AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO BETA FOSFATO TRICÁLCICO (β-TCP) DOPADO COM ESTRÔNCIO (Sr^{2+}) VIA MÉTODO PECHINI

Farias, J.R. S.[1]; Feitosa, R. P.[1]; Sousa, E. I. S.[1]; Carvalho, G. K. G.[1]; Simões, V. N.[2]; Silva-Filho, E. C.[1]; Braga, A. N. S.[3*]

1 - Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Teresina-PI, Brasil.

2- Departamento de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé-PB, Brasil.

3- Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande-PB, Brasil

*Autor Correspondente: aluskasimoes@hotmail.com

RESUMO

A busca por materiais adequados para reparação de enxertos ósseos requer extensa pesquisa. O β-TCP é um biomaterial utilizado para essa finalidade. O desenvolvimento do β-TCP através de dopagens têm sido o foco de pesquisas, onde o Sr^{2+} usado como elemento dopante têm gerado resultados positivos. Diversas técnicas têm sido reportadas para a produção do β-TCP, onde destaca-se o método Pechini, que é um método de síntese que permite produzir pós nanométricos, com controle do tamanho de partícula e de morfologia. Neste sentido, este estudo teve como objetivo sintetizar β-TCP dopado com Sr^{2+}, pelo método Pechini. Foram realizadas as caracterizações por difração de raios X, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura, e ensaio de toxicidade. Os resultados mostraram que o método é eficiente na síntese do β-TCP, e que ocorreu a incorporação dos íons de Sr^{2+} na rede. A amostra possui uma morfologia em placas e não apresentou toxicidade.

Palavras-chave: *Síntese, Beta Fosfato Tricálcico, estrôncio, Toxicidade*

ABSTRACT

The search for suitable materials for bone graft repair requires extensive research. The β-TCP is a biomaterial used for this purpose. The development of β-TCP through doping elements has been the focus of research, where Sr^{2+} used as a doping element has shown positive results. Various techniques have been reported for the production of β-TCP, with the Pechini method standing out. This synthesis method allows the production of nanometric powders with controlled particle size and morphology. In this

study, the objective was to synthesize Sr^{2+} doped β-TCP by the Pechini method. Characterizations were performed by X-ray diffraction, thermogravimetric analysis, Scanning Electron Microscopy and toxicity. The results showed that the method is efficient in synthesizing β-TCP*, and the incorporation of Sr^{2+} ions network occurred. The sample has a plate shaped morphology revealed plate and the did not exhibit toxicity.*

Keywords: *Synthesis, Beta-Tricalcium Phosphate, Strontium, Toxicity*

INTRODUÇÃO

A busca por materiais e métodos inovadores a fim de restaurar fragmentos do corpo humano, exige uma maior demanda de pesquisas, uma vez que esses materiais devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutivos. Neste sentido, a ciência dos materiais, aliada às ciências biomédicas (medicina e biologia), tem contribuído para o desenvolvimento de biomateriais para reconstruir ou substituir tecidos danificados, onde tais materiais devem possuir propriedades mecânicas, bioquímicas e físicas específicas (1, 2). Uma importante classe dos biomateriais são as biocerâmicas, onde as compostas à base de fosfato de cálcio se sobressaem entre as demais, principalmente devido a sua semelhança química e cristalográfica com o osso humano (3, 6).

De formulação química $Ca_3(PO_4)_2$, o beta fosfato tricálcico (β-TCP), se destaca por conta de suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, bioatividade in vivo, biorreabsorbilidade e osteocondutividade, liberando íons de cálcio e fosfato promovendo a osteogênese. Além disso, pode ser parcialmente reabsorvido entre 6 a 15 semanas após ser implantado no organismo, possuindo melhor osteocondutividade e degradabilidade do que a hidroxiapatita (HAp), bem conhecida e amplamente utilizada em várias aplicações médicas (7, 8).

Quando um íon é incorporado à estrutura de uma biocerâmica como o β-TCP, uma nova categoria de material é criada, onde inúmeras propriedades únicas que superam as desvantagens do material primitivo favorecem seu uso em diferentes aplicações biológicas. Neste sentido, o processo de dopagem pode melhorar as propriedades de manuseio, desempenho angiogênico e osteogênico, atividade antimicrobiana, entre outras propriedades. Dentre os íons mais utilizados como dopantes na estrutura cristalina do β-TCP, o estrôncio (Sr^{2+}) desempenha um papel

importante na formação e remodelação óssea, onde é utilizado para o tratamento de osteoporose, acelerando o processo de osteogênese e de mineralização óssea (1, 9).

O método Pechini, também chamado de método dos precursores poliméricos, destaca-se uma vez que permite produzir amostras de alta qualidade devido ao alto potencial para obtenção de materiais a baixa temperatura de processamento, curto tempo de recozimento, alta pureza dos materiais produzidos e melhores propriedades. Além disso, é um método que facilita a mistura dos precursores a nível molecular, permitindo assim uma maior homogeneidade química e um maior controle estequiométrico. Todavia, são pouquíssimos os trabalhos presentes na literatura acerca da síntese do β-TCP pelo método Pechini, sendo relatado apenas em pesquisas que estudaram a síntese de outros fosfatos de cálcio e obteve-se o β-TCP como fase secundária (10, 11).

Neste sentido, este trabalho tem por objetivo a síntese de β-TCP nanométrico pelo método Pechini, com dopagem com íons de Sr^{2+}, no intuito de se obter o β-TCP com melhores propriedades visando aplicações biomédicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese do β-TCP foi realizada da seguinte maneira: 100 ml de água deionizada foi aquecida à uma faixa de temperatura de 70 °C, com agitação constante. O ácido cítrico (AC) foi então adicionado na solução, e em seguida, os precursores, nitrato de cálcio e fosfato de amônio. Após total dissolução, foi adicionado o nitrato de estrôncio, em uma proporção de 20% em massa. A relação de ácido cítrico/cátions metálicos usada foi de 3:1. Após total homogeneização da solução, o etileno glicol (EG) foi adicionado de acordo com a razão 60/40 de AC/EG. A temperatura foi, então, aumentada e mantida entre 100-120°C, para a realização das reações de poliesterificação e, consequente, formação do gel. Foi realizada uma pirólise no gel a 400 ºC/1h, com uma taxa de aquecimento de 10 ºC/min, para a eliminação de matéria orgânica. O material obtido foi desaglomerado e passado em peneira ABNT n°200 (0,074mm). Em seguida, o puff obtido da pirólise foi calcinado à 800 ºC durante 1 hora, com uma taxa de aquecimento de 10 ºC/min, com o intuito de obter a fase desejada. A amostra obtida foi nomeada de β-TCP 20%Sr.

A amostra sintetizada foi caracterizada por difração de raios X (DRX), para identificação das fases formadas, quantificação das fases, cristalinidade e tamanho de cristalito. O equipamento utilizado para essa análise foi o difratômetro de raios X

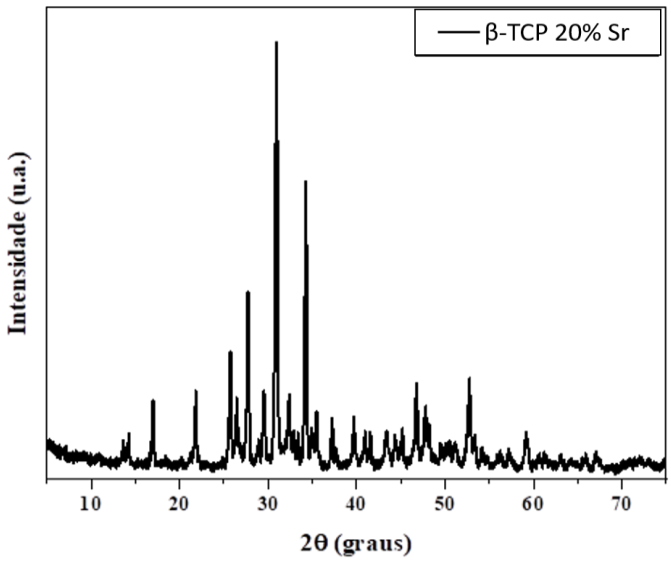
modelo XRD-6000 da Shimadzu com radiação kα do cobre e varredura de 20 a 60º. A quantificação das fases foi realizada por meio do programa HighScore Plus. O tamanho de cristalito foi calculado a partir da equação de Scherrer (12). A cristalinidade foi determinada a partir da razão entre a área integrada do pico referente à fase cristalina e a área referente à fração amorfa. A análise termogravimétrica (TG/DTG) foi realizada na amostra pirolisada em um analisador térmico, modelo TGA-51H Shimadzu e o DSC 60 Plus com taxa de aquecimento de 5°C/min, em atmosfera de nitrogênio, usando um cadinho de alumina e faixa de temperatura ambiente até a temperatura máxima de 1000ºC para avaliação das perdas de massa ocorridas durante o aquecimento do material. A morfologia das amostras foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio eletrônico de varredura FEI/Thermo Fisher, modelo Quanta FEG 250.

Para determinação da toxicidade das amostras, realizou-se o ensaio de toxicidade com *artêmias salinas* (A. salinas) de acordo com a metodologia proposta por Meyer *et al.* (12), com modificações. O método consiste em preparar água do mar artificial utilizando NaCl (15,153 g), MgCl (1,398 g), $MgSO_4$ (1,888 g), $CaCl_2$ (0,652 g), KCl (0,414 g), $NaHCO_3$ (0,116 g), dissolvidos em 1L de água destilada, de forma a mimetizar a constituição salina da água do mar. Em seguida, os ovos de *artêmia salina* foram colocados em pequena quantidade na solução preparada, na presença constante de luz e oxigênio por 48 horas. Após esse período de tempo, as larvas atingiram o estágio de metanáuplio do microcrustáceo, que é mais sensível ao tratamento. Após esse período, coletou-se 10 larvas de *artêmias salinas* para cada tubo de ensaio. Em seguida, foi preparado soluções mãe a partir de 10 mg de pó da amostra, a uma concentração de 10 mg/ml, obtendo-se diluições nas concentrações de 5, 1, 0,50 e 0,10 mg/ ml. Posteriormente, adicionou-se 0,5mL das amostras diluídas em tubos de ensaio e o volume dos tubos foi completado com solução salina até 5mL. O ensaio foi realizado em triplicata, onde o resultado foi obtido contando-se após 24 e 48h o número de metanáuplios do microcrustáceo mortos e vivos em cada tubo de ensaio, por meio de visualização macroscópica com lupa e análise estatística descritiva que foi feita com a contagem do número de sobreviventes calculando-se a porcentagem de mortos. Os microcrustáceos foram considerados mortos quando não exibiam nenhum movimento após 10 segundos de observação. Neste sentido, o material é considerado tóxico quando causa a mortalidade de 50% dos organismos expostos no período de 24 ou 48 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 ilustra o difratograma da amostra β-TCP 20%Sr, dopado com 20% de estrôncio e calcinada à 800 °C.

Figura 1: Difratograma de raios X da amostra β-TCP 20% Sr.



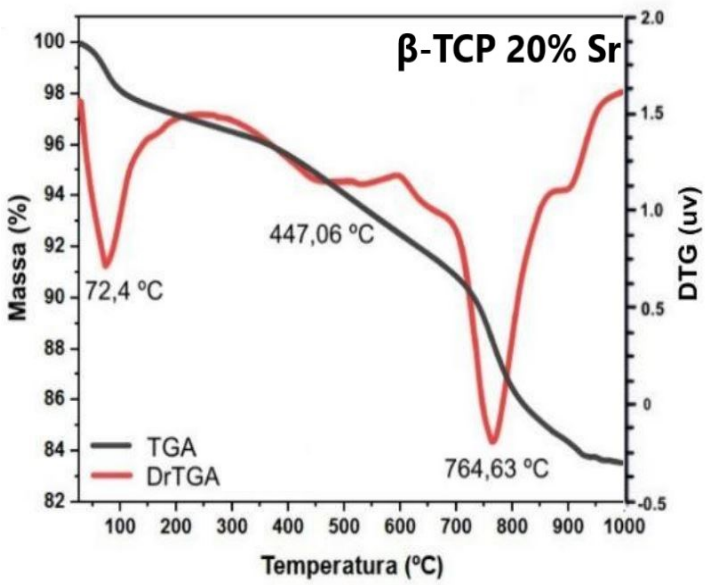
Observando o difratograma da Figura 1 é possível observar picos bem definidos da fase beta fosfato tricálcico, de acordo com a ficha JCPDS-96-151-7239. Não houve a formação de fases secundárias indesejadas de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HAp) ou fosfato de cálcio amorfo (ACP), o que comprova a eficácia do método Pechini.

Comparando o difratograma da Figura 1 com dados da literatura para o β-TCP puro (7, 14), percebe-se que nessa pesquisa ocorreu um pequeno deslocamento dos principais picos em direção a ângulos menores. Isso ocorreu devido a adição do estrôncio, uma vez que os íons Sr^{2+} (0,113 nm) possuem raio iônico maior quando comparados ao íons Ca^{2+} (0,099 nm) o que provoca distorções na rede cristalina (15 – 20). Assim, tal fato é um indicativo da incorporação bem sucedida de íons Sr^{2+} na estrutura cristalina do β-TCP.

Além disso, a amostra apresentou valor de tamanho de cristalito em nível nanométrico, igual à 36,45 nm e com um grau de cristalinidade de 58,74 %.

A Figura 2 ilustra as curvas de TG/DTG da amostra β-TCP 20%Sr que foi dopada com 20% de estrôncio e pirolisada na temperatura de 400 °C.

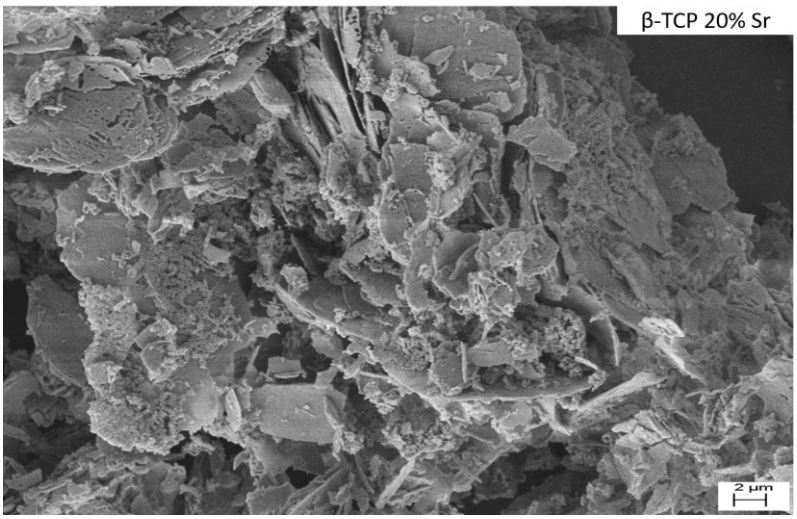
Figura 2: Curvas TG/DTG da amostra β-TCP 20%Sr pirolisada à 400 °C.



Observando as curvas TG/DTG da Figura 2, percebe-se que o processo de decomposição térmica apresentou três eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu a aproximadamente 72, 4 °C, relacionado com a saída de água adsorvida. O segundo evento ocorreu a aproximadamente 447 °C, relacionado com a combustão da matéria orgânica advinda do ácido cítrico, do etileno glicol e dos precursores metálicos. E o terceiro evento ocorreu a aproximadamente 764, 63 °C, relacionado com a formação da fase β-TCP inicial.

A Figura 3 exibe a morfologia obtida por microscopia eletrônica de varredura da amostra β-TCP 20%Sr, com ampliação de 2000 vezes.

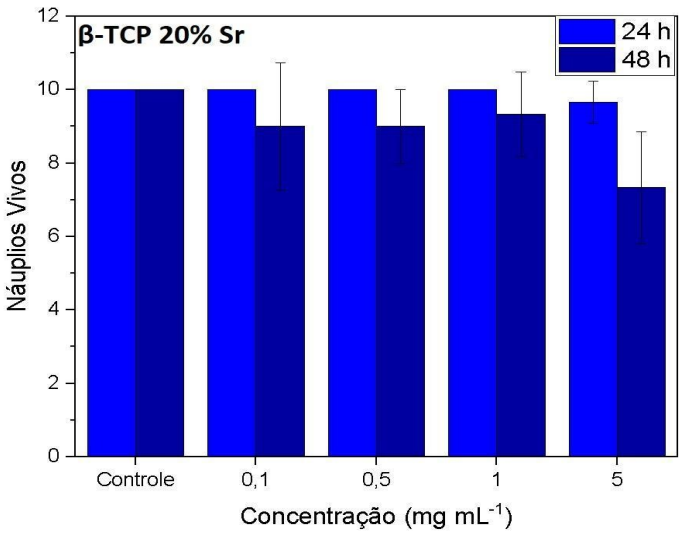
Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura da amostra β-TCP 20% Sr



Observando a microscopia observa-se que as características morfológicas do material obtido estão de acordo com as características relatadas na literatura, uma vez que o material é formado por aglomerados no formato de placas finas (21). Além disso, observou-se também a presença de certo grau de porosidade no material, que é bastante benéfico para aplicações biológicas (22).

A Figura 4 apresenta os resultados dos testes de toxicidade com a espécie Artemia salina relacionando a porcentagem de mortalidade com a concentração de microcrustáceos.

Fig. 4 - Índice de Mortalidade das Artêmias salinas da amostra β-TCP 20% Sr



Analisando a Figura 4 percebe-se que a amostra apresentou baixo índice de letalidade, onde a concentração de 5 mg/ ml após 48 horas apresentou o maior índice de letalidade, com 3 artêmias mortas, uma vez que apresenta maior quantidade de material e exposição à luz. Neste sentido, o teste realizado coincide com os relatos da literatura, comprovando que o material é de caráter não tóxico, podendo facilmente ser utilizado em sistemas biológicos interagindo com tecidos vivos (23).

CONCLUSÕES

O método Pechini foi eficiente na síntese de nanopartículas de β-TCP dopadas com íons Sr^{2+}. A partir dos resultados de DRX, percebeu-se que os íons de Sr^{2+} foram inseridos com sucesso na rede do β-TCP, apresentando um tamanho de cristalito em escala nanométrica. Na análise térmica foi visto que o processo de decomposição térmica ocorreu em três processos distintos, referentes a saída de água adsorvida,

combustão da matéria orgânica e formação da fase β-TCP. A análise microscópica revelou que a morfologia das partículas é no formato de placas, onde é possível observar também a presença de poros, contribuindo para aplicações em biomateriais. Além disso, o teste de toxicidade comprovou que a amostra não é tóxica, tornando-a segura para uso em aplicações biomédicas.

REFERÊNCIAS

1. SCHATKOSKI, V. M.; MONTANHEIRO, T. L. A.; MENEZES, B. R. C.; PEREIRA, R. M.; RODRIGUES, K. F.; RIBAS, R. G.; SILVA, D. M.; THIM, G. P. Current advances concerning the most cited metal ions doped bioceramics and silicate-based bioactive glasses for bone tissue engineering. CERAMICS INTERNATIONAL, v.47, p.2999-3012, 2021.
2. JODATI, H.; YILMAZ, B.; EVIS, Z. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. CERAMICS INTERNATIONAL, v. 46, n. 10, parte B, p. 15725-15739, 2020.
3. PUNJ, S.; SINGH, J.; SINGH, K. Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future prospectives. CERAMICS INTERNATIONAL, v.47, p.28059-28074, 2021.
4. DOROZHKIN, S. V. Calcium Orthophosphate ($CaPO_4$) Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY AND BIOMEDICAL SCIENCE, v. 1, n. 3, p. 25-93, 2018.
5. FARIAS, J. R. S.; CARVALHO, G. K. G.; BRAGA, A. N. S. Cerâmicas de fosfatos de cálcio bifásicas: uma revisão. REVISTA ELETRÔNICA DE MATERIAIS E PROCESSOS, v.15, n. 2, p. 54-70, 2020.
6. CANILLAS, M.; AZA, A. H.; RODRÍGUEZ, M. A. Calcium Phosphates in Biomedical Engineering. ENCYCLOPEDIA OF MATERIALS: TECHNICAL CERAMICS AND GLASSES, v. 3, p. 595-600, 2021.
7. CHAAIR, H.; LABJAR, H.; BRITEL, O. Synthesis of β-tricalcium phosphate. MORPHOLOGIE, v. 101, n. 334, p.120-124, 2017.
8. WU, Y.; ZHANG, S.; SUN, L.; LU, Y.; JIANG, Y.; XIAO, G. Strontium doping stimulates the phase composition and evolution of β-tricalcium phosphate prepared by wet chemical method. JOURNAL OF SOLID STATE CHEMISTRY, v.318, 2023.

9. ALMEIDA, C. M.; RIBEIRO, J. S.; MEEREIS, C. T. W.; OGLIARI, A. O.; NOREMBERG, B. S.; OGLIARI, F. A.; MICHELON, D.; LUND, R. G. β-TCP nanoparticles doped with antimicrobial agents as an orthodontic adhesive component. INTERNATIONAL JOURNAL OF ADHESION AND ADHESIVES, v. 110, p.102896, 2021.
10. OMORI, Y.; OKADA, M.; TAKEDA, S.; MATSUMOTO, N. Fabrication of dispersible calcium phosphate nanocrystals via a modified Pechini method under non-stoichiometric conditions. MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: C, v.42, p.562-568, 2014.
11. CARVALHO, G. K.; FARIAS, J. R. S.; LIMA, I. S.; NASCIMENTO, A. M.; NEVES, G. A.; MENEZES, R.; OSAJIMA, J. A.; BRAGA, A.; SILVA-FILHO, E. C. HAp/β-TCP Biphasic Ceramics Obtained by the Pechini Method: An Antibacterial Approach. MINERALS, v. 12, 2022.
12. SCHERRER, P. NACHRICHTEN VON DER GESELLSCHAFT DER WISSENSCHAFTEN ZU GOTTINGEN. Math.-Phys. Kl, v.2, p.98-100, 1918.
13. MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. PLANTA MEDICA, v. 45, n. 5, p. 31 -34, 1982.
14. BOHNER, M.; SANTONI, B. L. G.; DOBELIN, N. β-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. ACTA BIOMATERIALIA, v. 113, p. 23-41, 2020.
15. WANG, M.; GE, X.; CUI, Z.; WU, S.; ZHU, S.; LIANG, Y.; LI, Z.; LU, W. W. Influences of strontium on the phase composition and lattice structure of biphasic calcium phosphate. CERAMICS INTERNATIONAL, v. 47, p. 16248 - 16255, 2021.
16. HE, L.; DONG, G.; DENG, C. Effects of strontium substitution on the phase transformation and crystal structure of calcium phosphate derived by chemical precipitation. CERAMICS INTERNATIONAL, v. 42, n. 10, p. 11918 - 11923, 2016.
17. WU, Y.; ZHANG, S.; SUN, L.; LU, Y.; JIANG, Y.; XIAO, G. Strontium doping stimulates the phase composition and evolution of β-tricalcium phosphate prepared by wet chemical method. JOURNAL OF SOLID STATE CHEMISTRY, v.318, 2023.
18. KOC, S. G. Synthesis and characterization of strontium and chlorine co-doped tricalcium phosphate. MATERIALS LETTERS, v. 248, p. 69-72, 2019.

19. LIU, W. C.; HU, C. C.; TSENG, Y. Y.; SAKTHIVEL, R.; FAN, K. S.; WANG, A. N.; CHUNG, R. J. Study on strontium doped tricalcium silicate synthesized through sol-gel process. MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING: C, v. 108, 2020.
20. BOANINI, E.; GAZZANO, M.; RUBINI, K.; MAZZEO, P. P.; BIGI, A. Structural interplay between strontium and calcium in α-CaHPO4 and β-SrHPO4. CERAMICS INTERNATIONAL, v. 47, n. 17, p. 24412-24420, 2021.
21. BARBECK M, JUNG O, SMEETS R, KORŽINSKAS T, EDITORS. Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration [Internet]. INTECHOPEN; 2019.
22. PANDA, S.; BISWAS, C. K.; PAUL, S. A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering. CERAMICS INTERNATIONAL, v. 47, n. 20, p. 28122-28144, 2021.
23. KIM, E.; YOO, S.; HO, H. Y.; HAN, H. J.; BAEK, Y. W.; EOM, I. C.; KIM, H. M.; KIM, P.; CHOI, K. Aquatic Toxicity Assessment of Phosphate Compounds. ENVIRONMENTAL HEALTH AND TOXICOLOGY, v. 28, 2013.