

CAPÍTULO 2

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

José Rosa de Souza Farias¹;

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí.

<http://lattes.cnpq.br/9404467330103347>

Rodrigo Prado Feitosa²;

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí.

<http://lattes.cnpq.br/5079332648563704>

Erica Ianne da Silva Sousa³;

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí.

<http://lattes.cnpq.br/4888137102478661>

Edson Cavalcanti da Silva Filho⁴;

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí.

<http://lattes.cnpq.br/7892423373858047>

Valdeci Bosco dos Santos⁵;

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí.

<http://lattes.cnpq.br/0011700686113389>

Aluska do Nascimento Simões Braga⁶.

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, Paraíba.

<http://lattes.cnpq.br/2429557575387821>

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 íons estrôncio (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 demonstraram que o método Pechini foi eficiente na síntese do β -TCP dopado

com Sr^{2+} , evidenciando a incorporação dos íons na rede cristalina. A amostra apresentou morfologia em placas e não indicou sinais de toxicidade, sugerindo seu potencial para aplicações biomédicas.

PALAVRAS-CHAVE: Beta Fosfato Tricálcico. Estrôncio. Toxicidade.

EVALUATION OF THE TOXICITY OF STRONTIUM DOPED BETA TRICALCIUM PHOSPHATE (B-TCP) SYNTHESIZED VIA THE PECHINI METHOD

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.

KEY-WORDS: 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 (Schatkoski *et al.*, 2021; Jodati *et al.*, 2020). 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 (Punj *et al.*, 2021; Dorozhkin, 2018; Farias *et al.*, 2020; Canillas *et al.*, 2021).

De formulação química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 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 (Chaairet *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2023).

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 (Schatkoski *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2021).

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 (Omori *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2022).

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.

METODOLOGIA

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, conseqüente, formação do gel. Foi realizada uma pirólise no gel a 400 °C/1h, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/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 a 800 °C durante 1 hora, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, com o intuito de obter a fase desejada. A amostra obtida foi nomeada de β -TCP 20%Sr.

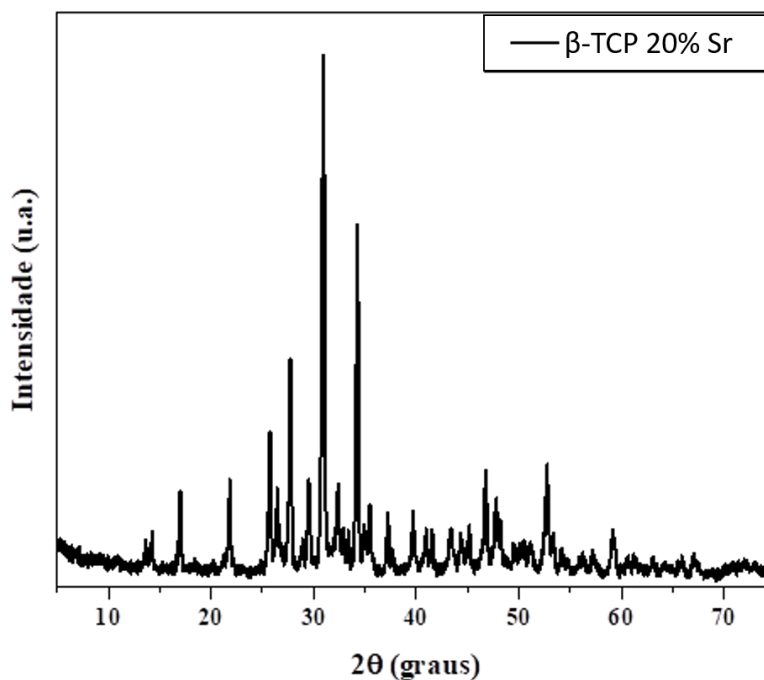
A amostra sintetizada foi caracterizada por difração de raios X (DRX), para identificação das fases formadas, quantificação das fases, cristalinidade e tamanho de cristalito. O equipamento utilizado para essa análise foi o difratômetro de raios X modelo XRD-6000 da *Shimadzu* com radiação $\text{K}\alpha$ do cobre e varredura de 20 a 60°. A quantificação das fases foi realizada por meio do programa *HighScore Plus*. O tamanho de cristalito foi calculado a partir da equação de Scherrer (Scherrer, 1918). 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 1000°C 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.*, 1982), 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 *artemia 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 metanúplio 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 metanúplios 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 DISCUSSÕES

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

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

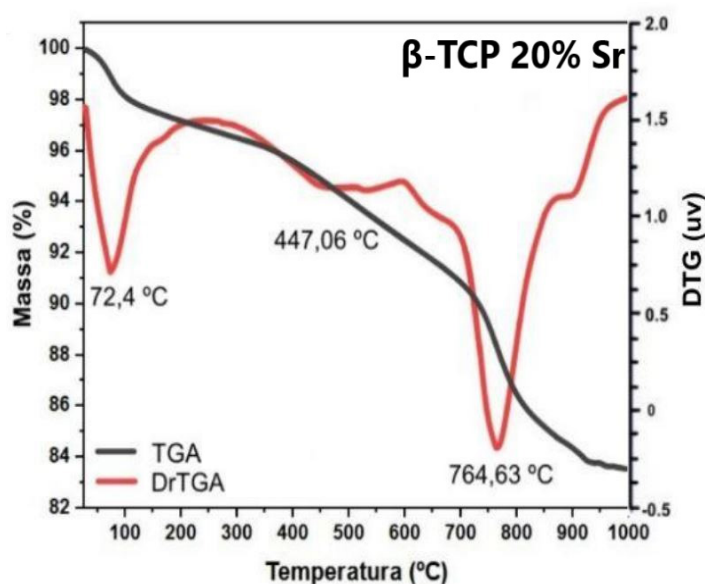


Observando o difratograma da Figura 1 é possível observar picos bem definidos da fase beta fosfato tricálcico, de acordo com a ficha JCPDS-96-151-7239. Não houve a formação de fases secundárias indesejadas de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HAp) ou fosfato de cálcio amorfo (ACP), o que comprova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

Comparando o difratograma da Figura 1 com dados da literatura para o β -TCP puro (Chaair *et al.*, 2017; Bohner *et al.*, 2020), percebe-se que nesta 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 (Wang *et al.*, 2021; He *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2023; Koc, 2019; Liu *et al.*, 2020; Boanini *et al.*, 2021). 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.

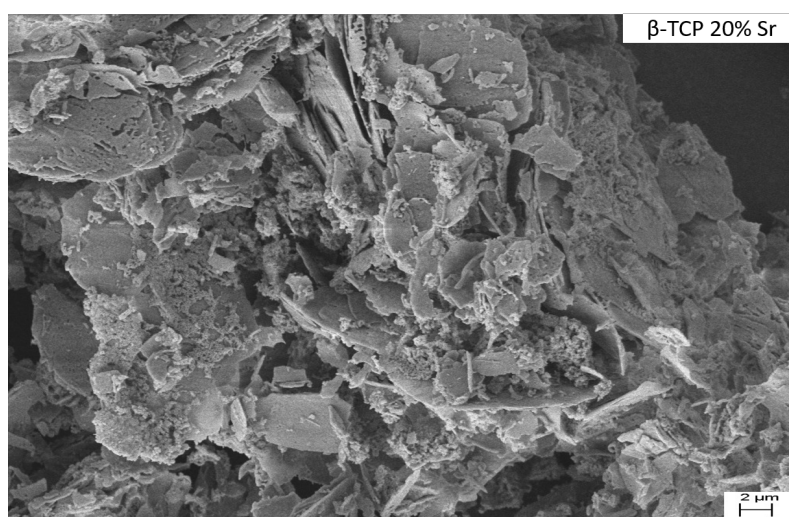
Figura 2. Curvas TG/DTG da amostra β -TCP 20%Sr pirolisada à 400 °C.



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.

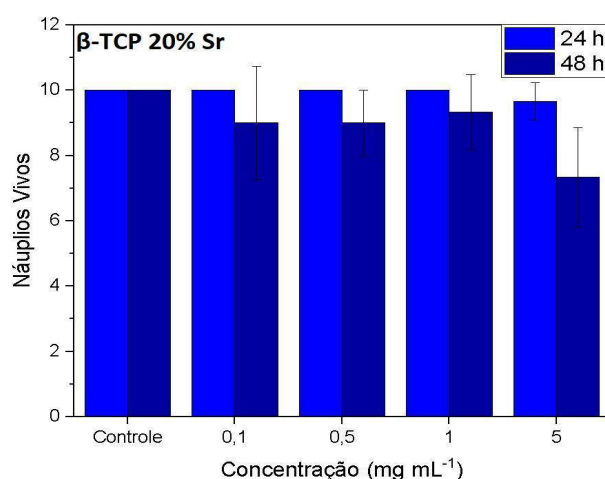
Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura da amostra β -TCP 20% Sr.



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 (Barbeck *et al.*, 2019). Além disso, observou-se também a presença de certo grau de porosidade no material, que é bastante benéfico para aplicações biológicas (Panda *et al.*, 2021).

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.

Figura 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 (Kim *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

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.

DECLARAÇÃO DE INTERESSES

Os autores do artigo declaram que não possuem conflitos de interesses de ordem financeira, comercial, política, acadêmica e pessoal.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Barbeck M, Jung O, Smeets R, Koržinskas T, Editors. **Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration [Internet]**. INTECHOPEN; 2019.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chaaïr, H.; Labjar, H.; Britel, O. **Synthesis of β -tricalcium phosphate**. Morphologie, v. 101, n. 334, p.120-124, 2017.
- Dorozhkin, S. V. **Calcium Orthophosphate (CaPO₄) Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications**. Journal of Biotechnology and Biomedical Science, v. 1, n. 3, p. 25-93, 2018.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Koc, S. G. **Synthesis and characterization of strontium and chlorine co-doped tricalcium phosphate**. Materials Letters, v. 248, p. 69-72, 2019.

Kolar, D. **Chemical research needed to improve high-temperature processing of advanced ceramic materials (Technical report)**. Pure and Applied Chemistry, v. 72, n. 8, p. 1425-1448, 2000.

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.

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.

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.

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.

Punj, S.; Singh, J.; Singh, K. **Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future prospectives**. Ceramics International, v.47, p.28059-28074, 2021.

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.

Scherrer, P. **Nachrichten von der gesellschaft der wissenschaften zu gottingen**. Math.-Phys. Kl, v.2, p.98-100, 1918.

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.

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.