#### Universidade de São Paulo

Instituto de Física

### A Razão Sr/Ca em Hidroxiapatita Produzida a Partir de Células Ósseas Humanas em Ambientes com Diferentes Concentrações de Estrôncio

Priscila Ribeiro dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciências

#### Orientador

Prof. Dr. Nemitala Added

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Johnny Ferraz Dias (UFRGS)Profa. Dra. Maria Teresa Moura Lamy (IFUSP)Prof. Dr. Nemitala Added (orientador - IFUSP)

São Paulo 2008

#### FICHA CATALOGRÁFICA Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Santos, Priscila Ribeiro dos

A razão Sr/Ca em hidroxiapatita produzida a partir de células ósseas humanas em ambientes com diferentes concentrações de estrôncio São Paulo, 2008.

Dissertação(Mestrado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. de Física Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Nemitala Added

Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Física Moderna; 2. Física Nuclear; 3. Física Experimental.

USP/IF/SBI-085/2008

"After climbing a great hill, one only finds that there are many more hills to climb." Nelson Mandela

# Sumário

$\mathbf{A}$	grad	ecimen	tos	i
R	esum	10		iii
A	bstra	nct		$\mathbf{v}$
1	Inti	roduçã	0	1
<b>2</b>	$\mathbf{Oss}$	0		9
	2.1	Funçã	o Óssea	9
	2.2	Morfo	logia Óssea	10
	2.3	Osso a	in vitro	12
3	Conceitos Teóricos			15
	3.1	Absor	ção de Infravermelho por Transformada de Fourier	15
	3.2	Difraç	ão de Raios-X (XRD) $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$	17
	3.3	Retro-	espalhamento Rutherford (RBS)	19
	3.4	Emiss	ão de Raios-X por Indução de Partículas (PIXE)	22
4	Ma	teriais	e Métodos	25
	4.1	Prepa	ração de Amostras	25
	4.2	Prepa	ração dos Padrões	33
	4.3	Técnie	cas de Caracterização	34
		4.3.1	FT-IR	34
		4.3.2	XRD	35
	4.4	Técnie	cas de Quantificação	38
		4.4.1	Laboratório de Materiais e Feixes Iônicos	38
		4.4.2	Medidas de RBS dos Padrões	40
		4.4.3	Medidas de PIXE	41

### SUMÁRIO

<b>5</b>	Res	ultados e Análise de Dados	<b>45</b>
	5.1	Técnicas de Caracterização	45
		5.1.1 FT-IR	45
		5.1.2 XRD	48
	5.2	Técnicas de Quantificação	55
		5.2.1 RBS dos Padrões $\ldots$	55
		5.2.2 Técnica PIXE	56
6	Disc	cussão	65
	6.1	Caracterização	65
		6.1.1 FT-IR	65
		6.1.2 XRD	68
	6.2	Quantificação da razão Sr/Ca $\ \ldots \ \ldots$	70
7	Con	siderações Finais	75
A	Fich	a Cristalográfica da $Ca_5(PO_4)_3(OH)$	79
в	3 Ficha Cristalográfica do $\mathrm{Ca}_8\mathrm{H}_2(\mathrm{PO}_4)_6{\cdot}5\mathrm{H}_2\mathrm{O}$		
Re	Referências Bibliográficas		

# Lista de Figuras

1.1	Figura com a comparação entre a temperatura na superfície do mar e a	
	razão $Sr/Ca$ de um coral em um mesmo local ao longo de mais de 10 anos [3].	2
1.2	Quantidade de Sr em função da quantidade de Ca em esmalte, no gráfico	
	da esquerda, e em dentina, no gráfico da direita. A reta representa o ajuste	
	dos dados da hidroxiapatita sintética	3
1.3	Desenho esquemático da distribuição da razão Sr/Ca $(\times 10^{-3})$ obtida em	
	vários pontos do corpo do jacaré [6].	4
1.4	Desenho esquemático da distribuição da razão Sr/Ca $(\times 10^{-3})$ obtida em	
	vários pontos do corpo do cachorro sem raça definida, à esquerda, e do	
	<i>poodle</i> , à direita	5
2.1	Na figura a) é possível observar um desenho esquemático da fisiologia óssea	
	(retirada de [11]). Na figura b ) é possível observar um pedaço de osso com	
	indicação da região do osso trabecular e do osso cortical (retirada de $[10]$ ).	10
2.2	Figura esquemática da mineralização óssea (retirada de [12])	11
2.3	Desenho esquemático das fibras de colágeno e da mineralização da matriz	
	inorgânica	12
2.4	A) As setas destacam algumas das regiões de mineralização óssea. Na parte	
	de baixo da foto é possível observar algumas fibras de colágeno (campo com	
	2,5 $\mu {\rm m}$ de comprimento). B) Região com alta mineralização (a), borda en-	
	tre os sítios mineralizados (b) e fibras de colágeno (c) (campo com 2,5 $\mu {\rm m}$	
	de comprimento). C) Interface da matriz mineralizada com as células da	
	placa de petri (campo com 90 $\mu {\rm m}$ de comprimento). D) Oste ócito rode-	
	ado por fibras calcificadas (campo com 45 $\mu {\rm m}$ de comprimento). Figuras	
	retiradas de [13]. $\ldots$	14
3.1	Esquema dos modos vibracionais moleculares. Figura retirada de [17]	16
3.2	Desenho esquemático da difração de raios-X. Figura retirada de [19]	17

#### LISTA DE FIGURAS

3.3	Figura com as seis possíveis simetrias cristalinas: 1) Monoclínica, figura retirada de [21] 2) Triclínica, figura retirada de [22] 3) Ortorrômbica sim-	
	ples figura retirada de [23] 4) Cúbica, figura retirada de [24] 5) Tetragonal	
	figura retirada de [25] e 6) Heyagonal, figura retirada de [24]	19
21	Desenho esquemético de método PBS. Figure retirada de [27]	20
0.4 9.5	Desenho esquematico do metodo 1055. Figura fetrada de [27]	20
3.3	Desenno esquematico de um atomo ionizado	23
3.6	Desenho esquemático do diagrama de níveis atomicos. Figura retirada de	0.0
	[29]	23
4.1	Figura esquemática das etapas de cultivo celular. $\hfill \ldots \hfill \ldots \hfil$	26
4.2	Frasco plástico com células no início do cultivo. $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	27
4.3	Placas de cultura com células MG-63	29
4.4	Fotos das células MG-63 em duas etapas diferentes da cultura: a) Célu-	
	las MG-63 em confluência, ocupando todo o espaço da área de cultivo; b)	
	Células sob estímulo. As manchas escuras são nódulos ós seos. $\hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \hfill \hfill \hfill \ldots \hfill \ldots \hfill \hfill \hfill \hfill \ldots \hfill \hf$	30
4.5	As duas placas da esquerda faziam parte do grupo branco e foram coradas	
	com Vermelho de Alizarina. As duas placas do meio foram estimuladas	
	para produção de nódulos ósseos e também foram coradas com Vermelho	
	de Alizarina. Como as placas estimuladas produziram mais nódulos ósseos,	
	elas têm a cor vermela mais forte. Nas duas placas da direita foi feito o	
	teste da fosfatase alcalina.	32
4.6	Fotos da evaporadora Univex 405 do laboratório de alvos do Laboratório	
	Pelletron.	34
4.7	À esquerda, foto do espectrômetro Espectrum GX do laboratório LACIFID.	
	À direita, foto do porta amostras em detalhe. O feixe passa da esquerda	
	para a direita	35
4.8	Foto do difratômetro ${\it Rigaku}$ do Laboratório de Cristalografia do IFUSP. $~$ .	36
4.9	Foto da parte interna do difratômetro Rigaku do Laboratório de Cristalo-	
	grafia do IFUSP	36
4.10	Foto das duas fontes de íons do acelerador do LAMFI. À direita, a fonte	
	SNICS e à esquerda, a alphatross	38
4.11	Desenho esquemático do acelerador do LAMFI	39
4.12	Detalhe da câmara de espalhamento da canalização multi-uso	40
4.13	Espectro típico do alvo de calibração. A linha vermelha é uma simulação,	
	usada na calibração em energia e espessura da amostra	41

#### LISTA DE FIGURAS

4.14	Foto de uma amostra posicionada para medida de PIXE externo. Além da amostra, é possível observar os dois detectores de Si-PIN e a folha de Au montada entre a amostra e a saída do feixe	42
4.15	Foto do porta amostras usado nas medidas de PIXE externo. Nesta foto também é possível observar um padrão sendo irradiado e um dos detectores de Si-PIN	43
5.1	Espectro FT-IR com as curvas da cultura de células MG-63, hidroxiapatita sintética e fundo. Os círculos em azul sinalizam as regiões de interesse para as ligações de $PO_{4^-}$ .	46
5.2	Desenho esquemático que relaciona a esquação 5.1 com as medidas de FT-IR.	47
5.3	Espectro FT-IR das amostras com o fundo subtraído	48
5.4	a) Gráfico dos dados de XRD das amostras de branco antes do tratamento térmico. b) Gráfico resultante da medida de XRD das amostras somadas de branco após tratamento térmico. Neste gráfico é possível observar os picos mais intensos da hidroxiapatita muito bem definidos $(2\theta \text{ (graus)} = 22,9; 32,2 \text{ e } 32,9)$ . Este gráfico é referente a duas amostras somadas. Além dos picos obtidos nas medidas, estão dispostas as linhas cristalográficas de referência para hidroxiapatita (linhas verticais). Os círculos vermelhos são picos que não pertencem às linhas cristalográficas de referência da hidroxi- apatita	50
5.5	a) Gráfico do espectro de difração de raios-X obtido junto com as linhas cristalográficas de referência do fosfato de cálcio e hidrogênio hidratado $(Ca_8H_2(PO_4)_6\cdot 5H_2O)$ . b) Linhas cristalográficas de referência do fosfato de sódio (NaP). c) Linhas cristalográficas de referência do cilcotetrafosfato de cálcio tetrahidratado $(Ca_2(P_4O_{12})\cdot 4H_2O)$ .	53
5.6	a) Gráfico dos dados de XRD da amostra com 8 $\mu$ g de estrôncio por mL de meio antes do tratamento térmico. Os picos próximos a 30° e 45° são possivelmente do plástico das placas de cultura, pois desapareceram após o tratamento térmico, como pode ser observado na figura b), gráfico dos dados de XRD da amostra com 8 $\mu$ g estrôncio por mL de meio após o tratamento térmico. Neste gráfico é possível observar os picos mais intensos	
	da hidroxiapatita	54
5.7	Espectro típico obtido nas medidas de RBS	55

#### LISTA DE FIGURAS

5.8	a) Espectro típico obtido na irradiação da folha de Au e utilizado para a	
	calibração da carga. b) Espectro típico obtido na irradiação das amostras.	
	c) Espectro típico obtido na irradiação dos padrões . $\ldots$ . $\ldots$ . $\ldots$ .	57
5.9	a) Ajuste do espectro de uma das amostras com concentração de estrôncio	
	no meio de 2 $\mu$ g por mL. b) Resíduo do ajuste da figura a)	59
5.10	Gráfico com os valores finais de Sr/Ca nas amostras pela concentração de	
	estrôncio no meio de cultura para estímulo ósseo . $\ \ldots\ \ldots\ \ldots\ \ldots\ \ldots$	62
5.11	Gráfico com a quantidade de cálcio mineralizada pelas células em função	
	da concentração de estrôncio no meio de cultura	63
6.1	Resultados obtidos com a técnica FT-IR para duas regiões de interesse:	
	700-450 cm <sup>-1</sup> (figuras A e B) e 1200-900 cm <sup>-1</sup> (figuras C e D). Medidas	
	feitas em células ósseas de ratos $(A, \ B)$ e hidroxiapatita sintética $(C, \ D)$	
	para diferentes concentrações de estrôncio no ambiente de formação do	
	mineral. Figura retirada de [34]	66
6.2	Detalhe das regiões a) entre 700 e 450 $\rm cm^{-1}$ e b) entre 1200 e 900 $\rm cm^{-1}$ do	
	gráfico obtido nas medidas de FT-IR (figura 5.3).	67
6.3	Gráfico da média ponderada (círculos) e média simples (triângulos) dos	
	valores da razão Sr/Ca obtidos com o método PIXE. Este gráfico foi plotado	
	na mesma escala do gráfico da figura 5.10 para facilitar a comparação entre	
	os dois	71
6.4	Coloração por Vermelho de Alizarina em células com três diferentes con-	
	centrações de estrôncio no meio de cultura para estímulo ósse o. A figura a) $\hfill$	
	é de uma cultura sem estrôncio no meio de cultura ; a figura b) é de uma $% f(x)$	
	cultura celular com 16 $\mu{\rm g}$ de estrôncio por mL de meio de cultura ; a figura	
	c) é de uma cultura de MG-63 com 33 $\mu {\rm g}$ de estrôncio por mL de meio	
	de cultura. É possível observar a diminuição de nódulos ós seos produzidos	
	conforme a concentração de estrôncio no meio é aumentada. $\ \ldots\ \ldots\ \ldots$	73

# Lista de Tabelas

4.1	Tabela com as etapas do cultivo celular. .	26
4.2	Tabela com os períodos de preparação de amostras	33
4.3	Tabela das concentrações de estrôncio medidas em cada um dos períodos	
	de PIXE	44
5.1	Tabela com os valores de $d$ dos seis principais picos do gráfico da figura	
	5.4b que não são da hidroxiapatita	51
5.2	Tabela com o nome, a fórmula química e a referência das linhas crista-	
	lográficas dos possíveis compostos cristalinos que compõem as amostras de	
	cultura celular, além da hidroxiapatita	51
5.3	Tabela com os valores absolutos de Ca e Sr dos padrões	56
5.4	Tabela com os valores de contages de Ca e Sr de todas as amostras. $% f(x) = \int f(x)  dx$	60
5.5	Tabela com o fator de correção para cada um dos períodos de medidas de	
	PIXE	61

#### LISTA DE TABELAS

## Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a participação direta ou indireta de diversas pessoas às quais quero registrar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço ao Nemi pelos cinco os anos de dedicação à minha formação, com discussões, conselhos e conversas.

A Rita que se dedicou ao trabalho tanto quanto eu, meu profundo agradecimento por toda a paciência, todos os ensinamentos e por todas as férias e feriados que pude aproveitar durante o período em que as amostras estavam sendo preparadas. Quero agradecer também a todas as outras pessoas do Laboratório de Fisiopatologia Renal da FM-USP que me apoiaram e disponibilizaram toda a infraestrutura necessária para que esse trabalho acontecesse, em especial à Profa. Vanda Jorgetti.

A todos os professores e funcionarios do IFUSP que em algum momento me ajudaram na realização deste trabalho: Marquinhos e Marcel do LAMFI; Wanda do laboratório de alvos do Pelletron; Prof. José Fernando Diniz Chubaci e a Roseli Gennari do LACIFID; Beth, Zenaide, Andréia e Sérgio da secretaria do DFN. Agradeço especialmente à Profa. Márcia Fantini do LCr pelas dicas e explicações.

Gostaria também de agradecer à CAPES e ao meu pai pelo suporte financeiro que fez possível minha dedicação integral ao mestrado.

A todos do GFAA, agradeço pelo apoio, discussões e idéias. Quero agradecer em especial ao Manfredo e à Adriana Delgado pela amizade, ótimas conversas e muitas risadas e ao Jim pelas grandes idéias. Agradeço também aos professores Beth Yoshimura e Nilberto Medina pelas conversas nos momentos em que eu precisava de distração e nos momentos em que eu me encontrava confusa.

Aos muitos amigos do instituto e de fora, agradeço pelas conversas sobre a vida, física, política, por todos os momentos de diversão e principalmente pelo apoio: Marela, Robertão, Lud, Pat, Mauro, Nathaly, Luci, Véio, Má, Lê, Jailson e Di. Agradeço em especial ao Diogo, ao Gabriel, ao Francisco e à Kika pela paciência em todas as vezes que eu derramei lágrimas quando o Jairo não estava por perto e à Mi pela amizade de uma vida toda.

À Ucha, Regina, Fernando e Inácio agradeço o maravilhoso jantar que deu origem ao meu projeto de mestrado e a todos os outros encontros cheios de boas idéias, agradáveis conversas e incentivos.

Agradeço aos meus pais e à minha irmã pelo apoio incondicional e incentivo em todas as minhas escolhas. Agradeço também a todos da minha família pela torcida e carinho: Má, Dan, Bento, tia Ana, vó Ana, vó Glória, vô Jaime, tia Beth, tia Pata, tio Ricardo, Jê, tio Giba, Cíntia, tia Preta, Ken, D. Maria, Sr. Souza, Jardel, Patrícia e Gustavo. Agradeço especialmente ao tio Tiza pela empolgação e apoio em minhas escolhas profissionais.

Por último, agradeço ao Jairo pelos mais de cinco anos me apoiando e acreditando em mim mesmo quando nem eu acreditava.

## Resumo

Esta dissertação de mestrado descreve o estudo realizado sobre como a oferta de estrôncio afeta a razão Sr/Ca em hidroxiapatita formada in vitro. Este trabalho pretende dar subsídios para que posteriormente seja possível fazer um estudo da razão Sr/Ca em função da temperatura também em hidroxiapatita formada in vitro. Foram utilizadas células osteoblásticas da linhagem MG-63 com concentrações de estrôncio no meio de cultura que variaram de 0,0 até 33,0  $\mu$ g por mL de meio. Os nódulos ósseos formados pelas células foram caracterizados pelas técnicas Absorção de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), que foi utilizada com o objetivo de identificar ligações de PO<sub>4-</sub> nas amostras, e Difração de Raios-X (XRD), que teve como objetivo confirmar a presença de hidroxiapatita nos minerais formados e comparar a cristalinidade do material com e sem estrôncio. A quantificação da razão Sr/Ca foi feita utilizando as técnicas Retroespalhamento Rutherford (RBS) e Emissão de Raios-X por Indução de Partículas (PIXE), que são capazes de fazer a identificação e quantificação elementar. Os resultados obtidos mostram que os nódulos formados são compostos por hidroxiapatita. Com relação à quantificação, mostrou-se que não foi possível substituir mais de 10% do íons de cálcio por íons de estrôncio, o que está de acordo com previsões teóricas. Além disso, para altas concentrações de estrôncio no meio a mineralização do cálcio diminuiu duas ordens de grandeza e as medidas da razão Sr/Ca obtiveram resultados bastante dispersos, indicando uma possível mudança metabólica das células que parece inviabilizar o bom funcionamento fisiológico das mesmas.

RESUMO

## Abstract

This Masters dissertation describes the study of how the availability of strontium affects Sr/Ca ratio of *in vitro* hydroxyapatite. This work intends to provide the basic understanding needed to a future study of how temperature changes Sr/Ca ratio in this material. MG-63 cells were grown in the culture medium doped with 0.0, 1.0, 2.0, 4.1, 8.2, 16.4, 22.9 and 33.0  $\mu g$  of Sr/mL. The nodules formed by osteoblastic cells were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) technique, used to identify PO<sub>4</sub>domain, and X-Ray Diffraction (XRD) technique, which was used to verify the presence of crystallized hydroxyapatite in the mineral composition with and without strontium. Quantification of Sr/Ca ratio was made using the Rutherford Backscattering (RBS) and Particle Induced X-Ray Emission (PIXE) techniques, which are used to do elementary identification and quantification. The results of characterization confirmed the presence of hydroxyapatite in the cultivated MG-63 cells. The experiments have shown that it was not possible to replace more than 10% of the calcium ions by strontium, which is consistent with theoretical predictions. In addition, high concentrations of strontium in the growing solution, reduced the mineralization yield and also the Sr/Ca ratio, indicating a possible change in the metabolism of the cells.

ABSTRACT

# Capítulo 1

# Introdução

Praticamente todos os organismos vivos podem produzir minerais em alguma forma específica, como sais minerais, ossos, dentes, casulos e cascos. Os mecanismos pelos quais estes depósitos são realizados em muitos casos não são completamente entendidos. Existem dois mecanismos predominantes para os depósitos de compostos de cálcio: aqueles usados por moluscos para criar cristais de calcita (CaCO<sub>3</sub>) em suas conchas e a criação de cristais de hidroxiapatita (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) que é o principal composto mineral da formação de ossos e dentes das várias espécies de vertebrados.

A substituição de alguns íons de cálcio por íons de estrôncio na criação desses cristais é observada freqüentemente devido ao fato de serem ambos metais alcalinos terrosos. A taxa de substituição destes átomos depende do tipo de cristal e condições químicas e físicas do meio usado para a criação dos cristais, como por exemplo a temperatura, a solubilidade e a disponibilidade do estrôncio no meio.

Desde o final da década de 70 a razão entre a quantidade de estrôncio e de cálcio (Sr/Ca) em conchas e esqueletos de corais vem sendo estudada [1]. Estudos mostraram uma correlação muito grande entre a taxa de substituição de íons de cálcio por íons de estrôncio nos esqueletos de corais e a temperatura local do mar [2, 3]. A figura 1.1 mostra a comparação da razão Sr/Ca em esqueletos de corais e a temperatura da superfície do

mar obtida por satélite. Os dados dos corais foram obtidos através de medidas da razão Sr/Ca no seu eixo de crescimento. Assim como as árvores, os corais crescem radialmente, desta forma, sabe-se que a parte mais externa do coral é mais antiga. É possível que o que varie no mar não seja a quantidade de estrôncio disponível e sim a solubilidade do estrôncio, de acordo com a temperatura da água.



Figura 1.1: Figura com a comparação entre a temperatura na superfície do mar e a razão Sr/Ca de um coral em um mesmo local ao longo de mais de 10 anos [3].

Se o que muda no mar nos meses de inverno e verão é a disponibilidade de estrôncio no meio e não sua solubilidade, é possível que exista uma correlação entre a razão Sr/Ca e a temperatura para outros compostos de cálcio, como por exemplo os ossos e dentes (que são formados principalmente por hidroxiapatita). Com a intensão de verificar esta correlação nosso grupo iniciou um estudo com dentes suínos, bovinos e humanos e amostras de hidroxiapatita sintética em 2003. Estas espécies foram escolhidas por possuirem uma diferença apreciável na temperatura média de seus corpos (humano 36,5°C, bovino 38°C e suíno 39°C). Todas as amostras foram irradiadas utilizando o método nuclear PIXE no Laboratório de Materiais e Feixes Iônicos - LAMFI. Na análise da razão Sr/Ca das amostras de hidroxiapatita sintética e das dentinas e esmaltes das amostras de dentes observamos grupos distintos para cada espécie, tanto para as irradiações de esmalte como para as de dentina (figura 1.2).



Figura 1.2: Quantidade de Sr em função da quantidade de Ca em esmalte, no gráfico da esquerda, e em dentina, no gráfico da direita. A reta representa o ajuste dos dados da hidroxiapatita sintética.

A origem dos dentes irradiados é desconhecida e por isso é bem possível que a alimentação de cada grupo seja bastante heterogênia, o que influencia nos resultados. Os vegetais contém muito mais estrôncio do que a carne, disponibilizando mais estrôncio no organismo de quem os come. Existem estudos que determinam qual dos ancestrais do *Homo Sapiens* foi o primeiro a caçar [4]. Foi medida a quantidade de estrôncio em ossos e dentes de vários hominídeos e determinado quando houve uma queda brusca na mesma. Uma primeira forma encontrada para eliminar a influência da alimentação em nossos estudos foi comparar a relação Sr/Ca de cristais de hidroxiapatita de um único indivíduo. Porém, inicialmente é necessário entender como funciona a distribuição da temperatura corpórea dos animais.

Todo vertebrado, independente do padrão termoregulador (homeotermo, animal que mantém a temperatura corporal praticamente constante, ou pecilotermo, animal no qual a temperatura corporal varia conforme a temperatura do meio), tem uma variação da temperatura interna em diferentes regiões do corpo. Partes do corpo como cabeça e tronco (parte próxima ao pulmão e ao coração) são mais quentes e as extremidades (mãos e pés ou patas) são mais frias.

Estudos com jacarés do Pantanal mostraram que a temperatura média do corpo desses animais no inverno é quase 5 °C mais baixa do que no verão. Para se ter uma idéia, em tal estudo, um único indivíduo, durante o ano de 1998, teve a sua temperatura média corporal mínima de 17,3 °C e a máxima de 35,6 °C [5].

Assim, para testarmos a idéia de comparar a razão Sr/Ca dos ossos de um único indivíduo, irradiamos alguns ossos de um único jacaré, animal pecilotermo, e comparamos a razão Sr/Ca entre diversas partes do seu corpo [6, 7]. Foram irradiados ossos da coluna vertebral, pernas e cauda (figura 1.3). Os resultados obtidos comprovaram que partes mais quentes do corpo (mais próximas ao coração) têm a razão Sr/Ca menor do que as partes mais frias (patas e cauda).



Figura 1.3: Desenho esquemático da distribuição da razão Sr/Ca (×10<sup>-3</sup>) obtida em vários pontos do corpo do jacaré [6].

É interessante notar que os valores obtidos nos ossos da coluna são compatíveis entre si, dentro de três desvios padrões, e que tanto o valor obtido no osso de uma das patas quanto nos da cauda não são compatíveis com nenhum outro valor. Os resultados obtidos com o jacaré nos levaram a estudar a relação entre a taxa de substituição do cálcio pelo estrôncio em função da distância entre o centro do corpo e as extremidades. Para tanto, foram usados dois cães, um sem raça definida com 30 cm de altura e um *poodle* com 15 cm de altura (figura 1.4). Novamente, para contornar a influência dos hábitos alimentares, os valores da razão Sr/Ca de cada cão foram apenas comparados individualmente. O objetivo destas medidas era verificar se a variação da razão Sr/Ca era menor no *poodle* do que no cão sem raça definida, visto que neste segundo a distância entre as partes mais quentes do corpo e as extremidades era maior.



Figura 1.4: Desenho esquemático da distribuição da razão Sr/Ca (×10<sup>-3</sup>) obtida em vários pontos do corpo do cachorro sem raça definida, à esquerda, e do *poodle*, à direita.

Da mesma forma que nos resultados obtidos nas irradiações de ossos de jacaré, os resultados obtidos nas irradiações dos ossos dos cães mostraram uma menor razão Sr/Ca nos ossos referentes às partes mais quentes do corpo. No cão sem raça definida os valores obtidos da razão Sr/Ca para o osso da cauda não é compatível com o valor obtido para o osso da pata, dentro de três desvios padrões. Já no *poodle*, esses dois valores são compatíveis. Levando-se em conta a diferença de tamanho entre a cauda e a pata dos dois animais, temos mais um indicativo de que a diferença de temperatura pode influenciar a razão Sr/Ca nos ossos.

É importante ter em mente que a premissa básica é que a região onde se encontram

os órgãos vitais, importantes para a manutenção da vida, mantenha a temperatura praticamente constante, garantindo adequada atividade metabólica/fisiológica. Para isso, o corpo usa mecanismos vasculares, como a constrição vascular (vasoconstrição), diminuição do diâmetro do vaso e conseqüente diminuição do fluxo sanguíneo, e a dilatação vascular (vasodilatação), aumento do diâmetro dos vasos periféricos. Assim, quando a temperatura do ambienteé relativamente baixa, o corpo diminui o diâmetro dos vasos sanguíneos da periferia corporal para perder menos calor e manter a temperatura ideal nas regiões mais internas (órgãos vitais). Este padrão é reconhecido em todos os animais, pecilotérmicos e homeotérmicos. Nos animais homeotérmicos, além do mecanismo de redução da perda de energia, outros são acionados para o aumento da produção de calor, e conseqüentemente conseguem a regulação térmica eficiente (homeotermia). Nos animais pecilotermos, este incremento de energia se faz através, principalmente, de forma comportamental. Alguns exemplos são: o banho de Sol, na busca dos raios solares para se aquecerem; e a diminuição do ritmo metabólico como forma de economizar calor.

Dentro desta perspectiva, optamos por dar continuidade ao trabalho eleminando o máximo de parâmetros que podem influenciar na razão Sr/Ca. Desta forma, o presente trabalho se propõe a estudar a taxa de substituição de íons de cálcio por íons de estrôncio na hidroxiapatita formada em nódulos ósseos produzidos *in vitro*. O estudo *in vitro* proporciona a possibilidade de controlar parâmetros como a oferta de estrôncio e a temperatura no meio no qual os minerais são produzidos. A proposta era entender como a disponibilidade de estrôncio influencia na razão Sr/Ca. Foi estudada a caracterização dos nódulos ósseos formados com e sem a adição de estrôncio e também a quantificação da substituição do cálcio pelo estrôncio de acordo com a oferta de estrôncio no meio celular. Este trabalho dá subsídios necessários para o estudo da taxa de substituição do cálcio pelo estrôncio na hidroxiapatita *in vitro* em função da temperatura.

Para produzir as amostras estudadas foram utilizadas células osteoblásticas da linhagem MG-63 [8]. A oferta de estrôncio no meio celular foi feita através da adição de um sal de estrôncio em diferentes concentrações  $(0,0; 1,0; 2,0; 4,1; 8,2; 16,4; 22,9 e 33,0 \mu g de$ Sr por mL de meio de cultura).

Para analisar o material coletado das culturas celulares, foram utilizados quatro métodos de análise de materiais de forma complementar. A técnica Absorção de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) foi usada para determinar a existência de ligações de  $PO_{4^-}$  em uma amostra sem adição de estrôncio. O  $PO_{4^-}$  é um indicativo da presença de hidroxiapatia e seu padrão de absorção de infravermelho é muito bem conhecido.

Como a hidroxiapatita é um cristal com rede cristalina hexagonal que tem seus padrões cristalográficos bem definidos, foram feitas também medidas de Difração de Raios-X (XRD), com o objetivo de confirmar a presença da hidroxiapatita e comparar a cristalinidade do material com e sem estrôncio.

Além disso, para quantificar o estrôncio e o cálcio nos nódulos ósseos formados pelas células, foram feitas medidas de Retro-espalhamento Rutherford (RBS) e de Emissão de Raios-X por Indução de Partículas (PIXE).

O próximo capítulo desta dissertação descreve, de forma não muito aprofundada, a fisiologia e morfologia óssea. No capítulo 3 estão descritos os conceitos teóricos de cada uma das quatro técnicas de medidas usadas na caracterização dos nódulos ósseos formados e quantificação da razão Sr/Ca nos mesmos. No capítulo 4 são explicados os métodos e materiais usados nas preparações de amostras e medidas. No capítulo 5 desta dissertação são apresentados os resultados obtidos com as medidas e as análises de dados. No capítulo 6 são discutidos os resultados finais obtidos e finalmente, no 7° capítulo são apresentadas as considerações finais.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

# Capítulo 2

## Osso

Este estudo pretende relacionar a razão Sr/Ca em hidroxiapatita produzida por células osteoblásticas com a oferta de estrôncio no meio, a fim de subsidiar o entendimento dessa relação em ossos de diversas espécies de vertebrados. Assim sendo, é importante entender, pelo menos superficialmente, como funciona a produção e a fisiologia óssea, e onde a mineralização da hidroxiapatita acontece.

### 2.1 Função Óssea

O esqueleto nas diversas espécies de vertebrados é responsável por várias funções, das quais podemos destacar as seguintes [9, 10] :

- Proteção de órgãos internos como o cérebro e os pulmões;

- Sustentação do corpo;

- Juntamente com músculos e articulações, os ossos são responsáveis pelo movimento do corpo;

- Usado pelo corpo como reserva mineral para as reações metabólicas, contendo 99% do cálcio e 85% de todo o fósforo presente no corpo humano;

- Mantém o equilíbrio ácido-base absorvendo sais alcalinos;

- Usado como armadilha para metais pesados, como por exemplo o chumbo. Os ossos removem estes metais do sangue, reduzindo o efeito de intoxicação em outros tecidos.

### 2.2 Morfologia Óssea

Existem dois tipos de estrutura óssea: os ossos trabeculares e os ossos corticais (figura 2.1). Os ossos trabeculares (menos densos e com maior área) são responsáveis pela reciclagem óssea e os ossos corticais (densos, que formam a superfície óssea) são responsáveis pela sustentação estrutural.

Os ossos trabeculares preenchem a cavidade interna dos ossos longos. Eles têm estrutura lamelar, de tal forma que as lâminas horizontais e verticais se interceptam formando uma estrutura parecida com a de favos de mel. Este formato assegura a resistência mecânica do osso trabecular. O osso cortical é compacto, com poucos espaços, tendo aparência sólida. Ele representa 80% de toda a massa óssea de um adulto.



Figura 2.1: Na figura a) é possível observar um desenho esquemático da fisiologia óssea (retirada de [11]). Na figura b) é possível observar um pedaço de osso com indicação da região do osso trabecular e do osso cortical (retirada de [10]).

A figura 2.1a mostra que o osso é um sistema complexo. O osteóide é a parte da matriz óssea que ainda não está calcificada e o perióteo é uma membrana extremamente vascularizada que envolve os óssos não articulares. Os canais de Volkmann e de Havers são estruturas cilíndricas que são percorridas por nervos e vasos sangüíneos.

Os ossos, tanto trabeculares quanto corticais, são formados a partir das células osteoblásticas. Estas células se diferenciam (se tornam mais especializadas para realizar determinada função) para executar diversas tarefas da produção óssea. Além dos osteoblastos, os osteoclatos e os osteócitos são células que também têm função na formação óssea. Os osteoclastos são responsáveis pela remodelação óssea a partir da localização das enzimas desmineralizantes. Já os osteócitos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea. Além disso, é através deles que acontece a difusão de nutrientes dentro dos ossos. A figura 2.2 mostra os três tipos de células em ação.



Figura 2.2: Figura esquemática da mineralização óssea (retirada de [12]).

O osso é composto de uma parte orgânica e uma parte inorgânica. A parte orgânica do osso (matriz orgânica) é formada por diversas proteínas, sendo a mais abundante o colágeno tipo I (também encontrado em dentes e tendões). As fibras de colágeno presentes no osso são responsáveis por sua relativa elasticidade. A estrutura do colágeno é diferente na parte mineralizada e não mineralizada do osso. Acredita-se que na matriz mineralizada existam espaços entre as fibras de colágeno, nos quais a mineralização se inicia (figura 2.3) [13]. A parte inorgânica do osso, ou matriz inorgânica, é composta principalmente (70% de toda a matriz inorgânica) de fosfato e cálcio na forma de hidroxiapatita ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ) [14]. A mineralização óssea envolve a ação de várias enzimas secretadas pelas células ósseas, como a fosfatase alcalina, que age na deposição do fosfato e do cálcio. Os processos fisiológicos pelos quais o osso se forma, amadurece e é remodelado dependem do equilíbrio dinâmico entre a superfície do osso e os fluídos extracelulares [15].



Figura 2.3: Desenho esquemático das fibras de colágeno e da mineralização da matriz inorgânica.

#### 2.3 Osso in vitro

Existem duas formas de se produzir ossos *in vitro*: a primeira delas é pelo método do explante primário. Neste método um pedaço de osso doado com aproximadamente  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$  é colocado em uma placa de petri com meio de cultura até cobrí-lo. Em aproximadamente uma semana as células ósseas começam a sair do osso e se fixar na placa e se reproduzir. Com aproximadamente três semanas a placa já pode estar cheia de células. O pedaço de osso pode ser descartado e o processo de produção de nódulos ósseos iniciado.

O segundo método, que é o método utilizado neste trabalho, consiste em utilizar uma linhagem celular bem estabelecida, isto é, células idênticas comercializadas por laboratórios. A utilização de uma linhagem bem estabelecida tem a vantagem de garantir uma maior reprodutibilidade das células. Além disso, é possível escolher células tumorais, que se multiplicam mais rapidamente, diminuindo em algumas semanas o tempo necessário para que as células passem a produzir nódulos ósseos. A figura 2.4 mostra fotos feitas com microscópio eletrônico de culturas *in vitro* em diversas fases.



Figura 2.4: A) As setas destacam algumas das regiões de mineralização óssea. Na parte de baixo da foto é possível observar algumas fibras de colágeno (campo com 2,5  $\mu$ m de comprimento). B) Região com alta mineralização (a), borda entre os sítios mineralizados (b) e fibras de colágeno (c) (campo com 2,5  $\mu$ m de comprimento). C) Interface da matriz mineralizada com as células da placa de petri (campo com 90  $\mu$ m de comprimento). D) Osteócito rodeado por fibras calcificadas (campo com 45  $\mu$ m de comprimento). Figuras retiradas de [13].

# Capítulo 3

# **Conceitos Teóricos**

# 3.1 Absorção de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Os átomos que constituem as moléculas estão em constante movimento de vibração e rotação. Estes movimentos correspondem às energias características médias das moléculas. Quando os átomos de uma molécula recebem determinada quantidade de energia, essa pode ser absorvida e os átomos podem ser promovidos a um nível energético excitado. Essas transições só ocorrem para quantidades específicas de energia (ressonância) correspondente à diferença entre a energia do estado fundamental e a do nível excitado.

As vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos: vibrações de deformação axial (*stretching*) e de deformação angular (*bending*) (figura 3.1) [16].

Ao submeter uma dada substância à radiação infravermelho, observa-se a absorção devido à transição de níveis vibracionais (~0,2 eV). Contudo, o mesmo não é observado para os níveis rotacionais, pois estes apresentam separação muito menor entre os níveis (~  $10^{-4}$  eV).



Figura 3.1: Esquema dos modos vibracionais moleculares. Figura retirada de [17].

A espectroscopia por absorção de infravermelho consiste na determinação de bandas de absorção de energia na região do infravermelho da radiação incidente pelo material estudado. Como os níveis de energia são característicos das ligações químicas, é possível determinar a existência de alguns compostos conhecendo as bandas de absorção de uma dada amostra.

No espectrômetro de FT-IR a radiação é colimada e em seguida dividida. Parte do feixe se dirige a um espelho móvel com velocidade v, a outra parte do feixe se diriga a um espelho fixo. Os dois feixes voltam a se encontrar no mesmo ponto onde foram divididos. O feixe reconstruído é enviado na direção da amotra e em seguida coletado por um detector. O movimento do espelho móvel resulta em um sinal, que para o comprimento

de onda  $\lambda$ , varia com  $\omega = v/\lambda$ . A varredura é repetida diversas vezes. Um interferograma médio é calculado pelo próprio programa de aquisição e a transformada de Fourier dos dados é efetuada de forma a se obter o espectro de absorção da amostra [17].

#### 3.2 Difração de Raios-X (XRD)

A técnica XRD é poderosa no estudo da estrutura de materiais na fase cristalina sólidas ou em pó [18]. Esta técnica consiste em, através de um feixe de radiação monocromática, com comprimento de onda bem conhecido, determinar para quais ângulos em torno da amostra ocorre interferência construtiva. Desta forma os ângulos de difração são conhecidos, sendo então possível determinar as distâncias interplanares d e a estrutura do material, como mostra a figura 3.2 abaixo.



Figura 3.2: Desenho esquemático da difração de raios-X. Figura retirada de [19].

As distâncias interplanares de um material são centros espalhadores isotrópicos de radiação na faixa dos raio-X. Isso ocorre por que a faixa de freqüência dos raios-X é da mesma ordem de grandeza das distâncias interatômicas nos materiais [20].

Para cada ângulo a radiação total espalhada é dada pela soma dos raios-X provenientes de cada centro espalhador que, ao se somarem, originam uma interferência construtiva, no caso de todas as componentes estarem em fase, ou destrutiva no caso em que as mesmas estiverem fora de fase. Em um cristal, a seqüência periódica de átomos funciona como um conjunto de planos cristalográficos. Estes planos são indexados através dos índices de Miller (*hkl*) [20]. Estes índices descrevem o conjunto de planos existentes num cristal. A posição e orientação de um plano cristalino são determinadas por três pontos do eixo do cristal, definidos pela intersecção do plano com os eixos do sistema de coordenadas da célula unitária.

A equação fundamental da técnica XRD é a Lei de Bragg (equação 3.1 abaixo) [18]:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta_{hkl} \tag{3.1}$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação,  $d_{hkl}$  é a distância interplanar e  $\theta_{hkl}$ , o ângulo do raio difratado em relação ao plano da superfície do material. n é a ordem de difração e assume apenas valores inteiros maiores ou igual a 1. Os valores de  $d_{hkl}$  de compostos padrões estão tabelados, disponíveis no sistema ICCD (JCPDS) da International Union of Crystallography.

O feixe difratado traz informações sobre a simetria e as distâncias interatômicas do cristal. Com essas informações é possível determinar a cela unitária do composto cristalino estudado [26]. Existem seis simetrias cristalinas possíveis: monoclínica, triclínica, ortorrômbica, cúbica, tetragonal e hexagonal (figura 3.3).


Figura 3.3: Figura com as seis possíveis simetrias cristalinas: 1) Monoclínica, figura retirada de [21], 2) Triclínica, figura retirada de [22], 3) Ortorrômbica simples, figura retirada de [23], 4) Cúbica, figura retirada de [24], 5) Tetragonal, figura retirada de [25] e 6) Hexagonal, figura retirada de [24].

# **3.3** Retro-espalhamento Rutherford (RBS)

O RBS faz parte de um grupo de técnicas analíticas denominado genericamente por Métodos de Análise de Materiais por Feixes Iônicos - IBA. Estas técnicas têm em comum a utilização de feixes de íons monoenergéticos com poucos  $MeV/u^1$  de energia e dezenas de nA de corrente, para quantificar composição elementar e determinar perfis elementares em diversos materiais [27]. Na técnica RBS o feixe de íons tem tipicamente

 $<sup>^1</sup>$ u: unidade de massa unificada. 1<br/>u= 1/12 da massa do  $^{12}\mathrm{C}.$ 

energia ente 0,5 e 3 MeV/u. O método é baseado no espalhamento de íons em campos coulombianos (figura 3.4). Seu limite é determinado pela resolução do detector e da eletrônica utilizada. Este limite é a capacidade do arranjo resolver pequenas diferenças de energia.

Na técnica RBS, átomos do feixe (normalmente de elementos leves) colidem com a amostra, são retro-espalhados e coletados em detectores de barreira de superfície. Na colisão, parte da energia do átomo incidente é transferida para os átomos da amostra. A razão entre a energia do íon antes e depois do espalhamento depende da razão das massas entre o átomo espalhado do feixe e o átomo estacionário do alvo, o que permite a identificação da composição elementar da amostra. Porém, apenas quando a perda de energia na colisão é pequena (se comparada com a energia total do átomo do feixe) as colisões entre átomos do feixe e do alvo podem ser descritas usando a teoria de espalhamento clássico com força central, sem levar em conta qualquer influência do potencial nuclear. Neste caso as partículas podem ser aproximadas por massas puntiformes com carga positiva [27].



Figura 3.4: Desenho esquemático do método RBS. Figura retirada de [27].

Identificado o elemento, sua concentração em átomos/cm<sup>2</sup> pode ser determinada a partir da probabilidade de colisão entre os átomos do feixe incidente e os átomos da amostra (seção de choque). Para tanto é necessário saber o número de partículas detectadas, N, e a quantidade total de partículas incidentes, I. A relação entre  $N \in I$  é dada pela seção de choque de espalhamento. Como a perda de energia é proporcional ao comprimento da trajetória na amostra, é possível estabelecer uma escala de profundidade e associar a energia da partícula detectada à profundidade em que a partícula chegou. A profundidade que a partícula incidente penetrou na amostra antes de colidir pode ser determinada a partir da perda de energia na trajetória devido às colisões com os elétrons do material analisado.

Pela conservação de momento linear e energia no momento da colisão é possível calcular a razão entre a energia final E' e a inicial E da partícula espalhada. Tal razão é chamada de fator cinemático  $(K_m)$ :

$$K_m = \frac{E'}{E} = \left[ \frac{\left(1 - \left(\frac{M_1}{M_2}\right)^2 \cdot \sin^2 \gamma\right)^{\frac{1}{2}} + \frac{M_1}{M_2} \cdot \cos \gamma}{1 + \frac{M_1}{M_2}} \right]$$
(3.2)

Onde  $M_1$  é a massa do íon do feixe,  $M_2$  é a massa do átomo do alvo (com  $M_2 > M_1$ ) e  $\gamma$ , o ângulo entre a entrada do feixe e a saída do íon espalhado pelo alvo. A transferência de energia é máxima no caso limite, em que  $\theta = 180^{\circ}$ .

A seção de choque de espalhamento Rutherford no centro de massa é dada pela equação 3.3 abaixo. Esta equação é uma aproximação, pois não considera a energia de recuo do alvo, o deslocamento do centro de massa (CM), o potencial coulombiano efetivo (no caso de parâmetro de impacto grande) e as interações nucleares (no caso de parâmetro de impacto pequeno) [27].

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(E,\gamma) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \left(\frac{Z_1 \cdot Z_2 \cdot e^2}{4 \cdot E_0}\right)^2 \frac{1}{\sin^4(\frac{\gamma}{2})}$$
(3.3)

Onde  $Z_1$  é o número atômico do íon do feixe,  $Z_2$  é o número atômico do átomo da amostra e  $E_0$  a energia inicial do feixe.

# 3.4 Emissão de Raios-X por Indução de Partículas (PIXE)

O método PIXE foi proposto em 1970 por Johansson e Johansson [28]. Assim como o RBS, o PIXE também faz parte do grupo de técnicas denominado *IBA*. Os principais atrativos da técnica PIXE são que i) é uma técnica analítica não destrutiva e ii) tem poucas restrições quanto ao tamanho da amostra utilizada.

O método PIXE é baseado na espectroscopia de raios-X característicos. Nele a amostra é irradiada com um feixe de H<sup>+</sup> ou He<sup>+</sup> de alguns MeV. Os íons do feixe colidem com os elétrons atômicos, ionizando as camadas eletrônicas internas (K, L ou M) dos átomos da amostra. Quando as vacâncias resultantes da ionização são preenchidas por elétrons periféricos ocorre a emissão de raios-X característicos associados às transições eletrônicas. Raios-X provenientes de transições para a camada K (n=1 na figura 3.5) são chamados de raios-X K. Se a transição é do nível n=2 para o nível n=1, transição de menor energia possível, a linha é chamada de K<sub> $\alpha$ </sub>. Se a transição é do nível n=3 para o n=1, a linha é chamada de K<sub> $\beta$ </sub>. Da mesma forma, os raios-X provenientes de transições para a camada L são chamados de raios-X L<sub> $\alpha$ </sub>, L<sub> $\beta$ </sub> e assim por diante (figura 3.6). A energia de ligação dos vários níveis eletrônicos de energia diferem de um elemento químico para outro. Como a energia dos raios-X característicos é a diferença de energia entre esses níveis, é possível então identificar os elementos de uma amostra.





Figura 3.5: Desenho esquemático de um átomo ionizado.

Figura 3.6: Desenho esquemático do diagrama de níveis atômicos. Figura retirada de [29].

Os raios-X emitidos pela amostra são coletados por detectores semi-condutores de Si. Filtros podem ser utilizados de forma a otimizar a detecção da região de energia de interesse. Como a seção de choque de cada raio-X característico é constante durante a medida, a identificação dos elementos é feita através de uma curva de calibração canal do ADC  $\times$  energia do raio-X. Já a quantificação elementar é feita utilizando padrões com quantidade bem conhecida de, pelo menos, alguns dos elementos de interesse. Os padrões são irradiados nas mesmas condições das amostras. Da comparação entre os valores absolutos dos elementos nele contidos e da quantidade de raios-X coletados é determinada a correção experimental. O método PIXE é limitado pela absorção dos raios-X característicos pela janela do detector e é capaz de identificar e quantificar elementos com Z>10, com precisão absoluta que varia entre 5 e 30%.

A equação 3.4 abaixo é a função geral para uma análise PIXE, em função da energia do íon incidente [27]. É a partir dela que se obtém a quantificação dos elementos que compõem a amostra:

$$N_{i} = \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon_{i} \frac{N_{0} Q \rho_{j}}{A_{j} q \cdot e \rho} \int_{E_{0}}^{E} \frac{\sigma_{raio-x}(E) \cdot e^{-\frac{\mu \cos \varphi}{\rho \cos \alpha} \int_{E_{0}}^{E} \frac{(-dE')}{S(E)}}{S(E)} (-dE')$$
(3.4)

Onde  $N_i$  é o número de raios-X produzidos,  $\Omega$  é o ângulo sólido do detector e  $\varepsilon_i$ , a eficiência do detector,  $N_0$  é o número de Avogadro, Q é a carga total do feixe integrado na amostra,  $\phi$  é o ângulo de incidência do feixe e  $\alpha$ , o de saída do raio-X,  $\rho_j$  é a densidade de massa do elemento j em [g/cm<sup>3</sup>],  $A_j$  é a massa molar correspondente,  $\rho$  é a densidade de massa da amostra em [g/cm<sup>3</sup>],  $\mu$  é o coeficiente de absorção, q é o estado de carga,  $\sigma_{raio-x}$  é a seção de choque de produção de raios-X característicos e S(E) é o poder de freamento total na amostra.

No limite para alvos finos a auto-absorção é desprezível, neste caso:

$$\int_{E_0}^{E} \frac{\sigma_i(E) \cdot e^{-\frac{\mu \cos\varphi}{\rho\cos\alpha} \int_{E_0}^{E} \frac{(-dE')}{S(E)}}}{S(E)} (-dE') \cong \sigma_{raio-x}(E_0) \cdot \rho \cdot \frac{h}{\cos\varphi}$$
(3.5)

Onde h é a espessura da amostra.

Desta forma, a expressão final do PIXE para alvos finos pode ser escrita como:

$$N_i = \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon_i \frac{N_0 Q \rho_j}{A_j \cdot q \cdot e} \sigma_{raio-x}(E_0) \cdot \rho \cdot \frac{h}{\cos\varphi}$$
(3.6)

A equação 3.6 ainda pode ser simplificada em função da carga total integrada na amostra, da densidade superficial de massa da amostra e do fator de rendimento do arranjo experimental  $(r_i)$ , que é um coeficiente de calibração que é dependente de fatores geométricos:

$$N_i = r_i \cdot Q(\rho_j \cdot h) \tag{3.7}$$

no qual

$$r_i = \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon_i \frac{N_0}{A_j \cdot q \cdot e \cos\varphi} \sigma_{raio-x}(E_0)$$
(3.8)

No limite para alvos espessos a integral da equação 3.4 deve ser calculada, porém ela depende da composição da amostra, a ser determinada pelo próprio método PIXE, o que exige o uso de métodos iterativos.

# Capítulo 4

# Materiais e Métodos

# 4.1 Preparação de Amostras

Este trabalho foi desenvolvido utilizando amostras com nódulos ósseos produzidos *in vitro* por células osteoblásticas da linhagem estabelecida MG-63 originadas de osteossarcoma humano, devido ao fato de se multiplicarem mais rapidamente diminuindo o tempo de produção das amostras. Foram escolhidas células de uma linhagem estabelecida para garantir a menor variação possível.

Todo o procedimento de cultivo celular foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da USP. O laboratório possui toda a infraestrutura básica necessária para o cultivo de células como sala limpa, cabine de fluxo laminar vertical e duas estufas. Praticamente todo o material usado no processo de cultivo celular era descartável de forma a evitar contaminação.

A preparação das amostras pode ser dividida em três etapas (tabela 4.1). Porém nem sempre estas etapas seguem uma ordem linear, como pode ser observado na figura 4.1 adiante. Às vezes a primeira etapa (multiplicação garrafa) se repete por várias vezes antes de passarmos para a segunda fase do cultivo.

Multiplicação garrafa	Multiplicação placa	Mineralização
$(1^{\rm o} {\rm etapa})$	$(2^{\circ} \text{ etapa})$	$(3^{\circ} \text{ etapa})$
Início do procedimento de	As células são passadas da	Estímulo ósseo. É nesta
cultivo de células. Um tubo	garrafa para as placas de	etapa que o estrôncio é
criogênico é desconge-	cultivo. Esta etapa termina	colocado nas culturas. Es-
lado. As células são coloca-	quando as placas se tornam	ta etapa dura 21 dias.
das em uma garrafa de culti-	confluentes. Esta etapa dura	
vo. A etapa termina quando	aproximadamente 7 dias.	
a garrafa se torna confluente.		
Esta etapa dura aproxima-		
damente 21 dias.		

Tabela 4.1: Tabela com as etapas do cultivo celular.



Figura 4.1: Figura esquemática das etapas de cultivo celular.

## Primeira etapa do cultivo celular

O cultivo foi iniciado a partir de células previamente armazenadas em tubos criogênicos. Para cada início de período de cultivo celular um único tubo criogênico foi retirado da garrafa térmica com nitrogênio líquido (-196 °C) e descongelado em banho maria a 37 °C. O conteúdo do tubo foi transferido para um frasco plástico (Corning, NY, EUA), próprio para cultivo celular, estéril, com 75 cm<sup>2</sup> de área.

Um composto com 90% de meio essencial DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Gibco BRL, Rockville, EUA), suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio como sistema tampão, 10% de SFB - soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 UI/mL<sup>1</sup>

 $<sup>^1\</sup>mathrm{UI}:$  unidade internacional. Unidade vastamente usada em farmacologia.

de Penicilina, 100  $\mu$ g/mL de Estreptomicina (Gibco, NY, EUA) e 2,5  $\mu$ g/mL de Anfotericina B foi adicionado às células com a finalidade de simular o fluido corporal. Nele as células encontram o mesmo pH e as mesmas quantidades de sais minerais encontradas no corpo humano. Este composto será chamado daqui para frente de meio de cultura básico.

O frasco foi posteriormente deixado na posicão horizontal (figura 4.2), em incubadora (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) a 37 °C com ambiente interno controlado a 5% de CO<sub>2</sub>, conforme recomendação [8]. Devido ao metabolismo celular e conseqüente consumo de nutrientes e produção de metabólitos (que alteram o pH), o meio de cultura era trocado três vezes por semana. O crescimento celular foi observado em microscópio óptico invertido (Olympus, Japão).

Ao final de aproximadamente três semanas as células se multiplicaram a ponto de formar uma monocamada celular que cobre todo o fundo do frasco plástico. Neste ponto diz-se que a cultura atingiu sua confluência.



Figura 4.2: Frasco plástico com células no início do cultivo.

### Segunda etapa do cultivo celular

Após as células se tornarem confluentes, era necessário trocar as células para recipientes menores e mais convenientes para as próximas etapas do trabalho.

Para trocar as células de recipiente o meio de cultura era retirado da garrafa e as células eram dissociadas e destacadas da superfície de cultivo através da utilização de solução enzimática de tripsina, *Tryple Express* (Gibco, NY, USA), durante 2 minutos a 37 °C. Porém, se ativa durante muito tempo, a solução de tripsina pode matar as células. Para inativar a ação da tripssina 1 mL de meio de cultura básico era utilizado. A solução de tripsina, meio de cultura básico e células era colocada em um tubo de ensaio plástico com tampa e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante, composto por meio de cultura básico, solução de tripsina e células mortas era descartado e as células diluidas (ressuspensas) em 1 mL de meio de cultura básico.

Uma solução contendo 90% de um corante e 10% de meio de cultura básico com células era colocada na Câmara de Neubauer para que fosse possível contar a quantidade de células. A partir desse resultado eram semeadas  $1 \times 10^5$  células por placa plástica (Corning, NY, EUA), estéril, com 35 mm de diâmetro e adicionado meio de cultura básico até completar 2 mL. As células eram incubadas conforme descrito na primeira etapa. O meio de cultura básico das placas era trocado três vezes por semana e a visualização das células foi feita através de microscópio.

O excedente de células (células que não foram transferidas para placas plásticas) era congelado possibilitando sua reutilização. Para tanto, o restante das células era novamente centrifugado. O sobrenadante mais uma vez era desprezado e as células eram obtidas por ressuspensão em meio de congelamento, composto por 60% de DMEM, 30% SFB e 10% DMSO - Dimetil Sulfóxido ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO). O meio de congelamento com células era dividido em porções contendo da ordem de 10<sup>6</sup> células. Cada porção era colocada em um tubo criogênico (Corning, NY, EUA) com 1 mL de meio de congelamento, levados

imediatamente ao freezer (-80 °C) por 24 horas e transferidos para o tanque de nitrogênio líquido.



Figura 4.3: Placas de cultura com células MG-63.

### Terceira etapa do cultivo celular

Após a confluência das células nas placas (uma semana depois do início do cultivo), formavam-se grupos de 4 placas para dar início à produção de nódulos ósseos sob estímulo de substâncias que aceleram a mineralização das células osteoblásticas (osteoblastos). Para tanto foi preparado o que será chamado, neste trabalho, de meio de cultura para estímulo ósseo: para 2 mL de meio de cultura básico foi adicionado 100  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Sigma, St Louis, EUA) e 5 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma, St Louis, EUA). Além disso, uma solução concentrada de cloreto de estrôncio hexahidratado (SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) 1 mg/mL foi preparada para ser utilizada em adição ao meio de cultura em diversas concentrações.

Em cada período de estímulo ósseo, um grupo de 3 placas foi escolhido como grupo

de controle. Nas placas deste grupo eram utilizados somente 2 mL do meio de cultura básico. O grupo de controle é utilizado como referência durante o processo de cultivo celular, por isso este grupo não é estimulado a produzir nódulos ósseos.

Em todos os outros grupos (cada um com 4 placas) era utilizado o meio de cultura para estímulo ósseo, sendo que os grupos de placas escolhidos para serem estimulados com estrôncio no meio recebiam também alguns  $\mu$ L da solução concentrada de estrôncio. Foram utilizadas diferentes concentrações de solução de estrôncio: 1,0; 2,0; 4,1; 8,2; 16,4; 22,9 e 33,0  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio. Em cada placa eram utilizados 2 mL de solução composta pelo meio de cultura para estímulo ósseo e pela solução de estrôncio com a respectiva concentração.



Figura 4.4: Fotos das células MG-63 em duas etapas diferentes da cultura: a) Células MG-63 em confluência, ocupando todo o espaço da área de cultivo; b) Células sob estímulo. As manchas escuras são nódulos ósseos.

Desta forma, em cada período de estímulo ósseo havia um grupo com 3 placas chamado de grupo de controle, um grupo com 4 placas no qual era feito o estímulo ósseo sem a adição de estrôncio no meio, chamado de grupo branco e um ou mais grupos com 4 placas cada, no qual o estímulo era feito com alguma concentração de estrôncio adicionada ao meio de cultura para estímulo ósseo. As placas eram incubadas por 21 dias. O meio de cultura de todas as placas era trocado três vezes por semana respeitando o tipo de meio (básico ou para estímulo ósseo de acordo com cada caso) e a concentração de estrôncio utilizada.

Para confirmação da diferenciação celular durante os experimentos, os osteoblastos de pelo menos uma das placas do grupo de controle foram caracterizados segundo a atividade da enzima fosfatase alcalina, importante para a fase inicial da mineralização, como dito anteriormente. Para a caracterização, a placa com células é lavada com tampão sulfatosalino (PBS) - um isotônico não-tóxico à base de cloreto de sódio e fosfato de sódio. Em seguida adiciona-se uma solução filtrada de 0,025 g de *Naphtol Phosphate AS-MX* (Sigma, St Louis, USA) dissolvido em 500 UI de N,N-Dimetilformamida -  $C_3H_7NO$  (Merck, Alemanha) com 0,05 g de 4-cloro-2-*metilbenzenediazonium* sal - *Fast Red* -  $C_{14}H_{12}N_4O_2Cl_2ZnCl_2$  e 50 ml de *Tris-HCl* 0,05 M. A cultura era então incubada por 30 minutos a 37 °C, em seguida lavada com PBS novamente e por último fixada com formaldeído a 4%. Os osteoblastos eram visualizados em cor vermelha em microscópio.

Um outro teste feito em pelo menos uma das placas de cada grupo (com estrôncio no meio e grupo branco) era o da coloração pelo Vermelho de Alizarina, que tem a capacidade de se ligar ao cálcio depositado ajudando na visualização dos nódulos (figura 4.5). A coloração pelo Vermelho de Alizarina era realizada após os 21 dias de estímulo para a produção de nódulos ósseos. As células eram fixadas com formaldeído 4%, diluído em PBS, por 5 minutos. Em seguida, adicionava-se o corante Vermelho de Alizarina 1% (Merck, Alemanha), com pH 6,3, por 15 minutos. As culturas eram finalmente lavadas com água destilada.

Para as culturas celulares que não foram utilizadas em nenhum dos testes, o processo de cultivo é finalizado após etapa de estímulo da produção óssea (21 dias após a confluência). Todas as placas, antes de serem armazenadas, foram lavadas com PBS e depois com água destilada. O armazenamento foi feito em geladeira (ambiente seco e frio), de forma a



evitar o aparecimeto de fungos e bactérias.

Figura 4.5: As duas placas da esquerda faziam parte do grupo branco e foram coradas com Vermelho de Alizarina. As duas placas do meio foram estimuladas para produção de nódulos ósseos e também foram coradas com Vermelho de Alizarina. Como as placas estimuladas produziram mais nódulos ósseos, elas têm a cor vermela mais forte. Nas duas placas da direita foi feito o teste da fosfatase alcalina.

A tabela 4.2 a seguir mostra todas as amostras preparadas durante o trabalho. Nem todas as amostras preparadas puderam ser utilizadas nas medidas devido à contaminação de várias delas por fungos ou bactérias durante o período de cultivo, sendo inutilizadas. Os períodos de cultivo estão separados por duas linhas horizontais cada vez que um período de medidas de PIXE foi realizado. Esta demarcação mostra quais os tipos de amostra que foram irradiadas no mesmo período de medidas.

Período de preparação	tipo de amostra	$N^{\circ}$ de amostras	Testes feitos
1	controle	4	fosfatase alcalina
	branco	2	-
2	controle	3	fosfatase alcalina
	branco	1	-
3	controle	2	-
	branco	4	-
4	controle	1	-
	branco	1	-
	4,1 $\mu$ g de Sr	5	vermelho de alizarina
5	controle	2	-
	branco	2	-
	8,2 $\mu$ g de Sr	3	-
6	controle	3	fosfatase alcalina
	branco	4	vermelho de alizarina
	16,4 $\mu$ g de Sr	3	vermelho de alizarina
	33,0 $\mu$ g de Sr	1	vermelho de alizarina
7	controle	3	-
	branco	3	-
	$8,2 \ \mu g \ de \ Sr$	3	vermelho de alizarina
	16,4 $\mu$ g de Sr	2	-
	33,0 $\mu$ g de Sr	4	-
7	controle	4	fosfatase alcalina
	branco	4	vermelho de alizarina
	1,0 $\mu$ g de Sr	4	vermelho de alizarina
	2,0 $\mu$ g de Sr	4	vermelho de alizarina
	22,9 $\mu {\rm g}$ de Sr	4	vermelho de alizarina
	33,0 $\mu g$ de Sr	4	vermelho de alizarina

Tabela 4.2: Tabela com os períodos de preparação de amostras.

# 4.2 Preparação dos Padrões

Para quantificar amostras pelo método PIXE utilizando o feixe externo é necessária a utilização de padrões. Para o cálculo dos valores de rendimento neste trabalho, foram utilizados padrões contendo um sal de Sr e outro de Ca (CaO e SrO) confeccionados em mylar armados em anéis plásticos. Os padrões foram produzidos no laboratório de alvos do Laboratório Pelletron.

Os sais CaO e SrO foram depositados por evaporação a vácuo sobre mylar utilizando um canhão eletrônico com focalização eletromagnética do tipo ESV6, instalado na evaporadora Univex 450 [30]. Neste método um feixe de elétrons é focalizado no sal provocando um aquecimento que culminam em sua evaporação na direção do alvo.



Figura 4.6: Fotos da evaporadora Univex 405 do laboratório de alvos do Laboratório Pelletron.

# 4.3 Procedimento Experimental das Técnicas de Caracterização

### 4.3.1 FT-IR

As medidas de FT-IR foram realizadas no laboratório LACIFID do IFUSP. Foi utilizado um espectrômetro do tipo *Espectrum GX* da *Perkin Elmer* (figura 4.7) em conjunto com o *software* de aquisição de dados *Spectrum* versão 5.3.1. Este espectrômetro pode trabalhar com o feixe em três regiões de comprimento de onda: NIR - k entre 12800 e 4000 cm<sup>-1</sup>, MIR - k entre 4000 e 200 cm<sup>-1</sup> e FAR - k entre 200 e 10 cm<sup>-1</sup>.

Neste trabalho, utilizamos o espectrômetro somente na região MIR, porém apenas o intervalo entre 1200 e 400 cm<sup>-1</sup> foi analisado, região na qual aparecem os picos característicos das ligações de  $PO_{4^-}$ . O programa de aquisição efetuava a média de 32 medidas

por ponto para o cálculo da transformada de Fourier.



Figura 4.7: À esquerda, foto do espectrômetro Espectrum GX do laboratório LACIFID. À direita, foto do porta amostras em detalhe. O feixe passa da esquerda para a direita.

Para se realizar as medidas de FT-IR, as amostras de cultura celular tiveram de ser removidas da placa plástica, pois ela é muito espessa e absorve totalmente o feixe emitido pelo espectrômetro. Desta forma, uma amostra de branco (cultura de MG-63 sem adição de cloreto de estrôncio no meio) foi raspada com uma lâmina de bisturi e as raspas obtidas foram fixadas em fita adesiva.

Além da amostra de branco colada na fita adesiva, foram efetuadas duas outras medidas no espectrofotômetro: de uma amostra de hidroxiapatita sintética em pó, também colada em fita adesiva, para comparção, e uma somente da fita adesiva utilizada (espectro de fundo).

### 4.3.2 XRD

As medidas de XRD foram realizadas no Laboratório de Cristalografia do IFUSP. Foi utilizado um difratômetro *Rigaku* modelo *Ultima IV*, na geometria Bragg-Brentano ( $\theta$ -2 $\theta$ ) (figuras 4.8 e 4.9). O intervalo angular utilizado foi de 5 a 50° em 2 $\theta$ , com um passo de 0,05°. O tempo de aquisição de cada ponto do espectro foi de 40 segundos, o que equivale a 10 horas de medida por amostra.

# CAPÍTULO 4. MATERIAIS E MÉTODOS



Figura 4.8: Foto do difratômetro Rigaku do Laboratório de Cristalografia do IFUSP.



Figura 4.9: Foto da parte interna do difratômetro Rigaku do Laboratório de Cristalografia do IFUSP.

### 4.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

O arranjo interno do difratômetro para as medidas foi o seguinte: os raios-X foram produzidos em um gerador de 3 kW, com ânodo de Cu  $k_{\alpha}$  ( $\lambda = 1,5418$  Å), operando sob tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. Após a produção, os raios-X foram colimados por uma fenda com abertura angular de 1°. Em seguida os raios-X passaram por uma outra fenda de abertura de 10 mm. Depois de incidir na amostra, o feixe difratado foi colimado novamente por mais uma fenda também com abertura angular de 1°. Os raios-X passaram finalmente por uma fenda de abertura de 0,3 mm, de onde seguiram em direção a um monocromador curvo, com finalidade de focalizar o feixe espalhado pela amostra. Por fim, o feixe era coletado após passar por um colimador de abertura de 0,6 mm posicionado em frente ao detector cintilador.

Nas medidas de XRD duas amostras de branco e uma amostra de cultura celular com 8  $\mu$ g de estrôncio por ml de meio foram utilizadas. As amostras foram raspadas do fundo das placas plásticas com a ajuda de uma lâmina de bisturi e o pó obtido foi colocado sobre uma lâmina de vidro, com auxílio de uma fina camada de graxa de silicone para segurá-lo. Em seguida, as amostras foram montadas no porta amostras do equipamento.

Cada amostra foi medida duas vezes, uma antes e outra depois de passarem por um tratamento térmico específico com a finalidade de deixar a hidroxiapatita em fase cristalina. Este tratamento consistia em aquecer o pó obtido da raspagem do fundo das placas a 700 (5) °C por um período de 2 horas em ar, com rampa de subida e de descida de 6 °C/min.

# 4.4 Procedimento Experimental das Técnicas de Quantificação

# 4.4.1 Laboratório de Materiais e Feixes Iônicos - LAMFI

O LAMFI é um laboratório utilizado na aplicação de métodos de feixes iônicos à análise de materiais, tais como filmes finos, polímeros, obras de arte e amostras biológicas. Ele é equipado com um acelerador do tipo *Pelletron-tandem* da *National Electrostatic Corporation* (NEC), modelo *5SDH*, com *stripper* gasoso de N<sub>2</sub>. Neste acelerador é possível atingir até 1,7 MV de tensão no terminal [31].



Figura 4.10: Foto das duas fontes de íons do acelerador do LAMFI. À direita, a fonte SNICS e à esquerda, a alphatross.

Um feixe negativo é gerado a partir de uma das duas fontes de íons existentes (Alphatross e SNICS - Source of Negative Ions by Cesium Sputtering) e acelerado em vácuo em

#### 4.4. TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO

direção ao terminal, mantido em potencial positivo. No terminal está o *stripper*, no qual os íons do feixe perdem elétrons e sofrem inversão de carga. Os íons, agora positivos, passam a ser repelidos pelo potencial e são novamente acelerados, desta vez até a saída do acelerador.

Para garantir que não ocorram descargas de alta tensão entre o terminal e a carcaça do tanque, o tubo do acelerador fica envolto em gás hexafluoreto de enxofre  $(SF_6)$  pressurizado.

O LAMFI contém duas linhas de medidas no laboratório: uma linha multi-uso a  $+15^{\circ}$ , destinada basicamente a medidas de RBS, e uma linha exclusiva para medidas de PIXE em vácuo a  $-30^{\circ}$ . Uma terceira canalização, específica para medidas em ar, encontra-se em construção na canalização a  $+30^{\circ}$ , ao lado da linha multi-uso.

Em todas as medidas feitas neste trabalho, apenas a linha multi-uso, em diferentes configurações, foi utilizada e por esta razão somente ela está descrita aqui.



Figura 4.11: Desenho esquemático do acelerador do LAMFI.

#### Canalização Multi-Uso

A canalização multi-uso é composta por um dubleto de quadrupolos e uma câmara de espalhamento com 43,0 cm de diâmetro e 15,0 cm de altura. Dentro da câmara estão acomodados dois detectores de barreira de superfície e um detector de raios-X tipo Si(Li). Para irradiações em vácuo, as amostras são montadas em um porta-amostras móvel fixado a um goniômetro com cinco graus de liberdade, sendo possível o posicionamento das amostras na frente do feixe de forma automatizada, sem a quebra do vácuo na câmara. A aquisição de dados é feita por um *buffer*-multicanal acoplado a um microcomputador, no qual está instalado o software de aquisição MAESTRO.



Figura 4.12: Detalhe da câmara de espalhamento da canalização multi-uso.

## 4.4.2 Medidas de RBS dos Padrões

Medidas de RBS foram feitas para quantificar o Ca e o Sr nos padrões usados nas medidas de PIXE externo. Estas medidas foram realizadas sempre poucos dias antes das medidas dos três últimos períodos de medidas de PIXE para evitar que quaisquer mudanças nos padrões influenciassem os resultados. No primeiro período de PIXE foram utilizados padrões referenciados de CaF<sub>2</sub> e SrF<sub>2</sub> comprados da Micromatter<sup>®</sup>.

Em cada período de medidas de RBS a linha de feixe multi-uso foi utilizada na configuração de medidas em vácuo. Os padrões foram bombardeados com feixe de He<sup>+</sup> de 2,2 MeV. As partículas retro-espalhadas foram coletadas por um detector de barreira de superfície posicionado a 170°. A carga total depositada em cada padrão foi de 1,5  $\mu$ C.

A calibração em energia é feita a partir de um padrão de composição conhecida. No LAMFI é comum se fazer a calibração com um alvo composto por três camadas, uma de tântalo, outra de alumínio e uma de titânio. Um espectro típico do alvo de calibração pode ser visto na figura 4.13.



Figura 4.13: Espectro típico do alvo de calibração. A linha vermelha é uma simulação, usada na calibração em energia e espessura da amostra.

## 4.4.3 Medidas de PIXE

Durante este trabalho quatro períodos distintos de medidas PIXE foram realizados. Em todos, amostras e padrões foram irradiadas em ar por um feixe de  $H^+$  com 2,4 MeV de energia na saída do acelerador. A carga total depositada em cada amostra variou entre

10 e 20  $\mu$ C.

Para que as irradiações pudessem ser feitas em ar, uma flange com janela de *kapton* de 1,17  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> de espessura foi acoplada à câmara. As amostras foram posicionadas a aproximadamente 3,0 (3) cm da saída do feixe em um porta amostras com três graus de liberdade. Como a placa plástica na qual as amostras estavam fixadas era suficientemente grossa para que o feixe não a atravessasse, uma folha de Au com 50  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> de espessura foi usada para avaliar a carga total depositada em cada amostra. A detecção foi feita por dois detectores do tipo Si-PI *NXR-100CR* da *Amptek* com cristal de 6 mm (resolução de 140 eV para o Fe) [32]. Um detector foi posicionado enxergando a amostra e o outro, uma folha de Au posicionada entre a folha de *kapton* e o porta-amostras (figuras 4.14 e 4.15).



Figura 4.14: Foto de uma amostra posicionada para medida de PIXE externo. Além da amostra, é possível observar os dois detectores de Si-PIN e a folha de Au montada entre a amostra e a saída do feixe.

A perda de energia nas camadas pelas quais o feixe passou ao sair da canalização até chegar na amostra (ar, Au e kapton) foi simulada com o programa SRIM conforme o arranjo descrito no parágrafo anterior. O feixe simulado de H<sup>+</sup> chegava na amostra com

#### 4.4. TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO

#### 1,901 (22) MeV de energia.

Como havia muito pouco estrôncio (comparado à quantidade de cálcio) nas amostras, era necessário aumentar a carga do feixe para que o número de contagens de estrôncio fosse estatisticamente razoável. A carga nas amostras poderia ser mais alta medindo as amostras por mais tempo ou aumentando a corrente do feixe. Medir cada amostra por mais de 30 minutos não era viável devido à grande quantidade delas, assim a corrente do feixe foi aumentada. Como as amostras tinham muito cálcio, o aumento da corrente do feixe aumentava muito a quantidade de raios-X deste elemento, saturando o sistema de aquisição. Para que fosse possível uma maior corrente do feixe sem que houvesse a saturação do sistema de aquisição, um filtro de polímero mais eficiente para raios-X de baixa energia foi posicionado entre a amostra e a janela do detector, possibilitando melhorar a estatística dos raios-X de estrôncio sem aumentar o tempo de medida de cada amostra.



Figura 4.15: Foto do porta amostras usado nas medidas de PIXE externo. Nesta foto também é possível observar um padrão sendo irradiado e um dos detectores de Si-PIN.

Os valores de rendimento foram obtidos através de padrões de Sr e Ca. No primeiro período de medidas de PIXE foram utilizados padrões de  $CaF_2$  e  $SrF_2$  da Micromatter<sup>®</sup>. Do segundo período de medidas em diante foram usados padrões de CaO e SrO confeccionados em um único anel (no laboratório de alvos do Laboratório Pelletron). A mudança dos padrões se deve à maior facilidade de se utilizar um único padrão contendo tanto o cálcio quanto o estrôncio.

A tabela 4.3 abaixo apresenta as medidas realizadas correlacionando o número de amostras com a concentração de estrôncio para cada um dos períodos de medidas PIXE.

Tabela 4.3: Tabela das concentrações de estrôncio medidas em cada um dos períodos de PIXE.

período	data	Sr ( $\mu$ g/ml)	n° de amostras
1	17/01/2007	0,0	1
		4,1	5
2	11/07/2007	0,0	2
		8,2	2
3	10/01/2008	0,0	2
		8,2	2
		16,4	3
		33,0	3
4	28/05/2008	0,0	2
		1,0	4
		2,0	4
		22,9	2
		33,0	1

# Capítulo 5

# Resultados e Análise de Dados

# 5.1 Técnicas de Caracterização

### 5.1.1 FT-IR

Das medidas de FT-IR descritas na seção 4.3.1, foram obtidos os gráficos da figura 5.1. Neste espectro estão dispostos os resultados obtidos para a medida do fundo (em vermelho), de uma cultura de MG-63 sem adição de cloreto de estrôncio no meio (em verde) e da hidroxiapatita sintética em pó (em preto). Utilizando a técnica FT-IR, era esperado observar as ligações de  $PO_{4^-}$  provenientes da hidroxiapatita. As bandas de absorção características das ligações de  $PO_{4^-}$  têm comprimento de onda nas regiões de 1030, 600 e 560 cm<sup>-1</sup> [33].



Figura 5.1: Espectro FT-IR com as curvas da cultura de células MG-63, hidroxiapatita sintética e fundo. Os círculos em azul sinalizam as regiões de interesse para as ligações de  $PO_{4^-}$ .

Para melhor visualização dos resultados é interessante descontar o sinal do fundo do espectro de cada uma das amostras, porém não é possível fazer uma simples subtração de sinal, pois cada um desses espectros é regido por uma exponencial que leva em conta a espessura da amostra  $(x_i)$  e o coeficiente de absorção do material  $(\mu_i)$ , como pode ser observado na equação 5.1.

$$N = N_0 \cdot e^{-\mu x} \tag{5.1}$$

Onde  $N_0$  é o número de fótons incidente, N é o número de fótons transmitidos,  $\mu$  é o coeficiente de absorção do material e x é a espessura da amostra.

A figura 5.2 mostra um desenho esquemático que relaciona a equação 5.1 com a si-

### 5.1. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

tuação de medidas deste trabalho. O retângulo azul representa a fita adesiva (fundo) e o retângulo laranja a amostra, que pode ser de hidroxiapatita sintética ou biológica.



Figura 5.2: Desenho esquemático que relaciona a esquação 5.1 com as medidas de FT-IR.

Para descontar o sinal do fundo do espectro das amostras é necessário dividir o sinal da amostra pelo sinal do fundo (equação 5.2).

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{N_0 \cdot e^{-\mu_1 x_1} \cdot e^{-\mu_2 x_2}}{N_0 \cdot e^{-\mu_1 x_1}} = e^{-\mu_2 x_2}$$
(5.2)

Onde, como no desenho, o índice 1 representa o fundo e o índice 2 representa a amostra.

Utilizando este procedimento para descontar o sinal do fundo de cada um dos dois espectros de amostra foi obtido o gráfico da figura 5.3 adiante. Nele estão circuladas as regiões de interesse para as ligações de  $PO_{4^-}$ .



Figura 5.3: Espectro FT-IR das amostras com o fundo subtraído.

# 5.1.2 XRD

As figuras 5.4 e 5.6 mostram as curvas obtidas nas medidas de XRD. Os gráficos da figura 5.4 são referentes às amostras cultivadas sem cloreto de Sr (branco). Comparando os dois é possível verificar, que após o tratamento térmico, nas regiões onde apenas era possível identificar bandas de difração apareceram picos bem definidos.

No gráfico da figura 5.4a é possível observar o comportamento das duas amostras de MG-63 sem estrôncio que foram medidas antes do tratamento térmico. Como a quantidade de material obtida em cada cultura é muito pequena (da ordem de 1 mg) e as duas amostras analisadas mostraram as mesmas bandas de difração, elas foram somadas para facilitar a obtenção de melhor sinal após o tratamento.

No gráfico da figura 5.4b, os traços verticais azuis representam as linhas cristalográficas de referência para a hidroxiapatita (apêndice A). Quanto mais alta, mais intensa é a linha cristalográfica. As linhas verticais pretas são a extensão das linhas cristalográficas. Os círculos vermelhos são picos que não pertencem às linhas cristalográficas da referência da hidroxiapatita e a linha contínua preta é o espectro obtido na medida de XRD das duas amostras somadas de MG-63 sem entrôncio no meio (branco), após tratamento térmico. Neste espectro é possível observar vários picos bem definidos. De acordo com sistema ICCD (JCPDS), os picos mais intensos da hidroxiapatita sintética são  $2\theta$  (graus) = 22,9;  $32,2 \in 32,9$ , como pode ser observado no gráfico.

É importante ressaltar que as linhas cristalográficas de referência da hidroxiapatita foram determinadas a partir de uma amostra de hidroxiapatita sintética e que por isso pode haver uma pequena variação quanto à posição de cada pico, visto que a hidroxiapatita biológica pode conter pequenas imperfeições.

Para tentar determinar quais outros cristais fazem parte da amostra (picos circulados em vermelho que aparecem no gráfico da figura 5.4b), foi feita uma busca no banco de dados das fichas cristalográficas utilizando os valores de  $d \pm 0.02$  Å dos seis principais picos do gráfico que não são da hidroxiapatita. Os valores de d de cada um desses picos pode ser observado na tabela 5.1 adiante.



Figura 5.4: a) Gráfico dos dados de XRD das amostras de branco antes do tratamento térmico. b) Gráfico resultante da medida de XRD das amostras somadas de branco após tratamento térmico. Neste gráfico é possível observar os picos mais intensos da hidroxiapatita muito bem definidos  $(2\theta \text{ (graus)} = 22.9; 32.2 \text{ e } 32.9)$ . Este gráfico é referente a duas amostras somadas. Além dos picos obtidos nas medidas, estão dispostas as linhas cristalográficas de referência para hidroxiapatita (linhas verticais). Os círculos vermelhos são picos que não pertencem às linhas cristalográficas de referência da hidroxiapatita.

## 5.1. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Pico	$d$ $\mathring{A}$	$2\Theta$
1	3,84	23,20
2	$3,\!58$	24,85
3	2,85	31,35
4	2,66	33,70
5	2,59	34,70
6	1,92	47,30

Tabela 5.1: Tabela com os valores de d dos seis principais picos do gráfico da figura 5.4b que não são da hidroxiapatita.

Foram obtidas três possibilidades de cristais com pelo menos cinco das linhas cristalográficas procuradas. Na tabela 5.2 abaixo estão dispostos o nome, a fórmula química e a referência das linhas cristalográficas dos compostos cristalinos.

Tabela 5.2: Tabela com o nome, a fórmula química e a referência das linhas cristalográficas dos possíveis compostos cristalinos que compõem as amostras de cultura celular, além da hidroxiapatita.

Nome do composto	Fórmula química	Ref. cristalográfica	Linhas mais intensas $(2\theta)$
Fosfato de cálcio e	$Ca_8H_2(PO_4)_6\cdot 5H_2O$	PDF#26-1056	$4,7^{\circ}; 31,6^{\circ};$
hidrogênio hidratado			$31,7^{\circ}$
Fosfato de sódio	NaP	PDF#32-1143	$17,1^{\circ};\ 30,9^{\circ};\ 34,3^{\circ}$
Ciclotetrafosfato de	$Ca_2(P_4O_{12})\cdot 4H_2O$	PDF#50-0582	9,3°; 31,3°;
cálcio tetrahidratado			$21,9^{\circ}$

As figuras 5.5a, 5.5b e 5.5c mostram as linhas cristalográficas de referência desses compostos cristalinos junto com o espectro de difração obtido. Assim como no gráfico da figura 5.4b, as linhas verticais representam as linhas cristalográficas de referência com suas respectivas intensidades.

Os gráficos das figuras 5.6a e 5.6b foram obtidos por meio da análise da amostra de cultura celular com 8  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio de cultura para estímulo ósseo. O primeiro gráfico corresponde à amostra antes do tratamento térmico e o segundo, à amostra depois do tratamento. É possível observar dois picos muito bem definidos no primeiro

gráfico, um próximo de  $2\theta = 30^{\circ}$  e outro próximo de  $2\theta = 45^{\circ}$ . Com o aquecimento esses picos não aparecem mais, o que indica que eram possivelmente do material plástico da placa de cultura que foi raspado junto com a amostra e evaporou durante o tratamento térmico.

Com relação aos picos da hidroxiapatita, eles não aparecem antes do tratamento e aparecem depois, porém bem menos definidos do que no espectro da amostra sem cloreto de estrôncio (figura 5.4b). Mais uma vez as linhas cristalográficas de referência estão representadas pelas linhas verticais azuis.



Figura 5.5: a) Gráfico do espectro de difração de raios-X obtido junto com as linhas cristalográficas de referência do fosfato de cálcio e hidrogênio hidratado  $(Ca_8H_2(PO_4)_6\cdot 5H_2O)$ . b) Linhas cristalográficas de referência do fosfato de sódio (NaP). c) Linhas cristalográficas de referência do cilcotetrafosfato de cálcio tetrahidratado  $(Ca_2(P_4O_{12})\cdot 4H_2O)$ .



Figura 5.6: a) Gráfico dos dados de XRD da amostra com 8  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio antes do tratamento térmico. Os picos próximos a 30° e 45° são possivelmente do plástico das placas de cultura, pois desapareceram após o tratamento térmico, como pode ser observado na figura b), gráfico dos dados de XRD da amostra com 8  $\mu$ g estrôncio por mL de meio após o tratamento térmico. Neste gráfico é possível observar os picos mais intensos da hidroxiapatita.
## 5.2 Técnicas de Quantificação

#### 5.2.1 RBS dos Padrões

#### **Espectros Obtidos**

A técnica RBS foi utilizada para se estimar a quantidade de cálcio e estrôncio nos padrões produzidos no laboratório de alvos do Laboratório Pelletron, correspondentes aos alvos usados em três dos quatro períodos de medidas PIXE realizados. A figura 5.7 mostra um espectro típico obtido com a técnica RBS. É fácil observar os picos de Sr e de Ca bem definidos e separados um do outro, facilitando a quantificação.

Como descrito na seção 3.3, a identificação do pico do cálcio e do estrôncio é feita pela sua posição no espectro de energia. Como o átomo de Sr é mais pesado, o íon de He<sup>+</sup> retroespalhado perde menos energia na colisão.



Figura 5.7: Espectro típico obtido nas medidas de RBS.

#### Análise dos Espectros

Os espectros obtidos nas medidas de RBS foram analisados utilizando o programa *RUMP* [35]. Este programa faz um ajuste de pico levando em conta a seção de choque de espalhamento elástico, a partir da demarcação da largura do pico pelo usuário. O objetivo foi obter as quantidades absolutas de estrôncio e cálcio nos padrões que posteriormente foram usados nas medidas de PIXE.

A tabela 5.3 mostra os valores absolutos de Ca e Sr de cada padrão preparado no laboratório de alvos do Laboratório Pelletron, posteriormente usados nas medidas de PIXE. As incertezas dos valores de Sr/Ca vêm da propagação das incertezas dos valores de Ca e Sr, provenientes da flutuação estatística da área de cada pico.

100 0101 ±000	ora com os rarore	s assoratos ao ea	e of aco pa
data	$Ca (g/cm^2)$	$Sr (g/cm^2)$	Sr/Ca
11/07/07	$1,30~(9)~\times 10^{-5}$	$2,85~(10)~\times 10^{-5}$	2,18(17)
10/01/08	$1,11~(5) \times 10^{-5}$	$2,54~(6) \times 10^{-5}$	2,28(11)
28/05/08	$1,59~(4) \times 10^{-5}$	$2,23~(4)~\times 10^{-5}$	1,40(5)
28/05/08	$1,66(4) \times 10^{-5}$	$2,22 (4) \times 10^{-5}$	1,33(4)

Tabela 5.3: Tabela com os valores absolutos de Ca e Sr dos padrões.

#### 5.2.2 Técnica PIXE

#### Dados Obtidos

Nos períodos de medidas com a técnica PIXE, cada medida gerou dois espectros de energia. Os detectores foram montados de forma que um deles coletasse preferencialmente os raios-X vindos da folha de Au e o outro, os raios-X vindos do porta-amostras. As figuras 5.8a, 5.8b e 5.8c são exemplos típicos de espectros obtidos.

É fácil observar que o espectro da figura 5.8a tem muito mais picos do que o espectro da figura 5.8b ou 5.8c. Isso ocorre por que o átomo de Au tem muitas linhas de raios-X característicos correspondentes às transições L e M, o que não ocorre com os átomos mais leves da tabela periódica (linhas K), que são os que aparecem no segundo e terceiro espectros.



Figura 5.8: a) Espectro típico obtido na irradiação da folha de Au e utilizado para a calibração da carga. b) Espectro típico obtido na irradiação das amostras. c) Espectro típico obtido na irradiação dos padrões.

#### Quantificação dos Picos de Sr e Ca

As áreas dos picos são diretamente proporcionais ao número de raios-X característicos emitidos por um determinado elemento da amostra pesado pelo fator de rendimento e pela carga. Para quantificar os elementos nas amostras foi utilizado o programa *Axil* [36]. Primeiro foi criado um arquivo de *input* com os dados do arranjo experimental e a calibração da energia dos raios-X característicos, que é feita discriminando alguns picos conhecidos nos espectros medidos. O programa ajusta a altura e a largura dos picos e o fundo presente no espectro. Utilizando o mesmo arquivo de *input* para todos os espectros de um mesmo período de medidas, a área dos picos do Ca e do Sr, foram determinadas as áreas dos picos de Ca e Sr, assim como as áreas dos outros elementos existentes na amostra.

A figura 5.9a mostra um ajuste de dados típico. Este é o espectro de uma amostra de cultura celular com 2,0  $\mu$ g de Sr por mL de meio. A figura 5.9b mostra o gráfico de resíduo reduzído do ajuste. Nele o eixo da ordenada é a diferença entre o valor experimental e o valor ajustado dividida pela incerteza.

A tabela 5.4 adiante contém todos os dados de contagens de estrôncio e cálcio obtidos a partir do ajuste do programa *Axil*.

## 5.2. TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO





Figura 5.9: a) Ajuste do espectro de uma das amostras com concentração de estrôncio no meio de 2  $\mu$ g por mL. b) Resíduo do ajuste da figura a).

concentração	período	contagens $\operatorname{Ca}_{k_{\alpha}}$	contages $\operatorname{Sr}_{k_{\alpha}}$	$\mathrm{Sr/Ca}_{cont}$	contagens $\operatorname{Au}_{k_{\alpha}}$
de Sr ( $\mu g/mL$ )	de PIXE				
0,0	1º		-	-	
4,1	1º	$1,087(3) \times 10^5$	$1,36(4) \times 10^3$	$1,25(3) \times 10^{-2}$	-
4,1	1º	$2,009(5) \times 10^5$	$2,37(5) \times 10^3$	$1,181(25) \times 10^{-2}$	-
4,1	1°	$1,832(4) \times 10^5$	$2,20(5) \times 10^3$	$1,202(26) \times 10^{-2}$	-
4,1	1°	$1,091(3) \times 10^5$	$1,27(3) \times 10^3$	$1,16(3) \times 10^{-2}$	-
4,1	1º	$8,236(28) \times 10^4$	$1,00(3) \times 10^3$	$1,21(4) \times 10^{-2}$	-
0,0	2°	$2,082(15) \times 10^4$	-	-	-
0,0	2°	$9,11(10) \times 10^3$	-	-	-
8,2	2°	$4,243(21) \times 10^4$	$6,55(26) \times 10^2$	$1,54(6) \times 10^{-2}$	-
8,2	$2^{\circ}$	$3,528(19) \times 10^4$	$5,16(23) \times 10^2$	$1,46(7) \times 10^{-2}$	-
0,0	3°	$1,4451(28) \times 10^5$	$1,5(3) \times 10^{1}$	$1,00(20) \times 10^{-4}$	$3,060(17) \times 10^4$
0,0	3°	$3,415(19) \times 10^5$	-	-	$3,211(22) \times 10^4$
8,2	$3^{\circ}$	$9,84(10) \times 10^3$	$1,62(11) \times 10^2$	$1,65(11) \times 10^{-2}$	$1,027(3) \times 10^5$
8,2	3°	$5,94(8) \times 10^3$	$9,7(10) \times 10^{1}$	$1,63(17) \times 10^{-2}$	$1,410(3) \times 10^5$
16,4	3°	$1,353(12) \times 10^4$	$2,18(15) \times 10^2$	$1,61(11) \times 10^{-2}$	$1,234(3) \times 10^5$
16,4	3°	$1,584(13) \times 10^4$	$2,28(15)\times10^2$	$1,44(10) \times 10^{-2}$	$1,067(3) \times 10^5$
16,4	3°	$4,489(21) \times 10^4$	$7,30(27) \times 10^2$	$1,63(6) \times 10^{-2}$	$8,295(27) \times 10^4$
33,0	$3^{\circ}$	$2,51(5) \times 10^3$	$2,1(5) \times 10^{1}$	$8,4(20) \times 10^{-3}$	$1,730(4) \times 10^5$
33,0	$3^{\circ}$	$1,00(4) \times 10^3$	$2,0(20) \times 10^{0}$	$2,0(20) \times 10^{-3}$	$1,051(3) \times 10^5$
33,0	$3^{\circ}$	$3,57(24) \times 10^2$	$1,3(4) \times 10^{1}$	$3,6(11) \times 10^{-2}$	$1,011(3) \times 10^5$
0,0	4º	$1,922(5) \times 10^5$	$2,6(6) \times 10^{1}$	$1,4(3) \times 10^{-4}$	$9,147(27) \times 10^4$
0,0	4º	$9,707(24) \times 10^4$	$1,20(20) \times 10^{1}$	$1,20(20) \times 10^{-4}$	$7,\!655(25)\! imes\!10^4$
1,0	4°	$3,057(13) \times 10^4$	$7,8(6) \times 10^{1}$	$2,55(20) \times 10^{-3}$	$7,830(25) \times 10^4$
1,0	4°	$3,233(14) \times 10^4$	$9,4(7) \times 10^{1}$	$2,91(22) \times 10^{-3}$	$7,614(25) \times 10^4$
1,0	4º	$2,271(11) \times 10^4$	$7,5(6) \times 10^{1}$	$3,30(26) \times 10^{-3}$	$6,651(23) \times 10^4$
1,0	4º	$2,272(6) \times 10^4$	$6,5(3) \times 10^{1}$	$2,86(13) \times 10^{-3}$	$5,511(21) \times 10^4$
2,0	4°	$3,147(13) \times 10^4$	$1,59(9) \times 10^2$	$5,05(29) \times 10^{-3}$	$7,489(25) \times 10^4$
2,0	4°	$8,422(20) \times 10^4$	$5,50(18) \times 10^2$	$6,53(21) \times 10^{-3}$	$8,361(26) \times 10^4$
2,0	4°	$1,579(6) \times 10^4$	$8,4(4) \times 10^{1}$	$5,32(25) \times 10^{-3}$	$6,026(22) \times 10^4$
2,0	4º	$2,241(11) \times 10^4$	$1,36(8) \times 10^2$	$6,1(4) \times 10^{-3}$	$5,405(21) \times 10^4$
22,9	4º	$5,82(14) \times 10^2$	$2,80(20) \times 10^{1}$	$4,8(4) \times 10^{-2}$	$1,070(3) \times 10^5$
22,9	4º	$2,54(10) \times 10^2$	$6,0(10) \times 10^0$	$2,4(4) \times 10^{-2}$	$7,174(24) \times 10^4$
33,0	4º	$3,93(12) \times 10^2$	$9,0(10) \times 10^{0}$	$2,29(26)\times10^{-2}$	$7,142(24) \times 10^4$

Tabela 5.4: Tabela com os valores de contages de Ca e Sr de todas as amostras.

#### Determinação do Fator de Correção do Arranjo Experimental

Foi avaliado para cada período de medidas de PIXE o fator de correção do arranjo experimental (Y). Este fator foi determinado dividindo a razão  $Sr/Ca_{cont}$ , obtida pelo ajuste dos picos  $Ca_{k_{\alpha}}$  e  $Sr_{k_{\alpha}}$  usando o programa Axil (método PIXE) para os alvos padrões, pela razão  $Sr/Ca_{RBS}$  obtida pelo método RBS (ajuste do programa RUMP) (equação 5.3). O fator de correção obtido para cada um dos períodos de medidas de PIXE está na tabela 5.5 adiante. Novamente as incertezas dos valores de Sr/Ca vêm da propagação das incertezas dos valores de Ca e Sr, que por sua vez estão relacionadas à flutuação estatística.

$$Y = \frac{Sr/Ca_{cont}}{Sr/Ca_{RBS}} \tag{5.3}$$

Tabela 5.5: Tabela com o fator de correção para cada um dos períodos de medidas de PIXE.

data do período	fator de correção
17/01/07	0,300(31)
11/07/07	0,176(14)
10/00/08	0,190(10)
28/05/08	0,296(11)

#### Valores de Sr/Ca

Os valores finais (Sr/Ca<sub>corr</sub>) para cada uma das amostras foi obtido dividindo-se o valor de contagens obtido para o pico  $k_{\alpha}$  do estrôncio pelo valor de contagens do pico  $k_{\alpha}$  do cálcio e pelo valor do fator de correção do arranjo do respectivo período (equação 5.4). O gráfico com todos os valores de Sr/Ca em função da concentração de Sr no meio pode ser visto na figura 5.10 mais adiante.

$$Sr/Ca_{corr} = \frac{Sr_{k_{\alpha}}}{Ca_{k_{\alpha}} \cdot Y}$$
(5.4)

 $\operatorname{Sr}_{k_{\alpha}}$  é o valor obtido no ajuste do Axil do pico  $k_{\alpha}$  do Sr,  $\operatorname{Ca}_{k_{\alpha}}$  é o valor obtido no ajuste do Axil do pico  $k_{\alpha}$  do Ca e Y é o fator de correção do arranjo experimental (equação 5.3).



Figura 5.10: Gráfico com os valores finais de Sr/Ca nas amostras pela concentração de estrôncio no meio de cultura para estímulo ósseo.

A análise dos dados obtidos com técnica PIXE mostrou que a razão Sr/Ca aumenta linearmente para adição de baixas concentrações de estrôncio no meio de cultura, até 8  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio. Para concentrações entre 8 e 16  $\mu$ g por mL de meio de cultura, a razão Sr/Ca parece permanecer constante e para altas concentrações o comportamento não fica bem definido.

Outro ponto estudado foi a quantidade de cálcio total nas culturas. Ela é diretamente proporcional à quantidade de nódulos ósseos mineralizados pelas células. Assim, com os mesmos dados também é possível visualizar qualitativamente para quais concentrações de estrôncio no meio houve uma maior mineralização de cálcio pelas células (figura 5.11 a seguir). Para calcular a quantidade normalizada de cálcio por cultura foi necessário dividir as contagens do pico  $\operatorname{Ca}_{k_{\alpha}}$  de cada espectro pela carga total depositada na amostra.

Para determinar a carga depositada em cada amostra foi feito o ajuste do espectro de Au obtido simultaneamente ao espectro de cada amostra. As contagens da linha L3M5 do Au (linha mais intensa do espectro do Au) foram determinadas com o Axil usando o mesmo procedimento descrito anteriormente. A relação entre as contagens da linha L3M5 e a carga real em  $\mu$ C foi determinada normalizando um espectro de Au à carga integrada medida por um copo de faraday.



Figura 5.11: Gráfico com a quantidade de cálcio mineralizada pelas células em função da concentração de estrôncio no meio de cultura.

O gráfico da figura 5.11 mostra que a quantidade de cálcio mineralizado por cultura celular diminui com o aumento da concentração de estrôncio. Este gráfico, assim como o da figura 5.10, está de acordo com o observado durante o período de preparação de amostras. As culturas de MG-63 com maior concentração de estrôncio no meio tinham visivelmente uma menor produção de nódulos ósseos.

## Capítulo 6

## Discussão

### 6.1 Caracterização

#### 6.1.1 FT-IR

Como explicado anteriormente, o objetivo das medidas de FT-IR era determinar a existência de ligações de  $PO_{4^-}$  nas amostras de nódulos ósseos. Como parâmetro de comparação é apresentada a figura 6.1, retirada da referência [34]. Nesta figura é possível observar apenas duas regiões do espectro de FT-IR, as regiões entre 700 e 450 cm<sup>-1</sup> e entre 1200 e 900 cm<sup>-1</sup> (regiões onde há picos de absorção de infravermelho por moléculas de  $PO_{4^-}$ ).

Os espectros da figura 6.1 foram obtidos a partir de medidas de absorção de FT-IR de hidroxiapatita sintética com várias concentrações de estrôncio no ambiente de crescimento e de nódulos ósseos produzidos por células de rato (UMR-106), também para diversas concentrações de estrôncio no meio de cultura. Estas medidas tinham como um dos objetivos confirmar a produção de hidroxiapatita biológica nos nódulos ósseos por meio da determinação da existência de ligações de  $PO_{4-}$  através da técnica FT-IR.

Observando os espectros obtidos é fácil notar que para uma mesma concentração de estrôncio no ambiente de formação da hidroxiapatita, as amostras de hidroxiapatita sintética têm os picos mais bem definidos do que as amostras de hidroxiapatita biológica. Além disso, conforme a concentração de estrôncio no meio aumenta os picos vão se tornando menos definidos, tanto nas amostras de hidroxiapatita sintética quanto nas de hidroxiapatita biológica.



Figura 6.1: Resultados obtidos com a técnica FT-IR para duas regiões de interesse: 700-450 cm<sup>-1</sup> (figuras  $A \in B$ ) e 1200-900 cm<sup>-1</sup> (figuras  $C \in D$ ). Medidas feitas em células ósseas de ratos (A, B) e hidroxiapatita sintética (C, D) para diferentes concentrações de estrôncio no ambiente de formação do mineral. Figura retirada de [34].

A figura 6.2 destaca nos espectros obtidos para as amostras deste trabalho as duas regiões de número de onda destacadas na figura de referência (figura 6.1). A primeira análise a ser feita é que as estruturas observadas no espectro inteiro estão restritas às regiões destacadas (mesma região de número de onda do espectro da referência). Ressaltamos que nossos dados de hidroxiapatita biológica devem ser comparados com a curva correspondente a 0  $\mu$ g/mL de Sr da referência, pois apenas uma amostra de cultura de branco foi analisada. Além disso, a forma como a hidroxiapatita sintética usada neste trabalho foi formada não é conhecida e por isso não é possível afirmar qual das concentrações da referência ela se equivale. No entanto, como a estrutura na região entre 700 e 450 cm<sup>-1</sup> apresenta três picos bem definidos, é mais provável que a concentração de estrôncio seja baixa.

Comparando as estruturas existentes na figura 6.2a com o espectro equivalente da referência, é possível observar que elas têm o mesmo padrão, tanto no espectro das amostras de cultura celular quanto no espectro da hidroxiapatita sintética. Da mesma forma, a estrutura que aparece na figura 6.2b também pode ser identificada na figura 6.1. Estes resultados indicam a provável existência de ligações de  $PO_{4^-}$ , que é uma das evidências da formação de hidroxiapatita.



Figura 6.2: Detalhe das regiões a) entre 700 e 450 cm<sup>-1</sup> e b) entre 1200 e 900 cm<sup>-1</sup> do gráfico obtido nas medidas de FT-IR (figura 5.3).

Além disso, é fácil observar, tanto nos espectros deste trabalho quanto nos da referência, que os picos são mais definidos quando se trata da amostra de hidroxiapatita sintética do que da amostra de hidroxiapatita produzida *in vitro*. Esta falta de definição indica uma menor cristalinidade, um menor tamanho dos cristais de hidroxiapatita ou menor quantidade de  $PO_{4^-}$  (que pode ser um indicativo de menos moléculas de hidroxiapatita).

#### 6.1.2 XRD

Através dos resultados obtidos com a técnica XRD foi possível observar que os nódulos ósseos formados pelas células MG-63 são amorfos, pois não há picos bem definidos nos espectros de XRD obtidos nas medidas das amostras sem qualquer tipo de tratamento. Os dados também confirmam que estes nódulos se tornaram cristalinos após tratamento térmico, pois foi possível, principalmente no espectro das amostras sem estrôncio, observar picos bem definidos.

As linhas mais intensas da hidroxiapatita aparecem tanto na amostra sem adição de cloreto de estrôncio, quanto na amostra com 8  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio, porém nesta segunda amostra estes picos estão menos definidos devido à pouca estatística (figuras 5.4b e 5.6b respectivamente). A baixa estatística impossibilita a visualização das linhas menos intensas, lembrando que apenas as quantidades relativas a uma amostra com estrôncio foi analisada e duas amostras sem estrôncio somadas foram medidas para dar origem ao gráfico da figura 5.4b. Uma possível explicação para esta baixa estatística é a hipótese de que os cristais de hidroxiapatita com estrôncio são menores e por isso o feixe incidente é menos difratado. Além disso, é possível que o estrôncio torne a hidroxiapatita menos cristalina, o que também diminui a fração do feixe que é difratada pelos átomos. Métodos de microscopia eletrônica podem ser utilizados para determinar o tamanho dos cristais formados, porém a menor cristalinidade da hidroxiapatita com alguns átomos de cálcio substituídos por átomos de estrôncio foi verificada em outros estudos e está de acordo com o observado na figura 6.1 [33, 34].

Os resultados também confirmaram a presença de hidroxiapatita nos nódulos formados pelas culturas celulares. No gráfico da amostra de cultura sem adição de sal de estrôncio, após o tratamento térmico, é possível observar uma boa concordância entre as linhas cristalográficas de referência da hidroxiapatita, a posição em  $2\theta$  e a intensidade dos picos obtidos, como mostra a figura 5.4b. É possível observar que alguns desses picos

#### 6.1. CARACTERIZAÇÃO

não estão exatamente na mesma posição prevista pelas linhas cristalográficas, indicando uma diferença entre as linhas cristalográficas de referência (hidroxiapatita sintética) e as amostras biológicas analisadas neste trabalho. A explicação para este fato é que os cristais produzidos por células podem conter pequenas imperfeições, mudando as distâncias interplanares e conseqüentemente afetando levemente a posição de cada pico.

Além dos picos da hidroxiapatita, é possível observar a existência de outros picos, sugerindo a contribuição de outros compostos cristalinos. Respeitando os critérios estabelecidos no capítulo 5 (concordância com pelo menos 5 linhas), três compostos cristalinos foram testados: o fosfato de cálcio e hidrogênio hidratado (Ca<sub>8</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>·5H<sub>2</sub>O), o fosfato de sódio (NaP) e o Ciclotetrafosfato de cálcio tetrahidratado (Ca<sub>2</sub>(P<sub>4</sub>O<sub>12</sub>)·4H<sub>2</sub>O), figura 5.5. Apesar dessa coincidência com as linhas não pertencentes ao conjunto da hidroxiapatita, os compostos cristalinos fosfato de sódio e Ciclotetrafosfato de cálcio tetrahidratado podem ser descartados pois suas linhas cristalográficas mais intensas não aparecem no espectro de XRD obtido, eliminando qualquer possibilidade da existência desses compostos. Já o fosfato de cálcio e hidrogênio hidratado apresenta concordância com linhas cristalográficas em quase todos os picos que não são da hidroxiapatita. Porém não é possível afirmar com segurança a existência desse composto pois sua linha cristalográfica mais intensa se localiza numa região angular que não foi irradiada ( $2\theta = 4, 7^{\circ}$ ) como é possível observar na tabela 5.2 e no apêndice B.

Através dos espectros de XRD também é possível determinar a separação entre os diferentes planos cristalográficos de um cristal (d). Estudos mostram variações da ordem de 0,2° do plano 211 entre amostras de hidroxiapatita com e sem estrôncio [37]. Variações da mesma ordem de grandeza também podem ser encontradas nos planos 002 e 310 deste composto cristalino. Seria necessária uma maior quantidade de material para se obter um espectro com resolução de picos suficiente para este tipo de análise. A falta de uma melhor definição dos picos da amostra de hidroxiapatita com Sr impossibilita esta análise nos dados obtidos neste trabalho.

### 6.2 Quantificação da razão Sr/Ca

A análise dos dados obtidos por meio da técnica PIXE mostrou que a razão Sr/Ca apresenta comportamentos distintos em função da concentração de estrôncio no meio, como pode ser observado na figura 5.11. Esta razão aumenta linearmente nas culturas com baixas concentrações de estrôncio, até aproximadamente 8  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio. Para concentrações entre 8 e 16  $\mu$ g por mL de meio de cultura, a razão Sr/Ca parece permanecer constante e para altas concentrações não foi possível definir se permanece constante ou diminui. Trabalhos anteriores previram uma limitação teórica de que apenas um íon de cálcio em cada dez pode ser substituído por estrôncio na hidroxiapatita [38], sugerindo um patamar para a razão Sr/Ca em função da concentrações de estrôncio no meio. Porém, os resultados obtidos para altas concentrações de estrôncio apresentam uma indefinição com relação à existência da limitação. Em particular, nesta concentração os pontos estão muito dispersos entre si e muitos deles têm incerteza alta, dificultando a identificação de qualquer padrão comportamental.

Uma primeira hipótese para explicar a grande flutuação entre os pontos nesta concentração de estrôncio no meio de cultura para estímulo ósseo está relacionada a possíveis diferenças na fase de preparação das amostras, como por exemplo a variação da temperatura da estufa ou do ambiente de CO<sub>2</sub> ou a contaminação por estrôncio. Porém, outras amostras com distintas concentrações de estrôncio (1,0, 2,0 e 22,9  $\mu$ g/mL) foram produzidas nas mesmas condições (tabela 4.2), e não apresentaram tais comportamentos. O fato das amostras com 1,0 e 2,0  $\mu$ g de Sr por mL de meio apresentaram flutuação muito pequena sugere que esta hipótese pode ser descartada. A compatibilidade entre os dados referentes às amostras com 1,0 e 2,0  $\mu$ g/mL sugere também que não houve problemas na fase de medidas, pois muitas delas além de produzidas nas mesmas condições que as amostras de 22,9 e 33,0  $\mu$ g de Sr por mL de meio (tabela 4.3), foram irradiadas no mesmo período de medidas PIXE. Um ponto interessante a ser salientado é o fato das amostras com baixa concentração de estrôncio no meio terem distribuição de nódulos praticamente constante, enquanto que as amostras com muito estrôncio no meio apresentaram os poucos nódulos formados muito dispersos na placa de cultura.



Figura 6.3: Gráfico da média ponderada (círculos) e média simples (triângulos) dos valores da razão Sr/Ca obtidos com o método PIXE. Este gráfico foi plotado na mesma escala do gráfico da figura 5.10 para facilitar a comparação entre os dois.

Como guia de comparação, o gráfico da figura 6.3 mostra os valores médios da razão Sr/Ca para cada uma das concentrações de estrôncio no meio obtidos nas medidas PIXE. São apresentados pontos da média ponderada pela incerteza (círculos) e da média simples tendo o desvio padrão como incerteza (triângulos). Para os pontos referentes à região com baixa concentração de estrôncio, nem a média ponderada nem a média simples trazem qualquer informação nova. Porém, para os pontos com alta concentração de estrôncio (principalmente 22,9 e 33,0  $\mu$ g) o desvio padrão da média mostra quão grande é a dispersão dos dados, indicando que pode haver uma dificuldade no funcionamento metabólico das células quando há muito estrôncio no meio. A média ponderada reforça a possibilidade de que a razão Sr/Ca diminui quando a concentração de estrôncio no meio aumenta muito, pois para a concentração de 33,0  $\mu$ g de estrôncio três dos quatro pontos existentes têm a razão Sr/Ca menor do que 0,1 e o único ponto para o qual ela é mais alta tem a maior das incertezas, diminuindo seu peso.

Lembrando que, em teoria, apenas 10% dos átomos de cálcio podem ser substituidos por átomos de estrôncio, temos, em termos de massa, uma razão Sr/Ca máxima de 87, 6/400, 8 = 0, 22. O valor máximo obtido para a razão Sr/Ca pelos resultados de PIXE foi de 0,1, que corrobora a previsão teórica mencionada.

Uma razão para o auto valor relativo da incerteza dos pontos está relacionado com a baixa estatística nesses espectros. Deve ser salientado que uma menor quantidade de nódulos ósseos produzidos podia ser notada, mesmo sem a ajuda de microscópio, nas culturas de MG-63 com alta concentração de Sr no meio e ficam evidente quando foi feita a coloração por Vermelho de Alizarina, como pode ser observado na figura 6.4.

A dificuldade que as culturas de MG-63 apresentaram para mineralizar nódulos ósseos com altas concentrações de estrôncio no meio é corroborada pelo gráfico da figura 5.11, no qual é possível observar que a quantidade de cálcio mineralizada diminuiu em mais de duas ordens de grandeza conforme a concentração de estrôncio aumentou no meio. Esta diminuição de produção mineral a altas concentrações de estrôncio pode estar ligada a uma eventual mudança metabólica das células em função da quantidade de estrôncio, inviabilizando o bom funcionamento fisiológico das células, justificando uma mudança no valor da razão Sr/Ca. No entanto, apesar de menor, a distribuição de nódulos continua sendo homogênia, indicando que qualquer que seja o processo que esteja ocorrendo, ocorre igualmente para todas as células da cultura.



Figura 6.4: Coloração por Vermelho de Alizarina em células com três diferentes concentrações de estrôncio no meio de cultura para estímulo ósseo. A figura a) é de uma cultura sem estrôncio no meio de cultura ; a figura b) é de uma cultura celular com 16  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio de cultura ; a figura c) é de uma cultura de MG-63 com 33  $\mu$ g de estrôncio por mL de meio de cultura. É possível observar a diminuição de nódulos ósseos produzidos conforme a concentração de estrôncio no meio é aumentada.

Para entender melhor o mecanismo de troca dos íons de cálcio por íons de estrôncio na hidroxiapatita biológica é necessário um conhecimento mais aprofundado de como os nódulos ósseos são formados pelas células. É possível que sua formação se dê externamente às células. Se este for o caso, parte da troca iônica provavelmente se deve a um balanço termodinâmico dos sais no meio extracelular. Porém o cálcio tem papel fundamental no metabolismo celular. Como o estrôncio ocupa todas as mesmas funções que o cálcio, pode ser que mudanças metabólicas ocorram nas células quando há muito estrôncio no meio intracelular.

CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO

# Capítulo 7

## **Considerações Finais**

No presente trabalho foi possível caracterizar o mineral formado pelas células MG-63 como hidroxiapatita ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ). A técnica FT-IR comprovou a existência de ligações de  $PO_{4^-}$  e as medidas de XRD mostraram que após o tratamento térmico adequado as amostras passaram a apresentar picos que podem ser interpretados como sendo da hidroxiapatita pela boa concordância com as linhas cristalográficas de referência deste mineral. Além disso, foi mostrado que existe pelo menos mais um outro composto cristalino nas amostras, sendo o principal candidato o fosfato de cálcio e hidrogênio hidratado ( $Ca_8H_2(PO_4)_6\cdot 5H_2O$ ).

Com relação à quantificação da razão Sr/Ca foi possível observar que esta relação tende a um valor constante, por volta de 1 íon de Sr para cada 10 íons de Ca, concordando com a previsão teórica. Porém, para altas concentrações de estrôncio no meio (33,0  $\mu$ g/mL de meio) a razão Sr/Ca aparentemente diminui. A provável hipótese para este comportamento é uma possível mudança metabólica causada pelo excesso de estrôncio no meio intracelular, causando o mal funcionamento fisiológico das células osteoblásticas. Esta hipótese é reforçada pelo gráfico da quantidade total de cálcio (figura 5.11) que mostra que a mineralização diminui conforme a concentração de estrôncio no meio aumenta.

Como o estrôncio é utilizado no tratamento de osteoporose (ranelato de estrôncio),

vários estudos *in vivo* sobre a toxicidade deste elemento já foram feitos. Em muitos deles mudanças na cristalinidade dos ossos e problemas renais foram reportados, porém não existe um caso sequer relatado de morte por altas taxas de estrôncio no organismo. Desta forma o estrôncio não pode ser considerado um elemento tóxico [39]. No entanto, é possível afirmar que, apesar do estrôncio não ser considerado um elemento tóxico, em grandes quantidades ele pode alterar funções metabólicas das células e com isso prejudicar a mineralização óssea.

A continuação natural deste trabalho seria relacionar a razão Sr/Ca com a temperatura fixando a concentração de estrôncio no meio. Este estudo necessita de outra linhagem celular, pois as células da linhagem MG-63 não são capazes de sobreviver a mudança de mais de meio grau para cima ou para baixo de sua temperatura ótima de crescimento. Uma opção é usar linhagens com a hFOB 1.19 que se multiplica bem na faixa de temperatura entre 33,5 e 39,5 °C [40]. Levando em conta a diferença de temperatura necessária para observar diferenças na razão Sr/Ca em corais e em diversas regiões do corpo é esperado que esta faixa de temperatura já seja suficiente para observar alguma mudança significativa.

Comparando os resultados da razão Sr/Ca obtidos neste trabalho com os valores medidos nos óssos de cães e do jacaré estudados anteriormente, é possível observar que os nódulos ósseos formados com a mais baixa concentração de estrôncio utilizada no meio de cultura (1,0  $\mu$ g de Sr por mL de meio) apresentaram valores da mesma ordem de grandeza que os registrados nas medidas dos óssos (10<sup>-3</sup>). Em particular, o valor da razão Sr/Ca mais baixo obtido na hidroxiapatita *in vitro* foi 8,6(7) ×10<sup>-3</sup>. Portanto, para o estudo da relação entre a razão Sr/Ca e a temperatura seria interessante fixar a concentração de estrôncio no meio em região anterior ao patamar, pois esta região é mais próxima da razão encontrada nas amostra medidas de hidroxiapatita *in vivo* e não é afetada por possíveis limitações relacionadas ao patamar.

Seria interessante também o desenvolvimento de um modelo que pudesse descrever os resultados obtidos levando em conta a dificuldade que as células têm de produzir nódulos ósseos com altas concentrações de estrôncio no meio. No entanto, para esta finalidade seria necessário o conhecimento aprofundado da formação dos nódulos ósseos pelos osteoblastos. Um dos pontos é entender se os nódulos ósseos são formados dentro das células e excretados pelas mesmas, sendo necessário primeiramente o transporte dos minerais para o meio intracelular, ou se todo o processo de mineralização ocorre do lado de fora da célula (meio extracelular). Também é importante entender todas as funções metabólicas das células nas quais o cálcio tem papel fundamental, pois o estrôncio é incorporado em todas elas [39].

Por fim a caracterização da hidroxiapatita formada pelas células com e sem estrôncio pode ser refinada através do estudo das distâncias interplanares nas duas situações usando a técnica XRD e um estudo do tamanho dos cristais formados através de técnicas de microscopia eletrônica.

# Apêndice A

# Ficha Cristalográfica da Hidroxiapatita

PDF#09-0432

Hidroxiapatita sintética -  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ Radiation=Cu-K<sub> $\alpha_1$ </sub> Lambda=1,5406 A° Hexagonal, P63/m(176) Z=2 Density(c)=3,08 Vol=528,8

CELL: 9,418 x 9,418 x 6,884 <<br/>90,0 x 90,0 x 120,0>

$2\theta$	$d(\text{\AA})$	I(f)	(h k l)	d(c)	$\Delta$	2T(c)	$\Delta$
10,820	8,1700	12,0	(100)	8,1562	0,0138	10,838	-0,018
16,841	5,2600	6,0	(101)	$5,\!2607$	-0,0007	$16,\!839$	0,002
18,785	4,7200	4,0	(110)	4,7090	0,0110	18,829	-0,044
21,819	4,0700	10,0	(200)	4,0781	-0,0081	21,775	0,044
22,902	3,8800	$10,\!0$	(111)	3,8867	-0,0067	22,862	0,040

$2\theta$	$d(\text{\AA})$	I(f)	( h k l)	d(c)	$\Delta$	2T(c)	$\Delta$
25,354	3,5100	2,0	(201)	3,5087	0,0013	25,364	-0,010
25,879	3,4400	40,0	$(0\ 0\ 2)$	3,4420	-0,0020	25,863	$0,\!015$
28,126	3,1700	12,0	(102)	3,1712	-0,0012	28,115	0,011
28,966	3,0800	18,0	(210)	3,0828	-0,0028	28,939	0,027
31,773	2,8140	100,0	(211)	2,8135	0,0005	31,778	-0,005
32,196	2,7780	60,0	(112)	2,7788	-0,0008	32,186	0,010
32,902	2,7200	60,0	(300)	2,7187	0,0013	32,917	-0,016
34,048	2,6310	$25,\!0$	(202)	2,6303	0,0007	$34,\!057$	-0,009
35,480	2,5280	6,0	(301)	2,5287	-0,0007	35,470	0,010
39,204	2,2960	8,0	(212)	2,2964	-0,0004	39,198	$0,\!007$
39,818	2,2620	20,0	(310)	2,2621	-0,0001	39,816	$0,\!002$
40,452	2,2280	$2,\!0$	$(2\ 2\ 1)$	2,2278	0,0002	40,456	-0,004
42,029	2,1480	$10,\!0$	(311)	2,1491	-0,0011	42,007	0,022
42,318	2,1340	4,0	(302)	$2,\!1335$	0,0005	42,329	-0,011
43,804	2,0650	8,0	(113)	2,0628	0,0022	43,853	-0,049
44,369	2,0400	$2,\!0$	(400)	2,0391	0,0009	44,390	-0,022
45,305	2,0000	6,0	(203)	1,9998	0,0002	45,309	-0,004
46,711	1,9430	30,0	(222)	1,9433	-0,0003	46,703	0,009
48,103	1,8900	$16,\!0$	(312)	1,8904	-0,0004	48,091	$0,\!011$
48,623	1,8710	6,0	(320)	1,8712	-0,0002	48,618	$0,\!005$
49,468	1,8410	40,0	(213)	1,8407	0,0003	49,476	-0,008
50,493	1,8060	20,0	(321)	$1,\!8057$	0,0003	$50,\!503$	-0,010
51,283	1,7800	12,0	(410)	1,7798	0,0002	51,288	-0,005
52,100	1,7540	$16,\!0$	(402)	1,7543	-0,0003	52,090	0,011
53,143	1,7220	20,0	(004)	1,7210	0,0010	53,177	-0,033
54,440	1,6840	4,0	(104)	1,6839	0,0001	54,443	-0,003

$2\theta$	$d(\text{\AA})$	I(f)	( h k l)	d(c)	$\Delta$	2T(c)	$\Delta$
55,879	1,6440	$10,\!0$	(322)	1,6440	0,0000	55,881	-0,002
57,128	1,6110	8,0	(313)	1,6110	0,0000	57,130	-0,002
58,073	1,5870	$_{4,0}$	(501)	1,5873	-0,0003	58,062	0,012
59,938	1,5420	$_{6,0}$	(420)	1,5414	0,0006	$59,\!965$	-0,026
$60,\!457$	1,5300	6,0	(331)	1,5304	-0,0004	60,440	0,017
61,660	1,5030	$10,\!0$	(214)	1,5027	0,0003	61,674	-0,014
63,011	1,4740	$12,\! 0$	(502)	1,4741	-0,0001	$63,\!007$	0,004
63,443	1,4650	$_{4,0}$	(510)	1,4649	0,0001	63,447	-0,005
64,078	1,4520	$26,\!0$	(304)	1,4541	-0,0021	63,972	0,106
65,031	1,4330	$_{9,0}$	(511)	1,4328	0,0002	65,040	-0,009
66,386	1,4070	8,0	(422)	1,4068	0,0002	66,398	-0,012
69,699	1,3480	$_{3,0}$	(512)	1,3479	0,0001	69,705	-0,005
71,651	1,3160	$10,\!0$	$(4\ 3\ 1)$	1,3161	-0,0001	71,642	0,009
72,286	1,3060	8,0	(520)	1,3060	0,0000	72,283	0,003
73,995	1,2800	$^{7,0}$	(423)	$1,\!2795$	0,0005	74,028	-0,033
75,022	1,2650	6,0	(324)	$1,\!2667$	-0,0017	74,904	0,118
75,583	1,2570	9,0	$(2\ 1\ 5)$	$1,\!2571$	-0,0001	$75,\!575$	0,009
76,154	1,2490	1,0	$(4\ 3\ 2)$	1,2494	-0,0004	76,123	0,030
77,175	1,2350	11,0	(513)	1,2347	0,0003	77,194	-0,019
78,227	1,2210	9,0	(522)	1,2211	-0,0001	78,220	0,007

## Apêndice B

# Ficha Cristalográfica do Fosfato de Cálcio e Hidrogênio Hidratado

#### $\mathrm{PDF}\#26\text{-}1056$

Fosfato de cálcio e hidrogênio hidratado -  $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$ Radiation= $CuK_{\alpha_1}$  Lambda=1,5406 A° Triclinic(Unknown), Z=2 Density(c)=2,673 Vol=1220,6 CELL: 9,529 x 18,994 x 6,855 <92,33 x 90,13 x 79,93>

$2\theta$	$d(\text{\AA})$	I(f)	(h k l)	d(c)	$\Delta$	2T(c)
4,722	18,7000	100,0	$(0\ 1\ 0)$	2,361	0,0267	0,3360
9,441	9,3600	$15,\!0$	$(0 \ 2 \ 0)$	4,720	$0,\!0534$	0,6713
9,765	9,0500	$13,\!0$	$(1 \ 1 \ 0)$	4,883	$0,\!0552$	0,6943
14,509	6,1000	$^{2,0}$	(-1 2 0)	7,254	0,0820	1,0300
16,043	5,5200	8,0	(-1 0 1)	8,021	0,0906	1,1383

$2\theta$	$d(\text{\AA})$	I(f)	(h k l)	d(c)	$\Delta$	2T(c)
$16,\!350$	5,4170	$^{2,0}$	$(0\ 2\ 1)$	8,175	0,0923	$1,\!1599$
17,001	5,2110	1,0	(1 -1 1)	8,501	0,0960	1,2058
17,370	5,1010	4,0	(-1 1 1)	8,685	0,0980	1,2318
18,411	4,8150	$^{2,0}$	(-1 3 0)	9,205	0,1038	1,3049
18,841	4,7060	$^{2,0}$	(0 - 3 1)	9,421	0,1062	1,3351
18,988	4,6700	$1,\!0$	$(0 \ 4 \ 0)$	9,494	0,1071	1,3454
19,650	4,5140	$_{3,0}$	$(0 \ 3 \ 1)$	9,825	0,1108	1,3919
19,748	4,4920	$_{3,0}$	(-1 2 1)	9,874	0,1113	1,3988
20,668	4,2940	$^{2,0}$	$(1 \ 3 \ 1)$	10,334	0,1164	1,4632
$21,\!599$	4,1110	$^{2,0}$	$(2 \ 3 \ 0)$	10,799	0,1216	1,5284
22,671	3,9190	$^{5,0}$	$(-1 \ 4 \ 0)$	11,335	$0,\!1276$	1,6033
22,908	3,8790	4,0	$(2 \ 0 \ 1)$	11,454	0,1289	1,6198
23,010	3,8620	3,0	(-2 0 1)	11,505	$0,\!1295$	1,6269
23,478	3,7860	$_{3,0}$	$(0 \ 4 \ 1)$	11,739	0,1321	$1,\!6596$
23,739	3,7450	$^{5,0}$	$(2 \ 2 \ 1)$	11,869	$0,\!1335$	$1,\!6778$
24,299	3,6600	$10,\!0$	$(-2\ 1\ 1)$	12,149	$0,\!1366$	1,7167
$25,\!487$	3,4920	8,0	$(2 \ 3 \ 1)$	12,743	0,1432	1,7993
25,871	3,4410	17,0	(2-21)	12,935	$0,\!1453$	1,8260
26,002	3,4240	20,0	$(0 \ 0 \ 2)$	13,001	0,1460	1,8350
26,362	3,3780	6,0	(-2 2 1)	13,181	0,1480	1,8600
26,905	3,3110	$7,\!0$	(-1 -5 1)	13,453	0,1510	1,8977
27,181	3,2780	$^{6,0}$	(-1 5 0)	$13,\!591$	$0,\!1525$	1,9168
27,777	3,2090	8,0	(2 5 0)	13,889	0,1558	1,9580
28,036	3,1800	8,0	$(2\ 4\ 1)$	14,018	0,1572	1,9758
28,475	3,1320	3,0	(-1 -2 2)	14,237	0,1596	2,0061
28,615	3,1170	$^{2,0}$	$(-1\ 1\ 2)$	14,307	0,1604	2,0158

$2\theta$	$d(\text{\AA})$	I(f)	(h k l)	d(c)	$\Delta$	2T(c)
29,208	3,0550	$^{5,0}$	(0 -3 2)	14,604	$0,\!1637$	2,0567
29,604	3,0150	$_{3,0}$	$(3 \ 3 \ 0)$	14,802	$0,\!1658$	2,0840
30,314	2,9460	$^{5,0}$	(-1 2 2)	$15,\!157$	0,1697	2,1328
30,655	2,9140	$_{4,0}$	(-1 5 1)	$15,\!328$	$0,\!1716$	2,1562
31,104	2,8730	$10,\!0$	$(2\ 5\ 1)$	$15,\!552$	0,1740	2,1870
31,554	2,8330	$33,\!0$	$(2 \ 6 \ 0)$	15,777	$0,\!1765$	2,2179
31,703	2,8200	32,0	(2 -4 1)	$15,\!852$	$0,\!1773$	2,2281
32,184	2,7790	$15,\!0$	(-1 -4 2)	16,092	$0,\!1799$	2,2610
32,593	2,7450	$12,\!0$	$(3 \ 3 \ 1)$	$16,\!297$	0,1821	2,2890
33,064	2,7070	8,0	$(0\ 4\ 2)$	$16,\!532$	$0,\!1847$	2,3211
33,523	2,6710	$17,\! 0$	$(0\ 7\ 0)$	16,761	$0,\!1872$	2,3524
33,968	2,6370	$12,\!0$	(1 -6 1)	$16,\!984$	$0,\!1896$	2,3827
34,236	2,6170	$^{7,0}$	(-3 3 0)	17,118	0,1911	2,4009
34,385	2,6060	$^{7,0}$	(2 -2 2)	$17,\!192$	$0,\!1919$	2,4110
34,924	$2,\!5670$	$^{5,0}$	$(-1 \ 6 \ 1)$	$17,\!462$	0,1948	2,4477
35,250	2,5440	4,0	(-1 -7 1)	$17,\!625$	$0,\!1965$	2,4698
36,100	2,4860	$^{2,0}$	(-2 5 1)	$18,\!050$	0,2011	2,5274
36,266	$2,\!4750$	$_{3,0}$	(0 5 2)	$18,\!133$	0,2020	2,5387
$36,\!526$	$2,\!4580$	$2,\!0$	$(-1 \ 7 \ 0)$	$18,\!263$	0,2034	2,5562
38,016	$2,\!3650$	$^{2,0}$	$(1 \ 8 \ 0)$	19,008	0,2114	$2,\!6567$
38,524	2,3350	$_{3,0}$	$(2\ 7\ 1)$	19,262	0,2141	2,6909
39,063	2,3040	2,0	(-3 0 2)	$19,\!531$	0,2170	2,7271
39,654	2,2710	2,0	$(3 \ 6 \ 1)$	19,827	0,2202	2,7667
39,763	2,2650	2,0	(-1 -8 1)	19,882	0,2208	2,7740
39,892	2,2580	2,0	$(0\ 6\ 2)$	19,946	0,2214	2,7826
40,700	2,2150	$^{5,0}$	(-3 5 0)	20,350	$0,\!2257$	2,8367

$2\theta$	$d(\text{\AA})$	I(f)	(h k l)	d(c)	$\Delta$	2T(c)
41,825	2,1580	2,0	(-4 -4 1)	20,912	0,2317	2,9116
42,276	2,1360	2,0	$(4 \ 4 \ 1)$	21,138	0,2341	2,9416
42,908	2,1060	3,0	$(1 \ 9 \ 0)$	21,454	0,2374	2,9835
43,297	2,0880	2,0	(-2 5 2)	21,648	0,2395	3,0092
43,848	2,0630	2,0	(-2 -7 2)	21,924	0,2424	$3,\!0457$
44,461	2,0360	2,0	(-3 6 0)	22,230	0,2456	3,0860
$45,\!257$	2,0020	3,0	(2 -6 2)	22,629	0,2498	$3,\!1385$
45,353	1,9980	3,0	(4 -3 1)	22,676	0,2503	$3,\!1447$
$45,\!545$	1,9900	3,0	$(1 \ 9 \ 1)$	22,773	0,2513	$3,\!1574$
46,358	$1,\!9570$	2,0	(-4 -2 2)	23,179	$0,\!2555$	3,2106
46,584	1,9480	6,0	(3 8 1)	23,292	$0,\!2567$	3,2255
46,890	1,9360	6,0	(-3 6 1)	23,445	0,2583	3,2454
47,071	1,9290	4,0	(2 - 3 3)	$23,\!535$	0,2592	3,2572
47,462	1,9140	4,0	$(0 \ 5 \ 3)$	23,731	0,2612	3,2828
47,914	1,8970	3,0	(-3 -7 2)	$23,\!957$	0,2636	3,3122
48,076	1,8910	3,0	$(5 \ 3 \ 0)$	24,038	0,2644	3,3227
49,268	1,8480	7,0	(-1 -10 1)	24,634	0,2706	3,4000
49,583	1,8370	7,0	(-5 -2 1)	24,791	0,2722	3,4204
49,727	1,8320	6,0	$(5\ 1\ 1)$	24,864	0,2729	3,4297
$50,\!553$	1,8040	$^{5,0}$	(-2 -10 1)	25,276	0,2772	3,4829
52,389	1,7450	3,0	(2 -9 1)	$26,\!195$	0,2865	3,6007
52,454	1,7430	$_{3,0}$	(551)	26,227	0,2869	3,6048

## **Referências Bibliográficas**

- [1] S. V. Smith et al., *Science*, **204**, 404-407 (1979);
- [2] J. W. Beck et al., *Science*, **257**, 664-647 (1992);
- [3] B. K. Linsley et. al., *Science*, **290**, 1145-1148 (2000);
- [4] M. Sponheimer et. al., Journal of Human Evolution, 48, 147-156 (2005);
- [5] Z. Campos, *Herpetological Journal*, **15**, 97-106 (2005);
- [6] P. R. dos Santos et al., Brazilian Journal of Physics, 36, 4B, 1388-1390 (2006);
- [7] P. R. Santos et al., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 266, 1616-1618 (2008);
- [8] http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm? atccNum=CRL-1427 consultado em 05/2006;
- [9] http://en.wikipedia.org/wiki/Bone consultado em Outubro de 2008;
- [10] Bone Curriculum, American Society for Bone and Mineral Research: http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/ASBMRed.html consultado em 09/2008;
- [11] http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Illu\_compact\_spongy\_bone.jpg consultado em 09/2008;
- [12] http://www.gyne.de/index.php?id=150 consultado em outubro de 2008;
- [13] J. E. Davis, *Bone Engineering*,  $mc^2$ , Toronto (1999);
- [14] http://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxylapatite consultado em 09/2008;

- [15] J. F. Staub e. al, American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 284, 819-834 (2003);
- [16] http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm consultado em 07/2008;
- [17] A. O. Delgado, Estudo da Formação de Rastos Nucleares em Polímeros, Dissertação de Mestrado, Instituto de Física, USP, São Paulo (2007);
- [18] http://fcs.itc.it/labs/indexXRD.asp consultado em 07/2008;
- [19] http://en.wikipedia.org/wiki/X-ray\_crystallography consultado em 08/2008;
- [20] B. D. Cullity, *Elements of X-Ray Diffraction*, Addison-Wesley Publishing Company (1956);
- [21] http://pt.wikipedia.org/wiki/Monocl%C3%ADnico consultado em 08/2008;
- [22] http://pt.wikipedia.org/wiki/Tricl%C3%ADnico consultado em 08/2008;
- [23] http://pt.wikipedia.org/wiki/Ortorr%C3%B4mbico consultado em 08/2008;
- [24] N. W. Ashcroft and N. D. Mermin, Solid State Physics, Harcourt College Publishers (1976);
- [25] http://pt.wikipedia.org/wiki/Tetragonal consultado em 08/2008;
- [26] http://www.if.usp.br/cristal/XRD.pdf consultado em 08/2008;
- [27] M. H. Tabacniks, Os Elementos na Matéria, Tese de Livre Docência, Instituto de Física, USP, São Paulo (2005);
- [28] Johansson, S. A. E. and Johansson, T. B., Nucl. Instr. Meth, 137, (1976) 473-516;
- [29] A. C. Thompson and D. Vaughan, X-Ray Data Booklet, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, USA (2001), 2° ed. (http://xdb.lbl.gov/);
- [30] N. Ueta, W. G. P. Engel e J. J. G. Leandro, *Confecção de Alvos Nucleares*, Departamento de Física Nuclear, Instituto de Física, USP, 2° Ed., São Paulo (2007);
- [31] http://www.if.usp.br/lamfi/ consultado em 06/2008;
- [32] http://www.amptek.com/ consultado em 10/2007;

- [33] Steven C. Verberckmoes, Mark E. De Broe and Patrick C. D'Haese, Kidney International, 64, (2003) 534-543;
- [34] S. C. Verberckmoes et. al., *Calcif. Tissue Int.*, **75**, (2004) 405-415;
- [35] http://www.genplot.com/ consultado em 10/2007;
- [36] P. Van Espen, K. Janssens and I. Swenters, AXIL X-Ray Analysis software, Canberra Packard, Benelux (1986).
- [37] L. Oste et. al., X-ray Spectrometry, 36, 42-49 (2007);
- [38] G. Boivin et al., J. Bone Miner. Res., 11, 1302-1311 (1996);
- [39] S. Pors Nielsen, *Bone*, **35**, 583-588 (2004);
- [40] http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-11372&Template=cellBiology consultado em 09/2008.