. Processamento de cerâmicas bifásicas de fosfatos de cálcio. 46º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 26-29 de maio de 2002, São Paulo-SP. *Anais do 46º Congresso Brasileiro de Cerâmica*. p.842-853, 2002.
6. Li Yubao, C.P.A.T. Klein, Zhang Xingdong and K. de Groot. Formation of bone apatite-like layer on the surface of porous hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials* 10, v.15, 835-841, 1994.
7. Hankermeyer, C.R; Ohashi, L. K; Delaney, C. D; Ross, J; Constantz, R. B. Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid. *Biomaterials* 23, p. 743-750; 2002
8. L. Horvath et al. Effect of cationic surfactant on the transformation of octacalcium phosphate. *Journal of Crystal Growth* 219, p. 91-97; 2000.
9. Feng-Huei Lin, Chun-Jen Liao, Ko-Shao Chen, Jui-Sheng Sun, Chun-Pin Lin. Petal-like apatite formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water. *Biomaterials* 22, 2981-2992, 2001.
10. S. Koutsopoulos. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.62, 600-612, 2002.





11. R. Z. LEGEROS, Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monographs in Oral. v. 15 , 1991.

**IN VITRO EVALUATION OF THE REACTIVITY OF CALCIUM PHOSPHATE  
CERAMICS**

**ABSTRACT**

Biactive and reabsorbable ceramics have a number of applications in the orthopedy and odontology, such as simple bone substitutes and complex drugs delivery systems. Studies of *in vitro* reactivity with hydroxyapatite and tricalcium phosphate dissolution in simulated environment is of prime importance for preliminar evaluation. This can indicate the interaction with biological environment. In this work ceramics of differents reactivities were prepared using hydroxyapatite and tricalcium phosphate in differents proportions. The sintered samples were characterized by DRX and SEM. The dissolution kinetics and *in vitro* reactivity of ceramics were investigated using immersion in simulated body fluid (SBF) at 37°C for 3 weeks. The dissolution effect was monitored by pH variation of the solutions in contact with ceramics. The samples surfaces were analised by FTIR and SEM.

Key-words: bioactivity, dissolution, hydroxyapatite and tricalcium phosphate.