Uso de hidroxiapatita nanométrica em enxertos na fíbula de ratos

Nanometric hydroxyapatite use in grafts of rats fibula

Marília A. Pereira[1]; Rafael S. Geonmonond[2]; Uyara S. Oliveira[3];
Tomaz H. Araújo[4]; Wagner C. Rossi[5]; Mirta Mir[6].

Resumo: A apatita é um mineral que pertence ao grupo dos fosfatos e que possui diversas aplicações na linha de desenvolvimento de novos materiais. Dentre as variantes de apatitas, encontramos as hidroxiapatitas (HAP), que constituem uma porção considerável do nosso tecido ósseo. Atualmente, em práticas de enxertia, são utilizados diferentes tipos de cerâmicas para que se possa regenerar um defeito ósseo. No entanto, a utilização da hidroxiapatita nanométrica em enxertos tem sido uma alternativa interessante e plenamente satisfatória, pois este material apresenta propriedades similares às do tecido ósseo. Desta forma, este trabalho tem como objetivo estudar como a composição e a cristalinidade da hidroxiapatita podem afetar o enxerto ósseo. Para isto foram estudados três tipos de amostras, HAP comercial cristalina, HAP nanométrica e HAP carbonatada nanométrica (HAC). As amostras foram testadas em enxertos ósseos utilizando ratos machos jovens. A análise microestrutural foi realizada utilizando a técnica de difração de raios X por pó e o refinamento foi feito pelo método de Le Bail.
Palavras-chave: Hidroxiapatita manométrica; Caracterização microestrutural; Enxertos ósseos.

Abstract: Apatite is a mineral belonging to the group of phosphates, which have various applications in the line of development of new materials. Among the variants of apatite, found the hydroxyapatites (HAP), which constitute a substantial portion of our bone. Actually different types of ceramics may be used to regenerate the bone defect on grafting practices. However, the use of nano-hydroxyapatite grafts has been a fully satisfactory and attractive alternative due this material has similar properties to human bone tissue. This work aims to study how the composition and crystallinity of hydroxyapatite may affect the graft bone. For this we studied three types of samples, commercial crystalline HAP, nano- HAP and nano-carbonated HAP (HAC). The samples were tested for bone grafts using young male rats. The microstructural analysis was performed using the technique of powder X-ray diffraction and refinement was done by the Le Bail method.
Keywords: Nano-hydroxyapatite; Microstructural characterization; Bone grafts.

INTRODUÇÃO

A apatita é um mineral que apresenta a fórmula geral $[A1_2][A2_3](BO_4)_3X$, formada por diversos tipos de átomos. Nos sítios A, B e X podemos incorporar diferentes íons, alterando as propriedades finais do composto (WHITE e ZHILI, 2003). Tais minerais são de extrema importância na linha de desenvolvimento de novos materiais. Nesse contexto, torna-se notável o aumento de atividades de pesquisa fundamental sobre tais materiais, assim como o uso de diversos métodos da caracterização de tais sistemas.

Dentre as diversas variantes de apatitas, encontramos as hidroxiapatitas (HAP), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, que possuem diversas aplicações na medicina pelo fato de sua composição se aproximar da composição óssea. Dentre as maiores contribuições biológicas desta variante está sua aplicação em enxertos ósseos e em implantes dentários.

O enxerto ósseo é basicamente um procedimento cirúrgico onde se acrescenta uma ou mais formas de estimulação a um determinado local do corpo humano onde haja a necessidade da presença óssea (BAPTISTA et al., 2003). Em pequenas articulações, às vezes é possível que se utilize o próprio osso, neste caso temos um auto-enxerto. Para reconstruções mais extensas, o material para enxerto é fornecido por um banco de tecido ósseo, osso bovino, utilizando materiais sintéticos como a hidroxiapatita cristalina, o fosfato tricálcico (PTC), ou ainda uma mistura destes (BAPTISTA et al., 2003; PELEGRINI e MACEDO, 2008; RESNICK e NIWAYAMA, 1998).

Para aumentar a biofixação dos implantes de titânio tem-se procurado aumentar as interações implante-tecido mediante a deposição de uma camada de material bioativo na superfície do implante. Esse preenchimento bioativo pode ser realizado a partir da hidroxiapatita (HAP), pois as células epiteliais da gengiva aderem com maior facilidade a este tipo de material comparadas ao titânio (KARSTEN, SOILEAU e MEFFERT, 1990).

No nosso caso específico, o estudo está sendo feito em uma hidroxiapatita de forma nanométrica. Isto se baseia no fato do osso humano apresentar esta estrutura,

[1]Licenciada em Física pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
[2]Licenciado em Química pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
[3]Licenciada em Química pela Universidade de Franca (UNIFRAN).
[4]Doutor, Docente da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). E-mail: tomaz.araujo@unifal-mg.edu.br
[5]Doutor, Docente da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). E-mail: wcrj@unifal-mg.edu.br
[6]Doutor, Docente da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). E-mail: mmir@unifal-mg.edu.br

pelo que se espera que o osso apresente maior afinidade por este material, acelerando o processo de crescimento ósseo. Até o momento, a maioria dos materiais sintéticos que existem no mercado para enxertos não são utilizados em tamanhos nanométricos, daí o nosso interesse nestas estruturas.

Neste trabalho foi feita uma análise de todo o processo que envolve desde a caracterização até a aplicação cirúrgica em ratos da hidroxiapatita estequiométrica (HAP) em forma cristalina (comercial) e nanométrica, e da hidroxiapatita carbonatada (HAC) nanométrica. Inicialmente foram realizadas as sínteses com o objetivo de se produzir uma quantidade de amostra suficiente para o enxerto. As amostras foram estudadas utilizando a técnica de difração de raio-X, para estimar a cristalinidade do material obtido. Foram realizados enxertos em ratos para comparar o crescimento ósseo om as amostras de HAP que existem no mercado.

O estudo proposto neste trabalho poderá oferecer informações relevantes para a utilização da hidroxiapatita nanométrica em enxertos ósseos e o entendimento de suas propriedades para aplicações na área da medicina.

METODOLOGIA

- **Síntese da hidroxiapatita estequiométrica (HAP)**

A HAP estequiométrica, $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, (razão molar Ca/P=1,67) foi produzida pela adição controlada de $(NH_4)_2HPO_4$, e NH_4OH sobre uma solução de $Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$ e o pH ajustado à temperatura ambiente. A solução obtida foi mantida em agitação constante e o pH controlado. Ao final do gotejamento a solução ficou em digestão por duas horas sob agitação constante. Após a mistura e a maturação dos reagentes o material precipitado obtido, foi separado por filtração, lavado repetidamente com água deionizada e seco por 24 horas (MAVROPOULOS et al., 2013).

- **Síntese da hidroxiapatita carbonatada (HAC)**

A HAC $[Ca_{10-x/2}[(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x][(OH)_{2-2y}(CO_3)_y]$ para x= 0,44 foi obtida pelo método de solução aquosa por precipitação de $Ca(NO_3)_2$. 4 H_2O, $(NH_4)2HPO_4$ e $(NH_4)2CO_3$. A solução fosfato/carbonato foi adicionada sob fluxo lento à solução de cálcio. A temperatura e o pH foram rigorosamente controlados. Após a adição, a suspensão ficou em agitação por 2 horas. O precipitado foi lavado, filtrado e lavado repetidamente com água deionizada pelo método Milli-Q. As HAC foram precipitadas a baixa temperatura para obter amostras com baixa cristalinidade (WANG et al., 2010). A secagem foi realizada em estufa por 24h em temperatura de 70°C.

- **Caracterização por difração de raio-X**

Os dados de DRX das amostras de hidroxiapatitas foram obtidos de um difratômetro da marca RIGAKU, modelo Ultima IV, usando a radiação CuKα (λ=1,5418Å). A varredura angular 2Θ compreendeu o intervalo angular de 10.00° a 90.00°, com passo de 0.02° e tempo de 2 s/passo. O material padrão usado para obter a resolução instrumental foi o hexaborato de lantânio (LaB_6) medido nas mesmas condições das hidroxiapatitas.

As amostras de HAP (hidroxiapatita estequiométrica), HAC (hidroxiapatita carbonatada) e HAP+PTC (hidroxiapatita comercial) foram analisadas em forma de pó. Já as amostras da fíbula humana e da fíbula do rato estavam na forma do "próprio osso".

Para o refinamento, foi utilizado como modelo inicial o arquivo CIF número 26205 reportado por Sudarsanan e Young e disponíveis na base de dados, no Portal da CAPES "Inorganic Crystal Structure Database" (BELSKY et al., 2002). O grupo espacial P63/m, foi o grupo que mais justificou a estrutura das HAs. Para o refinamento utilizou-se o método de Le Bail implementado no programa Fullprof (RODRÍGUEZ-CARVAJAL, 2012). Foi utilizada a função Thompson-Cox-Hastings (TCHZ) junto ao método dos harmônicos esféricos com objetivo de estudar o tamanho dos cristais de forma anisotrópica (WHITE e ZHILI, 2003).

- **Aplicação cirúrgica**

Para o enxerto ósseo foi realizada uma pequena cavidade cirúrgica na fíbula do rato. Para a reconstituição do osso, foram utilizadas a HAP, HAC e HAP+PTC (comercial) para se acrescentar uma estimulação no local onde houve a necessidade da presença óssea.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com animais de laboratório e o trabalho foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (CEPE-UNIFAL-MG).

RESULTADOS

Na tabela 1 aparecem resumidos os resultados do refinamento como tamanho médio do cristalito, grupo espacial e fatores de concordância para os refinamentos de cada amostra. Os fatores de concordância mostrados na tabela, tais como χ^2, Rp e Rwp, indicam a qualidade do refinamento para cada amostra. Nas figuras 1, 2 e 3 aparecem os refinamentos obtidos para cada amostra. Como podemos ver, as amostras HAP e HAC, apresentaram tamanhos de cristal de ordem nanométrica com picos largos, diferentemente da comercial.

Os testes realizados em ratos mostraram que todas as amostras apresentaram uma boa regeneração óssea. Em todos os casos, as amostras nanométricas apresentaram uma regeneração óssea mais rápida que a amostra comercial cristalina.

Tabela 1: Tamanho médio do cristalito (T.C.), grupo espacial (G.E.), e fatores de concordância (Rp, Rwp e χ^2).

Amostra	G.E.	T.C. (Å)	χ^2	R_p (%)	R_{wp} (%)
HAP	P 6_3/m	57.90	1.42	11.2	13.0
HAC	P 6_3/m	40.60	1.82	4.43	2.81
(HAP+PTC)*	P 6_3/m	4931.50	0.949	17.1	19.0

*Comercial (HAP+PTC)

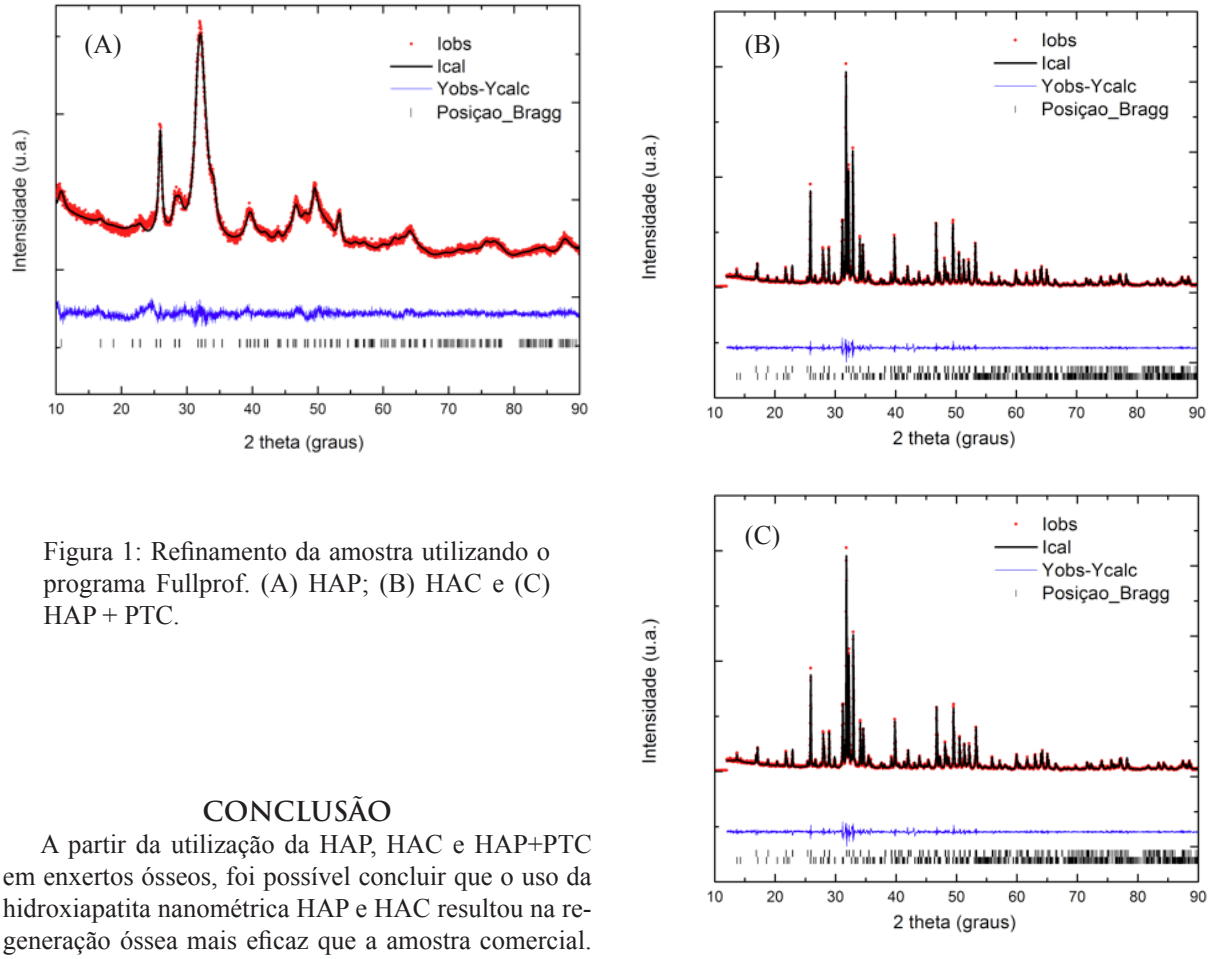

Figura 1: Refinamento da amostra utilizando o programa Fullprof. (A) HAP; (B) HAC e (C) HAP + PTC.

CONCLUSÃO

A partir da utilização da HAP, HAC e HAP+PTC em enxertos ósseos, foi possível concluir que o uso da hidroxiapatita nanométrica HAP e HAC resultou na regeneração óssea mais eficaz que a amostra comercial. Em todos os casos as regenerações ósseas foram mais rápidas nos ratos enxertados com HAC nanométrica.

REFERÊNCIAS

BAPTISTA, A. D.; SORRILHA, A.; MEDEIROS, T. T. et al., **"Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos".** Acta Orthop. Bras., v. 11, n. 4, p. 220-224, 2003.

BELSKY, A.; HELLENBRANDT, M.; KAREN, V. L.; LUKSCH, P. **"New developments in the inorganic crystal structure database (ICSD): accessibility in support of materials research and design".** Acta Crystallogr., Sect B: Struct. Sci., v. 58, p. 364-369, 2002.

KARSTEN, F. M.; SOILEAU, K,; MEFFERT, R. M., **"Quantitative evaluation of human gingival epithelial cell attachment to implant surfaces in vitro".** Int. J. Periodont. Rest., v. 10, n. 1, p. 69-79, 1990.

MAVROPOULOS, E.; HAUSEN, M.; COSTA, A. M.; ALVES, G.; MELLO, A.; OSPINA, C. A.; MIR, M.; GRANJEIRO, J. M.; ROSSI, A. M. **"The impact of the RGD peptide on osteoblast adhesion and spreading on zinc-substituted hydroxyapatite surface".** J. Mater. Sci. – Mater. Med., v. 24, n. 5, p. 1271-1283, 2013.

PELEGRINI, A. A.; MACEDO, L. G. **"Transplantes Ósseos na Odontologia – Aplicabilidade clínica e evidências científicas sobre o uso de tecidos provenientes de Banco de Ossos".** Editora Cosmo, ed. 1, 2008.

RESNICK, D.; NIWAYAMA, G. **"Tumor: diagnosis of bone and joint disorders".** ed. 1, W. B. Saunders Co., 1988.

RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. **"Guide to Program FULPROF for Rietveld Analysis of X-Ray and Neutron Powder Diffraction Patterns with a 'PC' and various other computers.** Laboratoire Leon Brillouin (CEA-CNRS). Version, may 2012.

SUDARSANAN, K.; YOUNG, R. A. **"Significant precision in crystal structural details: holly springs hydroxyapatite".** Acta Crystallogr., Sect B: Struct. Sci., v. 25, p. 1534-1543, 1969.

THOMPSON, P.; COX, D. E.; HASTINGS, J. M. "**Rietveld Refinement of Debye-Scherrer Synchrotron X-ray Data from Al_2O_3**". J. Appl. Crystallogr., v. 20, p. 79-83, 1987.

WANG, P.; LI, C.; GONG, H.; JIANG, X.; WANG, H.; LI, K. **"Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process".** Pow. Tech., v. 203, p. 315-321, 2010.

WHITE, T. J.; ZHILI, D., **"Structural derivation and crystal chemistry of apatite".** Acta Crystallogr. Sect B: Struct. Sci., v. 59, p. 1-16, 2003.