

## **AValiação IN VIVO DO DESEMPENHO DE COMPÓSITOS DE ALUMINA/FOSFATO DE CÁLCIO (CaPs) COMO MATERIAL DE RECONSTRUÇÃO ÓSSEA**

<sup>1a</sup>M. L. G; <sup>1b</sup> P. M. A. G. Araújo; <sup>2a</sup>, E.M.J.A. P; <sup>3a</sup> R.H.G.A K;  
<sup>1c</sup>A.C.F.M. C.

**Resumo:** Este trabalho tem como objetivo avaliar *in vivo* o desempenho de compósitos de alumina/fosfato de cálcio (CaPs) como material de reconstrução óssea. Para tanto, foram preparados compósitos de  $Al_2O_3$ /CaPs usando percentual de 0, 10, 20 e 30 % em massa de CaPs em relação a massa total da  $Al_2O_3$ . Os compósitos foram caracterizados por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura com mapeamento. Após implantados em tíbias de coelho foram divididos ao acaso em dois grupos, cada qual com nove coelhos, segundo o período de eutanásia (30 dias após o procedimento cirúrgico). Após eutanásia realizou-se a avaliação radiológica e histológica das áreas enxertadas. Os resultados confirmam que os compósitos  $Al_2O_3$ /CaPs apresentaram fase majoritária da alumina e segunda fase pirofosfato de cálcio. O aumento da concentração de CaPs na alumina favoreceu a uma redução na densidade e aumento na porosidade, assim como, um aumento no tamanho de grão e heterogeneidade na microestrutura. Mediante as análise radiográficas das tíbias dos nove (9) coelhos observou-se escore com grau 3, ou seja, com radiopacidade semelhante a radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente. Foi evidenciado que as tíbias dos coelhos com o implante mostraram a presença de material exógeno (compósito), bem delimitado, com neoformação óssea e proliferação óssea em torno dos implantes. No local onde foi implantado o compósito, no tempo de sacrifício de 30 dias, não foi observado nenhum sinal de infecção, uma vez que não se observaram nenhum infiltrado celular, nem de rejeição ao implante, concluindo que o compósito estudado foi biocompatível.

**Palavras Chaves:** compósitos, alumina, fosfato de cálcio, crescimento celular, biocompatibilidade.

### **INTRODUÇÃO**

Na ciência de desenvolvimento de implantes e/ou preenchimentos ósseos, os fosfatos de cálcio (CaPs) possuem um perfil biológico altamente atrativo, pois apresentam composição química muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (íons fosfato e cálcio). Podem, então, participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica apresentando grande habilidade em formar ligações com o tecido hospedeiro sem, no entanto, apresentar toxicidade local ou sistêmica, resposta inflamatória ao implante e formação de um tecido fibroso envoltório <sup>(1)</sup>. Sendo assim, os CaPs,

conseguem fornecer, um grau de integridade estrutural ao implante a fim de mantê-lo no lugar e intacto até que o novo osso cresça. Além disso, estimulam o crescimento de um tecido ósseo e apresentam solubilidade controlável, de maneira que podem ser absorvidos pelo organismo permitindo que o novo osso substitua o implante <sup>(2)</sup>.

Dentre os materiais empregados para tais fins, a hidroxiapatita (HAp) apresenta características promissoras para várias aplicações biomédicas visto que, é uma das fases do fosfato de cálcio mais atrativa para aplicações biomédicas devido à sua excelente biocompatibilidade, bioatividade, não toxicidade, biodegradação lenta, boa estabilidade mecânica, grande capacidade de adsorção e biocompatibilidade (3; 4) área superficial e porosidade elevada (5) e principalmente por sua semelhança com o osso humano natural (6). Contudo, as propriedades mecânicas dos fosfatos de cálcio dependem do tamanho, forma, distribuição das partículas e da formação dos aglomerados, os quais influenciam o processo de densificação (sinterização do material com retração).

Desta forma, estudos que viabilizam a síntese de fosfatos de cálcio tem se tornado um grande atrativo para pesquisadores nas mais diversas áreas (como por exemplo, medicina, ciências dos materiais, químicos e engenheiros), visando obter estes materiais com características estruturais e morfológicas que aperfeiçoem as propriedades físico-químicas de modo a contribuir para o avanço tecnológico e científico nas mais diversas aplicações.

Por outro lado, pesquisas científicas também avançam no estudo e desenvolvimento de novos materiais que possam resultar em propriedades mais compatíveis para fabricação de produtos mais estáveis termicamente e quimicamente, com alta durabilidade, propriedades mecânicas, elétricas, magnéticas e ópticas mais pronunciadas, de forma a reduzir o descarte no meio ambiente e possibilite a melhoria da qualidade de vida. Associado, temos também a busca pelos novos materiais que possam substituir ou reparar parte do corpo humano (os biomateriais) e que tem ganhado um forte impulso na última década, visto que tem crescido a busca incansável do homem por padrões de vida superiores e pela longevidade, gerando cada vez mais a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas ou patogenia.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar in vivo o desempenho de compósitos de alumina/fosfato de cálcio (CaPs) como material de reconstrução óssea.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Alumina comercial: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> AKP – 53 Sumitomo Co. Japan, com 99,995% de pureza, tamanho de partícula de 0,2 µm e área superficial de 13,6 m<sup>2</sup>/g; Hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) P.A. fabricado pela VETEC; Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) P.A. fabricado pela VETEC; Água deionizada (H<sub>2</sub>O).

### **Obtenção do Fosfato de Cálcio (CaPs)**

O fosfato de cálcio (CaPs) foi sintetizado pelo método de precipitação (7,8) envolvendo uma reação ácido-base denominada neutralização entre as soluções de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] com concentração 1M, obedecendo a relação de fósforo/cálcio = 1,67. A solução de hidróxido de cálcio foi submetida à agitação constante em um misturador/aquecedor IKA®RH basic KT/C até atingir a temperatura de 80 °C. Em seguida a esta solução, adicionou-se gota a gota a solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> previamente preparada, agitando constantemente, até atingir viscosidade de uma pasta que propiciou um meio adequado para manter em suspensão as partículas do CaPs. Depois de atingida a consistência da viscosidade desejada, a solução permaneceu em estufa FANEM Modelo 315 a 110 °C por 24 horas.

### **Preparação dos Compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs**

Os compósitos de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs foram obtidos usando percentual de 0, 10, 20 e 30 % em massa de CaPs em relação a massa total da Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Os compósitos obtidos foram designados por AC, 10C, 20C, 30C

Para obtenção das formulações dos compósitos de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs utilizou-se o seguinte procedimento:

Em um becker de 100 mL foi colocado 60 mL de água deionizada e adicionado 30 g do pó da mistura de alumina e do CaPs, previamente pesados mantendo-se sob agitação constante durante 30 minutos em um agitador magnético modelo IKA®RH basic KT/C, a temperatura ambiente. A mistura resultante da

formulação de cada compósito foi levada à estufa FANEM Modelo 315 por 24 horas a uma temperatura de 60 °C. Após a secagem a mistura na forma de pó de  $Al_2O_3/CaPs$ , foram desaglomerados em almofariz ágata e passado em peneira ABNT N° 100 (150  $\mu m$ ) e, então reservadas para conformação dos compósitos. A mistura  $Al_2O_3/CaPs$  de cada formulação foram compactadas na forma de pastilha com 10,0 mm de diâmetro e espessura em torno de 5 mm em um molde de aço tratado termicamente por meio de prensagem uniaxial 75 MPa.

Após a prensagem uniaxial as amostras foram prensadas isostaticamente com pressão de 260 MPa em prensa isostática marca AIP modelo CP 360. Os compósitos foram então, sinterizados a 1350 °C/2h em um forno MAITEC, fabricação INTI, modelo FE1600. As condições de sinterização foram: taxa de aquecimento 2 °C/min até 400 °C/1h; taxa de aquecimento de 10 °C/min até 1350 °C/2h. A temperatura de 1350 °C/2h foi tomada como referência a temperatura de máxima densificação (taxa de retração linear máxima) obtida para a alumina comercial utilizada neste estudo (9).

As amostras e os compósitos foram caracterizados quanto à estrutura cristalina por difração de raios X. A partir dos dados de difração foi realizada a identificação das fases formadas, cálculo do tamanho de cristalito, e da cristalinidade. O equipamento utilizado foi LAB X Ray Diffractometer 6000 da Shimadzu, com radiação monocromática de cobre.

Os aspectos morfológicos das amostras e a microestrutura dos compósitos foram analisados por meio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV, marca Philips, modelo FEG-XL30), equipado com microanálise da Universidade de São Paulo (USP).

## **Procedimento In Vivo**

### **Animais**

A implantação in vivo foi realizada pela introdução dos compósitos  $Al_2O_3/CaPs$  com concentração de 10 % (10C) e 30 % (30C) do CaPs em cobaias do tipo coelho (*Oryctolagus Cuniculus*), da raça Nova Zelândia, sendo utilizados 18 coelhos hípidos, adultos, machos. A idade variou entre 7 e 9 meses (média 8,1 + 1,11 meses) e o peso entre 1.800 e 3.500 g, com média de

2,511 + 586 g). A desvermifugação foi realizada com ivermectina (0,5 mg/kg) por via subcutânea. A Figura 1 ilustra a localização e uma descrição detalhada do cronograma de onde foi implantado cada um dos compósitos estudados, respectivamente.

Os animais foram divididos ao acaso em dois grupos, cada qual com nove coelhos, segundo o período de eutanásia (30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico):

Grupo I – Recebeu os compósitos implantados (10C e 30C) e um orifício controle (padrão de referência) por 30 dias.

Grupo II – Recebeu os compósitos implantados (10C e 30C) e um orifício controle (padrão de referência) por 60 dias.



**Figura 1** - Localização da posição onde foram implantados os compósitos 10C, 30C e controle.

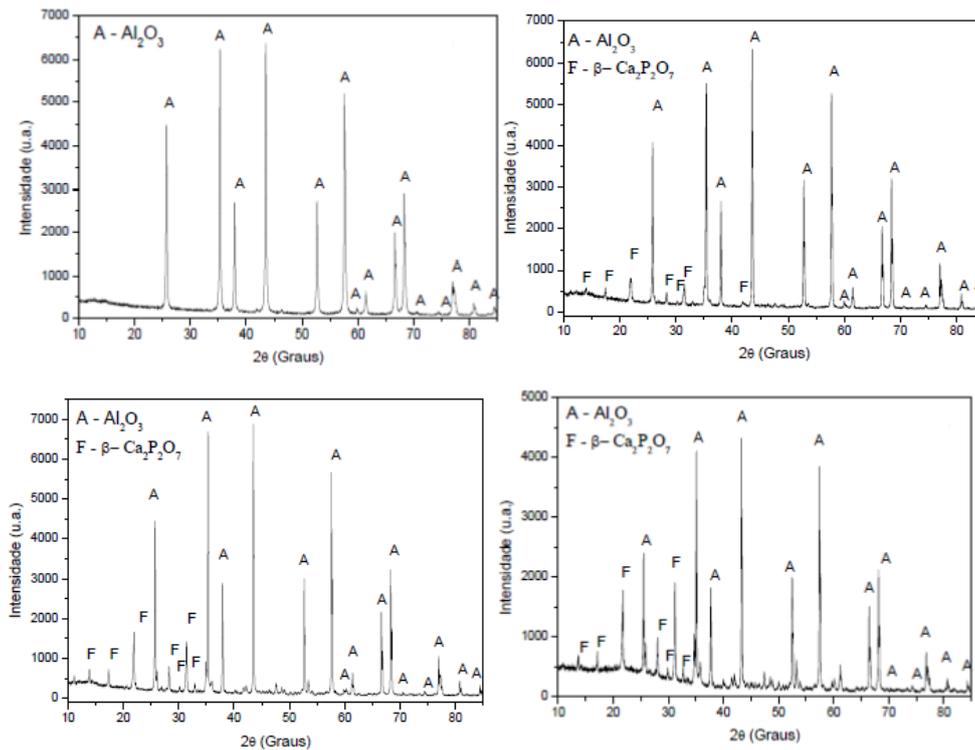
As radiografias foram realizadas na posição média lateral (ML) do membro operado, com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea em torno do implante. Foi utilizado o equipamento de raios X Chemetron Universal X Ray Easymatic Super 325 da Clínica Radiológica Dr. Saturnino Nóbrega de Campina Grande, com auxílio da Profa. Dra. Denise Nobrega Diniz, chefe do setor de radiologia. O aparelho para emissão de raios X perpendicularmente mantinha a distância foco filme padronizada de 30 cm.

Cada uma das 18 radiografias foi analisada separadamente e em conjunto com o seu referido grupo, onde foram avaliados a neoformação óssea, reabsorção óssea e fratura óssea em torno do implante.

A análise histológica foi realizada através de microscópio óptico de luz nas lentes com aumento de 10x e 40x NIKONECLIPSE E200 do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Pernambuco (FOP) da Universidade de Pernambuco (UPE). Utilizou-se um compósito de captura e análise de imagem por um conjunto de pixels –Image-Pro Plus®. A análise histológica foi realizada pelo Prof. Emanuel Sávio de Souza Andrade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 encontra-se ilustrados os difratogramas de raios X dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  sinterizados a  $1350^\circ\text{C}$ .



**Figura 2** - Difratogramas de raios X dos compósitos sinterizados a  $1350^\circ\text{C}$ : (a) AC, (b) 10C, (c) 20C e (d) 30C.

Observa-se na Figura 2a, a presença da fase cristalina romboédrica da  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  identificada pela ficha cristalográfica JCPDS 75 – 0783, sob a forma do mineral coríndon. Para as Figuras 2b a 2d, compósitos com adição do CaPs, observou-se a presença da fase  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e presença da fase  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  identificado de acordo com a ficha JCPDS 09 - 0346. Importante ressaltar que

o CaPs identificado pela fase  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> foi a fase majoritária indicando que a sinterização a 1350 °C, não alterou a estrutura do CaPs.

As Figuras 3 a 6 exibem as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície fraturada para a amostra de alumina (AC) e para os compósitos 5C, 10C, 15c, 20C e 30C, respectivamente, sinterizados a 1350 °C. Na Figura 3 observa-se uma microestrutura homogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,5 a 0,19  $\mu$ m e tamanho médio de 0,34  $\mu$ m. Pela Figura 3b, observa-se presença de poros de formato esférico intergranular.

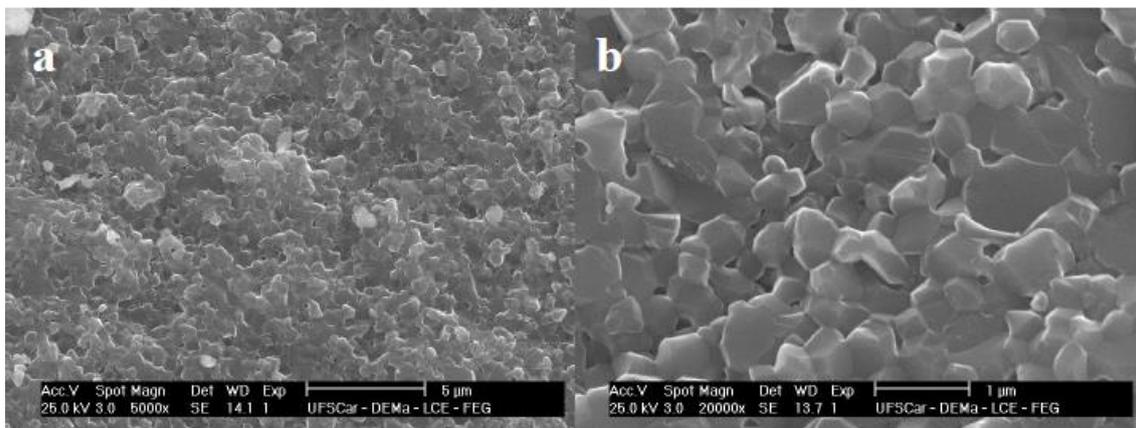


Figura 3 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da alumina AC; (a) escala 5  $\mu$ m e; (b) escala 1  $\mu$ m.

Na Figura 4a observa-se uma microestrutura heterogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,28 a 0,77  $\mu$ m e tamanho médio de 0,57  $\mu$ m. Na Figura 4b, observa-se ainda a presença de poros de formato esférico intergranular.

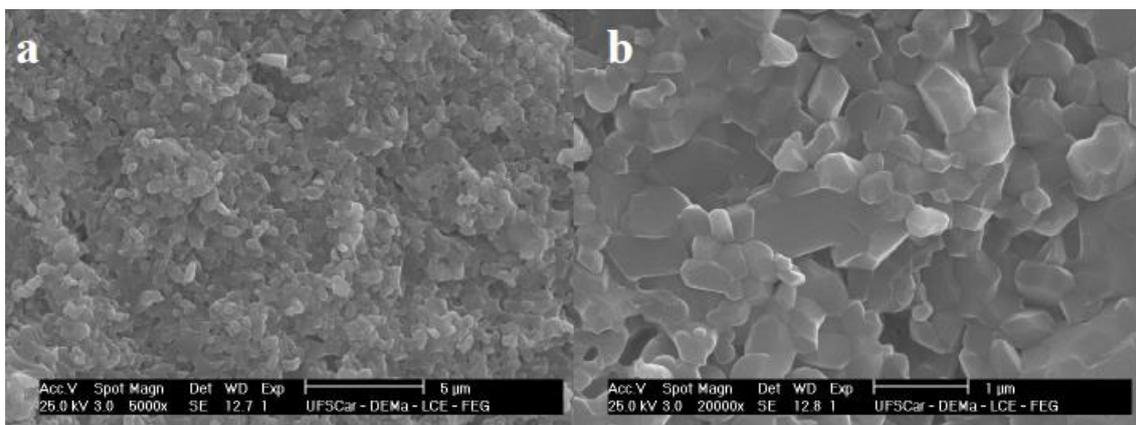


Figura 4 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 10C; (a) escala 5  $\mu$ m e; (b) escala 1  $\mu$ m.

Na Figura 5a, observa-se uma microestrutura heterogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de

0,23 a 1,04  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,73  $\mu\text{m}$  e presença de poros de formato esférico intergranular e presença de poros também intragranular. Observa-se ainda que, o aumento de CaPs na matriz  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , causou um aumento irregular no crescimento de grãos e poros.

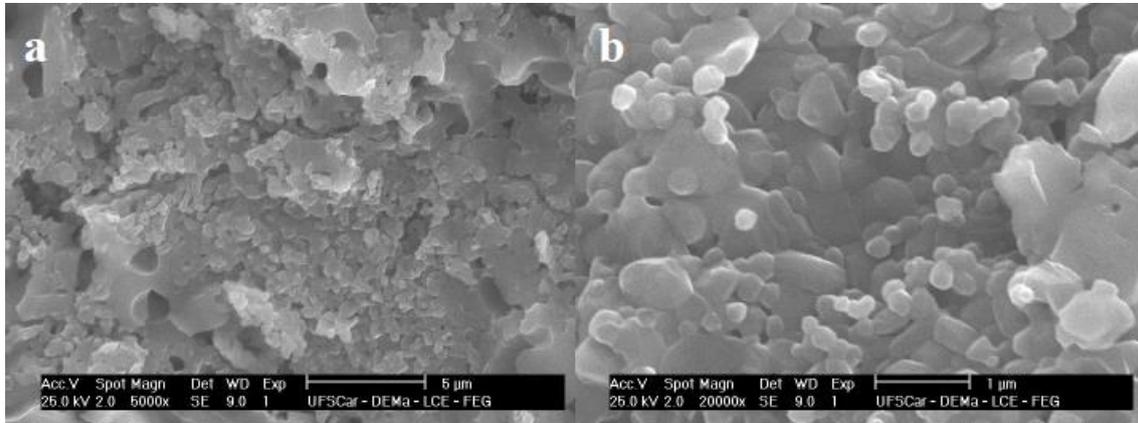


Figura 5 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 20C; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .

Na Figura 6a, observa-se uma microestrutura heterogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,41 a 1,43  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,85  $\mu\text{m}$  e presença de poros de formato esférico intergranular e intragranular. Observa-se ainda que, o aumento de CaPs na matriz  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , causou um aumento irregular no crescimento de grãos e poros.

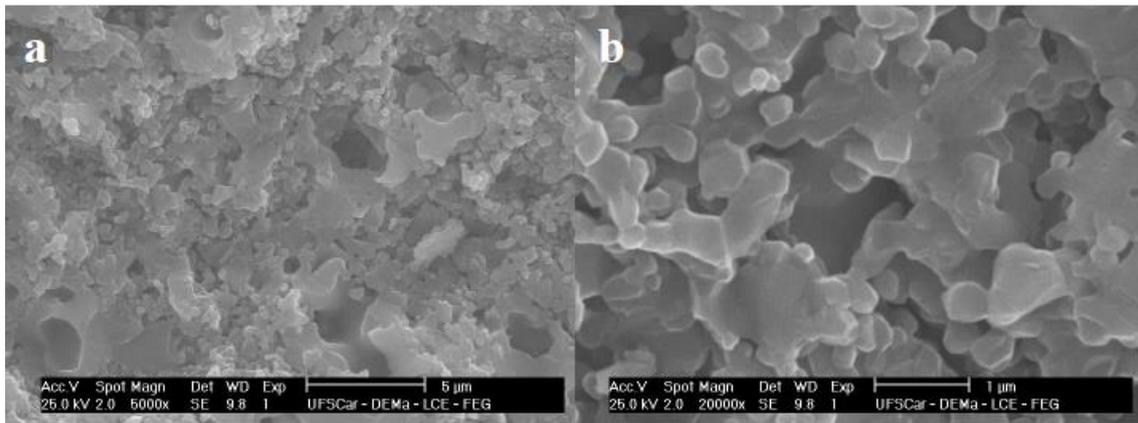


Figura 6 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 30C; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .

De modo geral, a introdução do fosfato de cálcio na alumina proporcionou um aumento no tamanho de grão e da porosidade, além de se observar um aumento na heterogeneidade da microestrutura. As formações dos poros são benéficas no aspecto de aplicações biotecnológicas, visto que

os poros permitem a circulação do fluido fisiológico quando é usado na superfície de um biomaterial.

A Figura 7 e 8 ilustram os aspectos radiográficos na metáfise proximal das tíbias de 9 coelhos para período de eutanásia 30 e 60 dias da realização do implante, respectivamente.

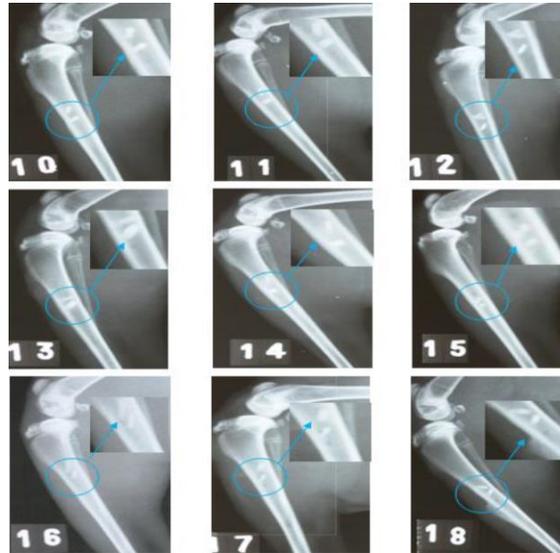


Figura 7 - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 60 dias da realização do implante

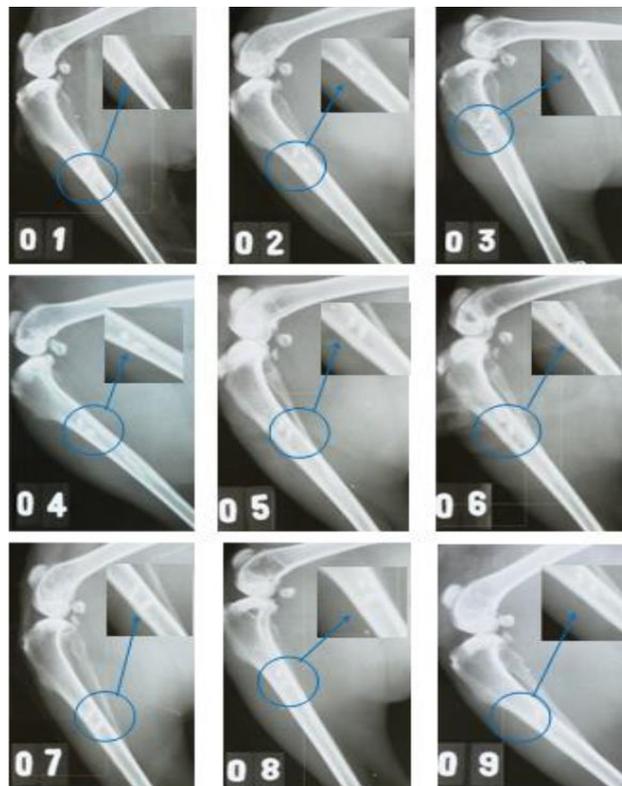
Mediante as radiografias da Figura 7, observa-se para os implantes 10C que todas as imagens radiográficas das tíbias dos nove (9) coelhos apresentaram escore com grau 3, ou seja, com radiopacidade semelhante a radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente. Para o implante 30C, observa-se escore com grau de radiopacidade 3 para todos os coelhos, exceto o coelho N<sup>o</sup> 17, que apresentou escore com grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea.

Para o orifício controle verifica-se que só ocorreu neoformação óssea total, escore de grau 3, apenas para os coelhos N<sup>o</sup> 12, 14, 16 e 18. Nos coelhos N<sup>o</sup> 10, 11, 13 e 17 foi observado escore de grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea. Apenas para o coelho N<sup>o</sup>15 foi observado para o orifício controle escore de grau 1 (radiopacidade discreta) indicando que houve uma discreta reação periosteal em torno do implante, sendo visualizado por uma região preta difusa.

Mediante as radiografias da Figura 8, observa-se para os implantes 10C que todas as imagens radiográficas das tíbias dos 9 coelhos

apresentaram escore com grau 3, ou seja, com radiopacidade semelhante a radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente. Para o implante 30C, observa-se escore com grau de radiopacidade 3 para todos os coelhos, exceto o coelho N° 17, que apresentou escore com grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea.

Para o orifício controle, verifica-se que só ocorreu neoformação óssea total, escore de grau 3, apenas para os coelhos N° 12, 14, 16 e 18. Nos coelhos N° 10, 11, 13 e 17 foi observado escore de grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea. Apenas para o coelho N°15 foi observado para o orifício controle escore de grau 1 (radiopacidade discreta) indicando que houve uma discreta reação periosteal em torno do implante, sendo visualizado por uma região preta difusa.



**Figura 8** - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 60 dias da realização do implante.

## CONCLUSÕES

Todos os compósitos  $Al_2O_3/CaPs$  apresentaram fase majoritária da alumina e segunda fase pirofosfato de cálcio. O aumento da concentração de CaPs nos na alumina favoreceu a uma redução na densidade e aumento na porosidade, assim como, um aumento no tamanho de grão e

heterogeneidade na microestrutura. O estudo *in vivo* indicou que o implante na concentração de 10 % de CaPs foi biocompatível.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências de fomento, CNPQ, CAPES/Rede Nanobiotec-Brasil; Inct-INAMI e JHs Biomateriais.

## REFERENCIAS

- [1] KAWACHI, E. Y., BERTRAN, C. A., REIS, R. R., ALVES, O. L., Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Química Nova, v. 23, n.4, p. 518-522, 2000.
- [2] VANDERSCHOOT, P. Treatment Options and Development of a Vertebral Replacement. Implant, Tese de Doutorado. Holanda: Universidade Católica de Leuven, 2002.
- [3] TAN, F.; NACIRI, M.; DOWLING, D.; AL –RUBEAI, MOHAME. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of CoBlast hydroxyapatite coating and the effect of impactation on its osteoconductivity. Biotechnology Advances, v. 30, p. 352–362, 2012.
- [4] NOELIA L.; D'ELÍA, A.; GRAVINA, N.; RUSO, J. M.; LAIUPPA, J. A. SANTILLÁN, G. E. MESSINA, P. V. Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v.1830, p. 5014-5026, 2013.
- [5] PON-ON, W.; CHAROENPHANDHU, N.; TANG, I-M.; JONGWATTANAPISAN, P.; KRISHNAMRA, N.; HOONSAWATF, R. Encapsulation of magnetic  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  in  $\text{SiO}_2$  nanocomposites using hydroxyapatite as templates: A drug delivery system. Materials Chemistry and Physics, v. 131, p. 485–494, 2011.
- [6] WIJESINGHE, W.P.S.L.; MANTILAKA, M.M.M.G.P.G.; PREMALAL, E.V.A.; HERATH, H.M.T.U.; MAHALINGAM, S.; EDIRISINGHE, M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; RAJAPAKSE, R.M.G. Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity. Materials Science and Engineering: C, v.42, p.83-90, 2014.
- [7] SAERI, M. R.; AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SORRELL, C. C. The wet precipitation process of hydroxyapatite. Materials Letters, 57, 4064–4069, 2003.

[8] BARROS, C. M. B.; OLIVEIRA, S. V.; MARQUES, J. B.; COSTA, A. C. F. M.; VIANA, K. M. S. Analysis of the hydroxyapatite incorporate MTA dental application. Materials Science Forum, v. 727-728, p. 1381-1386, 2012.

[9] CHINELATTO, A. S. A.; PALLONE, E. M. J. A.; TROMBINIC, V.; TOMASI, R. Influence of heating curve on the sintering of alumina subjected to high-energy milling. Ceramics International, v. 34, p. 2121–2127, 2008.

### Summary

*This study aims to evaluate the in vivo performance of composite aluminum/calcium phosphate (CAPs) as bone reconstruction material. To this end, mass CAPs relative to the total weight of  $Al_2O_3$  prepared  $Al_2O_3$ /CAPs using percentage of 0, 10, 20 and 30% composites. The composites characterized were by X-ray diffraction, scanning electron microscopy with scanning. After implanted in rabbit tibia randomly divided were into two groups, each with nine rabbits, according to the euthanasia period (30 days after surgery). After euthanasia was performed radiographic and histological evaluation of the grafted areas. The results confirm that the compounds  $Al_2O_3$ /CAPs presented major phase of alumina and the second phase calcium pyrophosphate. Increasing the concentration of CAPs on alumina promoted with a reduction in density and increase in porosity, as well as an increase in grain size and heterogeneity in the microstructure. Upon radiographic examination of the tibiae of the nine (9) rabbits score was observed with grade 3, or similar radiopacity presented by the remaining cortical bone. It shown was that the tibiae of rabbits with the implant showed the presence of foreign material (composite), well delimited with bone formation and bone proliferation around the implants. At the point where the composite in 30 days' time of sacrifice, there was no observable sign of infection was established, since there were observed no cellular infiltration, no rejection of the implant, concluding that the biocompatible composite was studied.*

**Key words:** composites, alumina, calcium phosphate, cell growth, biocompatibility.