

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO DE CERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO EM MEIO DE CULTURA CELULAR

C. Ribeiro\*, J. Marchi \*\* e A. H. A. Bressiani\*\*\*

\*Universidade Federal do ABC, Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Santo André, SP, Brasil.

\*\*Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Santo André, SP, Brasil.

\*\*\* Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais, São Paulo, SP, Brasil.

e-mail: christiane.ribeiro@ufabc.edu.br

**Resumo:** Neste trabalho é analisado o comportamento de dissolução *in vitro* de cerâmicas de fosfato de cálcio de diferentes composições, tais como hidroxiapatita (HAp) e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Para tal finalidade, pós comerciais de  $\beta$ -TCP puro e a composição  $\beta$ -TCP/HAp foram processados para se obter amostras densas e porosas. Os experimentos de dissolução foram realizados utilizando-se DMEM, um meio utilizado em culturas celulares. Após os experimentos de dissolução, as soluções sobrenadantes foram analisadas para determinar as concentrações de cálcio e fósforo, bem como o valor de pH. As amostras de fosfatos de cálcio foram caracterizadas em relação a alterações de massa e morfologia por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados revelaram nucleação de fosfato de cálcio na superfície das cerâmicas mesmo com tempos pequenos de exposição ao DMEM. Este comportamento foi mais rápido para as amostras porosas. O comportamento de dissolução mostrou-se dependente tanto da morfologia quanto da composição das cerâmicas de fosfato de cálcio.

**Palavras-chave:** cerâmicas de fosfato de cálcio, aplicações biomédicas, experimentos *in vitro*, meio de cultura celular DMEM.

**Abstract:** This paper describes the dissolution behavior of calcium phosphate based ceramics such as hydroxyapatite (HAp) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) with a complementary approach to conventional *in vitro* tests. TCP and biphasic  $\beta$ -TCP/HAp powders were processed to obtain dense as well as porous samples. Dissolution experiments were carried out by exposing calcium phosphate ceramics to the same culture medium used in cell culture experiments (DMEM). After the dissolution experiments, the soaking solutions were analyzed to determine the calcium and phosphorous contents and the pH of the solution was also measured. The calcium phosphate samples were characterized using weight change measurements and scanning electron microscopy. The results revealed nucleation of calcium phosphate on the surface of the ceramics after even short exposures, and this was faster on porous samples. Overall, the dissolution behavior depended on morphology and composition of the

*calcium phosphate ceramics.*

**Keywords:** *calcium phosphate ceramics, biomedical applications, in vitro experiments, DMEM culture medium.*

### Introdução

Os derivados inorgânicos à base de fosfatos de cálcio sintéticos, como hidroxiapatita (HAp) e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) representam uma categoria de materiais cerâmicos que se destaca na área médica e recentemente na engenharia de tecidos. Esta preferência está relacionada às suas propriedades como: osteocondução, biocompatibilidade, bioatividade (HAp), reabsortividade ( $\beta$ -TCP). As cerâmicas bioativas e reabsorvíveis se destacam frente às demais pela habilidade de estabelecer ligações interfaciais com os tecidos adjacentes. As cerâmicas bioativas, como é o caso da HAp tem a característica de desenvolver uma ligação puramente química com o tecido ósseo e se mantém estável, mesmo depois de um período prolongado de implantação. As cerâmicas reabsorvíveis, como o  $\beta$ -TCP, não permanecem no organismo por muito tempo, devido à capacidade de dissolução ou degradação *in vivo*. O material dissolvido, normalmente participa como matéria-prima para o desenvolvimento do novo tecido ósseo ou manutenção do tecido maduro [1].

A superfície do biomaterial quando atua como implante fica condicionada a componentes do fluido onde está alojado e pode ser encoberta por uma série de biomoléculas, íons e proteínas específicas de acordo com a composição química, topografia e a densidade de carga do substrato. As características da superfície determinam quais moléculas irão adsorver, definindo o tipo de interface formada [2-3]. O efeito da dissolução de cerâmicas que apresentam propriedade de degradação pode comprometer aspectos de ancoragem celular e alterações morfológicas em ensaios *in vitro*, quando se desconhece totalmente sua cinética de dissolução ou quando este processo ocorre de maneira descontrolada [3].

Na maioria dos estudos, utilizando cultura de células as consequências da dissolução não costumam ser analisadas, mas é conveniente fazer também a análise da

interação do material com o meio e, não exclusivamente uma avaliação da resposta celular em função do material. Muitos ensaios desta natureza são interpretados, exclusivamente em função do fenótipo celular e tipo de material, podendo sugerir um comportamento que não reproduz toda a fenomenologia envolvida, podendo resultar, em casos extremos, na condenação do material estudado. A nucleação de uma fase fosfática sobre a superfície de cerâmicas de natureza reabsorvível e/ou bioativa não pode ser desprezada em discussões que envolvam adesão celular. Variáveis como temperatura, pH e a presença de espécies afins no meio interferem não só no comportamento celular, mas também na resposta destas cerâmicas [1-4].

Neste trabalho foi realizada uma investigação sobre o comportamento de dissolução de diferentes cerâmicas de fosfatos de cálcio ( $\beta$ -TCP e a mistura HAp: $\beta$ -TCP), comparando o efeito da composição e microestrutura, em condições normalmente adotadas em estudos *in vitro*. Caracterizações desta natureza permitem uma avaliação mais criteriosa quanto aos efeitos da dissolução, na previsão da interação celular, como os mecanismos envolvidos durante a adesão e proliferação celular na interface das biocerâmicas.

## Materiais e métodos

Cerâmicas de fosfatos de cálcio densas e porosas foram obtidas a partir dos pós comerciais de  $\beta$ - fosfato tricálcico,  $\beta$ -TCP (Fluka) e hidroxiapatita - HAp (Strem Chemicals). Foram selecionadas duas composições distintas: o  $\beta$ -TCP, (T), e a composição bifásica  $\beta$ -TCP/HAp, (HT) na proporção 1:1, em massa. Esta composição foi obtida pela mistura dos pós em equipamento Turbula (T2C system Shatz Willy Maschine), por 2 horas em meio aquoso, usando esferas de alumina (~ 2 mm diâmetro) para melhor homogeneização dos pós.

As cerâmicas densas foram processadas por prensagem uniaxial, nas dimensões de 6,5 mm (diâmetro) e aproximadamente 5 mm (altura), seguida de prensagem isostática (200MPa). As amostras processadas foram sinterizadas a temperatura de 1250°C/30 min, adotando taxas de 5°C/min (aquecimento) e 10°C/min (resfriamento). As amostras T e HT apresentaram densidades de 89% dt e 92% dt, respectivamente, com relação às

com relação às densidades teóricas.

As amostras porosas foram obtidas a partir da dispersão das composições selecionadas, obtendo suspensões aquosas estáveis, usando o dispersante, Dispex A40 (poliacrilato de amônio-BASF), conforme estudos prévios [5]. A porosidade foi obtida pela ação espumante da ovalbumina (6%, em massa) associada ao tensoativo Genaminox KC180 (óxido dimetil alquil amina, Clariant), conforme reportado na literatura [5]. A consolidação da estrutura ocorre em função da gelificação da ovalbumina, que retém a forma da espuma. Esta etapa foi realizada em estufa bacteriológica (Q316M, Quimis) a 60°C, seguida de tratamento térmico a 600°C/2h, usando taxa de aquecimento de 3°C/min, e posterior sinterização nas mesmas condições das amostras densas. Os corpos de prova porosos foram dimensionados em 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura e apresentaram porosidades de 68% (T) e 69% (HT).

As superfícies das amostras foram analisadas antes e depois do processo de dissolução em meio de cultura (DMEM), por microscopia eletrônica de varredura (Philips, XL 30). Para o ensaio de dissolução adotou-se uma razão área/volume de 0,1 cm<sup>-1</sup>, considerando a área geométrica das amostras e tendo o meio DMEM como solução. Neste estudo as amostras foram mantidas em incubadora - Shaker (TE-420, Tecnal) a 40 rpm e temperatura de 36,5°C, por 3 e 10 dias. Durante o ensaio foram monitorados pH e perda/ganho de massa das amostras.

As soluções DMEM foram analisadas quanto à concentração de íons cálcio e fósforo antes (controle) e depois do contato com as cerâmicas, nos diferentes períodos, por espectrofotometria de emissão com fonte de plasma induzido-ICP-OES (M120 Spectro). Foram realizadas medidas em triplicatas, sendo considerado um grupo de 5 amostras para cada composição cerâmica.

## Resultados

Na Tabela 1 estão apresentadas as concentrações de Ca e P determinadas pela técnica de ICP-OES. Os dados representam a média e o desvio-padrão para as diferentes amostras em meio DMEM após 3 e 10 dias.

Observa-se após período de 3 dias, uma diminuição mais significativa para os dois elementos analisados das

Tabela 1: Concentrações de Ca e P após 3 e 10 dias de dissolução na solução DMEM para diferentes amostras e para solução controle (na ausência das amostras).

Solução das amostras: composição-microestrutura	Ca ( $\mu$ g/mL) 3 dias	Ca ( $\mu$ g/mL) 10 dias	P ( $\mu$ g/mL) 3 dias	P ( $\mu$ g/mL) 10 dias
controle	80,5 $\pm$ 0,8	81,9 $\pm$ 0,3	40,9 $\pm$ 0,2	40,0 $\pm$ 0,1
HT-porosa	49,1 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	23,9 $\pm$ 0,1	13,8 $\pm$ 0,4
HT-densa	75,6 $\pm$ 0,7	72,7 $\pm$ 0,6	40,1 $\pm$ 0,1	40,1 $\pm$ 0,4
T-porosa	60,5 $\pm$ 0,3	46,4 $\pm$ 0,3	30,2 $\pm$ 0,2	24,3 $\pm$ 0,1
T-densa	73,6 $\pm$ 0,1	64,2 $\pm$ 0,8	38,0 $\pm$ 0,1	34,7 $\pm$ 0,3

soluções que continham as amostras porosas comparadas às densas de mesma composição. Entre as diferentes composições de mesma microestrutura, nota-se que após este período, a composição bifásica porosa

apresentou menor concentração de Ca e P nas soluções que a composição de  $\beta$ -TCP de mesma microestrutura. Entre as amostras densas observa-se que a composição

bifásica apresentou um comportamento de dissolução mais expressivo que para composição de  $\beta$ -TCP, comportamento diferente com relação às amostras de mesma composição, porém de microestrutura porosa.

Após período de 10 dias de dissolução a mesma tendência foi observada para as amostras em função das microestruturas e composições analisadas. As amostras densas apresentaram uma concentração mais alta destes elementos em solução e para as composições bifásicas este comportamento foi mais evidente. Para as amostras

porosas um comportamento inverso foi observado, indicando que para esta microestrutura a tendência de nucleação foi maior para as amostras de composição bifásica, ou seja, a habilidade de precipitação justifica a menor concentração de íons em solução.

Na Tabela 2 estão apresentadas a variação de massa para as amostras de diferentes composições e microestruturas na presença da solução DMEM, e a variação de pH, em períodos distintos.

A temperatura foi mantida estável a  $36,5^{\circ}\text{C}(\pm 0,5^{\circ}\text{C})$ ,

Tabela 2: Variação de massa e pH das diferentes amostras após período de 3 e 10 dias em solução DMEM.

Amostra: composição-microestrutura	ganho de massa (%) 3 dias	pH - 3 dias	ganho de massa (%) 10 dias	pH - 10 dias
T-densa	$0,25 \pm 0,1$	$8,32 \pm 0,18$	$0,23 \pm 0,09$	$8,56 \pm 0,25$
T-porosa	$1,85 \pm 0,28$	$8,28 \pm 0,12$	$1,68 \pm 0,04$	$8,55 \pm 0,27$
HT-densa	$0,27 \pm 0,03$	$8,48 \pm 0,42$	$0,35 \pm 0,06$	$8,62 \pm 0,05$
HT-porosa	$2,26 \pm 0,09$	$8,07 \pm 0,05$	$2,96 \pm 1,07$	$8,76 \pm 0,08$

e o pH inicial da solução DMEM foi de 7,7.

As soluções resultantes das amostras de TCP (denso e poroso) apresentaram mesma tendência para variação de pH em intervalo de baixa alcalinidade (8,3) em período de 3 dias. No período de 10 dias, as amostras bifásicas apresentaram maior saturação de íons que as amostras de  $\beta$ -TCP, comportamento que faz referência a maior reatividade das cerâmicas bifásicas comparadas às cerâmicas de  $\beta$ -TCP. Em período de

3 dias as soluções apresentaram variações de pH que puderam ser relacionadas com os resultados de ICP, ou seja, as soluções resultantes das amostras porosas tiveram menor valor de pH.

As micrografias eletrônicas de varredura típicas das superfícies das amostras densas (Fig. 1A) e porosas (Fig. 1B), antes e após os experimentos de dissolução *in vitro*, em meio DMEM, mostram as alterações na morfologia do material durante o experimento.

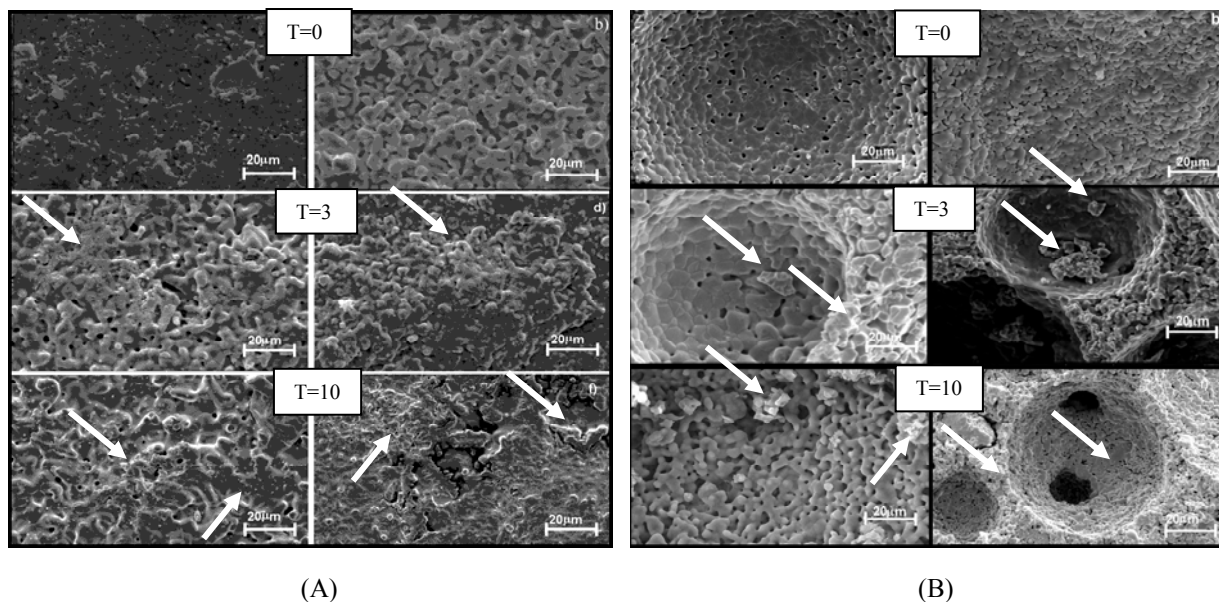


Figura 1: Micrografias eletrônicas de varredura típicas, durante os vários tempos experimentais (T, em dias). (A) amostras densas; (B) amostras porosas; Esquerda (1<sup>a</sup>. e 3<sup>a</sup>. colunas): amostras T; Direita (2<sup>a</sup>. e 4<sup>a</sup>. colunas): amostras HT. As setas são indicativas de sinais de precipitação e áreas de dissolução.

Três dias foram suficientes para iniciar a formação de núcleos nas amostras densas e porosas, sendo a quantidade de núcleos proporcional ao tempo de imersão. Após 3 dias de imersão, as amostras bifásicas mostraram mais precipitados que a amostra de TCP. A

topografia das amostras porosas dificultou a observação dos precipitados, também em função da nucleação no interior das porosidades.

## Discussão

Cálcio e o fósforo representam um dos principais elementos presentes no plasma humano e na constituição de cerâmicas bioativas e reabsorvíveis, cuja participação é bastante efetiva no processo de dissolução/precipitação. A liberação destes íons a partir de materiais cerâmicos representa um dos principais fatores que induzem a natural formação da camada biologicamente ativa de fosfato de cálcio e estímulo para o crescimento ósseo [5]. A avaliação das concentrações de Ca e P nas soluções estudadas em períodos de 3 e 10 dias, permite uma análise da cinética de dissolução para as amostras com diferentes microestruturas e composições.

A redução na concentração destes íons nos períodos analisados em relação à solução controle pode evidenciar a atuação do processo de nucleação, como consequência da saturação das soluções na presença das cerâmicas. Isso acontece em decorrência do processo de dissolução das amostras, que é facilitado pela presença da fase reabsorvível TCP, além da existência de íons comuns (Ca e P) na solução controle, podendo gerar gradientes de concentração no meio, orientando processos de difusão [6]. As soluções resultantes dos ensaios de dissolução com as amostras TCP porosas apresentaram concentração de íons em solução superior às soluções das amostras porosas bifásicas, sugerindo a existência de maior proporção de precipitados sobre a superfície da amostra bifásica porosa, fato reforçado pelo ganho maior de massa para estas amostras.

Cerâmicas bifásicas porosas apresentaram, em solução, concentrações de íons Ca e P menores que as densas. Sabe-se que o mecanismo de dissolução pode ser influenciado pela presença de porosidade aberta. Esta porosidade fornece um aumento da área de superfície específica, portanto maior área de contato para permeação do líquido, facilitando a difusão de íons da amostra para a solução e posterior nucleação [4]. Estes resultados confirmam a hipótese de que irregularidades da superfície podem aumentar a retenção de sólidos dispersos no meio, já que pode proporcionar locais de abrigo menos afetados pelas forças do fluido [5-6]. O mesmo comportamento não aconteceu com as amostras densas, por isso o ganho de massa para as porosas foi predominante. O ganho de massa pouco significativo associado às amostras de TCP com diferentes microestruturas, após período de 10 dias, pode estar associado ao processo contínuo de difusão devido a presença de diferentes espécies nas superfícies inerentes à variação de pH. Outro fator mais provável para as amostras densas pode estar relacionado à barreira de difusão que se deve a formação inicial de uma primeira camada de material inorgânico depositado sobre a superfície. A existência desta camada tende a dificultar a migração iônica do interior da cerâmica para solução, impedindo a livre difusão de espécies em períodos mais longos, permitindo o maior equilíbrio da solução, em termos de saturação [4,6]. Para as amostras porosas a deposição não é uniforme pelo aspecto topográfico irregular da superfície, por isso este efeito é pouco provável.

O fato da variação de pH, durante período de 10 dias, não seguir uma relação direta com as concentrações obtidas pode estar relacionado à presença de outros íons de natureza alcalina também presentes na solução DMEM e que não foram quantificados por ICP.

Diante dos resultados apresentados concluiu-se que as amostras porosas apresentaram maior tendência à saturação, comparada às amostras de microestrutura densa, que apresentaram variações de pH mais expressivas, em função do tempo mais prolongado que seus íons permanecem em solução, sem haver precipitação. A composição bifásica apresentou comportamento de dissolução dependente da morfologia, enquanto sua composição porosa apresentou maior dissolução. A morfologia das amostras teve efeito determinante no processo e dissolução, sendo esta característica mais significativa que a composição.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Márcia M. Marques (Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo) por fornecer o meio de cultura-DMEM; ao aluno Bruno B. Silva pela ajuda no procedimento experimental e ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] Bouler JM, Daculsi G. *In vitro* carbonated apatite precipitation calcium phosphate pellets presenting various HAp- $\beta$ -TCP ratios. *Key Engineering Materials*. 2001; 192-195: 119-22.
- [2] Raffaini G, Ganazzoli F. Sequential adsorption of proteins and the surface modification of biomaterials: A molecular dynamics study. *J Mater Sci: Mater Med*. 2007; 18(2):309-316.
- [3] Marchi J, Ribeiro C, Bressiani AHA, Marques MM. Cell response of calcium phosphate based ceramics, a bone substitute material. *Materials Research*. 2013; 16: 703-712.
- [4] Dorozhkin SV. A review on the dissolution models of calcium apatites. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. 2002; 44(1): 45-61.
- [5] Ribeiro C, Bressiani JC, Bressiani AHA. A study of the consolidation method with albumin to obtain porous  $\beta$ -TCP ceramics. *Materials Research*. 2007; 10(3): 307-310.
- [6] Ribeiro C, Rigo ECS, Sepulveda PA, Bressiani JC, Bressiani AHA. Formation of calcium phosphate layer on ceramics with different reactivities. *Materials science and Engineering C*. 2004; 24 (5): 631-636.