



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



JÚLIO CÉSAR BEZERRA PEREIRA

**USO DO POLIFOSFATO DE SÓDIO COMO FONTE DE FÓSFORO EM NUTRIÇÃO
PARENTERAL E PRECURSOR DE CERÂMICAS PARA CIMENTO ÓSSEO
INJETÁVEL**

Recife

2018

JÚLIO CÉSAR BEZERRA PEREIRA

**USO DO POLIFOSFATO DE SÓDIO COMO FONTE DE FÓSFORO EM NUTRIÇÃO
PARENTERAL E PRECURSOR DE CERÂMICAS PARA CIMENTO ÓSSEO
INJETÁVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana de Souza Alencar Falcão

Recife

2018

JÚLIO CÉSAR BEZERRA PEREIRA

**USO DO POLIFOSFATO DE SÓDIO COMO FONTE DE FÓSFORO EM NUTRIÇÃO
PARENTERAL E PRECURSOR DE CERÂMICAS PARA CIMENTO ÓSSEO
INJETÁVEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 31/08/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Beate Saegesser Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Giovannia Araujo de Lima Pereira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr. Wagner Eduardo da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^º. Dr. Rafael da Silva Fernandes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me dado força, saúde e coragem para superar as dificuldades ao longo dessa caminhada.

Agradeço a minha orientadora Beate Saegesser pela paciência, incentivos, confiança e pelos ensinamentos que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Professora Juliana de Souza, por toda assistência e atenção dedicadas para me auxiliar nesse processo.

À minha mãe, Maria Auxiliadora, e meus irmãos, Jorge e Ivo Júnior, pelo carinho, proteção e todo o suporte fornecido para que eu pudesse superar os desafios.

Faço um agradecimento em especial aos amigos Érida (*in memoriam*), Gricirene, Joalen e Antônio, pelo auxílio na execução deste trabalho e por todas as trocas de ideias e conhecimentos.

Por fim, agradeço a todos os amigos que me propiciaram apoio e companheirismo durante minha trajetória.

RESUMO

Polifosfato é um polímero inorgânico que em meio aquoso apresenta-se como um conjunto de poliânions que contém um número variável de grupos fosfato por cadeia. A presente pesquisa apresenta o polifosfato (PoliP) de sódio – $[\text{NaPO}_3]_n$ –, como fonte mineral alternativa de fósforo para uso em duas distintas aplicações no campo da saúde: nutrição parenteral e como precursor para formação de cerâmicas para cimentos ósseos injetáveis. A formação de precipitados de fosfato de cálcio é um dos maiores problemas enfrentados na preparação de formulações para nutrição parenteral (NP). Neste sentido o presente estudo mostra a viabilidade do uso de PoliP como fonte de fósforo e como estabilizante de formulações nutricionais parenterais 2-em-1. Com outro foco, os sistemas constituídos por PoliP-Ca que separaram fase nas formulações parenterais levaram à ideia de usar esta fonte de fosfato de cálcio como precursores de cerâmicas sintéticas. Foram estudadas misturas coloidais contendo PoliP e $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e todos os outros componentes da NP para encontrar as regiões de concentração onde íons Ca^{2+} e os poliânions podem ser misturados sem formação de precipitados. Este processo foi monitorado por espectroscopia de absorção eletrônica e por Ressonância Magnética de ^{31}P . Para a produção das cerâmicas, diferentes fontes de Ca^{2+} foram testadas e os materiais obtidos em fase aquosa foram secos e posteriormente calcinados em três diferentes temperaturas (300, 500 e 700 °C), sendo caracterizados em seguida. Foram testadas ainda formulações contendo PoliP, alginato de sódio e Ca^{2+} com relação a seus aspectos morfológicos e de escoamento. Também foram desenvolvidas novas composições voltadas para uso como cimento ósseo injetável misturando-se as cerâmicas sintéticas preparadas anteriormente com CaCO_3 ou ZnO . A fase semi-sólida foi constituída por um gel de alginato de sódio em meio aquoso contendo glicerol. Os cimentos ósseos foram avaliados quanto à injetabilidade por meio de um planejamento fatorial 2^3 . A técnica de Microscopia Confocal Raman foi utilizada para avaliação da uniformidade dos cimentos. A pesquisa comprovou a viabilidade de aplicação do polifosfato de sódio no preparo de misturas para NP, através da avaliação físico-química do mesmo e de sua interação com cálcio e outros componentes da NP. Os resultados indicam que foram obtidas cerâmicas baseadas em fosfato de cálcio ($\text{P}/\text{Ca} = 0,6 - 2,0$) e com morfologia na forma de grãos de tamanho micrométrico ($< 250 \mu\text{m}$). Constatou-se mudanças de fases com o aumento da temperatura. Verificou-se a presença das fases cristalinas monetita, brushita, hidroxiapatita e outras não identificadas nas cerâmicas obtidas. Verificou-se que o fator concentração do gel de alginato é o que exerce efeito negativo mais significativo sobre a injetabilidade, em intervalo de confiança de 95%. Os dados permitem

afirmar que o PoliP consegue estabilizar o Ca^{2+} em quantidades equivalentes às aquelas normalmente indicadas em NP, na proporção molar P:Ca em torno de 1. O PoliP não alterou os parâmetros de normalidade de hemácias, mostrando sua viabilidade para uso parenteral. Por um método simples e de baixo custo, foi possível a obtenção de promissoras cerâmicas biocompatíveis que podem constituir cimentos ósseos injetáveis.

Palavras-chave: Polifosfato. Cálcio. Nutrição parenteral. Coloides. Cerâmicas.

ABSTRACT

Polyphosphate is an inorganic polymer which in aqueous media is presented as a set of polyanions containing a variable number of phosphate groups per chain. The present research presents sodium polyphosphate (PolyP) - $[\text{NaPO}_3]_n$ - as an alternative mineral source of phosphorus for use in two different health applications: parenteral nutrition and as a precursor for the formation of ceramics for injectable bone cements. The formation of calcium phosphate precipitates is one of the major problems faced in the preparation of formulations for parenteral nutrition (PN). In this sense, the present study shows the feasibility of using PolyP as a source of phosphorus and as a stabilizer of 2-in-1 parenteral nutritional formulations. With another focus, PolyP-Ca systems that separated phase in the parenteral formulations led to the idea of using this source of calcium phosphate as precursors of synthetic ceramics. Colloidal mixtures containing PolyP and Ca^{2+} / Mg^{2+} and all other PN components were studied to find concentration regions where Ca^{2+} ions and polyanions can be mixed without precipitate formation. This process was monitored by electronic absorption spectroscopy and ^{31}P Magnetic Resonance. For the production of the ceramics, different sources of Ca^{2+} were tested and the materials obtained in the aqueous phase were dried and subsequently calcined at three different temperatures (300, 500 and 700 °C). Further formulations containing PolyP, sodium alginate and Ca^{2+} were also tested for their morphological and flow characteristics. Also developed were novel compositions intended for use as injectable bone cement by mixing the previously prepared synthetic ceramics with CaCO_3 or ZnO . The semi-solid phase consisted of a sodium alginate gel in an aqueous medium containing glycerol. Bone cements were evaluated for instability by means of a factorial design 2^3 . The Confocal Raman Microscopy technique was used to evaluate the uniformity of the cements. The research proved the feasibility of applying sodium polyphosphate in the preparation of mixtures for PN, through the physical-chemical evaluation of the same and its interaction with calcium and other components of NP. The results indicated that calcium phosphate based ceramics ($\text{P} / \text{Ca} = 0.6 - 2.0$) and morphology in the form of micron size ($<250 \mu\text{m}$) grains were obtained. It was observed changes of phases with the increase of temperature. The presence of the crystalline phases monetite, brushite, hydroxyapatite and others not identified in the obtained ceramics was verified. It was verified that the concentration factor of the alginate gel is the one that exerts the most significant negative effect on the injectability, in the 95% confidence interval. The data allow us to state that PolyP can stabilize Ca^{2+} in amounts equivalent to those normally indicated in PN, in the molar ratio P: Ca around 1. PolyP did not alter the normality parameters of red blood cells,

showing its viability for parenteral use. By a simple and low cost method, it was possible to obtain promising biocompatible ceramics that may constitute injectable bone cements.

Key words: Polyphosphate. Calcium. Parenteral nutrition. Colloids. Ceramics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Família de fosfatos existentes: ortofosfato e fosfatos condensados..... 18
- Figura 2** – Espectro de RMN³¹P do polifosfato de sódio comercial (NaPO₃)_n, apresentando as regiões espectrais características de grupos ortofosfato livre (Q₀); fosfato terminais (Q₁) e fosfatos intermediários (Q₂) 20
- Figura 3** – Esquema ilustrativo simplificado da função do PoliP na formação do tecido ósseo 25
- Figura 4** – Usos e aplicações estabelecidos do polifosfato..... 27
- Figura 5** – Imagens digitais de matrizes secas por 24 h após o estudo de 6 dias de eluição (largura do campo = 11 mm). Os discos apresentam 7,5 mm de diâmetro. As setas pretas indicam onde o núcleo interno das matrizes começou a fluir para o exterior. (a) e (b) mostram as superfícies superior e inferior de uma amostra controle (branco) secas por 24 h. As imagens (c) e (d) mostram as superfícies correspondentes de uma amostra secas por 24 h contendo vancomicina..... 31
- Figura 6** – Estrutura tridimensional da hidroxiapatita..... 38
- Figura 7** – Estrutura cristalina do fosfato tricálcio, contendo Mg²⁺ como substituinte 40
- Figura 8** – Estrutura cristalina da Brushita (CaHPO₄.2H₂O..... 41
- Figura 9** – Espectro de RMN ³¹P do (NaPO₃)_n utilizado neste estudo. Os termos Q₀, Q₁ e Q₂ representam o sinal dos ortofosfatos, fosfatos terminais e fosfatos intermediários, respectivamente..... 44
- Figura 10** – Comparação do espectro de RMN ³¹P do (NaPO₃)_n com e sem íons Ca²⁺ em solução..... 45
- Figura 11** – Esquema evidenciando a separação de fases ocorrendo entre o PoliP e o Ca²⁺ em meio aquoso (processo de coacervação) e fotografias evidenciando o resultado observado experimentalmente..... 46
- Figura 12** – Micrografia eletrônica de varredura e EDS do pó das amostras calcinadas a 300 (a); 500 (b) e 700 °C (c). EDS resultou na proporção Ca/P e análise de BET estima a área superficial (AS) em m²/g. Aumentos (a) 2000x, (b e c) 50.000x..... 47
- Figura 13** – Padrão de difração de raios X dos pós do material, produzidos a partir de (NaPO₃)₁₀ e nitrato de cálcio, após tratamento térmico a 300, 500 e a 700 °C, onde B = brushita, M = monetita, H = hidroxiapatita 49
- Figura 14** – Espectro de infravermelho médio do pó das cerâmicas, produzidos a partir de (NaPO₃)₁₀ e nitrato de cálcio, calcinadas a 300 (a), 500 (b) e 700 °C (c) 50
- Figura 15** – Espectros Raman dos materiais cerâmicos, produzidos a partir de (NaPO₃)₁₀ e nitrato de cálcio, calcinados a 300, 500 e 700°C 51

Figura 16 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, sem processo de calcinação secagem a 80 °C por 24 h. Aumentos (1 e 2) 2000x e (3)15000x	52
Figura 17 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 300 °C. Aumentos (1) 2000x, (2) 5000x, (3) 15000x	53
Figura 18 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 500 °C. Aumentos (1) 2000x, (2) 5000x, (3)15000x	54
Figura 19 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 700 °C. Aumento de (1, 2 e 3)15000x.....	55
Figura 20 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de microcristais de fosfato de cálcio na fase brushita sintetizados em meio aquoso (a) e sua representação esquemática (b)	56
Figura 21 – Mapa elementar obtido por EDS de duas regiões características de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 300 °C.....	57
Figura 22 - Difratomogramas dos pós cerâmicos baseados em polifosfato de cálcio (CaCl_2 .como fonte de cálcio) antes e após sua calcinação, onde M = monetita, B = brushita, OCP = fosfato de octacálcio	58
Figura 23 – Análise termogravimétrica do coacervato seco a 80 °C e do material cerâmico calcinado a 300 °C	59
Figura 24 – Assinalamento dos principais modos vibracionais observados no polifosfato de sódio $(\text{NaPO}_3)_n$	60
Figura 25 – Espectro de absorção no infravermelho do precursor $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e do coacervato baseado em polifosfato de cálcio (PFCa), destacando o assinalamento de alguns grupos funcionais presentes.....	61
Figura 26 – Comparação entre o espectro de absorção no infravermelho do coacervato seco e dos materiais cerâmicos baseados em polifosfato de cálcio (PFCa) calcinados a 300; 500 e 700°C	62
Figura 27 – Espectros Raman do $(\text{NaPO}_3)_{10}$ (PFNa) e do coacervato seco (PFCa) e calcinado (PFCa tratado a 700 °C) produzidos utilizando cloreto de cálcio	64
Figura 28 – Estrutura química do alginato (a) e formação de hidrogéis por <i>cross-linking</i> iônico (modelo “caixa de ovo”) (b).....	71
Figura 29 – Fluxograma de preparo dos cimentos ósseo injetáveis	77
Figura 30 – Fluxograma do preparo das amostras avaliadas no teste de injetabilidade	81
Figura 31 – Representação gráfica do aparato utilizado para realização do teste de injetabilidade	82
Figura 32 – Aspecto visual do (a) filme seco de Alginato 2% e (b) filme seco de Alginato 2% + PoliP 8%	83

- Figura 33** – Registro fotográfico do aspecto gelificado das misturas contendo (a) Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 40% ; (b) Alginato 2% + PoliP 8% + Ca^{2+} 40%; (c) Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 20% ; (d) Alginato 2% + PoliP 8% + Ca^{2+} 20%..... 84
- Figura 34** – Aspecto visual das misturas recém preparadas contendo (a) Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 1% ; (b) Alginato 2% + PoliP 8% + Ca^{2+} 1%; (c) Alginato 4% + PoliP 4% + Ca^{2+} 1%. (d) Alginato 1% + PoliP 4% + Ca^{2+} 1% (seco 60°C) ; (e) Alginato 1% + PoliP 8% + Ca^{2+} 1% (seco 60°C)..... 85
- Figura 35** – MEV da mistura Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 40%. Análise elementar por EDS do material mostra uma proporção Ca:P = 0,67 86
- Figura 36** – Espectros vibracionais no infravermelho do Alginato de Sódio (a) e do compósito seco com composição Alginato (4%) + Polifosfato (8%) + Cálcio (1%). A presença dos principais grupos funcionais encontra-se assinalada 87
- Figura 37** – Aspecto visual de diferentes composições de cimento ósseo: (a) contendo ZnO e CaCl_2 (amostra 1 – Tabela 5); (b) Cimento ósseo contendo CaCO_3 sem CaCl_2 (amostra 6) ; (c) Cimento ósseo contendo CaCO_3 e CaCl_2 (amostra 7); (d) CaCO_3 com maior percentual de fase sólida (Amostra 5) 88
- Figura 38** – (a) Imagem do cimento 4. (b) espectro Raman dos componentes mais abundantes no cimento 2 e imagens da distribuição dos componentes ZnO, PFCa e glicerol do cimento 4 obtidas por microscopia confocal Raman numa secção transversal com área $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ 89
- Figura 39** – (a) Corpo de prova preparado com o cimento 6. (b) Espectro Raman do cimento 6 e a representação dos componentes mais abundantes e as imagens da distribuição dos componentes CaCO_3 , PFCa e Alginato no cimento, obtidas por microscopia confocal Raman numa secção transversal com área $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ 90
- Figura 40** – Gráfico de pareto dos efeitos e suas interações..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de fosfatos de cálcio e suas relações Ca:P	40
Tabela 2 – Análises de BET dos pós do material preparado sem calcinação (secagem a 80 °C por 12 h) e após calcinação 300, 500 e a 700 °C por 1 h.....	58
Tabela 3 – Composição dos sistemas contendo alginato (1; 2; 4%), polifosfato (2; 4; 8%) e cálcio (1%)	75
Tabela 4 – Composição dos sistemas contendo alginato (2; 4%), polifosfato (2; 8%) e cálcio (20; 40%)	76
Tabela 5 – Composição das formulações de cimento ósseo.....	78
Tabela 6 – Fatores analisados e seus respectivos níveis.....	79
Tabela 7 – Matriz de planejamento fatorial 2 ³	80
Tabela 8 – Composição das formulações de cimento ósseo injetável	81
Tabela 9 – Efeitos observados dos fatores e suas interações.....	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Classificação e características químicas dos polifosfatos.....	17
3.2	Bioquímica do polifosfato	22
3.3	Toxicologia do polifosfato	23
3.4	Polifosfato e tecido ósseo.....	24
3.5	Aplicações tecnológicas do polifosfato.....	27
3.5.1	Aplicações na agroindústria e no meio ambiente.....	27
3.5.2	Aplicações alimentícias.....	28
3.5.3	Aplicações farmacêuticas, farmacológicas e biomédicas.....	29
3.5.4	Aplicações industriais diversas	33
4	RESULTADOS.....	35
4.1	ARTIGO 1 - SHORT CHAIN POLYPHOSPHATES AS A STRATEGIC COLLOIDAL SOURCE OF PHOSPHATE FOR PARENTERAL ADMIXTURES	35
4.2	ARTIGO 2 - MÉTODO DE COACERVAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE CERÂMICAS A BASE DE POLIFOSFATO DE CÁLCIO PARA APLICAÇÃO EM CIMENTO ÓSSEO.....	35
4.3	ARTIGO 3 - ELABORAÇÃO DE COMPÓSITOS PARA UTILIZAÇÃO COMO CIMENTOS ÓSSEOS INJETÁVEIS	69
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS	103

1 INTRODUÇÃO

Os polifosfatos são compostos amplamente estudados por possuírem importantes propriedades de interesse científico e tecnológico. As características básicas que determinam a aplicação comercial dos polifosfatos são as seguintes: apresentam menor custo comparado às fontes de fósforo inorgânico para nutrição parenteral disponíveis no comércio; são carregados negativamente; podem formar complexos com diferentes cátions metálicos; são capazes de unir e manter quantidades consideráveis de água devido à capacidade de ligação de hidrogênio; são atóxicos e biodegradáveis (SHANJANI et al., 2013). A habilidade dos polifosfatos em prevenir a precipitação ou dissolver precipitados de metais alcalinos terrosos é bem conhecida. O fenômeno é atribuído à formação de complexos solúveis relativamente estáveis entre o metal e o fosfato. Para o íon Ca^{2+} , a capacidade de complexação do polifosfato aumenta proporcionalmente com o tamanho de cadeia (RASHCHI; FINCH, 2000). A capacidade tamponante, antioxidante, antibacteriana e estabilizante dos polifosfatos já vem sendo explorada industrialmente no processamento e conservação de diversos alimentos, cosméticos e medicamentos.

Esta Tese apresenta o estudo de dois usos do polifosfato de sódio no desenvolvimento de sistemas voltados para o campo da saúde: Nutrição Parenteral e substitutos ósseos. Numa delas, o polifosfato de sódio é utilizado para manter íons Ca^{2+} em meio coloidal complexo, através da formação de estruturas supramoleculares estáveis, enquanto que no outro, o uso de coacervatos de polifosfato de cálcio são utilizados para uso como novos materiais voltados para substitutos ósseos.

O uso de polifosfato de cálcio como substituto ósseo vem ganhando cada vez mais destaque em pesquisas científicas. As perdas ósseas extensas representam grande desafio para os profissionais da área da saúde, principalmente, cirurgiões ortopedistas e dentistas. Para a regeneração e recuperação de tecidos ósseos que passaram por grandes traumas, onde o reparo espontâneo não é possível, deve-se fazer a aplicação de materiais substitutos ósseos. Em razão disso, cada vez mais buscam-se biomateriais, sintéticos ou naturais, que possam ser adequadamente utilizados para essa função. Em especial, os estudos com cerâmicas à base de fosfato de cálcio vêm se destacando em razão da sua similaridade estrutural com as apatitas da estrutura óssea do esqueleto humano e por favorecerem a biocompatibilidade, a bioatividade e regeneração de tecidos duros (ossos e dentes) (ROCHA, 2010). Os cimentos ósseos injetáveis a base de cerâmicas de fosfatos de cálcio têm uso cada vez mais disseminado na prática clínica. São materiais constituídos por duas fases, a sólida e a líquida, que são misturadas para uso

extemporâneo, levando à formação de uma pasta que pode ser facilmente injetada no local desejado de forma menos invasiva. O material endurece espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio (DRIESSENS et al., 1997). A facilidade de manipulação e moldagem, adaptando-se totalmente à forma da cavidade óssea, sem necessidade de dar forma prévia, são as características que promovem os cimentos de fosfatos de cálcio injetáveis como biomateriais para a reconstrução ou remodelação óssea (LOW et al., 2010). Essa forma de aplicação favorece um íntimo contato entre o osso e o cimento desde os primeiros estágios da implantação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Utilizar o polifosfato de sódio ((NaPO₃)_n) como uma nova fonte inorgânica alternativa de fósforo em nutrição parenteral e como precursor para obtenção pelo método de coacervação de cerâmicas à base de polifosfato de cálcio, para serem aplicadas no desenvolvimento de cimento ósseo injetável.

2.2 Objetivos Específicos

Para o estudo de aplicação do polifosfato (PoliP) em Nutrição parenteral (NP):

- i. Delimitar as regiões de concentrações em que a mistura entre soluções de PoliP e soluções de cálcio formam complexos solúveis estáveis;
- ii. Avaliar o grau de compatibilidade de sistemas constituídos de PoliP e cálcio com alguns constituintes presentes em misturas para NP (aminoácidos, glicose e oligoelementos);
- iii. Monitorar variações de pH das misturas em estudo;
- iv. Confirmar a ocorrência de interações entre PoliP e componentes da NP, principalmente cátions metálicos, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ³¹P;
- v. Testar a biocompatibilidade do PoliP em contato com células sanguíneas.

Para o estudo da aplicação de PoliP na produção de cimento ósseo:

- i. Determinar a natureza estrutural de precipitados formado pela mistura de PoliP com cálcio;
- ii. Preparar diferentes materiais cerâmicos baseados em polifosfato de cálcio;
- iii. Caracterizar o material obtido, através de diversas análises físico-químicas, e identificar propriedades similares aos fosfatos de cálcio conhecidos;
- iv. Desenvolver e avaliar compósitos, constituídos pelo polímero alginato, visando sua aplicação como matriz polimérica de cimentos ósseos injetáveis contendo a cerâmica;
- v. Avaliar o parâmetro de injetabilidade dos cimentos ósseos desenvolvidos por meio de planejamento fatorial 2³.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

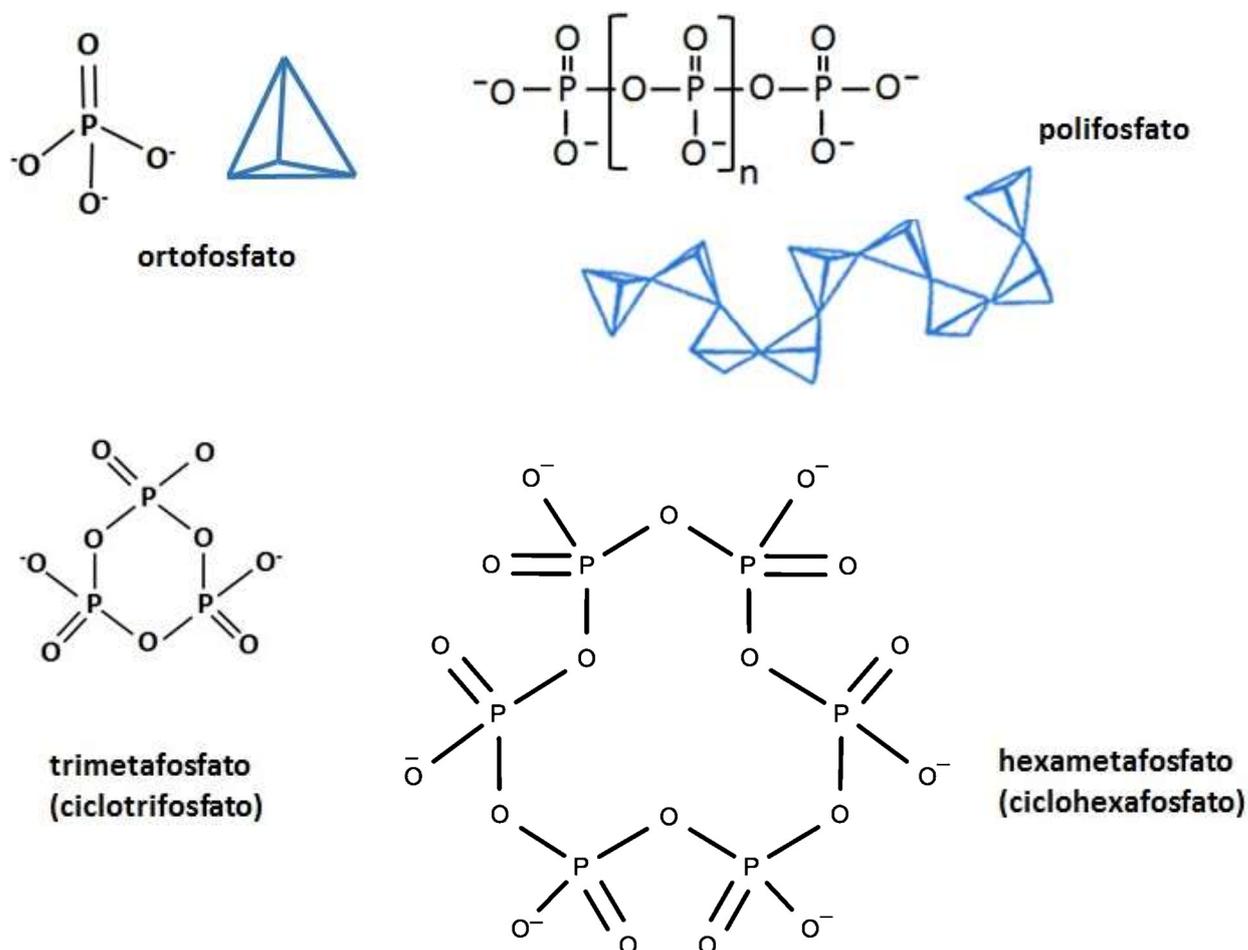
3.1 Classificação e características químicas dos polifosfatos

Os fosfatos inorgânicos são uma classe de compostos químicos nos quais os átomos de fósforo estão cercados por 4 átomos de Oxigênio em conformação espacial tetraédrica. No início do século 19, Graham estudou o ácido fosfórico e seus sais e os classificou em basicamente três tipos: ortofosfatos, pirofosfatos e metafosfatos (CORBRIDGE, 1990).

Os ortofosfatos são compostos que contêm apenas um único íon PO_4^{3-} . Os pirofosfatos e metafosfatos são conhecidos como fosfatos condensados (polifosfatos), os quais são formados pela polimerização de unidades tetraédricas de fosfato. A polimerização é resultante do compartilhamento de oxigênio em um ou nos dois lados do tetraedro fosfato. Em suma, estes compostos tratam-se de sais de ácidos polifosfóricos lineares, constituídos por unidades básicas de íon ortofosfato (PO_4^{3-}). Uma representação esquemática das principais estruturas da família de fosfatos encontra-se na Figura 1.1. Os polifosfatos de metais alcalinos e alcalinos terrosos são os mais bem conhecidos e estudados. Pirofosfato (difosfato) é o ânion fosfato condensado mais simples ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), formado pela condensação de dois ânions ortofosfato. O grau de polimerização dos compostos é estabelecido pela variável n . Compostos com $n < 10$ e variedades altamente polimerizadas (n igual ou maior que 50), formam sais bem cristalizados. Por outro lado, variedades com tamanhos de cadeia intermediários ($n = 10 \sim 50$) podem usualmente ser obtidas apenas como misturas em vidros. De acordo com a classificação original de Graham, os polifosfatos de cadeia linear eram chamados de metafosfatos. Atualmente, o termo metafosfato é utilizada para denominar os compostos cíclicos. Quando o número de unidades no polímero (n) se torna muito grande, a fórmula de um polifosfato de cadeia linear, $\text{M}_{(n+2)}\text{P}_n\text{O}_{(3n+1)}$, torna-se indistinguível daquele de um metafosfato verdadeiro, que é um composto cíclico com a fórmula exata $(\text{MPO}_3)_n$, onde M normalmente é um metal alcalino (Na e K) ou alcalino terroso (Ca, Mg) (GREENWOOD & EARNSHAW, 1998).

Em virtude das várias aplicações, os fosfatos condensados foram objetos de muitas investigações ao longo do século passado. Atualmente, os estudos envolvendo estes compostos os classificam em três grandes classes: polifosfatos lineares, ciclofosfatos (metafosfatos) e ultrafosfatos (cadeias, folhas e estruturas 3-D) (RASHCHI; FINCK, 2000). A Figura 1 apresenta as estruturas mais conhecidas da família de grupos fosfatos.

Figura 1 – Família de fosfatos existentes: ortofosfato e fosfatos condensados.



Fonte: próprio autor.

Os polifosfatos apresentam diversas denominações, que variam de acordo com a origem histórica, processo de síntese e grau de polimerização. Por tradição, o polifosfato de sódio comercial também é conhecido como hexametafosfato de sódio. O nome hexametafosfato de sódio induz enganosamente a pensar que se trata de um fosfato condensado cíclico com n igual a 6, como podemos ver representado na Figura 1. Entretanto, a apresentação comercial do polifosfato de sódio contém uma mistura de polifosfatos lineares com diferentes tamanhos de cadeia em distribuição quase-normal, onde n médio está entre 10 e 20 (PARKS; VAN WAZER, 1957), que apresenta um percentual de 0,5 – 4% de polifosfatos cíclicos e polifosfatos ramificados em sua composição. Estes últimos, quando em solução, geram poliânions lineares. Já o produto conhecido por sal de Graham refere-se a um produto composto de polifosfato de

sódio altamente polimerizado. É sintetizado através do brusco arrefecimento de $(\text{NaPO}_3)_n$ fundido, o que gera formação de um sólido vítreo em vez de material cristalino. O sal de Graham é um polímero com alto peso molecular, variando geralmente entre 12000-18000, que apresenta até 200 unidades de PO_3^- por cadeia. Os vidros preparados em laboratório podem variar de 3 a cerca de 3000 átomos de fósforo em média por cadeia (RASHCHI; FINCK, 2000). Polifosfatos também são biossintetizados em microorganismos como forma de estocagem energética. Estas cadeias podem atingir um grau de polimerização na ordem de 10^6 (KULAEV et al., 2004).

As propriedades físico-químicas e a distribuição da massa molecular dos polifosfatos estão principalmente relacionadas ao comprimento médio da cadeia (n), que depende das condições de preparo. As condições mais importantes são: o tempo de aquecimento e a temperatura de aquecimento dos fundidos de NaH_2PO_4 . Quanto maior a temperatura para um dado tempo de aquecimento e maior o tempo de aquecimento a uma determinada temperatura, maior é a massa molecular média e mais ampla é a distribuição de massa molecular (BHARGAVA; SRIVASTAVA; VARMA, 1974). O comprimento médio da cadeia é importante do ponto de vista do número de cargas elétricas necessárias para interagir com superfícies e polieletrólitos com cargas opostas (CINI; BALL, 2014).

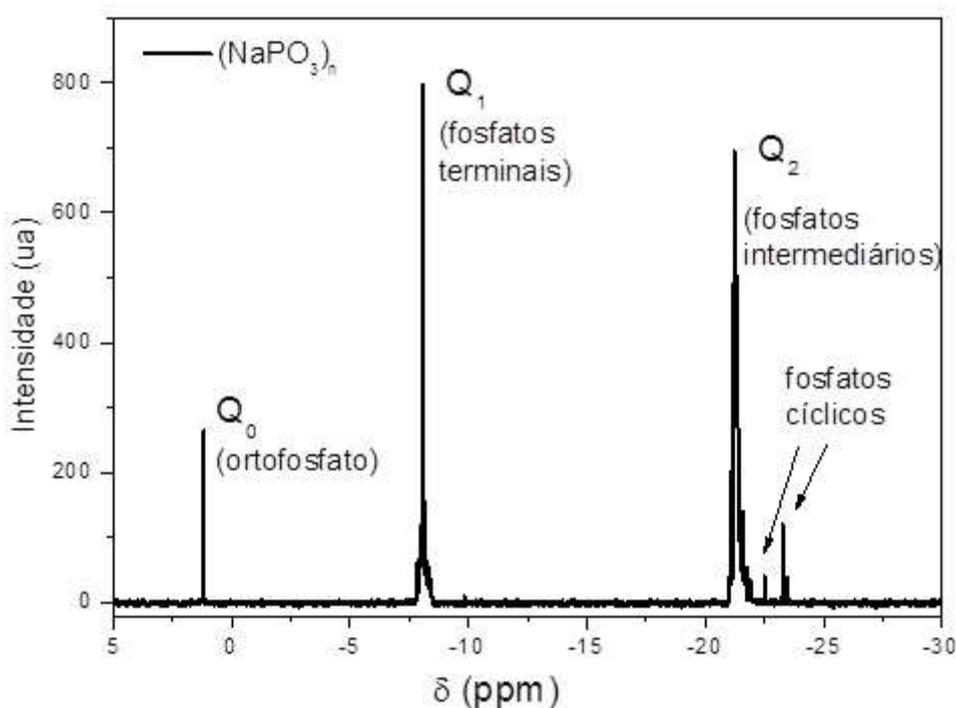
Para análise dos diferentes tipos de fosfatos condensados presentes nestes compostos, frequentemente, se utilizam as técnicas cromatográficas. Na década de 50, foram desenvolvidas as técnicas de cromatografia de papel e de cromatografia em coluna para tal finalidade. É possível separar através de cromatografia em papel os polifosfatos lineares e ciclofosfatos de baixo peso molecular ($n = 2 - 9$). Nesta época, a cromatografia de troca iônica também foi muito utilizada. Atualmente, a cromatografia líquida em coluna de alta eficiência (CLAE) é a técnica preferencial para separação e quantificação dos componentes de misturas de polifosfatos contendo fosfatos condensados lineares e cíclicos, podendo ser utilizado inclusive para a determinação do tamanho médio de cadeia (KULAEV et al., 2004). Entretanto, as formas mais práticas de elucidação da estrutura das cadeias de fosfatos condensados são as técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) (GREENFIELD & CLIFT, 1974). A técnica de RMN pode ser aplicada satisfatoriamente para a determinação do tamanho médio de cadeia. Inclusive, é bastante utilizada para análise de materiais biológicos por se tratar de uma técnica não destrutiva ou invasiva (CHEN, 1999). De uma forma geral, os espectros de RMN do núcleo ^{31}P de polifosfatos apresentam três regiões características, que são:

- Fosfatos livres (denominada Q_0)
- Fosfatos terminais (Q_1)
- Fosfatos intermediários (região Q_2).

A Figura 2 traz um exemplo de RMN do polifosfato de sódio comercial. A partir da área relativa destes picos pode-se estimar a relação entre grupos intermediários e terminais e, portanto, o grau de polimerização do polifosfato (Equação 1) (GREENFIELD; CLIFT, 1974).

$$n = 2 \cdot \left(\frac{AQ_2}{AQ_1} \right) + 2 \quad (1)$$

Figura 2 – Espectro de RMN³¹P do polifosfato de sódio comercial (NaPO_3)_n, apresentando as regiões espectrais características de grupos ortofosfato livre (Q_0); fosfato terminais (Q_1) e fosfatos intermediários (Q_2).



Fonte: PEREIRA, 2007.

A associação de polifosfatos com alguns metais de transição ou alcalino terrosos, sob determinadas condições experimentais, conduz à formação de complexos solúveis estáveis em relação à precipitação. As associações mais conhecidas são com os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , entretanto, a complexação do polifosfato com Al^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} também se encontram bem

estabelecidas (MASSON; SOUZA; GALEMBECK, 1997; MOMENI; FILIAGGI, 2014). A formação do complexo ocorre primordialmente por interação iônica, onde cadeias diferentes de polifosfato são interligadas através dos íons metálicos ao qual foi associado. Van Wazer e Callis estudaram estas interações por um grande intervalo de tempo e demonstraram que, geralmente, os polifosfatos são muitas vezes mais eficazes no sequestro do íon magnésio do que no cálcio. Assume-se que um dado fosfato é capaz de sequestrar cerca de cinco a dez vezes a quantidade de magnésio em comparação com o cálcio. Também no caso do sequestro de Mg^{2+} , diz-se que o ânion difosfato é mais eficaz do que o trifosfato que, por sua vez, é mais eficaz que os fosfatos vítreos, enquanto que para o íon cálcio, a ordem de eficácia é invertida (VAN WAZER; CALLIS, 1958).

As constantes de estabilidade dos complexos solúveis formados entre o polifosfato e os metais, também conhecidas como constantes de dissociação (pK_D), foram determinadas em diversos estudos. Os valores de pK_D calculados nesses estudos comprovam que as cadeias de polifosfato se associam por simples interação eletrostática com os metais alcalinos. A grande diferença entre as pK_D de complexos de metais alcalinos e metais alcalinos terrosos de fosfatos lineares, que é em torno de quatro a cinco ordens de magnitude, pode indicar que os íons de metais alcalinos terrosos são parcialmente ligados covalentemente nos complexos ou ao menos estão associados a sítios de coordenação específicos (VAN WAZER; CALLIS, 1958).

As reações de hidrólise de polifosfatos também já foram extensivamente estudadas. A principal razão para determinar as taxas de hidrólise é verificar a estabilidade do polifosfato em meio aquoso (submetidos a diferentes potenciais hidrogeniônicos) e elucidar os mecanismos reacionais. Os principais fatores que influenciam a taxa de hidrólise de uma solução de fosfato condensado são: (1) o número de ligações compartilhadas pelos tetraedros PO_4^{3-} na estrutura, (2) temperatura, (3) pH e (4) concentração da solução. Íons de hidrogênio catalisam a degradação hidrolítica do polifosfato. A maior parte da degradação hidrolítica obedece a cinética de primeira ordem em relação ao fosfato (CORBRIDGE, 1990; DE JAGER; HEYNS, 1998). A hidrólise do polifosfato é fortemente catalisada por ácido. Entretanto, todos os fosfatos condensados podem eventualmente ser convertidos em ortofosfatos por ebulição. Em menor extensão, a taxa de hidrólise dos polifosfatos é ainda afetada pela presença de cátions de metais pesados, que atuam como catalisadores da reação. O efeito mostra-se mais pronunciado com cátions de carga alta e raio pequeno (RASHCHI; FINCK, 2000).

3.2 Bioquímica do polifosfato

Os polifosfatos inorgânicos encontram-se amplamente disseminados em todos os seres vivos (bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais). Diversos estudos mostram evidências da importância vital desse composto em várias funções biológicas. Os resíduos de fosfato nas moléculas de PoliP estão ligados uns aos outros por ligações fosfoanidrido com uma energia semelhante à energia da ligação fosfórica terminal na adenosina trifosfato (ATP), que equivale a aproximadamente 10 kcal/mol (KUMBLE; KORNBERG, 1995). Desde então, as moléculas de polifosfato demonstraram estar envolvidas na produção de energia através de diferentes vias.

PoliP desempenha múltiplas funções fisiológicas, que são distintas e dependentes do tipo de organismo e da localização subcelular do polímero. Nos microrganismos, o PoliP desempenha principalmente um papel na transcrição gênica. PoliP é um poliânion e pode formar complexos com cátions inorgânicos e outros componentes celulares, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, modificando suas propriedades e atividades biológicas. O poliP atua também como reserva de fosfatos inorgânicos, participando na homeostase do fósforo nas células e no ciclo do fósforo na biosfera. O PoliP promove ainda a desintoxicação de cátions de metais pesados. Induz a síntese de RpoS, que é uma subunidade da RNA-polimerase em bactérias responsável pela expressão de genes envolvidos em ajustes na fase estacionária de crescimento e estresse. PoliP participa em muitos dos processos de motilidade celular bacteriana, da formação de biofilme e virulência (KULAEV; VAGABOV; KULAKOVSKAYA, 2005).

As células dos mamíferos possuem PoliP, mas em quantidades menores que as células de microorganismos. As células animais não necessitam de PoliP como reservas de fosfato, com exceção das células do tecido ósseo. Entretanto, as funções exercidas por esses biopolímeros são de grande importância. Os PoliPs foram detectados em diferentes tecidos e órgãos e praticamente em todas as frações subcelulares: núcleos, mitocôndrias, membranas plasmáticas e microsomas. Em mamíferos, o PoliP desempenha predominantemente um papel regulador e foi implicado na regulação da atividade enzimática em células cancerosas, estimulação da coagulação sanguínea, regulação do transporte de íons mitocondriais, e regulação da atividade da cadeia respiratória. Embora uma enzima específica responsável pela produção de PoliP em mamíferos não seja atualmente conhecida, a síntese de PoliP foi detectada em células intactas de mamíferos (KULAEV; VAGABOV; KULAKOVSKAYA, 2005). Em 2010, Pavlov demonstrou que: (i) a produção de PoliP em mitocôndrias de mamíferos está diretamente ligada ao seu estado energético; (ii) a síntese de poliP está

intimamente ligada à atividade da ATP sintase, mas não requer ATP como substrato; (iii) o nível de PoliP regula o nível de ATP celular (PAVLOV et al., 2010).

3.3 Toxicologia do polifosfato

A maioria dos PoliPs adicionados aos alimentos é decomposta em ortofosfatos no estômago; na verdade, muitos são convertidos em ortofosfatos já durante o armazenamento a frio ou durante o cozimento. O PoliP é também facilmente degradado em ortofosfatos pela fosfatase alcalina dos intestinos e por outras enzimas do organismo humano. Os estudos por administração endovenosa (EV) evidenciam que durante a circulação sanguínea os polifosfatos também sofrem hidrólise. A excreção desses fosfatos ocorre principalmente por via urinária. Verifica-se que quanto maior a cadeia de PoliP mais lentamente é degradada (GOSSELIN, 1952; LANIGAN, 2001; OMS, 1974).

Estudos de toxicidade aguda para a administração oral de PoliP (hexametáfosfato de sódio) indicam valores de dose letal em 50% dos indivíduos (DL₅₀) de 3,7 g/kg e 2,4-2,9g/kg para camundongos e ratos, respectivamente. Por administração via intraperitoneal (IP), têm-se a DL₅₀ de 0,19-0,69 g/kg para ratos e 0,87 g/kg para camundongos. Na administração IP de PoliP em coelhos numa dose de 0,14g/kg não se observou sinais de toxicidade (LANIGAN, 2001). Considera-se que a dose máxima diária de ingestão de fósforo recomendável para humanos é de 70 mg/kg (WEINER et al., 2001).

Ratos machos (12 por grupo) receberam 0; 0,93 ou 3,5% de polifosfato de sódio na dieta por 150 dias (DYMSZA et al., 1959). As concentrações de fosfato e cálcio na dieta basal foram de 0,42 e 0,56%, respectivamente. O peso renal foi significativamente aumentado no grupo de tratamento de 3,5%. Não foram observadas lesões histopatológicas no rim. Nenhum outro efeito relacionado ao tratamento foi observado durante os exames macroscópicos ou histopatológicos. O nível de não observação de efeitos adversos para este estudo foi de 3,5% na dieta, o que era equivalente a 1,800 mg / kg / dia (DYMSZA.; REUSSNER; THIESSEN, 1959). Ratos (16 fêmeas e oito machos por grupo) receberam polifosfato de sódio na dieta desde o desmame aos 100 dias de idade por três gerações. O polifosfato de sódio foi administrado a 0,5%. Os animais da terceira geração foram sacrificados com 1 mês de idade. Duas ninhadas de cada geração foram examinadas. Nenhum dos fosfatos inorgânicos afetou a fertilidade, tamanho da ninhada, ou crescimento ou sobrevivência da prole (HODGE, 1964).

Em 1975, a *Food and Drug Administration* (FDA), agência reguladora dos Estados Unidos, avaliou a segurança dos fosfatos inorgânicos condensados para uso como ingredientes alimentícios. Com base em uma revisão completa da literatura científica até aquele momento, a FDA classificou esses produtos como são classificados como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS). A ampla aceitação de fosfatos condensados como aditivos alimentares por várias agências reguladoras diferentes indica um consenso de que os fosfatos inorgânicos não representam um risco para a saúde humana quando consumidos diariamente como parte de uma dieta normal (WEINER et al., 2001).

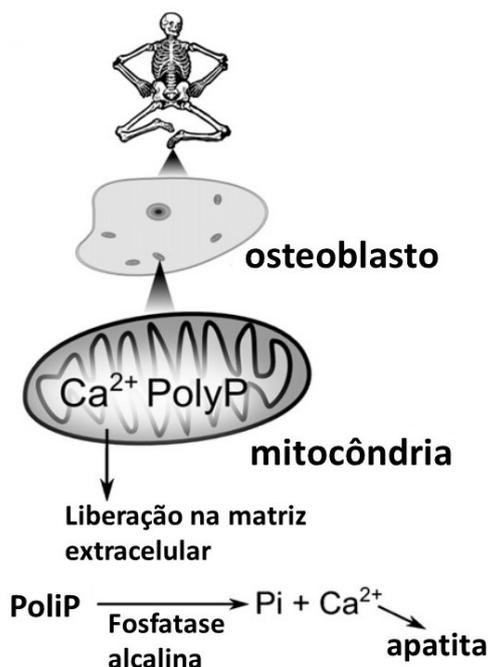
3.4 Polifosfato e tecido ósseo

O esqueleto vertebrado é composto de mineral de fosfato de cálcio conhecido como apatita. Após traumas ou sequelas patológicas, o esqueleto é continuamente reconstruído, reparado e reabsorvido durante o crescimento e remodelação óssea. Quantidades significativas de atividade de PoliP e exopolifosfatase foram detectadas em células semelhantes a osteoblastos derivadas de mandíbulas humanas. O conteúdo celular de PoliP em células semelhantes a osteoblastos diminuiu significativamente após o tratamento combinado de células com os estimuladores da proliferação e diferenciação de osteoblastos. O PoliP pode estar envolvido na modulação do processo de mineralização no tecido ósseo (LEYHAUSEN, 1998).

A mineralização do esqueleto está associada a grânulos elétron-densos não cristalinos, contendo cálcio e fosfato. Esses grânulos são originários de mitocôndrias que acumularam muito cálcio e perderam suas funções energéticas. As mitocôndrias absorvem fosfato e as condensam em PoliP e também sequestram Ca^{2+} . Os grânulos de polifosfato de cálcio poderiam servir como um depósito lábil de cálcio e fosfato em alta concentração, não cristalino (portanto, biodisponível), conforme representado na Figura 3. Estes grânulos encontram-se então disponíveis para serem transportados aos locais onde ocorrem a mineralização de apatita. Provavelmente, eles podem ser transportados para osteoblastos, que osteoblastos podem incorporar os grânulos no novo osso não mineralizado. Embora a fosfatase alcalina tenha sido considerada a enzima que degrada o PoliP para restaurar os níveis de fosfato, o exopolifosfatase (PPX), abundante nos osteoblastos, pode ser o mecanismo preferido. No decorrer da remodelação óssea o PoliP é um provável intermediário. Até agora, a enzima responsável pela síntese de PoliP nas células do tecido ósseo não foi revelada e as moléculas

sinalizadoras que determinam etapas separadas deste processo são desconhecidas (OMELON, 2009).

Figura 3 – Esquema ilustrativo simplificado da função do PoliP na formação do tecido ósseo.



Fonte: Adaptado de KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012.

Um estudo *in vitro* utilizando células semelhantes a osteoblastos revelou que o PoliP poderia induzir a expressão de genes envolvidos na diferenciação óssea e na calcificação celular (KAWAZOE, 2014). O PoliP também demonstrou acelerar a regeneração do tecido periodontal, incluindo a formação de osso alveolar, em ratos com defeitos artificiais no tecido periodontal (SHIBA et al., 2004).

Polifosfato de cálcio (PFCa) foi redescoberto como um novo material de reparo ósseo nos últimos anos. Este tipo de polímero inorgânico com uma forma de polímero de cadeia longa pode ser facilmente disposto para dar vidros de fosfato amorfo ou estruturas cristalinas, dependendo dos parâmetros de processamento e compostos de partida (WANG et al. 2009). Estudos como o objetivo de otimizar as capacidades de degradabilidade e mineralização do PFCa e, conseqüentemente, promover sua função biológica são desafios atuais. Um dos métodos de otimização utilizados é introduzir elementos diferentes no material para alterar sua estrutura e propriedades. Esses elementos dopados não exibem toxicidade e nem prejudicam o ambiente físico durante o processo de degradação do PFCa. Além disso, eles podem

desempenhar um papel significativo no metabolismo ósseo, no crescimento e na absorção da nutrição. Em geral, o efeito dos íons do elemento de dopagem nos defeitos cristalinos e na carga elétrica de superfície do PFCa é a seguinte: $Mg^{2+} > Na^+ > K^+ > Zn^{2+} > Sr^{2+}$. O elemento de dopagem com um raio iônico muito menor e igual valência em comparação com Ca^{2+} pode acelerar significativamente a degradação original e a taxa de mineralização de PFCa (SONG et al., 2009).

Pilliar (2016) investigou as características de partículas de PFCa poroso, formadas pelo uso de dois diferentes tipos de processamento, como preenchedores de cavidades ósseas em locais não suportadores de carga ou minimamente suportadores. As duas variantes de partículas de PFCa foram sintetizadas utilizando diferentes procedimentos de calcinação, realizada em duas etapas de aquecimento. Foram obtidas partículas de PFCa de degradação mais lenta (PFCaL) ou partículas de degradação mais rápidas (PFCaR) como sugerido por um estudo prévio de degradação conduzido *in vitro*. Os dois tipos de PFCa foram comparados como preenchedores de cavidades ósseas *in vivo* implantando partículas em defeitos criados em locais de côndilo femoral de coelho. O PFCaL e o PFCaR permaneceram implantados por períodos de 4 e 16 semanas. O estudo *in vivo* indicou uma diferença significativa na quantidade de osso novo formado nos locais preparados com PFCaL, resultando em mais formação óssea nova em comparação com PFCaR. A menor formação óssea característica do PFCaR foi atribuída à sua taxa de degradação mais rápida e resultando em maior concentração local de produtos de degradação de polifosfatos liberados (PILLIAR et al., 2017).

Song e colaboradores (2011) desenvolveram *scaffolds* ósseos bactericidas com potencial de osteointegração utilizando PoliP. Neste estudo, o revestimento de poli (álcool vinílico) (PVA) (7%) foi aplicado a um suporte de polifosfato de cálcio dopado com estrôncio impregnado com eritromicina usando um método de imersão em pasta. A análise por microtomografia de raios-X (micro-CT) mostrou que o revestimento de PVA reduziu o tamanho médio dos poros e a porcentagem de interconectividade dos poros em alguma extensão. Testes de resistência à compressão confirmaram que o revestimento de PVA aumentou significativamente a elasticidade do material e aumentou ligeiramente a resistência mecânica do *scaffold*. Além disso, descobriu-se que os *scaffolds* PCE-EM-PVA inibiram notavelmente a formação de osteoclastos. Os autores sugeriram que este compósito teria o potencial de promover liberação controlada de medicamentos com aplicações na engenharia de tecido ósseo (SONG et al., 2011).

3.5 Aplicações tecnológicas do polifosfato

Devido às suas propriedades químicas peculiares, baixo custo de síntese, não toxicidade e biodegradabilidade, o PoliP é amplamente utilizado em pesquisas científicas e em produção tecnológica. Trata-se de um composto de uso rotineiro em diversos ramos da indústria mineral, alimentícia e na agricultura. Além disso, polifosfatos de diferentes fontes e características, vêm sendo testados em diferentes aplicações farmacêuticas. A Figura 4 mostra os principais usos descritos na literatura, não se limitando a estes. Nas seções subsequentes serão relatados seu uso industrial mais frequente e algumas aplicações científicas.

Figura 4 – Usos e aplicações estabelecidos do polifosfato.



Fonte: próprio autor.

3.5.1 Aplicações na agroindústria e no meio ambiente

O polifosfato de amônio, um sal inorgânico de ácido polifosfórico e amônia, é um dos fertilizantes fosfóricos mais frequentemente usados (GOWARIKER et.al, 2009). É aplicado tanto no solo como na fertilização de microalgas que são utilizadas como alimento para peixes de viveiro (PARKER, 2011). Trata-se de um fertilizante mais eficaz do que fosfato de rocha (apatita) e superfosfatos, que são uma mistura de fosfato dicálcico e sulfato de cálcio. Os polifosfatos comerciais de amônio são geralmente uma mistura de orto e polifosfato. O comprimento da cadeia do composto polimérico é variável e pode ser superior a 1000 (KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012).

PoliPs são adicionados aos detergentes em pó, com o objetivo de complexar os íons metálicos responsáveis pela dureza das águas e tornar o meio alcalino, melhorando a ação de limpeza (OSORIO; OLIVEIRA, 2001) Muitos dos polifosfatos de sódio vítreos (como sais de Calgon e de Graham) são usados para abrandar a água e para desincrustar caldeiras e tubulações. O PoliP dissolve, estabiliza ou dispersa os minerais precipitados que já existem na água. Eles servem como uma espécie de "trocador iônico" solúvel. Para sequestrar ferro, manganês e cálcio, é necessária uma proporção molar de 1:1 unidades de fosfato. Uma dose de apenas 2 a 4 mg/L é necessária para diminuir o crescimento de cristais de calcita (CaCO_3). Acredita-se que isso se deva à adsorção de íons de fosfato na superfície dos núcleos de calcita, o que então impede o crescimento adicional de cristais. As cadeias de polifosfato em concentrações de poucos ppm também protegem superfícies metálicas submetidas a água dura pela formação de filmes inibidores de corrosão. A corrosão é impedida pela polarização anódica que resulta da adsorção do íon fosfato no filme de calcita que se deposita na superfície do metal (KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012).

3.5.2 Aplicações alimentícias

Os polifosfatos apresentam diversas propriedades que os tornam um ingrediente eficaz e multifuncional de alimentos como carnes, aves, pescados, embutidos e laticínios. Estas propriedades são: alta capacidade de tamponamento e propriedades quelantes; capacidade de retenção de água; efeito antibacteriano; efeito antioxidante. Deste modo, ele ajuda a prolongar a vida útil do produto e evita alterações indesejáveis na cor do produto durante o armazenamento. Além disso, o PoliP retarda a rancidez oxidativa. O PoliP é também amplamente utilizado no processamento e conservação de diversos outros alimentos, tais como ovos, cereais, sucos, óleos e gorduras, em razão de sua capacidade estabilizante de modo geral. O PoliP ajuda a manter dispersões, emulsões e suspensões alimentícias estáveis, devido à capacidade de ligação à água e a formação de gel (HOURANT, 2004).

Os polifosfatos são empregados na indústria da carne para prevenir a coagulação do sangue. Os polifosfatos revelaram-se mais eficazes em promover a complexação de cálcio do que o citrato de sódio, apresentando ainda a vantagem de não levar a uma precipitação adversa de fibrina. O tratamento com PoliP de peixes, carnes e aves antes do congelamento diminui o volume de gotejamento, ou seja, uma menor quantidade de líquido é liberado quando o peixe é descongelado (KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012).

O PoliP inibe o crescimento microbiano e, em geral, as bactérias gram-positivas são mais sensíveis que as gram-negativas. O *Bacillus cereus*, importante bactéria promotora de contaminação no âmbito da indústria alimentar, sofre lise e morte celular sob ação do PoliP em concentrações iguais ou acima de 0,1% m/v. Ocorre também a inibição de germinação e crescimento de esporos. Uma concentração maior de PoliP (1,0%) foi até mesmo esporicida. A capacidade quelante de cátions do PoliP é geralmente considerada como a causa desses efeitos inibitórios observados. PoliP também está implicado no desencadeamento de vazamento de Mg^{2+} das células, perda de osmorregulação e dano de membrana em *Staphylococcus aureus*, promovendo assim um efeito bacteriostático. (RAO; GÓMEZ-GARCÍA; KORNBERG, 2009)

3.5.3 Aplicações farmacêuticas, farmacológicas e biomédicas

Na indústria farmacêutica, os polifosfatos são polímeros de interesse como base para novos materiais substitutos do osso, como veículos para liberação prolongada de fármacos e como reagente para a síntese de compostos biologicamente ativos. Existem pesquisas que relatam o uso de polifosfatos na preparação de matrizes e co-polímeros utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos (DION, 2015).

Liu et al. (2010) relata o uso de um polifosfato hiper-ramificado (PHR) solúvel em água que, devido ao grande número de grupos hidroxila funcionais da superfície, pode ser utilizado como transportador para administração intracelular de fármacos. O trabalho investigou tanto a biocompatibilidade quanto a biodegradabilidade do PHR. Em seguida foi avaliada a captação celular do PHR e a sua conjugação ao fármaco clorambucil. Os ensaios *in vitro* indicaram que o PHR possuía a excelente biocompatibilidade para células COS-7. As análises de RMN provaram que o PHR foi degradado hidroliticamente e o processo de degradação foi acelerado em ambientes básicos e ácidos, especialmente em ambientes ácidos. Além disso, os produtos de degradação não eram tóxicos para as células COS-7. A atividade significativa do conjugado PHR-clorambucil foi atribuída à biodegradabilidade do PHR, que libera o clorambucil livre nas células (LIU et al, 2010).

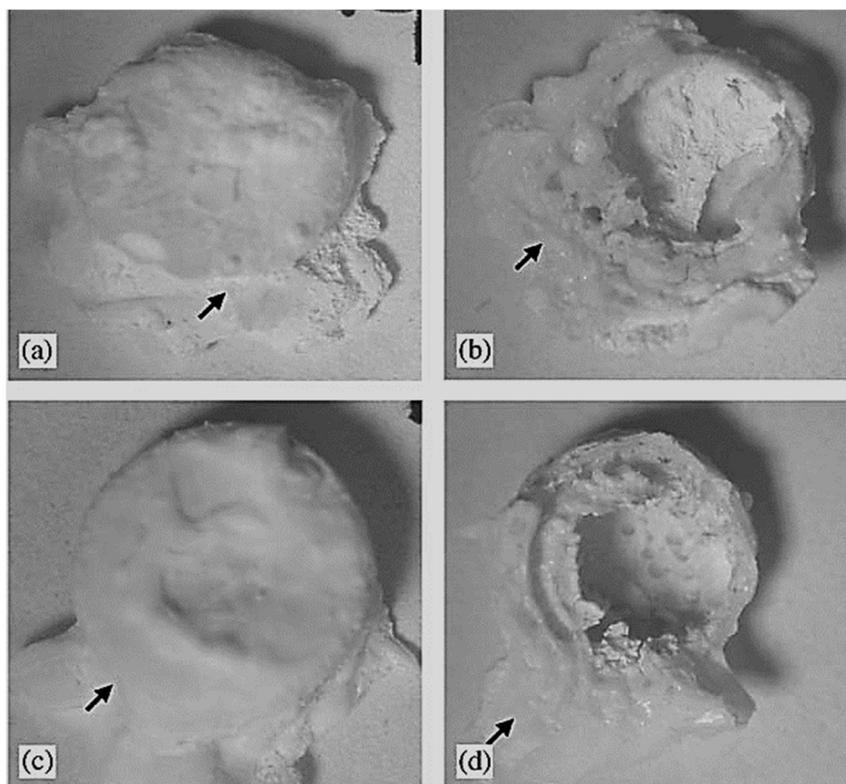
O polifosfato de cadeia longa, com grau de polimerização entre 25 e 80, é reconhecido como sendo um composto antioxidante, pois apresenta atividade inibitória da peroxidação e atividade de neutralização dos radicais livres. Este caráter é explorado em diversos produtos alimentícios e farmacêuticos. O PoliP vem sendo utilizado em produtos cosméticos, por efetivamente apresentar efeitos inibitórios sobre o envelhecimento da pele, por melhorar a

elasticidade da pele e prevenir marcas de expressão. De fato, este composto é encontrado na composição de alguns sabonetes e sais de banho, hidratantes, cremes nutritivos, loções e perfumes. As concentrações de polifosfatos nas formulações variam de 0,001 – 1% em massa. (HONG et al., 2004).

Pereira em 2007, sugeriu a viabilidade da aplicação do polifosfato de sódio no preparo de misturas para Nutrição Parenteral (NP), através da avaliação físico-química das misturas contendo PoliP e de sua interação com cálcio e outros componentes da NP (PEREIRA, 2007). Os dados permitiram afirmar que o PoliP consegue estabilizar íons Ca^{2+} , de forma que não há formação de precipitados ou cristais de fosfato de cálcio, em quantidades equivalentes àquelas normalmente indicadas em NP, na proporção molar P:Ca em torno de 1. A presença de precipitados insolúveis de fosfato de cálcio em misturas para NP é potencialmente fatal se administradas à pacientes pediátricos prematuros e neonatais, visto que partículas com tamanho $> 5 \mu\text{m}$ de diâmetro podem causar embolia (REEDY; KUHLMAN; VOYTOVICH, 2005).

Dion e colaboradores (2015) produziram matrizes de liberação de antibiótico a base de polifosfato de cálcio (PFCa) usando uma técnica de processamento que envolveu a exposição a alta umidade de pastas de PFCa carregadas com antibiótico por 0; 5 ou 24 h. Após o período de gelificação determinado, as amostras foram secas por um período de 24h. Por um período de até 130 h, o meio de eluição foi monitorado quanto aos níveis de liberação de vancomicina, íon Ca^{2+} , ortofosfato e polifosfato. A atividade da vancomicina também foi avaliada após 1; 24 e 130 h. A técnica de RMN ^{31}P foi usada para monitorizar, ao longo do processo de eluição por 24h, as alterações no comprimento da cadeia dentro de um disco de vancomicina gelificado. O processo de gelificação e secagem reduziu significativamente a taxa de liberação de vancomicina entre 2 a 4h de eluição inicial, enquanto prolongou o período de liberação de antibiótico por 80h. As condições suaves associadas à fabricação da matriz permitiram prontamente a incorporação da vancomicina dentro de um ambiente que não interrompia a atividade antibiótica. Em todo o processo de eluição, todos os grupos de amostras experimentaram intumescimento considerável seguido por certa erosão aparente na massa (Figura 5). A lise da cadeia de fosfato foi claramente observada no final do período de eluição (DION et al., 2015).

Figura 5 - Imagens digitais de matrizes secas por 24 h após o estudo de 6 dias de eluição (largura do campo = 11 mm). Os discos apresentam 7,5 mm de diâmetro. As setas pretas indicam onde o núcleo interno das matrizes começou a fluir para o exterior. (a) e (b) mostram as superfícies superior e inferior de uma amostra controle (branco) secas por 24 h. As imagens (c) e (d) mostram as superfícies correspondentes de uma amostra secas por 24 h contendo vancomicina.



Fonte: DION et al., 2015

Isolados das bactérias gram-negativas *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter ssp.* são naturalmente resistentes a muitas classes de antibióticos. Usando a técnica de difusão em disco, mostrou-se que permeabilizadores de membrana como PoliP aumentaram a suscetibilidade a uma variedade de antibióticos, incluindo imipenem, ciprofloxacina, tetraciclina e rifampicina. Esses efeitos provavelmente se devem também às propriedades quelantes de metais do PoliP (DENNY; WEST; PANIGRAHI, 2003).

O tetrapolifosfato de sódio e os polímeros mais longos, com comprimentos médios de 15, 34 e 91 resíduos de fosfato, inibiram significativamente a infecção de células pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) *in vitro*. Supõe-se que o efeito anti-HIV do PoliP é causado pela ligação destes compostos à superfície da célula hospedeira e ao vírus, inibindo assim a ligação do vírus (LORENZ et al., 1997).

Kim (2001) reivindica o uso de polifosfatos na promoção da cicatrização de feridas. O documento revela que PoliP aplicado a úlceras, tais como cortes ou sequela de operações cirúrgicas, pode efetivamente curar as feridas sem deixar nenhuma ou quase nenhuma cicatriz. O mecanismo de ação é justificado pela atividade antibacteriana do PoliP (KIM; LEE, 2001). Contudo, estudos posteriores comprovam que a proliferação de células de fibroblastos humanos normais pode ser melhorada *in vitro* pela adição de PoliP aos meios de cultura. As atividades mitogênicas do fator de crescimento de fibroblastos ácido (FGF-1) e do fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF-2) também podem ser aumentadas por PoliP. PoliP facilitou a ligação do FGF-2 aos seus receptores da superfície celular. O mecanismo de estimulação do crescimento por PoliP foi semelhante ao relatado com a heparina. PoliP pode facilitar a ligação de FGF-2 aos seus receptores e promover a sinalização através dos mesmos locais de ligação de sulfato de heparina, FGF-2 e seus receptores. Embora PoliP e heparina sejam ambos polianiónicos, eles têm estruturas diferentes, e é provável que o mecanismo de modulação da atividade do FGF por PoliP seja diferente do observado na heparina. O nível de estimulação do crescimento por PoliP é maior que o da heparina (SHIBA et al, 2003).

Outros estudos comprovaram a ocorrência de PoliPs com grau de polimerização entre 70-75 grupos fosfatos nos grânulos densos de plaquetas humanas através de visualizações após coloração com 4,6-diamidino-2-fenilindol, por RMN e por eletroforese em gel. Os grânulos são ricos em Ca^{2+} , semelhantes a acidocalcisomos, e são considerados responsáveis pelo fluxo de Ca^{2+} no citosol. A liberação de PoliP das plaquetas ativadas acelera a coagulação sanguínea ao ativar a via de contato, incluindo o fator V, que, por sua vez, antagoniza a proteína anticoagulante natural, o fator tecidual inibidor da via. A poliP atrasa também a lise do coágulo, aumentando um agente antifibrinolítico natural, o inibidor da fibrinólise ativável pela trombina. Assim, o PoliP liberado das plaquetas promove a formação e estabilidade do coágulo. A hidrólise de PoliP pelas fosfatases promove a inibição da coagulação e ativação da fibrinólise durante a cicatrização de feridas (SMITH et al., 2006).

Em Dissertação de Mestrado de 2011, Jovino demonstrou a ação do polifosfato de sódio, com $n = 9$, sobre as propriedades biomecânicas de hemácias estocadas (concentrado). As hemácias na presença do PoliP apresentaram menor perda de elasticidade (em função do tempo de estocagem), principalmente a partir da 5ª semana de armazenamento, indicando que o PoliP pode ser um potencial candidato a solução preservante de concentrado de hemácias. A sua ação sob a coagulação foi também analisada através do tempo de tromboplastina parcialmente

ativada e tempo de protrombina, mostrando aumento do tempo de coagulação cálcio dependente proporcionalmente ao aumento da concentração de PoliP no meio (JOVINO, 2011).

O custo do ATP para uso como agente fosforilante em escala industrial é proibitivo, assim como os altos custos dos reagentes, como fosfato de acetila, fosfoenolpiruvato e fosfato de creatina, que são usados em sistemas enzimáticos de regulação de ATP. Em seu lugar, o PoliP tem sido usado para regenerar o ATP com fosfoquinase (PPK) imobilizada em uma coluna (KAMEDA et al., 2001).

Durante o processo de apoptose celular, a cromatina nuclear sofre condensação e, nesse momento, uma endonuclease dependente de cálcio (caspase-3) é ativada e cliva o ácido desoxirribonucleico nuclear (DNA). A adição de PoliP a células plasmáticas humanas (CPs) inibiu a secreção de imunoglobulina e estimulou a apoptose. A estimulação de PoliP foi específica para as linhagens de CP e mieloma (CP maligno) bem como para células de mieloma primário e linhagens linfóides B. A adição de poliP à linhagem celular de mieloma ativou a caspase-3 e interrompeu o ciclo celular. Estas observações sugerem a relevância do PoliP para a resposta imune humoral e como um alvo para a terapia do mieloma (HERNANDEZ-RUIZ et al., 2006).

3.5.4 Aplicações industriais diversas

O polifosfato de amônio também é usado como um retardante de chama inorgânico de alta eficiência, que é não tóxico e não-halógeno. Seu mecanismo de ação é a seguinte: sob a influência de altas temperaturas, o PoliP perde a água ligada para produzir vapor que incha a tinta à prova de fogo. Ocorre a formação de uma camada espessa de isolamento térmico, que isola o material do ar e do aquecimento e evita o desenvolvimento da chama. Sua participação pode ser de até 25% na composição total de material à prova de fogo. O PoliP não inflamável é espalhado sobre as superfícies tratadas com o mesmo. É usado como um retardador de chama para materiais de fibra (papel, madeira, têxteis à prova de fogo), todos os tipos de polímeros, placa de construção refratária, material enrolado, resina epóxi e resina não saturada, cabo e borracha, material plástico de dispositivo eletrônico, etc. (KULAKOVSKAYA; VAGABOV; KULAEV, 2012).

Vidros a base de fosfato vêm sendo utilizados como suportes para catálise química e filmes finos sobre metais e ligas (ROSSETO; SANTOS; GALEMBECK, 2006). Algumas pesquisas mostram que os géis de polifosfato podem também ser explorados em sua

propriedade de bom condutor iônico (MENDES et al., 2006) ou ainda na obtenção de materiais híbridos, onde atuariam como matrizes hospedeiras de compostos com propriedades óticas, tais como, lantanídeos, corantes e indicadores (CASTRO et al., 2004; NERO et al., 2003). Esses géis compostos respondem à presença de moléculas como a amônia e mudam de cor na presença desse analito. Criptatos de térbio foram encapsulados em géis de polifosfato de alumínio onde os complexos baseados em térbio mantiveram suas propriedades luminescentes com um aumento substancial no tempo de vida de fluorescência de 0,7 ms em solução livre para 1,0 ms no gel. Esse achado reflete algumas fortes interações entre o cátion complexo e a matriz do gel (GALEMBECK et al., 2002). As interações de polifosfatos de sódio com contra-íons multivalentes, entre as quais o zinco (Zn^{2+}) também foi explorado para produzir coacervatos polifosfato- Zn^{2+} que foram posteriormente transformados em vidros de polifosfato de zinco capazes para revestir superfícies ou fibras. Vidros de PoliP são produzidos por reação no estado fundido tendo como precursores fosfatos monoméricos e óxidos metálicos (GREENWOOD; EARNSHAW, 1998). Os vidros de polifosfatos apresentam baixa temperatura de transição vítrea e um coeficiente de dilatação elevado. Os cátions metálicos são os componentes que determinam as propriedades físicas desses vidros e, conseqüentemente, suas aplicações (BROW, 2000).

Materiais vítreos à base de fosfato podem ser obtidos também após tratamento térmico de géis formados pela mistura de polifosfato e íons metálicos di- e trivalentes em meio aquoso (MASSON; SOUZA; GALEMBECK, 1997). Os géis consistem no material precipitado no sistema, que apresenta uma estrutura supramolecular tridimensional (LIMA; GALEMBECK, 1994). Outro processo de obtenção de vidros à base de fosfato é a coacervação, que se trata de uma separação de fases líquido-líquido, onde uma fase é rica em vesículas coloidais, chamados coacervatos, e a outra é pobre, o sobrenadante. O processo de formação de coacervatos é praticamente idêntico ao processo de formação de géis. Os fatores que parecem condicionar a formação de um ou outro são: a constante dielétrica e o pH do meio, a natureza e concentração dos precursores e a temperatura (PALAVIT; MONTAGNE; DELAVAL, 1995; WILLOT et al., 2002). A fase de coacervato pode ser extraída e seca para também formar um material vítreo sólido.

4 RESULTADOS

Em pesquisa realizada desde o ano de 2005, o autor da presente Tese investigou a aplicação de polifosfato de sódio como uma fonte inorgânica alternativa de fósforo em nutrição parenteral. A compilação dos resultados obtidos resultou na publicação de artigo científico (Artigo 1) na revista *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.

A presente Tese buscou também desenvolver uma nova cerâmica fosfatada (Artigo 2), que apresentasse similaridade e biocompatibilidade com o osso humano, para ser usada como substituto ósseo na forma de um cimento. O material aqui proposto foi produzido pelo método de coacervação utilizando polifosfato de sódio como precursor e variando-se as temperaturas de calcinação.

Durante a presente pesquisa foram ainda desenvolvidos compósitos a base de Alginato para utilização como matriz polimérica de cimentos ósseos injetáveis contendo as cerâmicas fosfatadas previamente obtidas (Artigo 3).

4.1 ARTIGO 1 - SHORT CHAIN POLYPHOSPHATES AS A STRATEGIC COLLOIDAL SOURCE OF PHOSPHATE FOR PARENTERAL ADMIXTURES

O artigo 1 desta Tese está disposto na íntegra no APÊNDICE A.

4.2 ARTIGO 2 - MÉTODO DE COACERVAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE CERÂMICAS A BASE DE POLIFOSFATO DE CÁLCIO PARA APLICAÇÃO EM CIMENTO ÓSSEO

RESUMO

Em busca de uma cerâmicas sintéticas, que apresentem similaridade estrutural com as apatitas das estruturas ósseas do esqueleto humano, foi testado o uso de polifosfato de sódio de cadeia curta $((\text{NaPO}_3)_n)$ ($n = 2 - 19$, com valor médio 10), juntamente com nitrato de cálcio $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ e cloreto de cálcio $(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ como precursores na obtenção de materiais cerâmicos, através do método de coacervação em fase aquosa. Após secagem, os materiais obtidos foram calcinados em três diferentes temperaturas (300, 500 e 700 °C) e caracterizados. Os resultados indicam que foram obtidas cerâmicas baseadas em fosfato de cálcio (proporções P/Ca = 0,6 – 2,0) com morfologia na forma de grãos (rugosos, com pétalas finas e/ou agulhas) de tamanho micrométrico ($< 250 \mu\text{m}$) e área superficial entre 0,02 – 2,50 m^2/g . A análise

vibracional através de espectroscopia Raman e FTIR confirmou a presença de grupos PO_4^{3-} . Constatou-se que, com o aumento da temperatura, houve mudanças de fases bem distintas desde o estado inicial amorfo dos materiais até a temperatura final a 700 °C constatando-se a presença das fases cristalinas monetita, brushita, hidroxiapatita e outras não identificadas. Os resultados mostram uma metodologia simples e de baixo custo para a obtenção de cerâmicas de porosidade controlável, baseadas em fosfato e cálcio, e com características promissoras para uso como substituto ósseo.

Palavras-Chave: Coacervação. Polifosfato. Cerâmica. Cimento ósseo.

4.2.1 Introdução

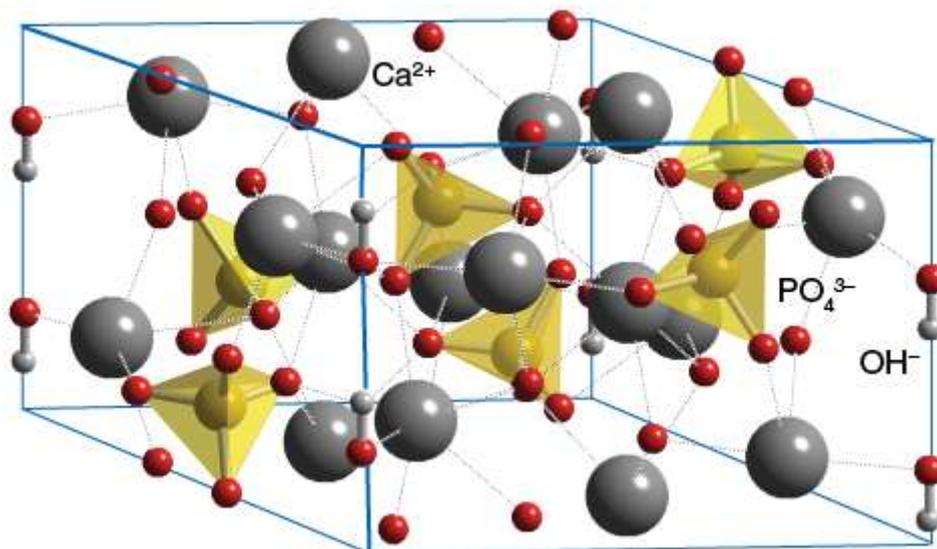
O osso é um tipo de tecido conjuntivo, composto por células ósseas e matriz extracelular mineralizada, característico da classe dos animais vertebrados. Portanto, trata-se de um tecido especializado que, por ser resistente e duro, transforma as contrações dos músculos esqueléticos em movimentos úteis, atuando no suporte de forças e tensões que recebe. Além de permitir estabilidade estrutural do corpo, os ossos protegem alguns órgãos vitais, tais como, cérebro, coração e pulmões etc. Estes também são considerados depósitos de íons fosfato e cálcio, dentre outros, que são liberados de maneira controlada, mantendo constante as concentrações nos líquidos corporais por homeostasia. O osso participa ainda da hematopoiese, ou seja, o processo de renovação celular do sangue a partir da medula óssea (RODAN, 1992). Um tipo de tecido conjuntivo que apresenta capacidade de diferenciação osteogênica recobre todas as superfícies ósseas. Na superfície externa, encontra-se o perióstio, já nas cavidades internas, encontra-se o endóstio. Estas camadas de tecido contribuem para o processo de remodelação óssea (NEWMAN; TAKEI; CARRANZA, 2004).

Conforme descrito por Misch (2000), pode-se definir a remodelagem como o processo, ocorrido em osso previamente existente, que gera uma modificação ou reestruturação interna. Esse processo é regulado pela associação de mediadores mecânicos, metabólicos, bioelétricos e locais (fatores de crescimento e citocinas). Deste modo, quando submetido a novas exigências mecânicas, o osso pode alterar as suas propriedades e configurações (SCHNEIDER et al., 1995). Se ocorrer uma lesão, como uma fratura, por exemplo, inicia-se através desse mecanismo um processo de regeneração, ou seja, haverá substituição do tecido danificado por um tecido idêntico ao anterior, com as mesmas funções fisiológicas e metabólicas. Normalmente não ocorre regeneração espontânea em grandes perdas, provocados por traumas, infecções,

neoplasias e anomalias de desenvolvimento, pois, esta capacidade regenerativa do osso é limitada pelo tamanho do defeito. Esse fato representa atualmente um problema para a medicina e odontologia (FROHBERGH et al., 2015). O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo que envolve células que compõem o tecido ósseo, que são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (ANDRADE, 2007). Os osteoblastos são os promotores da osteogênese. Atuam, durante o desenvolvimento ou a reparação do tecido ósseo, produzindo a matriz óssea. Os osteócitos são células localizadas no interior das lamelas do osso esponjoso e compacto que dão suporte ao osso. Os osteoclastos desempenham um papel fundamental no processo de remoção e reabsorção do osso que é destruído. São essas células que realizam a reabsorção do tecido ósseo mineralizado, permitindo a liberação de cálcio.

Na composição da matriz óssea incluem-se 33% de matriz orgânica e 67% de compostos inorgânicos (TEN CATE, 1986). As fibras de colágeno de tipo I, em porcentagens de 85 a 95%, compõem a matriz orgânica extracelular do osso (RODAN, 1992). O colágeno presente no osso se encontra envolvido por uma substância de suporte, o cimento. Este cimento orgânico preenche os espaços entre as fibrilas dando consistência ao tecido ósseo. Outros tipos de proteínas, não colágenas, também compõem a matriz orgânica, dentre essas temos: as glicoproteínas, fosfoproteínas, sialoproteínas, osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea (POM) (NEWMAN; TAKEI; CARRANZA, 2004). O constituinte mineral mais importante e abundante do osso é a hidroxiapatita (HA), constituída por íons cálcio e fosfato (Figura 6). O tamanho dos cristais de HA pode atingir de 10 a 100 nm. A dureza e resistência características do tecido ósseo é propiciada pela associação dos cristais com as fibras de colágeno. A formação da HA nos ossos ocorre através da reação de fosfato de cálcio com hidróxido de cálcio. Outros materiais inorgânicos, tais como carbonato de cálcio, sódio, magnésio e fluoreto, também são incorporados durante esse processo, conforme ocorre crescimento dos cristais (CONSTANTINEUSCU et al., 2002).

Figura 6 - Estrutura tridimensional da hidroxiapatita.



Fonte: <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>

O termo biomaterial foi redefinido, durante a segunda Conferência sobre Consenso nas Definições em Biomateriais realizado em *Chester* no ano de 1991, como sendo: "um material destinado a contatar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo" (WILLIAMS; BLACK; DOHERTY, 1992). As principais características para selecionar um material para utilização médica são: (i) biocompatibilidade, com ausência de efeitos nocivos ou tóxicos; e (ii) propriedades biomecânicas capazes de atenderem às solicitações estáticas e dinâmicas a que se sujeitará durante a sua vida útil (AFONSO, 1998).

Nossa sociedade atual apresenta uma expectativa de vida que vem crescendo a cada dia, ao mesmo tempo em que convive com a realidade de seus corpos deteriorarem-se mais rapidamente. Uma das consequências do envelhecimento é a diminuição da resistência dos ossos e o aumento da probabilidade de fratura e perda óssea. A perda de tecido ósseo pode ocorrer por diversos fatores, como: procedimentos cirúrgicos, trauma, fraturas e patologias, câncer e osteoporose. Muitas vezes, devido à perda de substância óssea, não há reparo completo, resultando em um defeito que pode implicar comprometimento da estética e perda parcial ou total da função da estrutura lesada (GRANDI, 2007). Portanto, diante desse problema o desenvolvimento de biomateriais para implantes ósseos é um tema que ocupa um lugar privilegiado nas pesquisas de materiais. O substituto ósseo ideal é não-humano, estéril, atóxico, imunologicamente compatível e encontrado em quantidades suficientes. Este deverá ser capaz

de induzir diferenciação de células locais para formação de células ósseas e, ao mesmo tempo, prover a gradual reabsorção e condução estrutural para a formação de novo osso. Um dos grandes problemas em situações cirúrgicas são as lacunas deixadas pelo tecido ósseo perdido, onde o crescimento de tecido conectivo nesses defeitos é frequente, impedindo assim a formação de novo tecido ósseo o que pode causar aberrações anatômicas e distúrbios funcionais. Portanto, na reparação destes problemas os biomateriais, substitutos ósseos aplicados irão agir como uma barreira mecânica, impedindo o crescimento de tecido fibroso ou interposição muscular no defeito ósseo (AABOE; PINHOLT; HJORTING-HANSEN, 1995). A propriedade de poder guiar a formação óssea na sua superfície, que alguns materiais possuem quando são implantados em tecido ósseo, é denominada osteocondução. Este processo ocorre pela penetração de vasos nos espaços e/ou nos poros existentes na estrutura do material, que vão induzir a deposição de osso imaturo O crescimento ósseo ocorre pela reabsorção e aposição da estrutura óssea existente ao redor. A propriedade de certos materiais de promover a formação de tecido ósseo quando são implantados em tecidos não ósseos, é chamada de osteoindução. Este fenômeno consiste na conversão fenotípica de células dos tecidos moles em precursores do tecido ósseo, através de uma estimulação apropriada (DACULSI et al., 2013).

Os biomateriais substitutos ósseos são classificados quanto à origem em: biológicos, que são os chamados enxertos ósseos, e sintéticos, que são os materiais aloplásticos (metais, cerâmicas, vidros bioativos, polímeros) (FIGUEIREDO et al., 2004). As cerâmicas são materiais que possuem boa estabilidade dimensional, resistência ao desgaste e à compressão e estabilidade em ambientes ácidos. Atuam como isolantes térmicos e elétricos e são estáveis a altas temperaturas. Contudo, as cerâmicas, geralmente, são menos densas do que a maioria dos metais e suas ligas (DEE; PULEO; BIZIOS, 2003). Dentre as diversas composições de cerâmicas existentes, as cerâmicas de fosfato de cálcio, devido à similaridade química e estrutural com a apatita biológica, são os materiais mais utilizados como substitutos ósseos (tanto na forma de cimento como no desenvolvimento de próteses específicas). As cerâmicas com as mais diferentes composições de fosfato de cálcio apresentam excelente biocompatibilidade e comportamento bioativo, possuindo assim elevados níveis de osseointegração e osteocondução (DOROZHKIN, 2010). Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , sob condições alcalinas ou ácidas. Uma forma usual de classificação dos diferentes fosfatos de cálcio é pela razão molar entre os elementos de cálcio e fósforo (Ca/P), que costuma variar entre 0,5 e 2,0. Menores taxas de solubilidade em condições neutras e baixas taxas de degradação são

observadas em compostos com maior razão Ca/P (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Fosfatos de cálcio com diferentes morfologias e estequiometrias podem ser preparados variando os parâmetros de síntese como: temperatura de precipitação, pH do meio, tempo reacional, velocidade de adição de reagentes, temperatura do tratamento térmico (RODRIGUEZ-LORENZO; VALLET-REGI, 2000). A Tabela 1 mostra os diversos tipos de fosfatos de cálcio e suas relações Ca/P.

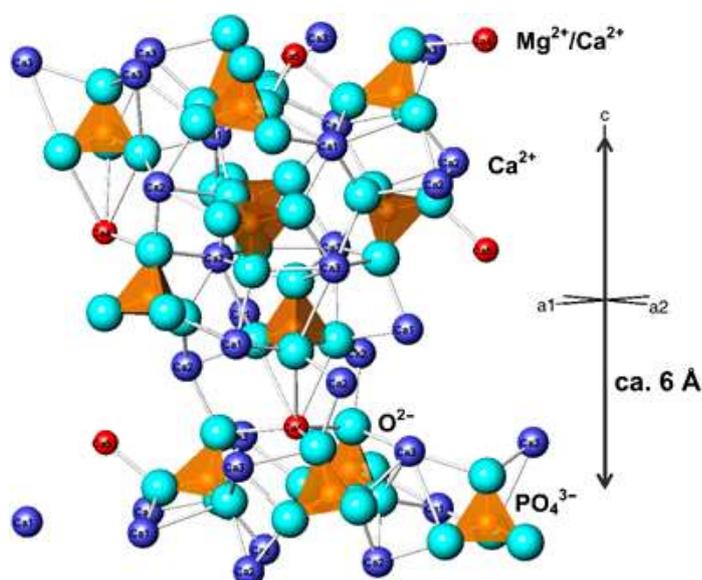
Tabela 1 – Tipos de fosfatos de cálcio e suas relações Ca:P .

CA:P	FÓRMULA QUÍMICA	NOME QUÍMICO	NOME MINERAL
0,5	$[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]_n$	Polifosfato de cálcio	-
1,0	CaHPO_4	Fosfato dicálcio	Monetita
1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dicálcio dihidratado	Brushita
1,33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de octacálcio	-
1,43	$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	-	Whitelockita
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico	-
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	-	Hidroxiapatita
2,0	$\text{C}_4\text{P}_2\text{O}_9$	Fosfato de tetracálcio	-

Fonte: Adaptado de Dorozhkin (2011).

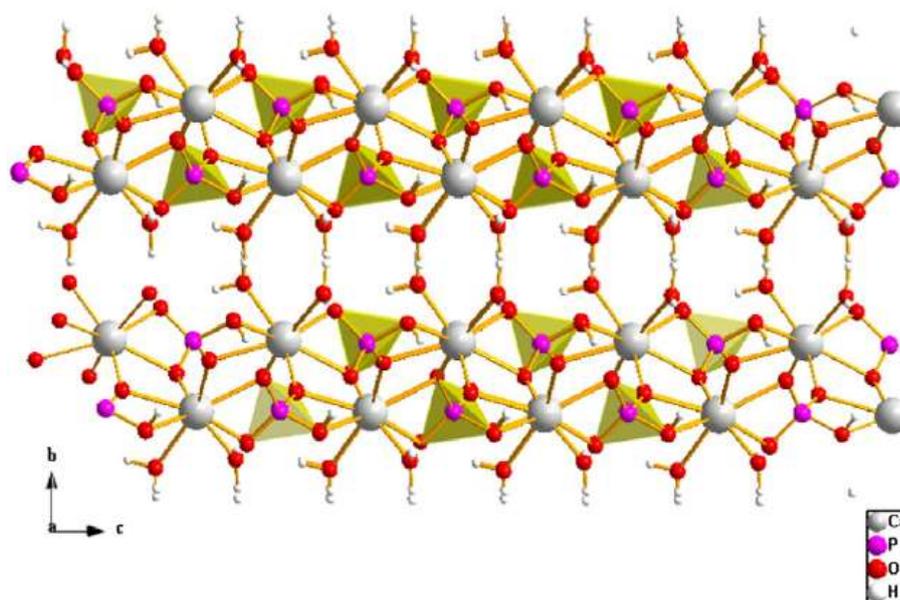
Além da hidroxiapatita (HA), o fosfato tricálcico (Figura 7) e a brushita (Figura 8) se destacam entre os fosfatos de cálcio mais utilizados.

Figura 7 – Estrutura cristalina do fosfato tricálcico, contendo Mg^{2+} como substituinte.



Fonte: Kannan et al., 2008.

Figura 8 – Estrutura cristalina da Brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).



Fonte: Amer et al., 2014.

Recentemente, cerâmicas à base de polifosfato de cálcio (PFCa), vêm sendo estudadas como possíveis materiais substitutos de ossos devido a (i) sua composição, (ii) suas propriedades mecânicas, (iii) sua degradabilidade em ambientes biológicos (SHANJANI et al., 2013). PFCa, com uma composição química de $[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]_n$ e com a relação cálcio para fosfato de 0,5 é formado pela condensação repetida dos grupos tetraédicos de fosfato por ligações entre oxigênios $(\text{PO}_4)^{3-}$ constituindo uma estrutura de rede de cadeia linear. Dependendo dos componentes de partida e dos parâmetros do processo, o PFCa pode ser produzido como um vidro de fosfato amorfo ou uma estrutura cristalina (GRYNPAS et al., 2002). Essa diferença leva a uma distinção em basicidade, resultando em diferentes taxas de solubilidade e degradação *in vivo* (BOHNER, 2000). A taxa global de dissolução físico-química depende de vários fatores, incluindo a área superficial por unidade de peso do material, a cristalinidade do material, o grau de polimerização, a solubilidade e a extensão das alterações no pH e na composição química do fluido de incubação (WANG et al., 2009).

O presente estudo pretende obter, utilizando a metodologia de coacervação em fase aquosa e posterior tratamento térmico do material cerâmico a base de polifosfato de cálcio para aplicação como biomaterial para substitutos ósseos.

4.2.2 Material e Método

4.2.2.1 Preparo das cerâmicas

Para o preparo da cerâmica foram utilizados como precursores hexametáfosfato de sódio ((NaPO₃)_n, n=10, Sigma-Aldrich, 96%,) e nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂.4H₂O, Dinâmica, PA) na proporção de Ca/P = 1,67. Soluções aquosas de (NaPO₃)₁₀ e Ca(NO₃)₂.4H₂O foram misturadas, seguido de vigorosa agitação por cerca de 15 minutos. Deixou-se o material em repouso por aproximadamente 24 horas. O precipitado foi filtrado e lavado com água destilada. O material foi secado em estufa a 80 °C por 12 h. Posteriormente, os pós obtidos foram calcinados a temperaturas de 300, 500 e 700 °C por 1 h. Os pós foram caracterizados por técnicas analíticas usuais para determinação estrutural e morfologia.

Realizou-se novamente a síntese de cerâmicas de polifosfato de cálcio. Dessa vez, utilizando como precursores (NaPO₃)₁₀ e Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O, Dinâmica, PA) obedecendo-se a proporção Ca/P igual a 1,67. Soluções aquosas de (NaPO₃)₁₀ e CaCl₂.2H₂O foram misturadas, seguido de vigorosa agitação por cerca de 15 minutos. Deixou-se o material em repouso por aproximadamente 24 horas. O precipitado foi filtrado e lavado cerca de três vezes com água destilada fervente (~100 °C). O material foi submetido a secagem em estufa a 80 °C por cerca de 12 h. Em seguida, foi realizada a calcinação das amostras nas seguintes temperaturas: 300, 500 e 700 °C por 1 h. O polifosfato de cálcio obtido no processo, antes e após a calcinação, foi caracterizado.

4.2.2.3 Caracterização físico-química dos materiais cerâmicos

As informações morfológicas e topográficas sobre as superfícies das amostras analisadas foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura, modelo QUANTA 200F, filamento FEG, fabricante: FEI, com voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras foram metalizadas com uma camada fina de ouro, usando um metalizador modular de alto vácuo. O equipamento conta com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). As amostras foram colocadas sobre porta amostras contendo fita de carbono condutora e cobertas com camada manométrica de filme de ouro.

As análises cristalográficas dos pós obtidos foram realizadas pelo método da Difração de Raios X, num difratômetro de Raios X, modelo XRD-7000, fabricante *Shimadzu*, utilizando-

se radiação $\text{CuK}\alpha$ (1,548Å), com uma tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, em amostras pulverizadas. As fases foram determinadas utilizando-se o Software HighScore Plus® versão 4.6a (Malvern Panalytical).

Para as análises de espectroscopia na região de infravermelho, foi utilizado um espectrômetro com transformada de *Fourier*, modelo Spectrum 400, fabricante *Perkin Elmer*, operando entre 400 a 4000 cm^{-1} (infravermelho médio) no modo de transmissão, com resolução de 4 cm^{-1} , acumulando 4 espectros. As amostras para análises foram preparadas em pastilhas de Kbr. Os espectros *Raman* foram obtidos em um equipamento *Raman*, modelo R3000, fabricante *Ocean optics*. Os espectros foram adquiridos com 5 varreduras com 10 s.

O estudo calorimétrico por Termogravimetria (TGA) foi utilizado para determinação da estabilidade térmica das cerâmicas. Esta técnica serviu também para determinação da umidade presente nos materiais. As análises foram efetuadas em uma termobalança modelo 60H da Shimadzu em atmosfera de ar sintético. As amostras de 20 mg foram aquecidas na faixa de 30 – 900 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/minuto. Utilizou-se nitrogênio (N_2) como gás de arraste a um fluxo de 20,0 mL/minuto.

O grau de polimerização (n) do $(\text{NaPO}_3)_n$ foi determinado através de Ressonância magnética Nuclear utilizando-se um aparelho modelo Unit Plus (Varian), frequência do equipamento de 300 MHz, Campo magnético 7 T, diâmetro do tubo de amostra de 5mm, frequência de ressonância ^{31}P de 121MHz.

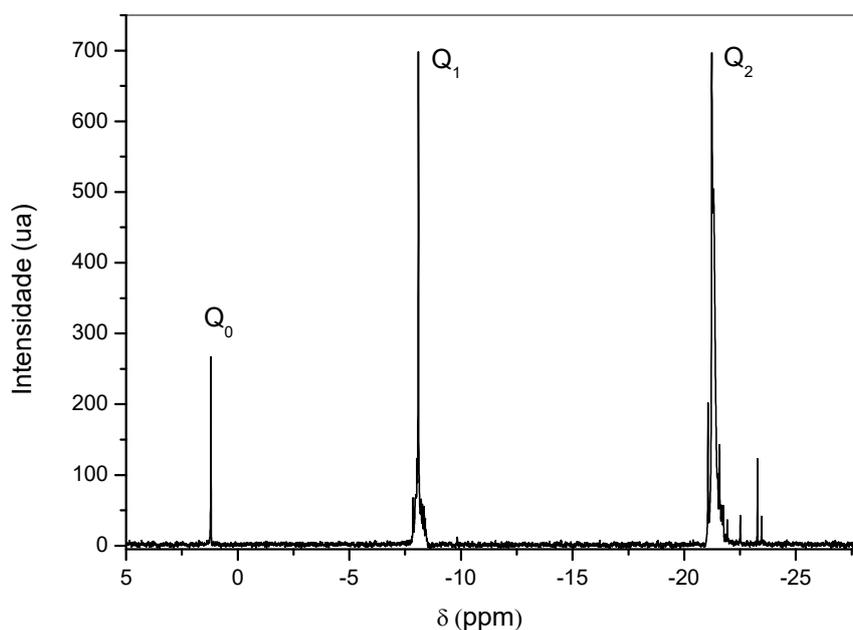
As medidas das áreas superficiais específicas foram observadas pelas isotermas de adsorção do método B.E.T. (*Brunauer, Emmett e Teller*), utilizando o equipamento Analisador de Área Superficial e de Poros Micromeritics ASAP 2440. O gás de análise foi o nitrogênio ultra puro. Faixa de pressão relativa: adsorção = 0,1 a 1,0 P/Po e dessorção = 1,0 a 0,1 P/Po.

4.2.3 Resultados e discussão

O tamanho médio das cadeias de polifosfato (PoliP) ou grau de polimerização (n) pode ser estimado através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) do elemento fósforo (^{31}P), utilizando-se soluções do sal e a Figura 9 apresenta um espectro representativo do composto utilizado. O grau de polimerização do PoliP utilizado no presente trabalho foi estimado aplicando-se a relação descrita por *Greenfield & Clift* (1974) e obteve-se obteve-se um grau de polimerização $n=10$, o que significa que em média as cadeias lineares de PoliP são compostas por 10 grupos fosfatos. Encontra-se descrito na literatura que este número representa

um conjunto de fosfatos condensados que varia de uma faixa de tamanhos desde o difosfato até cadeias que tem 20 unidades de fosfato (LIMA; GALEMBECK, 2010). É também possível identificar a presença de alguns fosfatos cíclicos (COSTELLO et al., 1974), na faixa de deslocamento químico $\delta = -22,5$ a $-23,5$.

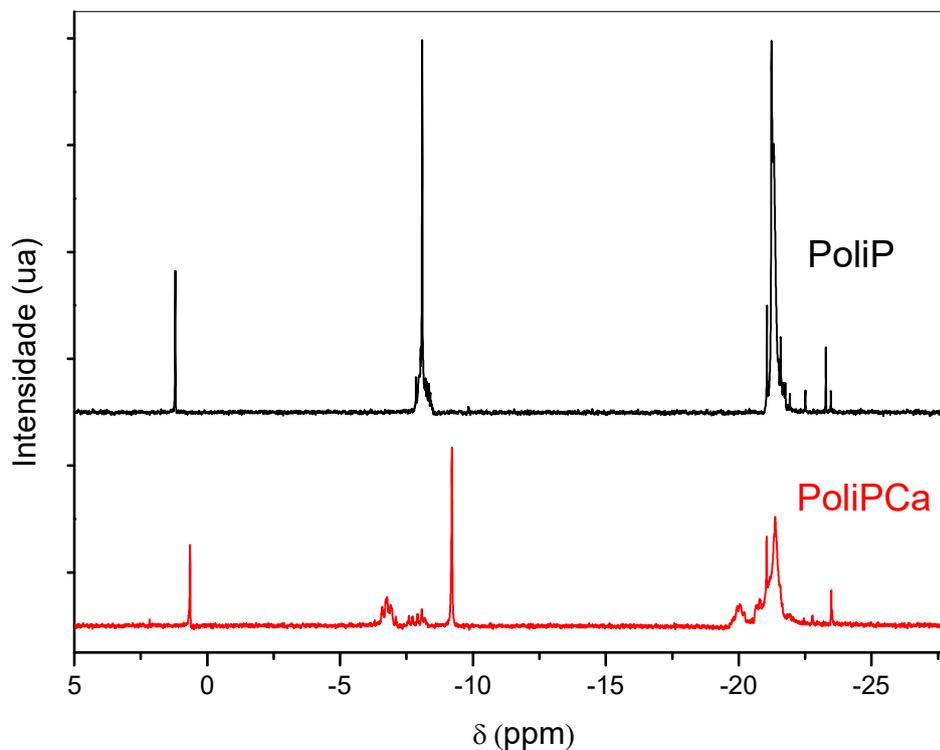
Figura 9 – Espectro de RMN ^{31}P do $(\text{NaPO}_3)_n$ utilizado neste estudo. Os termos Q_0 , Q_1 e Q_2 representam o sinal dos ortofosfatos, fosfatos terminais e fosfatos intermediários, respectivamente.



Fonte: próprio autor.

A associação de íons Ca^{2+} à soluções contendo cadeias de polifosfato resultam na associação destes íons e a formação de estruturas supramoleculares e que ao se densificarem em concentração resultam no processo de coacervação (PICKUP et al. 2014). Este processo pode também ser acompanhado através de RMN ^{31}P e a Figura 10 demonstra as modificações espectrais previstas: alargamento dos sinais de deslocamento químico de fosfato terminais bem como os intermediários. Isto decorre das interações químicas entre os grupos fosfatos e os íons divalentes (PEREIRA et al., 2018).

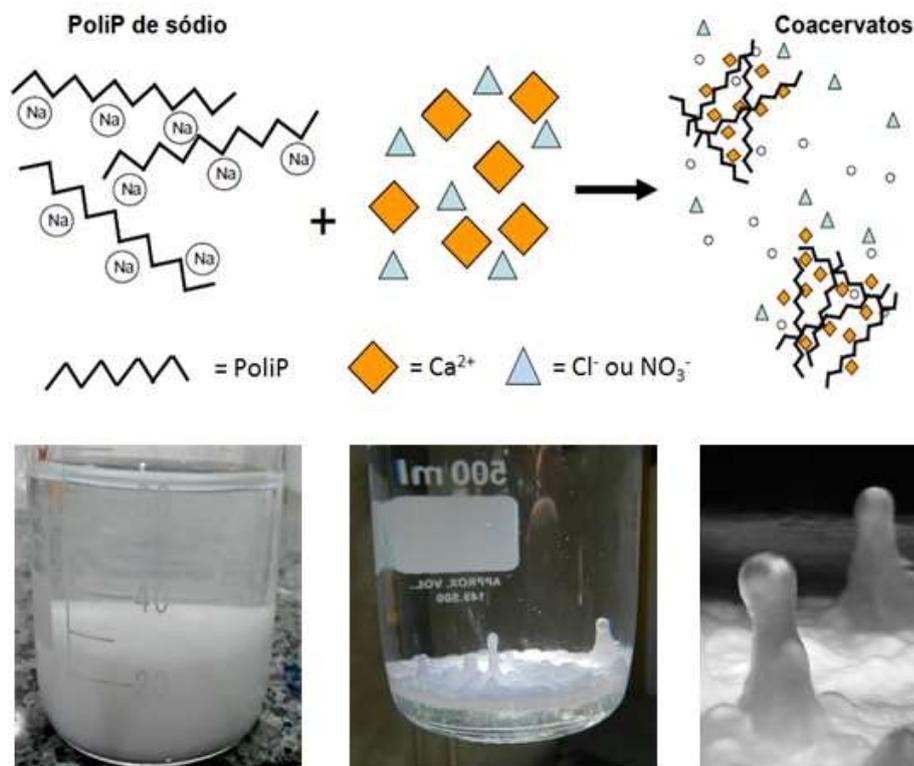
Figura 10 – Comparação do espectro de RMN ^{31}P do $(\text{NaPO}_3)_n$ com e sem íons Ca^{2+} em solução.



Fonte: próprio autor.

O processo de coacervação corresponde a um tipo de separação de fases em uma solução. A separação dos coacervatos é governada principalmente por forças eletrostáticas e hidrofóbicas (MOMENI; FILIAGGI, 2014). Após a coacervação, o aumento da concentração dos íons leva à separação de fases e, nas concentrações utilizadas neste estudo, observou-se que ao se misturar o polifosfato (PoliP) com íons Ca^{2+} em meio aquoso ocorre intensa turvação e formação de floculado branco. O material, identificado com coacervato, rapidamente decantou no recipiente. Nesse meio mais viscoso, a água está inserida entre as cadeias de polifosfato de cálcio resultando numa estrutura supramolecular coacervada (Fig. 11).

Figura 11 - Esquema evidenciando a separação de fases ocorrendo entre o PoliP e o Ca^{2+} em meio aquoso (processo de coacervação) e fotografias evidenciando o resultado observado experimentalmente.



Fonte: Próprio autor.

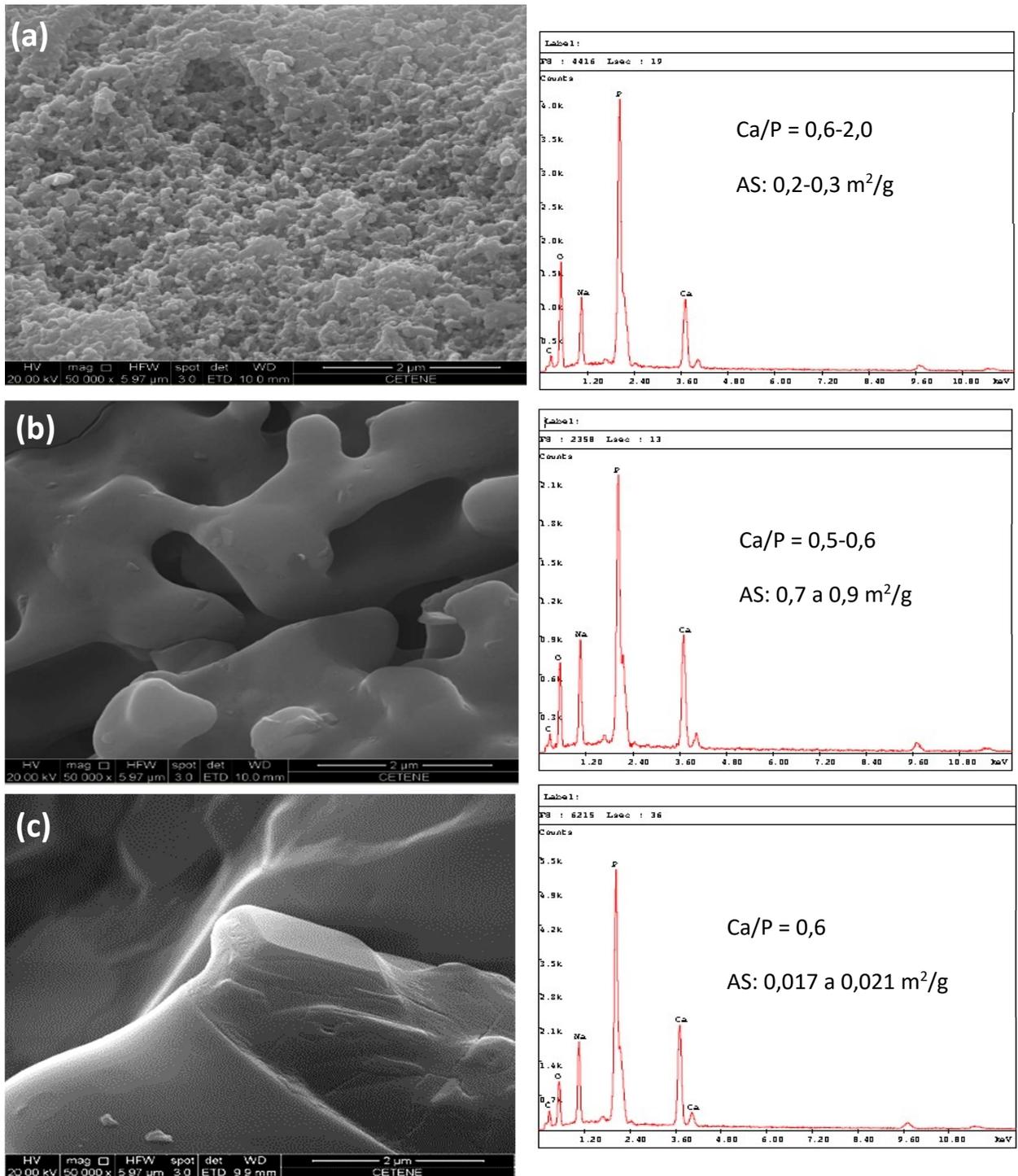
Como resultado das reações entre o polifosfato e Ca^{2+} foram obtidos materiais na forma de pós brancos secos e o resultado de suas caracterizações são detalhados nas próximas seções.

4.2.3.1 Análise morfológica, química e estrutural das amostras preparadas com nitrato de cálcio

As micrografias eletrônicas de varredura dos pós cerâmicos secos preparados utilizando-se como precursor o nitrato de cálcio encontram-se dispostas na Figura 12, bem como os gráficos de energia dispersiva mostrando a proporção semi-quantitativa Ca/P dos materiais calcinados a 300, 500 e 700 °C. As imagens de micrografia eletrônica de varredura (MEV) das amostras foram observadas com um aumento de 50.000x. Observa-se que o aumento da temperatura induz a coalescência dos grãos, formando conexões, características do processo de sinterização. O aspecto mais homogêneo do material calcinado a 500 e 700 °C pode ser atribuído à fusão parcial da superfície do material. Em uma observação mais detalhada da

imagem obtida deste material, é possível perceber formas pseudo-geométricas sugerindo a organização morfológica dos materiais.

Figura 12 – Micrografia eletrônica de varredura e EDS do pó das amostras calcinadas a 300 (a); 500 (b) e 700 °C (c). EDS resultou na proporção Ca/P e análise de BET estima a área superficial (AS) em m^2/g . Aumentos (a) 2000x, (b e c) 50.000x.



Fonte: Próprio autor.

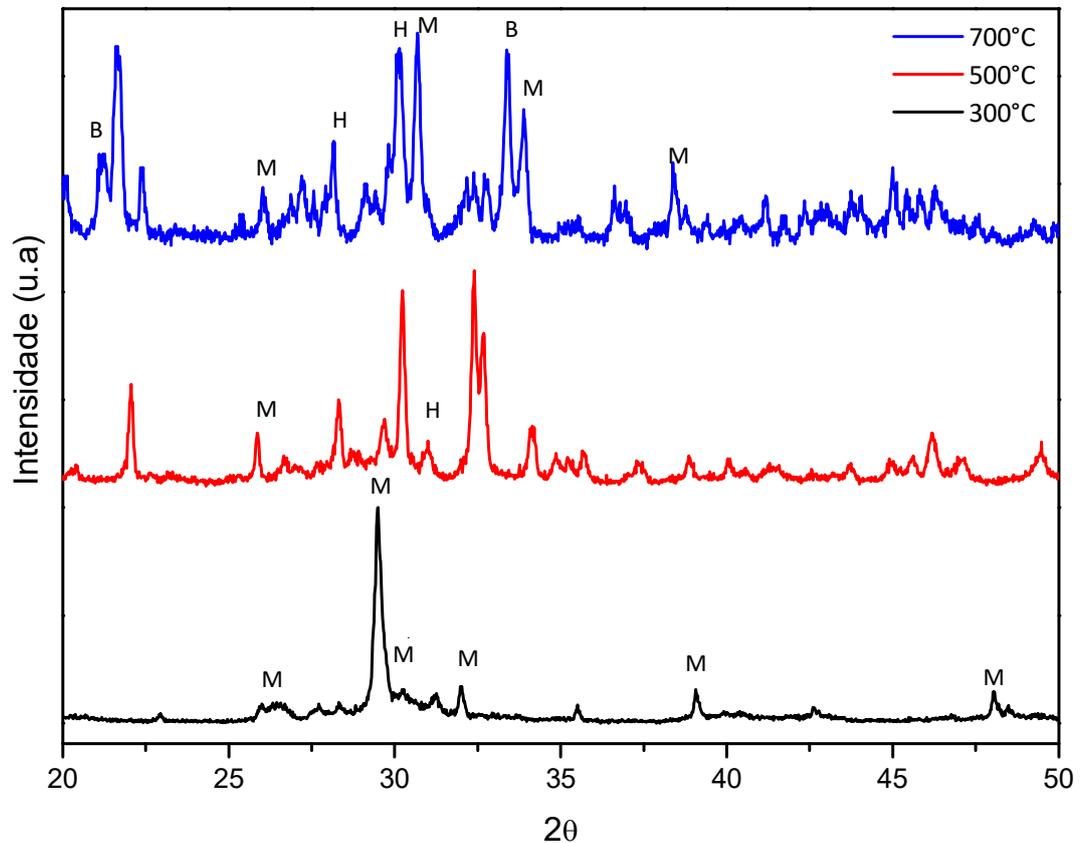
No espectro de EDS dos materiais são observados os íons Ca, P, e O. Os demais íons observados, tais como o C e Na podem ter vindo da fita de carbono usada na preparação da amostra (no caso de C) e o sódio é atribuído ao precursor usado na síntese (hexametáfosfato de sódio). Observou-se pela análise do EDS que a relação Ca:P variou de amostra para amostra, mas também na análise da mesma amostra. Foram observadas proporções que variaram desde $Ca/P = 0,35$ até $2,0$, o que sugere a presença de mais de uma fase cristalina.

Observa-se que a área superficial do pó cerâmico calcinado a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ é maior do que o calcinado a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este aumento pode ser atribuído às alterações sofridas pelo material devido ao surgimento de novas estruturas de caráter cristalino. O material calcinado a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou uma significativa redução da área superficial, comparada às outras temperaturas. Este resultado revela que houve uma redução na porosidade do material calcinado nesta temperatura e encontra-se em conformidade com as observações realizadas em MEV. A área superficial está diretamente relacionada à porosidade do material e ao tamanho de suas partículas. As formações de nano/microporos são benéficas, pois permitem a circulação do fluido fisiológico na superfície do biomaterial quando inserido num meio vivo. Para comparação, a porosidade (área superficial específica) da hidroxiapatita comercial descrita por Lacerda (2005) é de aproximadamente $17\text{ m}^2/\text{g}$, um valor bem mais elevado que a área superficial encontrada nas amostras preparadas neste estudo.

Analisando-se a variação dos padrões de difração de Raios X (Figura 13) observa-se que com o aumento da temperatura ocorre mudança de fases cristalinas.

Comparando-se os picos existentes nos difratogramas de todos os materiais com dados cristalográficos do *Software HighScore Plus*[®], observa-se que o material calcinado a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentou picos relacionados a fases cristalinas do mineral monetita (M). Observa-se no difratograma do material calcinado a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ notáveis diferenças em relação ao anterior, indicando que ocorreram mudanças estruturais. O material calcinado a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ exibiu um caráter mais complexo, com uma maior quantidade de planos presentes. É possível observar neste material planos relacionados ao mineral monetita, brushita (B) e hidroxiapatita (H), bem como fases ainda não definidas. Sugere-se que os materiais obtidos sejam policristalinos, com a presença de várias fases dependendo da relação cálcio/fosfato durante a formação do material. Isso pode estar correlacionado às várias possibilidades de formação de compostos entre os diferentes grupos fosfatos existentes na composição do hexametáfosfato de sódio.

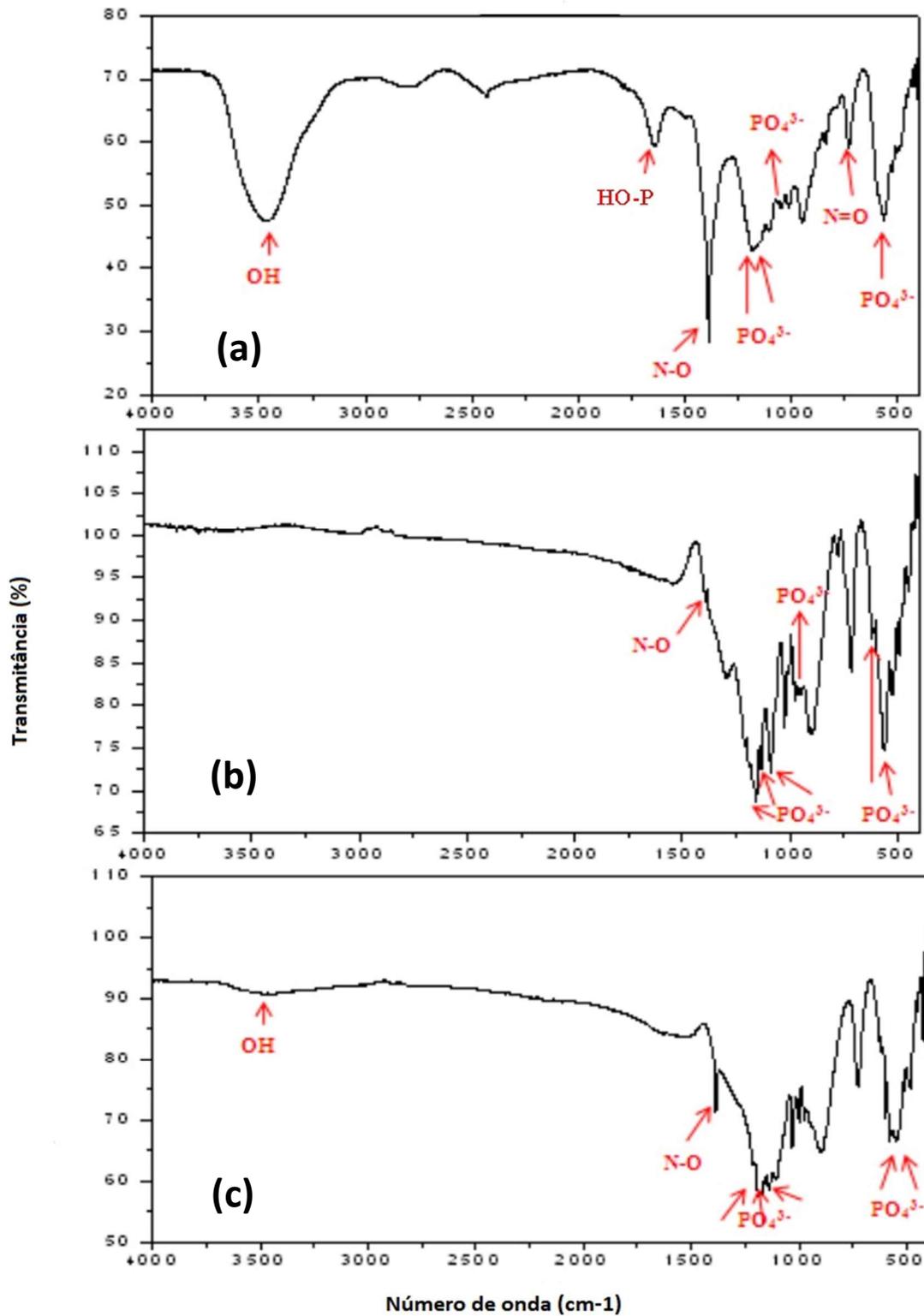
Figura 13 – Padrão de difração de raios X dos pós do material, produzidos a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e nitrato de cálcio, após tratamento térmico a 300, 500 e a 700 °C, onde B = brushita, M = monetita, H = hidroxiapatita.



Fonte: Próprio autor.

Os espectros de absorção na região do infravermelho de todas as amostras estão descritos nas Figuras 14. Após uma análise geral das frequências observadas, podem ser detectados em todos os espectros de amostras calcinadas a 300°C a presença dos grupos funcionais O-H, P-O e N-O. Como esperado, os picos relacionados ao grupo hidróxido desaparecem gradualmente nas amostras calcinadas a temperaturas superiores, indicando a saída de água coordenada no interior dos coacervatos. A intensidade de absorção do grupamento N-O (relacionado ao precursor nitrato de cálcio) também diminui à medida que aumenta a temperatura.

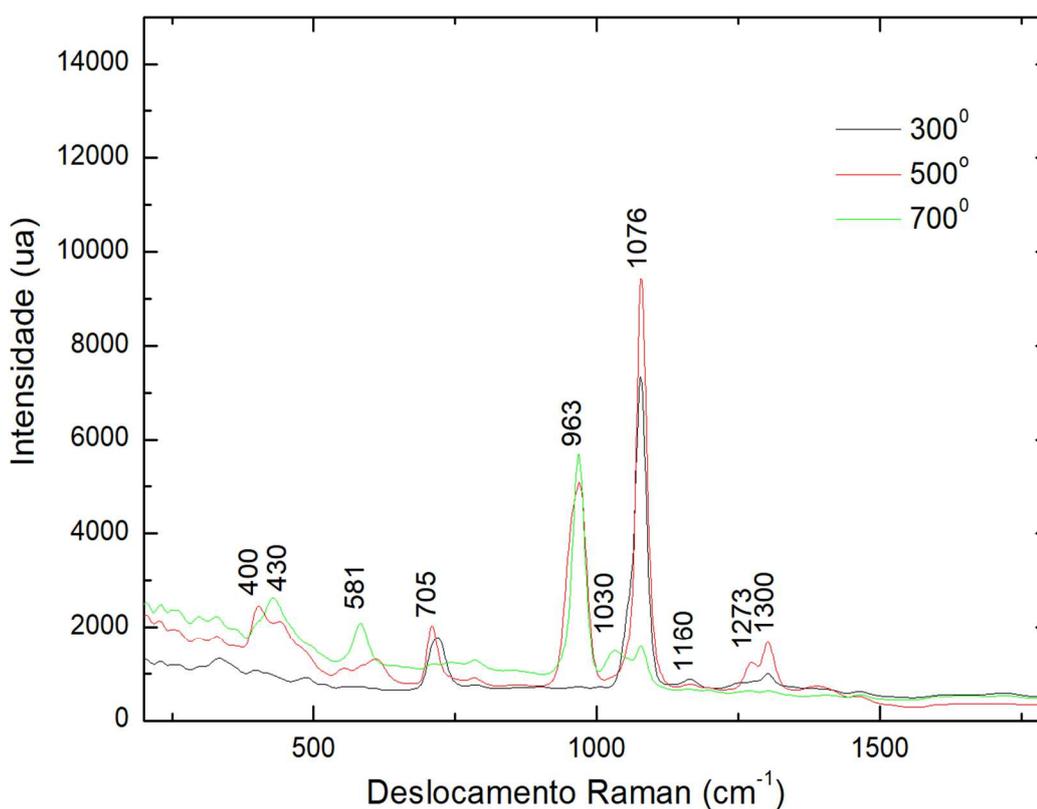
Figura 14 - Espectro de infravermelho médio do pó das cerâmicas, produzidos a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e nitrato de cálcio, calcinadas a 300 (a), 500 (b) e 700 °C (c).



Fonte: Próprio autor.

A Figura 15 mostra os espectros vibracionais *Raman* de todas as amostras preparadas. Observando-se os espectros nas temperaturas de 300, 500 e 700 °C, podemos notar que cada temperatura imposta na amostra resulta num perfil com pequenas alterações: surgimento ou modificação de frequências vibracionais relacionadas aos estiramentos P-O da cadeia do ânion polifosfato (p.ex. 430, 581, 963 e 1.076 cm^{-1} característicos das vibrações fosfato). As mudanças espectrais decorrem das diferentes interações dos íons Ca^{2+} com as cadeias de diferentes tamanhos e as diferentes simetrias apresentadas pelo polifosfato. A banda 963 cm^{-1} está relacionada ao principal modo vibracional de estiramento de ligações do tipo P-O-H (ν_1) presentes em estruturas cristalinas de minerais como monetita, brushita e hidroxiapatita.

Figura 15 – Espectros Raman dos materiais cerâmicos, produzidos a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e nitrato de cálcio, calcinados a 300, 500 e 700°C.

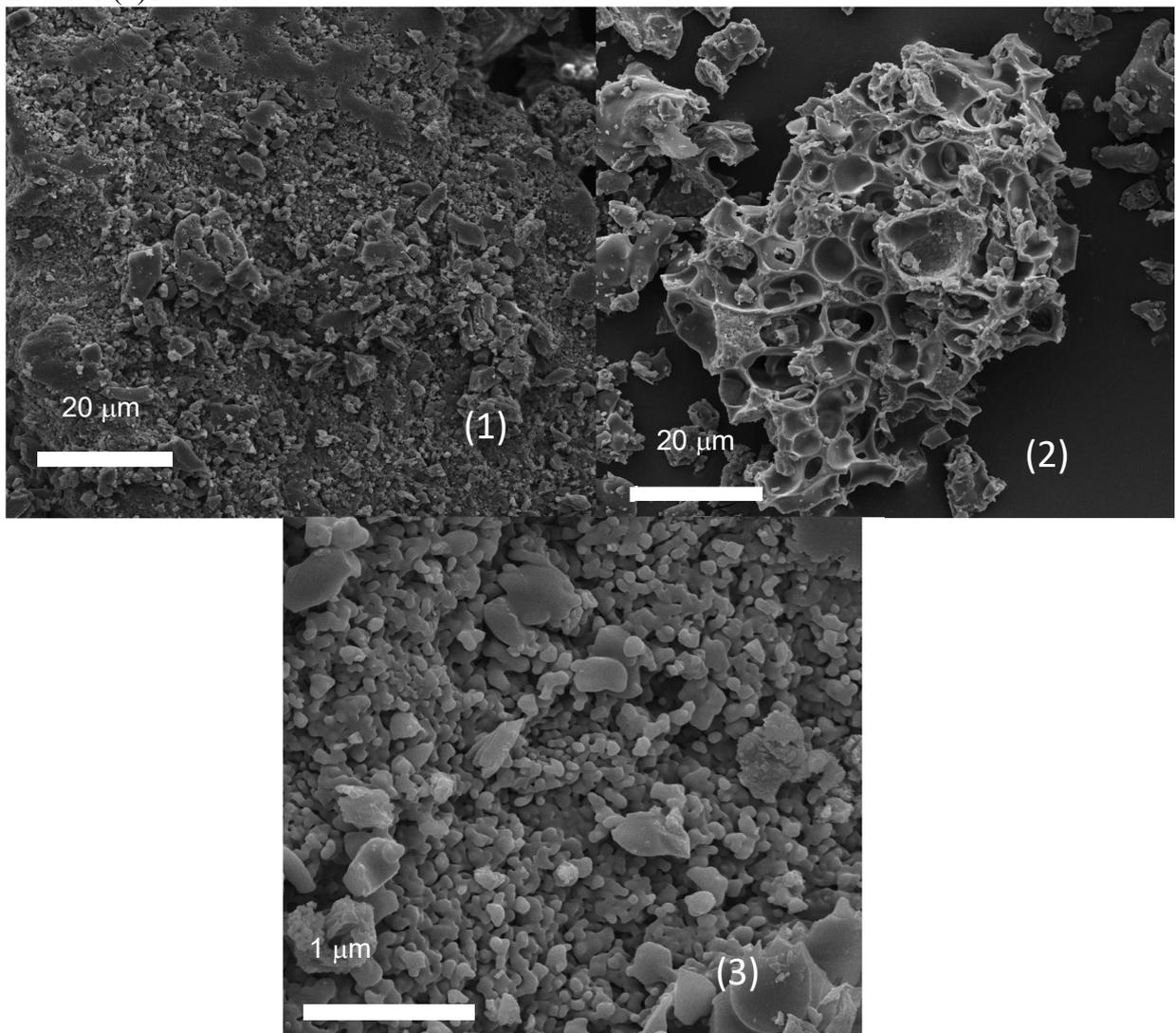


Fonte: Próprio autor.

4.2.3.2 Análise Morfológica, Química e Estrutural das amostras preparadas com cloreto de cálcio

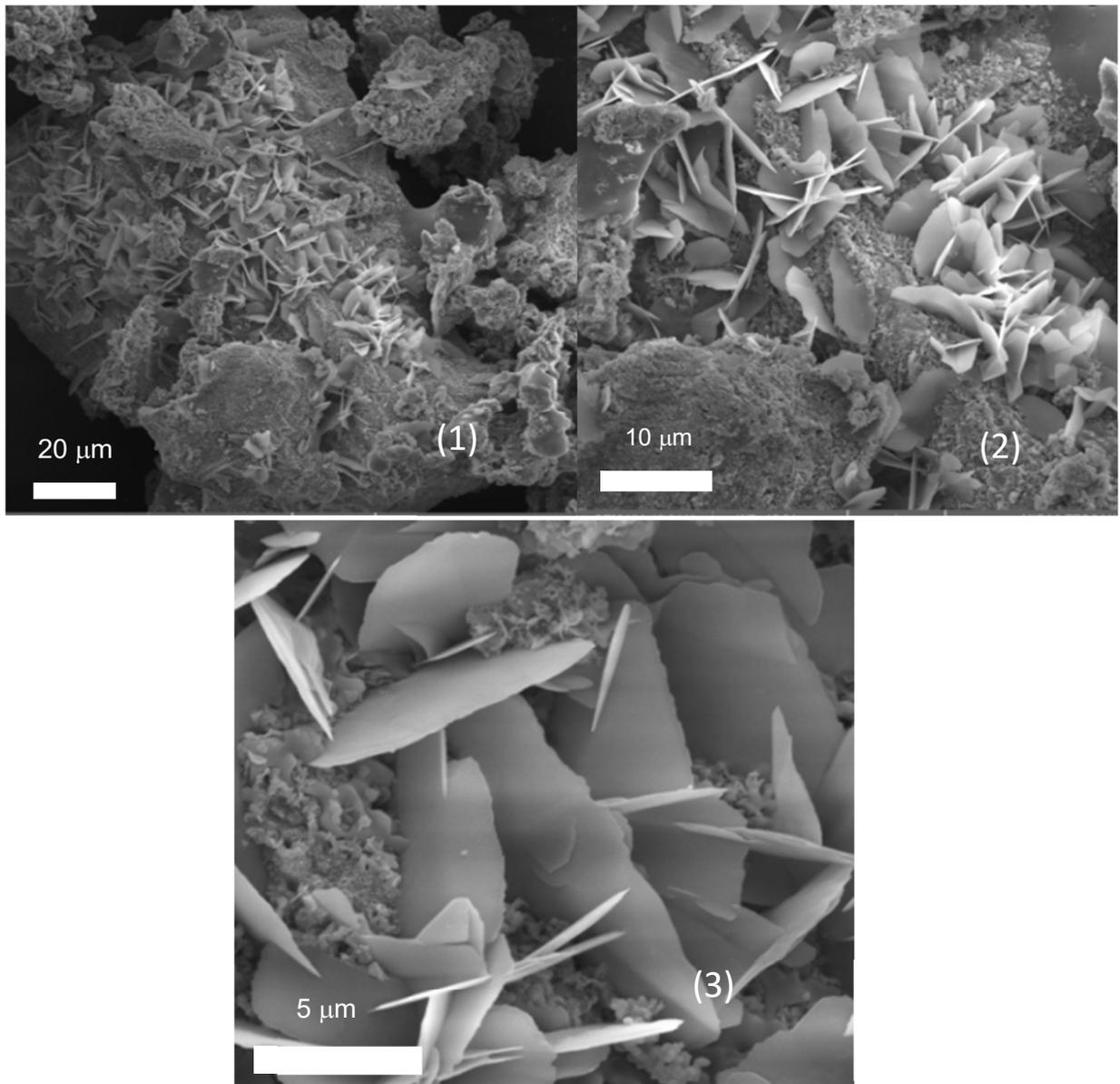
Observadas por MEV, a amostra da cerâmica de polifosfato de cálcio não calcinada (Figura 16) apresentou aspecto sem forma definida, com muitas irregularidades. Através das imagens de MEV, é possível observar um pó com grãos de tamanho não uniforme, que possuem cavidades (poros) e rugosidade macroscópica em suas superfícies. A amostra calcinada a 300 °C (Figura 17) se apresentou como grãos também com grande rugosidade superficial de onde se projetam regiões no formato de placas. Tais estruturas podem indicar diferentes formas estruturais cristalinas na composição da cerâmica.

Figura 16 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, sem processo de calcinação secagem a 80 °C por 24 h. Aumentos (1 e 2) 2000x e (3)15000x.



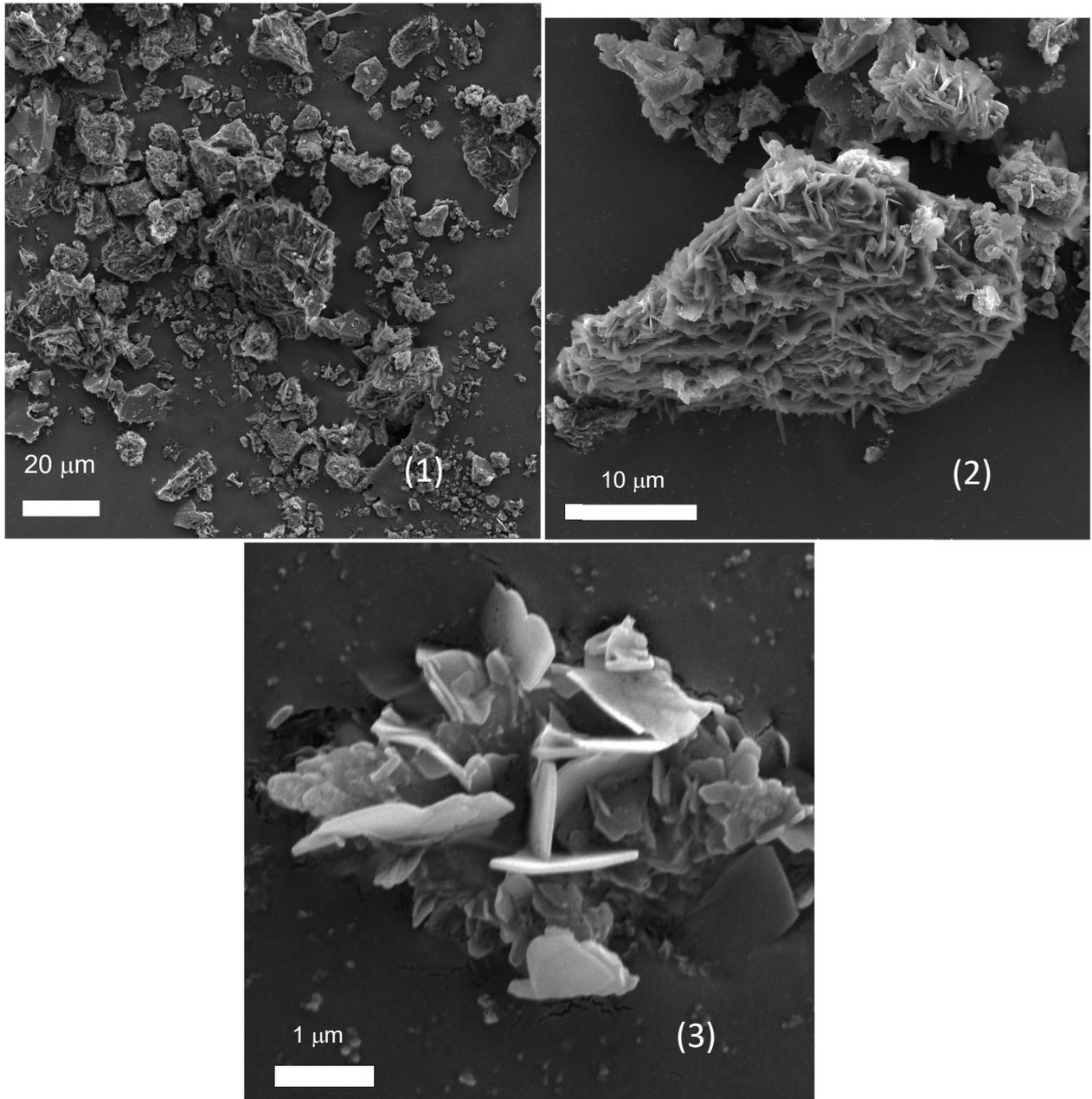
Fonte: Próprio autor.

Figura 17 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 300 °C. Aumentos (1) 2000x, (2) 5000x, (3) 15000x.



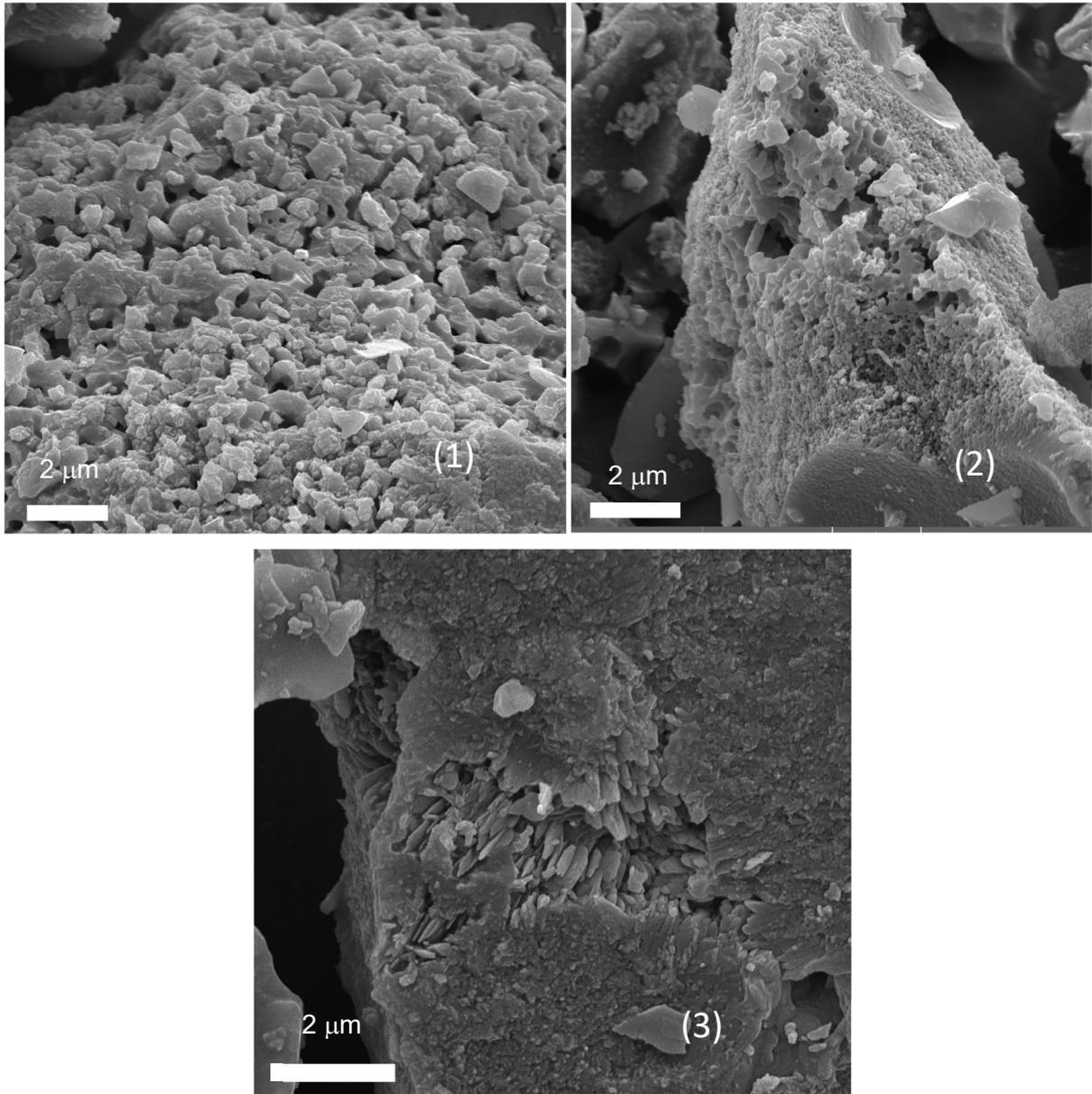
Fonte: Próprio autor.

Figura 18 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 500 °C. Aumentos (1) 2000x, (2) 5000x, (3)15000x.



Fonte: Próprio autor.

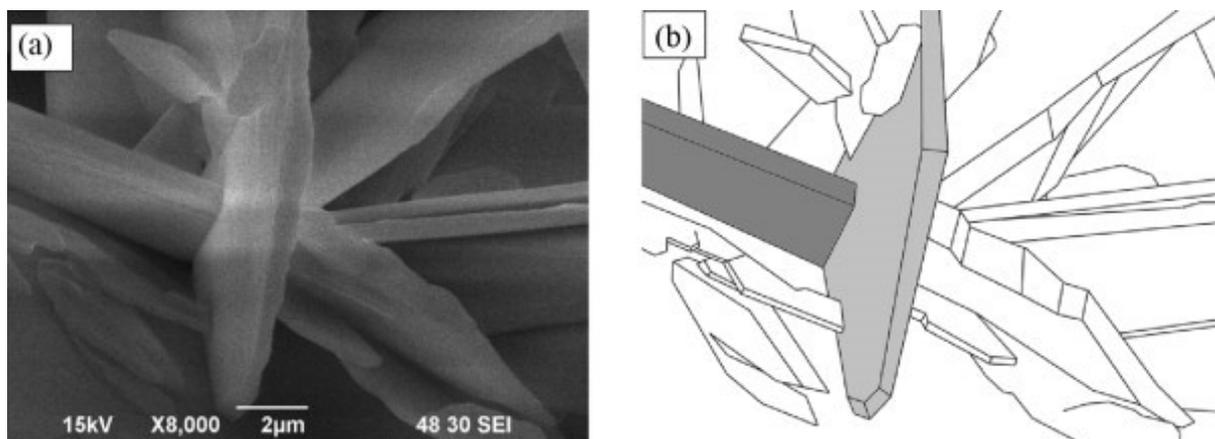
Figura 19 – Micrografias de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 700 °C. Aumento de (1, 2 e 3)15000x.



Fonte: Próprio autor.

As formas de placas finas que surgem em diferentes regiões das amostras são comuns no mineral brushita e já foram relatadas em materiais resultantes de processos de obtenção sintéticos de fosfato de cálcio. A Figura 20 exemplifica a observação destas estruturas efetuada por Toshima e colaboradores (2014) que reportaram a obtenção de brushita em meio coloidal aquoso.

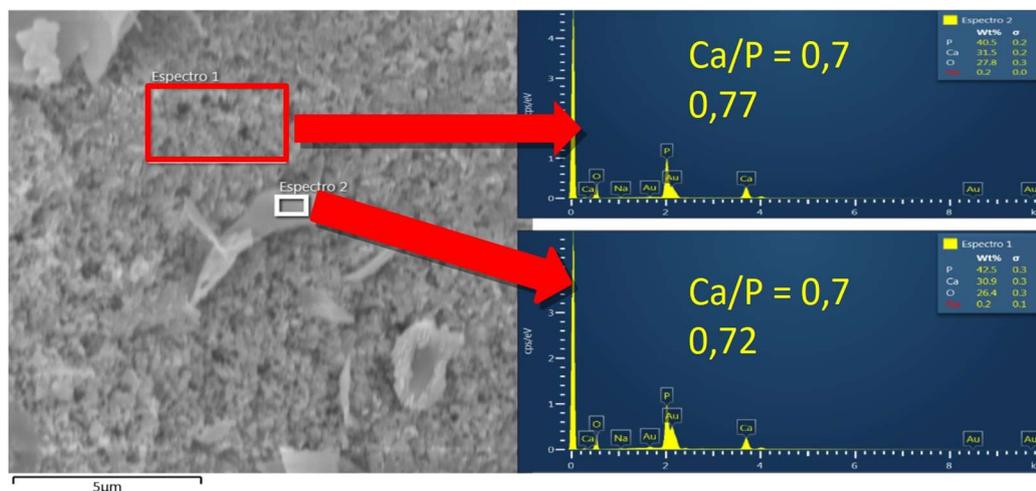
Figura 20 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de microcristais de fosfato de cálcio na fase brushita sintetizados em meio aquoso (a) e sua representação esquemática (b).



Fonte: TOSHIMA et al, 2014.

A análise por EDS da cerâmica produzida por calcinação a 300 °C por (Figura 21) confirma que tanto a superfície rugosa quanto a estrutura em placa são ricas de elementos P e Ca, apresentando uma relação Ca/P em massa de aproximadamente 0,7. A relação Ca/P para polifosfatos de cálcio vítreos descrita na literatura é de 0,5. Já para os minerais brushita e monetita esta relação é de 1,0. Portanto, visto que as cerâmicas obtidas apresentaram uma relação Ca/P intermediária entre estes valores, sugere-se que sejam constituídas por uma mistura de fases relacionadas aos compostos descritos.

Figura 21 - Mapa elementar obtido por EDS de duas regiões características de cerâmica de polifosfato de cálcio, produzida a partir de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e cloreto de cálcio, calcinada a 300 °C.



Fonte: Próprio autor.

Sabe-se que cimentos ósseos descritos na literatura a base de fosfato de tetracálcio (TTCP) e fosfato dicálcio anidro (DCPA, monetita) podem apresentar uma reação tipo ácido-base (Equação 2) quando em suspensão aquosa para formar um precipitado cristalino com uma baixa quantidade de hidroxiapatita (DOROZHKIN, 2011).



Durante o processo de endurecimento inicial desses cimentos, ocorre o surgimento de cristais em formatos de placas (pétalas) ou de agulhas, que se ampliam epitaxialmente e são responsáveis pela aderência e interconecção dos grãos cristalinos, o que resulta no endurecimento. Após aproximadamente 2 h, os cristais recém-formados adquirem formato de bastões, resultando em maior cristalinidade com o surgimento de mais material nos espaços entre partículas (DOROZHKIN, 2011). As amostras analisadas por microscopia (Figuras 17 e 18) apresentaram tal padrão de crescimento na forma de placas já relatado na literatura (DOROZHKIN, 2011), indicando que esses cristais podem estar relacionado à hidroxiapatita de baixa cristalinidade ou fosfato dicálcio dihidratado (DCPD, brushita). O material calcinado a 700 °C (Figura 19) apresentou um padrão mais uniforme de sua superfície, o que pode ser atribuído a coalescência dos cristais de fosfato de cálcio promovida pelo processo de sinterização. Em uma observação mais detalhada das imagens, percebe-se a presença de cristais semelhantes à agulhas ou bastões bastante agregados ou fundidos uns aos outros.

Tabela 2 – Análises de BET dos pós do material preparado sem calcinação (secagem a 80 °C por 12 h) e após calcinação 300, 500 e a 700 °C por 1 h.

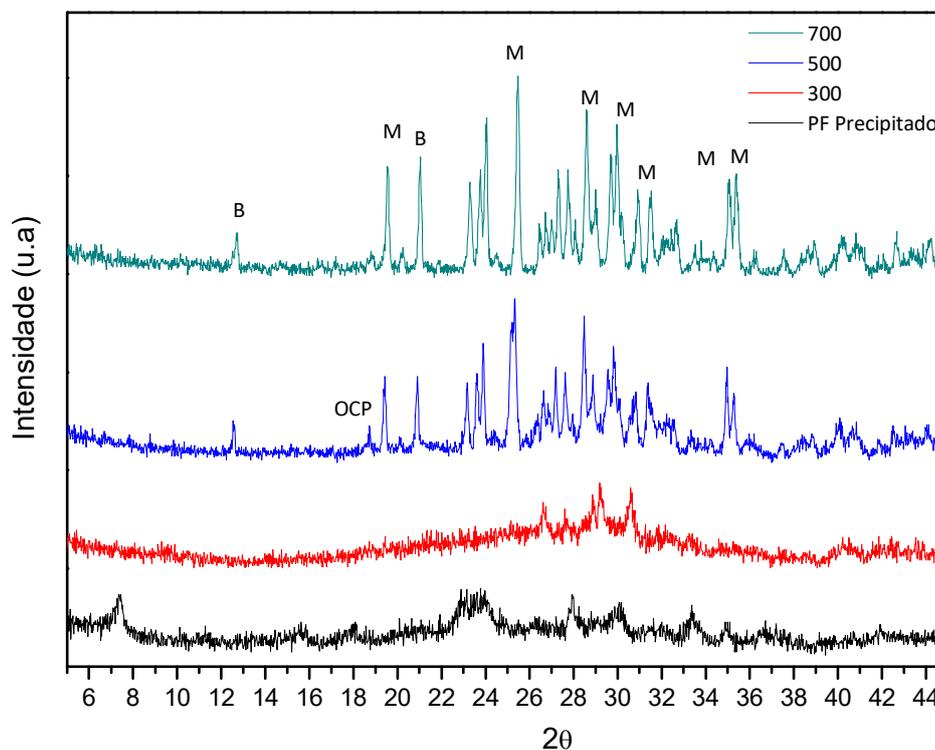
Temperatura (°C)	Área superficial (m ² /g)
80	1,5 a 2,5
300	1,6 a 2,6
500	1,2 a 1,6
700	0,8 a 1,2

Fonte: Próprio autor.

As áreas superficiais das amostras obtidas por BET (Tabela 2) indicam que o aquecimento do material cerâmico leva a uma pequena, porém consistente, redução nos valores. A redução da área superficial corrobora com a expectativa de diminuição dos poros do material em virtude do processo de sinterização, no qual há uma agregação e fusão do material permitindo o surgimento de produtos com superfícies mais uniformes e ou com formas cristalinas.

A cristalinidade do material cerâmico foi investigada por difratometria de raios X. A Figura 22 exhibe os difratogramas dos polifosfatos de cálcio obtidos.

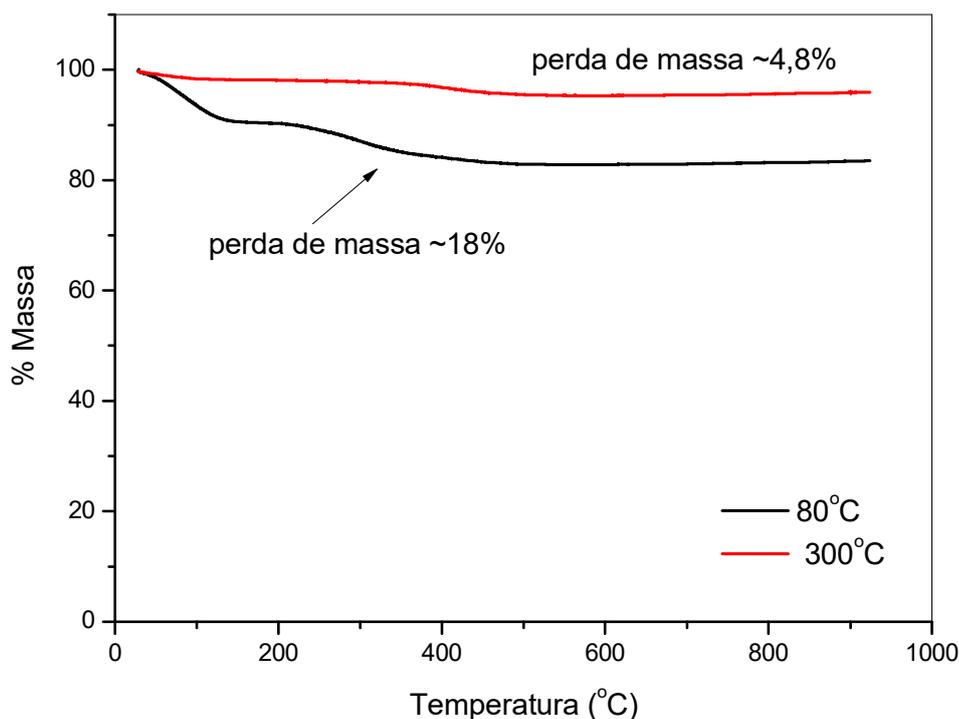
Figura 22 - Difratogramas dos pós cerâmicos baseados em polifosfato de cálcio (CaCl₂ como fonte de cálcio) antes e após sua calcinação, onde M = monetita, B = brushita, OCP = fosfato de octacálcio.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se um padrão aparentemente amorfo das amostras de polifosfato de cálcio não calcinado. Já o polifosfato de cálcio calcinado a 300 °C apresentou picos de baixa resolução, que podem estar relacionados ao surgimento de fases cristalinas. O difratograma do polifosfato de cálcio calcinado a 500 e 700 °C apresentaram picos bem definidos possibilitando a comparação com fases cristalinas de compostos baseados em fosfato de cálcio. Constatou-se a presença principalmente dos minerais monetita e brushita nestes compostos. Verificou-se que o composto calcinado a 500 °C e o calcinado a 700 °C apresentaram basicamente a mesma distribuição de fases cristalina. Portanto, é possível inferir que ambos se tratam do mesmo produto. Observa-se ainda nesse produto uma fase cristalina característica do fosfato de octacálcio (OCP), que pode ser considerado um mineral intermediário para surgimento de outros compostos cristalinos baseados em fosfatos de cálcio. Comparando-se ao produto obtido utilizando como precursor o nitrato de cálcio, observa-se que não houve o surgimento de fases relacionadas aos minerais monetita e hidroxiapatita no derivado do cloreto de cálcio. Isso indica que a mudança do sal de cálcio precursor induz uma significativa diferença na estrutura cristalina dos compostos após calcinação.

Figura 23 – Análise termogravimétrica do coacervato seco a 80 °C e do material cerâmico calcinado a 300 °C.



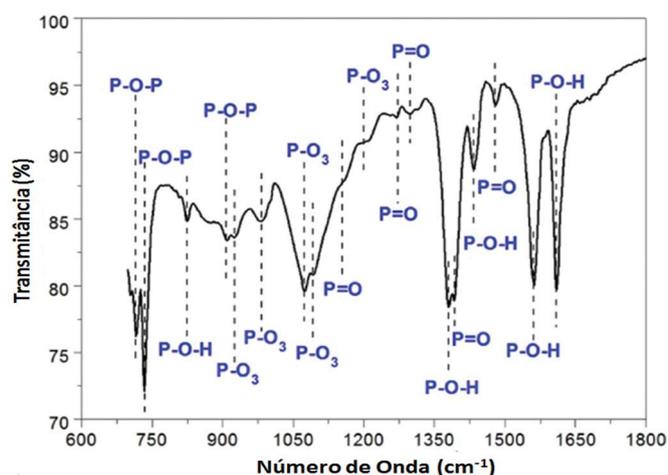
Fonte: Próprio autor.

A Figura 23 apresenta uma curva calorimétrica de perda de massa característica do pó cerâmico não calcinado e após calcinação à 300 °C. Analisando-se o perfil de perda de massa das cerâmicas preparadas, através de análise termogravimétrica observou-se que a perda de massa dos pós cerâmicos não sinterizados ficou em torno de 18%, enquanto que a dos pós calcinados apresentaram reduzida perda de material volátil (cerca 5%). Os materiais cerâmicos calcinados à temperaturas superiores tiveram perda de massa similar ao apresentado pelo material calcinado a 300 °C. Este material volatilizado foi provavelmente água adsorvida e absorvida no material.

Pickup *et al.* (2014) prepararam coacervatos baseados em polifosfato de cálcio e observaram um perfil similar de perda de massa e assinalaram ao primeiro evento de perda de massa à água fracamente ligada ao material e ao segundo evento a perda de água ligada quimicamente na estrutura cerâmica. O processo de coacervação leva à formação de separação de fases líquido-líquido e a separação de estruturas sólidas do meio ocorre com incorporação de água absorvida e presente entre as cadeias dos poliânions. Após a calcinação a temperaturas acima de 200°C as moléculas presas são liberadas continuamente da matriz até aproximadamente 350°C.

A presença dos grupos funcionais relacionados ao polifosfato de cálcio foi identificada por espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho e espectroscopia Raman. O espectro vibracional de polifosfato de sódio e de sais de polifosfato e metais alcalinos terrosos ou metais de transição já foram extensivamente estudados permitindo o assinalamento das bandas características observadas no presente estudo. A Figura 24 (adaptada do estudo de Tieu *et al.*, 2014) traz o assinalamento da grande maioria das bandas observadas neste estudo.

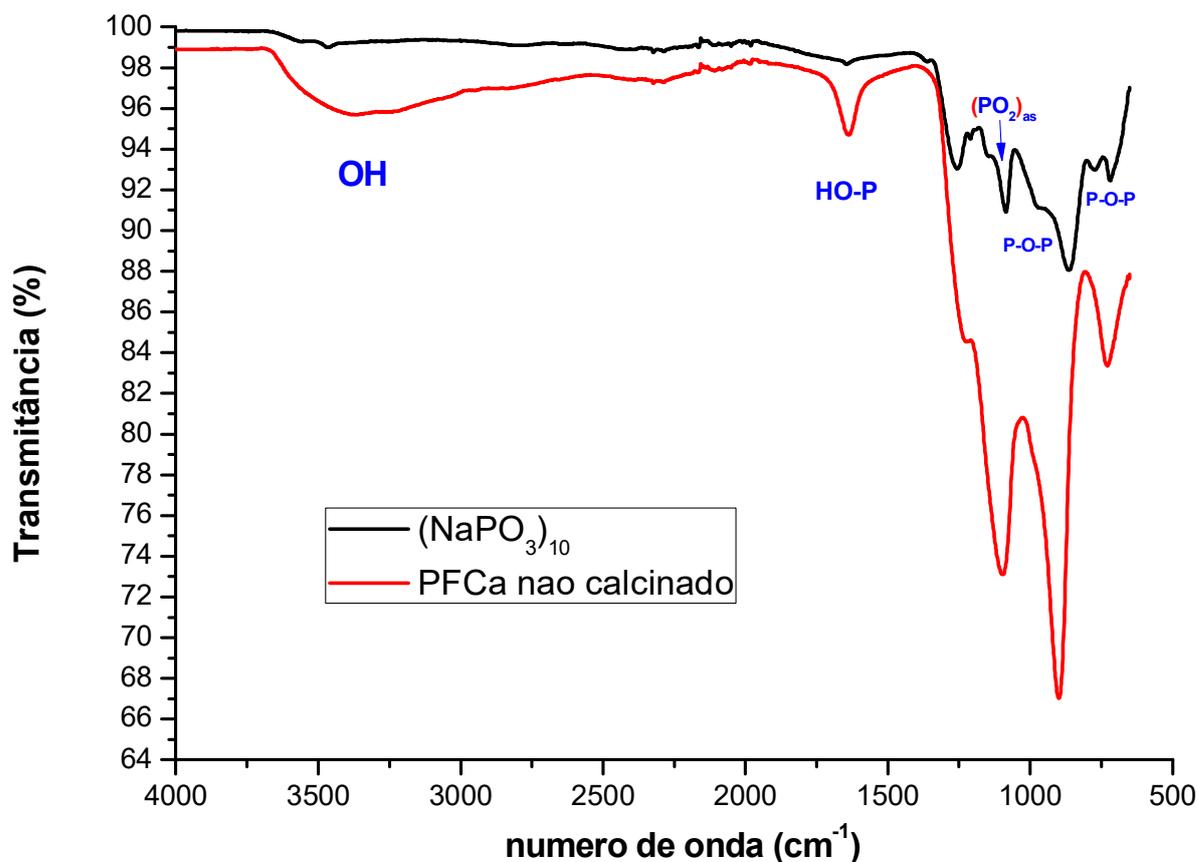
Figura 24 – Assinalamento dos principais modos vibracionais observados no polifosfato de sódio (NaPO_3)_n.



Fonte: Adaptado de Tieu *et al.*, 2014.

Observa-se uma grande similaridade entre as amostras de coacervatos e o polifosfato de sódio precursor. Percebe-se um alargamento das bandas nos coacervatos provavelmente devido à grande desordem das estruturas químicas presentes e também devido à presença de água entre as cadeias (evidenciada na análise térmica). Observando-se o espectro FT-IR do $(\text{NaPO}_3)_{10}$ (Figura 25), constata-se um conjunto de bandas características de modos vibracionais P-O, tais como (i) a banda em 1257 cm^{-1} está associada às unidades (PO_2) referentes aos modos de estiramento assimétrico dos oxigênio não ligados de um fósforo do meio da cadeia; (ii) a banda em 1085 cm^{-1} refere-se à vibração de estiramento do grupo (P-O-) do término da cadeia do polifosfato e (iii) a banda em 870 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico dos modos P-O-P do meio da cadeia. As bandas na região de 720 cm^{-1} são atribuídas a vibrações de estiramento simétrico dos grupos P-O-P.

Figura 25 – Espectro de absorção no infravermelho do precursor $(\text{NaPO}_3)_{10}$ e do coacervato baseado em polifosfato de cálcio (PFCa), destacando o assinalamento de alguns grupos funcionais presentes.

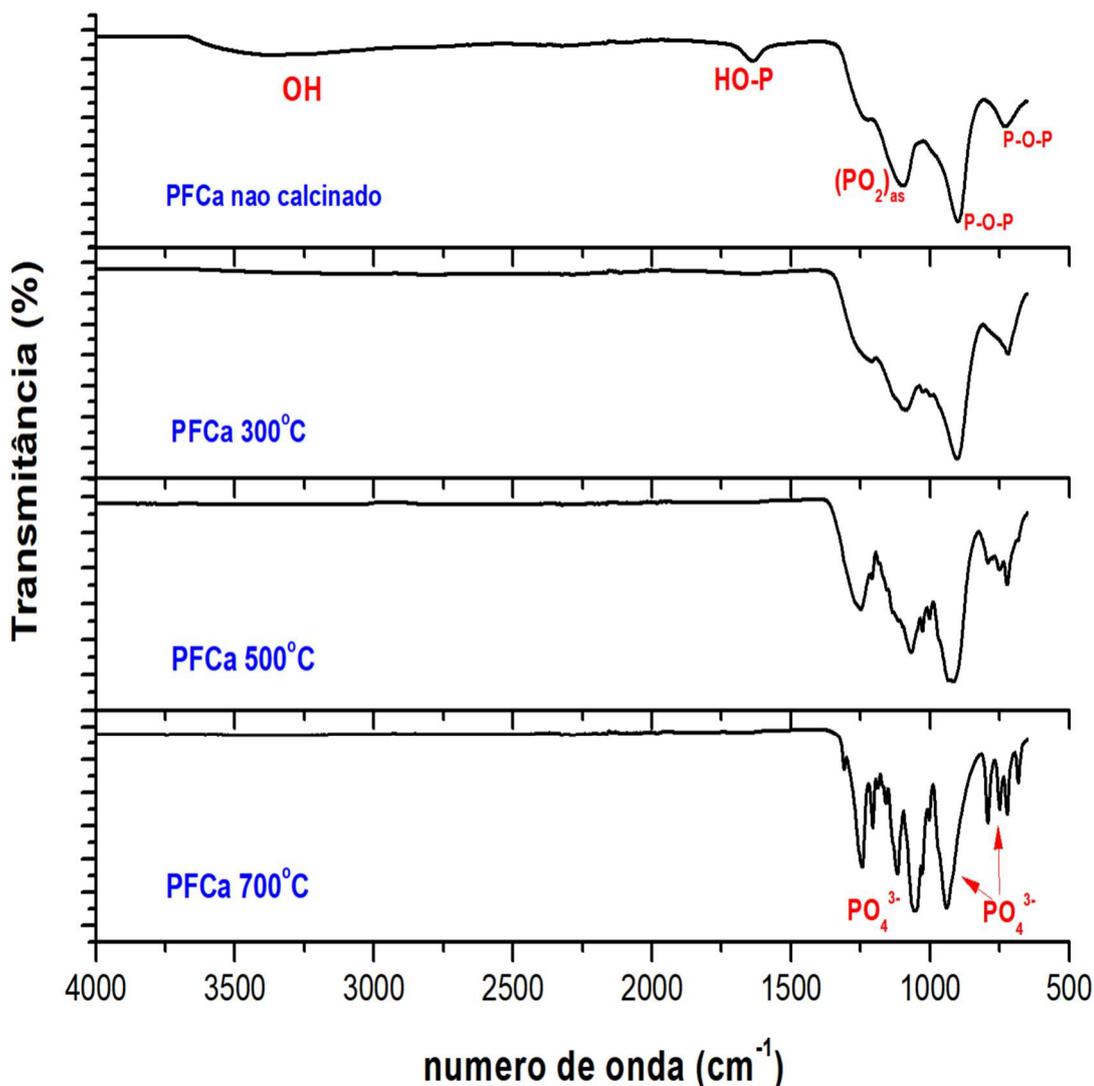


Fonte: Próprio autor.

Comparando-se o espectro de $(\text{NaPO}_3)_{10}$ com o do polifosfato de cálcio (PFCa) não calcinado (Figura 25), observa-se que há um deslocamento da banda referente a ligações P-O-P de meio de cadeia para a região de 901 cm^{-1} . Tal fato pode ser atribuído à ligação eletrostática com íons Ca^{2+} .

Comparando-se os espectros vibracionais dos materiais a base de PFCa preparados e submetidos a diferentes temperaturas (Figura 26), pode-se observar que com o aumento da temperatura resulta numa melhor estruturação das bandas dos grupamentos $(\text{PO}_4)^{3-}$, ficando mais definidas e estreitas. Observa-se também o desaparecimento da banda P-OH, provavelmente decorrente da saída de material volátil.

Figura 26 – Comparação entre o espectro de absorção no infravermelho do coacervato seco e dos materiais cerâmicos baseados em polifosfato de cálcio (PFCa) calcinados a 300; 500 e 700°C.

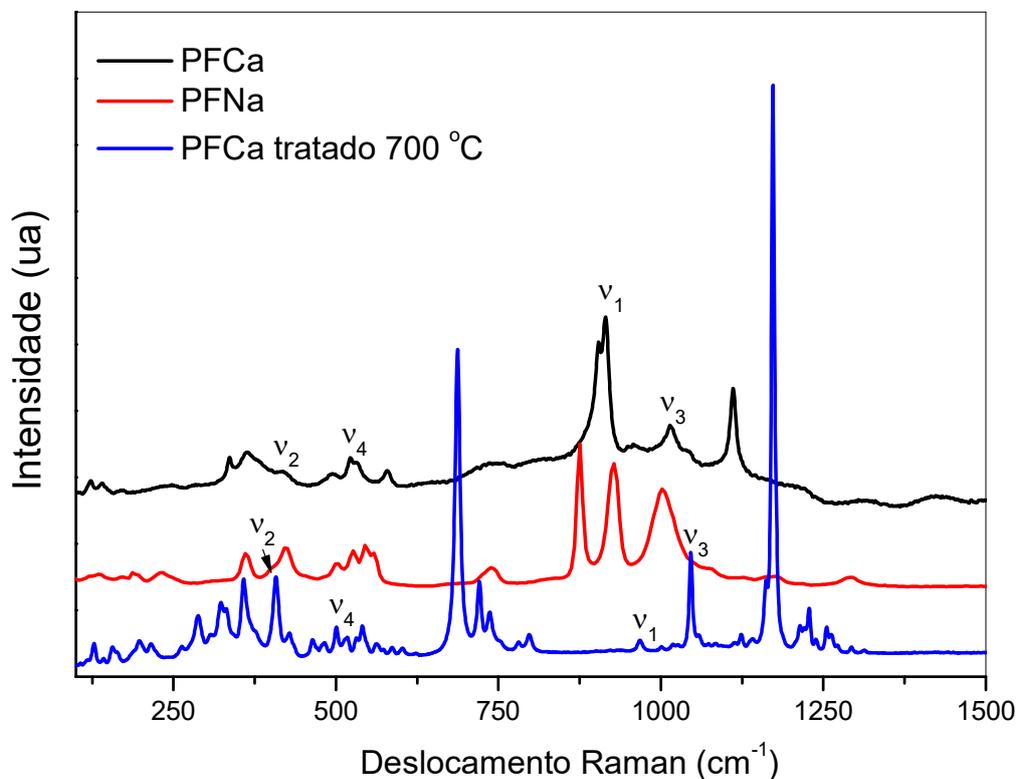


Fonte: Próprio autor.

De uma forma geral já é conhecido que em cristais iônicos complexos, dois tipos de modos vibracionais são observados: (i) modos externos, nos quais regiões de grupos iônicos complexos vibram coletivamente como unidades rígidas e (ii) modos internos, que resultam de vibrações atômicas dos grupos iônicos complexos (VENTKATAMARAN, 1970). Os modos vibracionais internos dominam o espectro Raman de compostos a base de fosfatos de Cálcio (ex. Hidroxiapatita, β -TCP, fluoroapatita) (KOUTSOPOULOS, 2002). O conjunto de frequências vibracionais destes espectros são relativas aos modos vibracionais dos grupos PO_4^{3-} (simetria tetraédrica) em ortofosfatos livres e aparecem entre 200 a 1200 cm^{-1} . Os principais modos correspondem aos modo de estiramento P-O simétrico do tetraedro (ν_1 , de maior intensidade em 938 cm^{-1}), modo de estiramento assimétrico do P-O ($\nu_3 = 1017\text{ cm}^{-1}$), modos de deformação angular O-P-O do tetraedro ($\nu_2 = 420\text{ cm}^{-1}$ e $\nu_4 = 567\text{ cm}^{-1}$). Em cristais iônicos complexos a base de fosfatos de cálcio, dois efeitos contribuem para induzir mudanças significativas e desdobramentos dos modos vibracionais PO_4^{3-} em relação ao fosfato livre. Mudanças na simetria que levam ao surgimento de distorções na rede de tetraedros, provocam o aparecimento de bandas que antes eram degeneradas no ortofosfato. Para tornar mais ainda complexo este cenário, as mudanças nas distâncias das ligações intratetraedrais, bem como nas angulaturas das ligações modificam o campo local modificando as constantes de força e provocando deslocamentos nas bandas originais. Estes são os efeitos de simetria. O acoplamento entre modos similares de tetraedros diferentes, promove excitações cooperativas de grupos PO_4^{3-} na célula unitária. Aza et al. (1997) por exemplo, determinaram as frequências vibracionais ativas no espectro Raman de fosfato de cálcio com fase cristalina β -TCP. Os autores estimaram dois modos vibracionais de rede, localizadas em 170 e em $204\text{-}305\text{ cm}^{-1}$, e observaram que os modos vibracionais internos esperados para o grupo PO_4^{3-} se desdobravam de 4 para 26 frequências, localizando-se próximas ao modo esperado para o ortofosfato (AZA et al., 1997).

Na Figura 27, observa-se que o espectro Raman dos coacervatos secos de polifosfato de cálcio guarda semelhanças com o espectro do seu precursor $(\text{NaPO}_3)_{10}$, exibindo bandas relacionadas ao modo vibracional de ligações P – O (assinaladas no espectro). Analisando-se o espectro do polifosfato de cálcio calcinado a $700\text{ }^\circ\text{C}$ observam-se vários desdobramentos das bandas características dos grupos fosfatos. Sugere-se que a grande quantidade de bandas está relacionada à grande complexidade de estruturas presentes. A banda em 1175 cm^{-1} foi assinalada por Dion et al. como sendo relacionada às vibrações de estiramento simétrico de ligações do tipo O – P = O (DION et al., 2014).

Figura 27 - Espectros Raman do $(\text{NaPO}_3)_{10}$ (PFNa) e do coacervato seco (PFCa) e calcinado (PFCa tratado a $700\text{ }^\circ\text{C}$) produzidos utilizando cloreto de cálcio.



Fonte: Próprio autor.

4.2.4 Conclusões

A pesquisa obteve uma nova cerâmica policristalina que pode ser utilizada na composição de biomateriais substitutos ósseos. Devido à constatação da presença de Ca, P e O na constituição, pode-se sugerir que o material se trata de uma cerâmica baseada em fosfato de cálcio, com Ca/P entre 0,5 e 1,0. Os reagentes utilizados como precursores na síntese de material cerâmico pelo método de coacervação não exigem o uso de altas temperaturas ou precursores orgânicos para a síntese dos materiais. Através das análises de espectroscopia vibracional, foi possível observar a similaridade química das cerâmicas obtidas, apresentando um perfil mais definido para o conjunto de bandas atribuídas dos estiramentos relacionados ao modo P - O. Foram observadas mudanças de fases cristalinas com o aumento da temperatura durante a calcinação das cerâmicas. As cerâmicas apresentaram redução dos valores de área de superfície conforme aumento da temperatura de calcinação ($700\text{ }^\circ\text{C}$). Isso indica que a formação e

crescimento de cristalitos de fosfato de cálcio promovem redução da porosidade do material. A redução da microporosidade poderia em tese prejudicar a utilização do material como base para proliferação celular na reconstrução óssea, porém, é um fator que pode incrementar a resistência mecânica do osso regenerado. Na análise por difração de raios X verificou-se que as amostras que foram calcinadas a 500 e 700 °C apresentaram maior cristalinidade. Foram identificados picos cristalinos correspondentes a uma mistura de fases distintas relacionados à fosfato de cálcio. Observadas por MEV, as cerâmicas que utilizaram CaCl_2 como precursor e foram calcinadas a 300 e 500 °C apresentaram cristais de fosfato de cálcio em formato de placas na superfície dos grãos, o que pode indicar o início de uma mudança estrutural na composição do material.

REFERÊNCIAS

AABOE, M.; PINHOLT, E. M.; HJORTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edimburgh, v.33, n.5, p.312-318, Oct. 1995.

AFONSO, A. S.. **Interacção entre Biomateriais e Tecido Ósseo**. Tese (Doutorado) - Universidade do Porto, Porto, 1998.

ANDRADE, Altair Dantas Andrade et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **ImplantNews**, v. 4, n. 06, p. 659-662, 2007.

AZA, P.N., SANTOS, C., PAZO, A., AZA, S., CUSCÓ, R., ARTÚS, L. Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 1. Raman Spectrum of β -tricalcium phosphate. **Chem Mater**. 9, 912-915, 1997.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v. 31, p. D37-D47, 2000.

CONSTANTINESCU, G. M. et al. **Clinical anatomy for small animal practitioners**. Iowa State Press, 2002.

COSTELLO, A. J. R. et al. Structure and properties of the condensed phosphates. XVIII. Ring-chain and other equilibria in organic solvents. **Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1225 – 1230, 1974

DACULSI, G. et al. Osteoconduction, osteogenicity, osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. **IRBM**, v. 34, n. 4-5, p. 346-348, 2013.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An introduction to tissue-biomaterial interactions**. John Wiley & Sons, 2003.

- DION, Anna et al. The effect of processing on the structural characteristics of vancomycin-loaded amorphous calcium phosphate matrices. **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4486-4494, 2005.
- DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465-1485, 2010.
- DOROZHKIN, S. V. Self-setting calcium orthophosphate formulations: cements, concretes, pastes and putties. **International Journal of Materials and Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-48, 2011.
- DOROZHKIN, S. V. Self-setting calcium orthophosphate formulations: cements, concretes, pastes and putties. **International Journal of Materials and Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-48, 2011.
- LIMA, E. C. de O.; GALEMBECK, F. Thermoreversible gel formation from aqueous aluminum polyphosphate solutions. **Journal of colloid and interface science**, v. 166, n. 2, p. 309-315, 1994.
- FIGUEIREDO, A.S. et al. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cir Bras**; v.19, n.4, Jul-Aug, 2004.
- FROHBERGH, Michael E. et al. Bone Tissue Engineering: Nanomedicine Approaches. **Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine**, v. 1, n. 2, p. 153-178, 2015.
- GRANDI, G. **Análise histomorfométrica comparativa entre o cimento de beta-TCP e os grânulos de beta-TCP/HAp no reparo ósseo de calotas cranianas de Ratos**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2007.
- GREENFIELD, S.; CLIFT, M. Analytical chemistry of the condensed phosphates. **International series in analytical chemistry**, 1974.
- GRYNPAS, M. D. et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications in vivo studies. **Biomaterials**, v. 23, n. 9, p. 2063-2070, 2002.
- GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química nova**, p. 1352-1358, 2010.
- KOUTSOPOULOS, s. Synthesis and Characterization of hydroxyapatite crustals: a review study on the analytical methods. **J. Biomed. Mater. Res.** 62:600-612, 2002.

LACERDA, K.A. **Obtenção de matrizes bioabsorvíveis à base de hidroxiapatita para aplicação em braquiterapia**. Dissertação (Mestrado) - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.

MISCH, C. E. **Aumento do osso para a inserção do implante: soluções para o enxerto ósseo**. In: MISCH, C.E. Implantes dentários contemporâneos. São Paulo: Ed. Santos, 2000. p. 451-65.

MOMENI, A.; FILIAGGI, M. J. Comprehensive study of the chelation and coacervation of alkaline earth metals in the presence of sodium polyphosphate solution. **Langmuir**, v. 30, n. 18, p. 5256-5266, 2014.

MOREIRA, Benjamim Silva. A biomecânica da fratura e o processo de cicatrização. In: **10º Semana de Pesquisa Extensão e Pós-Graduação**. 2013.

NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H.; CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. Cap. 2, p. 31-50.

PEREIRA, J. C. B. et al. Short chain polyphosphates as a strategic colloidal source of phosphate for parenteral admixtures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.558, p. 242 - 249, 2018.

PICKUP, D. M. et al. Characterisation of phosphate coacervates for potential biomedical applications. **Journal of biomaterials applications**, v. 28, n. 8, p. 1226-1234, 2014.

RODAN, G. A. Introduction to bone biology. **Bone**, v. 13, p. S3-S6, 1992.

RODRIGUEZ-LORENZO, L. M.; VALLET-REGI, M. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. **Chemistry of materials**, v. 12, n. 8, p. 2460-2465, 2000.

SCHNEIDER, V. et al. Bone and body mass changes during space flight. **Acta astronautica**, v. 36, n. 8, p. 463-466, 1995.

SHANJANI, Y. et al. Solid freeform fabrication of porous calcium polyphosphate structures for bone substitute applications: in vivo studies. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 6, p. 972-980, 2013.

TEN CATE, A. R. **Histologia Oral: Desarrollo, estructura y funcion**, 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana, p. 146-170, 1986.

TIEU, A. K. et al. The influence of alkali metal polyphosphate on the tribological properties of heavily loaded steel on steel contacts at elevated temperatures. **Advanced Materials Interfaces**, v. 2, n. 6, 2015.

TOSHIMA, T. et al. Morphology control of brushite prepared by aqueous solution synthesis. **J. Asian Ceram Soc.** 2,(1) 52-56, 2014.

VENKATAMARAN, G, SAHNI, V.C. **Rev. Sci. Mod. Phys.** 42, 409, 1970.

WANG, Q. et al. Degradation kinetics of calcium polyphosphate bioceramic: an experimental and theoretical study. **Materials Research**, v. 12, n. 4, p. 495-501, 2009.

WILLIAMS, D. F.; BLACK, J.; DOHERTY, P. J. **Second consensus conference on definitions in biomaterials.** In: DOHERTY, P.; WILLIAMS P. L.; LEE A.J.C. (Ed). **Advances in biomaterials: biomaterial-tissue interfaces**, v. 10, p. 525-33, 1992.

4.3 ARTIGO 3 – ELABORAÇÃO DE COMPÓSITOS PARA UTILIZAÇÃO COMO CIMENTOS ÓSSEOS INJETÁVEIS

RESUMO

A pesquisa desenvolveu novas formulações de cimento ósseo injetável constituídos por uma fase sólida inorgânica e uma fase semi-sólida (hidrogel) polimérica orgânica. Inicialmente, diferentes compósitos à base de polifosfato de sódio (PoliP), alginato de sódio e cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram preparados e caracterizados para se avaliar as interações físico-químicas existentes entre os componentes. Utilizou-se as técnicas de espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/EDS) nas análises dos compósitos. Uma nova cerâmica à base de polifosfato de cálcio calcinada a 700 °C foi utilizada na constituição da fase sólida das formulações de cimentos ósseos injetáveis. Foram acrescentados à fase sólida os minerais carbonato de cálcio (CaCO_3) e óxido de zinco (ZnO). A fase semi-sólida foi constituída por um gel de alginato de sódio em meio aquoso. Os cimentos ósseos injetáveis foram avaliados quanto à injetabilidade por meio de um planejamento fatorial 2^3 . A técnica de Microscopia Confocal Raman foi utilizada para avaliação da uniformidade dos cimentos. Verificou-se que o fator concentração do gel de alginato é o que exerce efeito negativo mais significativo sobre a injetabilidade, em intervalo de confiança de 95%. A técnica de Microscopia Raman se mostrou adequada para se avaliar a distribuição dos constituintes nas formulações. Os cimentos injetáveis desenvolvidos demonstraram potencial promissor para aplicações médicas em tecidos ósseos.

Palavras-Chave: Coacervação. Polifosfato. Cerâmica. Alginato. Cimento ósseo injetável.

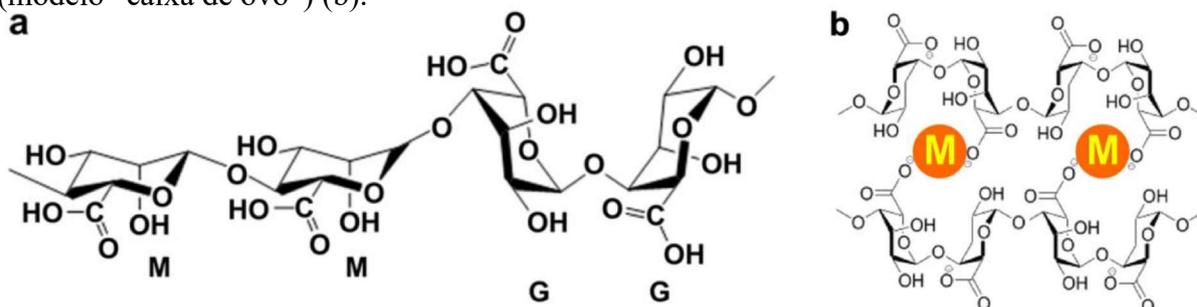
4.3.1 Introdução

A constante busca por inovações tecnológicas na área de saúde faz aumentar a cada dia o interesse no ramo de pesquisas em biomateriais. De modo geral, pode-se também definir biomaterial como um material que interage com os tecidos nos quais é implantado, mantendo a sua estrutura e propriedades, sem provocar alterações no meio fisiológico envolvente. Alguns exemplos em que é necessário o uso de biomateriais são: extirpação de tumores, patologias causadoras de danos irreversíveis, defeitos congênitos com perdas funcionais e atrofia com perda gradual de tecidos (BEOLCHI, 2009). Cronologicamente, as intenções de processamento

e características dos biomateriais foram evoluindo. Inicialmente, havia-se por objetivo a obtenção de materiais biocompatíveis que permitissem a substituição do tecido danificado, promovendo suporte mecânico e trazendo mínima resposta biológica do paciente. Depois, a intenção passou a ser o prolongamento da vida útil do implante, através de melhorias na interação com a interface do tecido hospedeiro. Posteriormente, o foco passou a ser o desenvolvimento de materiais biodegradáveis, ou seja, que permitissem ser incorporados ou absorvidos pelo tecido hospedeiro. Mais recentemente, as pesquisas buscam a obtenção de materiais biomiméticos, que participem ativamente do processo de recuperação e promovam a estimulação em nível celular, atuando no tecido de forma específica (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Os polímeros de origem biológica são abundantes e seus produtos de degradação são biocompatíveis e não-tóxicos, o que os torna seguros para utilização na constituição de biomateriais. Além disso, apresentam custo acessível e são obtidos de fontes renováveis. Vários são os polímeros utilizados na produção de materiais com aplicações biomédicas, tendo destaque as proteínas (como colágeno, elastina e fibroína da seda) e os polissacarídeos (como quitosana, alginato, goma xantana, ácido hialurônico e pectina) (SIONKOWSKA, 2011). O alginato é um polissacarídeo linear de alta massa molar que tem como principal fonte a parede celular de diversas espécies de algas marinhas marrons. Este biopolímero pode ser também sintetizado por algumas bactérias, como as espécies *Pseudomonas* e *Azotobacter*, originando um material de alta pureza e biocompatibilidade, com características e estrutura polimérica padronizáveis, de grande interesse em aplicações na área médica. A estrutura química do alginato consiste de resíduos do ácido α -L-glicurônico e ácido β -D-manurônico associados por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e distribuídos em diferentes proporções e combinações ao longo da cadeia (SACCHETIN et al., 2010). O alginato permite a formação de uma estrutura tridimensional do tipo gel (*cross-linking*), quando associado a cátions divalentes. Ocorre a formação de dímeros de cadeias de alginato, numa conformação denominada “caixa de ovo”, devido à ligação dos cátions aos blocos de ácidos α -L-glicurônicos (Figura 28). A junção de vários dímeros promove a formação da rede do gel (GOMBOTZ; WEE, 1998). Os géis de alginato são estáveis na faixa de temperatura entre 0 e 100 °C, porém, o aumento da temperatura tende a diminuir seu módulo de rigidez (GACESA, 1988).

Figura 28 – Estrutura química do alginato (a) e formação de hidrogéis por *cross-linking* iônico (modelo “caixa de ovo”) (b).



Fonte: SUN; TAN, 2013.

O alginato apresenta as seguintes propriedades: biocompatibilidade, bioadesão e baixa toxicidade. Devido à possibilidade de ajuste das propriedades por reticulação com íons divalentes, como o cálcio, o alginato tem aplicações na forma de hidrogéis, membranas e micropartículas. Este polímero tem sido usado na cicatrização de feridas, como matriz para cultivo celular e na engenharia tecidual visando a regeneração de ossos e vasos sanguíneos (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Novos estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos (WAN et al., 2006). Os compósitos são uma classe de materiais constituídos por duas fases distintas: a fase contínua, que é a matriz; e fase dispersa, também chamada de componente de reforço ou modificador. Os compósitos costumam apresentar propriedades combinadas dos seus constituintes individuais. A fase dispersa pode se apresentar na forma de fibras ou partículas e é adicionado com diversos objetivos, como, por exemplo: (i) melhorar a biocompatibilidade e bioatividade; (ii) aumentar a taxa de degradação; (iii) melhorar propriedades mecânicas, como módulo de elasticidade e resistência à tração; (iv) controlar o perfil de liberação de fármacos ou fatores de crescimento incorporados nesses materiais (HABRAKEN et al. 2007). Vários fatores afetam as propriedades dos compósitos, dentre estes, citam-se: (i) características dos materiais constituintes; (ii) percentual, distribuição e orientação das fibras ou partículas na matriz; (iii) interações interfaciais (WANG, 2003). As principais associações para formação dos biomateriais compósitos são do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica. Para uso de biomateriais poliméricos como substituto ósseo, é possível formar compósitos pela adição de partículas de biovidro, hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio, visando ao aumento da biocompatibilidade e melhoria do módulo elástico da matriz (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Existem vários estudos que combinam estas cerâmicas com diversos polímeros (REIS et al., 2015), tais como: gelatina, quitosana, colágeno, ácido polilático-co-glicólico (PLGA), ácido polilático (PLA), entre outros, para a produção de

diversos biomateriais. Destas combinações, resultaram microesferas; membranas; nanotubos; hidrogéis para formação de cimentos ósseos injetáveis; estruturas tridimensionais (*Scaffolds*) ou até mesmo revestimentos, visando aplicação na regeneração de tecidos (REIS et al., 2015). Wise et al. (2007) relataram que os constituintes moleculares da interface orgânico-mineral nos ossos são ricos em polissacarídeos, muito provavelmente açúcares de glicosaminoglicano (GAG), em vez de proteínas, como é amplamente assumido. Esses achados podem alterar o conceito aceito de biologia estrutural óssea e exercer um grande impacto no manejo farmacológico de distúrbios ósseos, bem como fornecer novas estratégias para o desenvolvimento de compósitos substitutos ósseos e biomarcadores para diagnóstico de doenças. Essas descobertas recentes sobre a riqueza de componentes de polissacarídeos nas interfaces orgânicas e inorgânicas no osso inspiraram uma nova estratégia na aplicação de polissacarídeos para mineralização biomimética (WIZE et al., 2007).

Os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) são sistemas que formam uma pasta devido à precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio, ocorrendo enrijecimento espontâneo à temperatura ambiente ou corporal. Esses sistemas são constituídos por duas fases: uma sólida e outra líquida. A fase sólida é composta de um tipo de fosfato de cálcio ou, normalmente, mais de um, podendo ainda conter outros sais de cálcio e alguns aditivos orgânicos. Já a fase líquida, é composta por água ou soluções aquosas compostos de cálcio ou fosfato, podendo também conter compostos orgânicos em sua composição (CARRODEGUAS et al., 1999). De modo geral, os CFCs são utilizados principalmente na cirurgia maxilofacial e para o tratamento da fratura distal do raio. No entanto, foram feitas tentativas de usar CFC para: fraturas calcâneas; fraturas de quadril; aumento de corpos vertebrais osteoporóticos; fraturas do platô da tíbia; restauração da fixação do parafuso do pedículo; reforço das fraturas toracolombar; e reforço de parafusos de ossos esponjosos (BOHNER et al, 2000). Para ser injetado *in vivo*, a pasta CFC deve ter duas características: injetabilidade e coesão. A injetabilidade é a capacidade da pasta de cimento de ser extrudada através de uma agulha pequena e longa (por exemplo, 2 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento) sem perder a coesão. A perda de coesão ocorre quando o líquido de mistura é muito fluido em comparação com o tamanho dos pós de cimento, o que faz com que o líquido seja expulso sem as partículas de fosfato de cálcio. Uma pasta de cimento com uma coesão apropriada se instala em um fluido sem se desintegrar. Isso pode ser conseguido mantendo uma alta viscosidade para a pasta CFC (BOHNER et al., 2000). Para aumentar as propriedades de injeção e coesão do cimento *in vivo*, biopolímeros como quitosana, gelatina e colágeno são frequentemente introduzidos no cimento de fosfato de cálcio. Às vezes,

esses polímeros são aplicados para reforçar mecanicamente o cimento, resultando na compacta microestrutura que é formada após a mistura de materiais orgânico-inorgânico (HABRAKEN et al., 2007).

A composição dos cimentos ósseos pode ser acrescida também de outros minerais em sua fase dispersa tendo por objetivos: (i) melhorar a biocompatibilidade e bioatividade; (ii) aumentar a taxa de degradação; (iii) melhorar propriedades mecânicas; (iv) controlar o perfil de liberação de fármacos ou fatores de crescimento incorporados nesses materiais (HABRAKEN et al. 2007). O íon zinco (Zn^{+2}) é um importante oligoelemento que está presente nos ossos em concentrações de 0,0126 a 0,0217% em massa (TAMM; PELD, 2006). A presença de Zn na hidroxiapatita diminui a reação de inflamação induzida pela fagocitose das partículas. Além disso, o Zn estimula o crescimento e a mineralização óssea (GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2006). Estudos realizados por Jallot et al. (2005) mostraram que a bioatividade da hidroxiapatita contendo 0,5% em massa de Zn ($x = 0,78$) é superior à da hidroxiapatita pura. O carbonato de cálcio ($CaCO_3$) é abundantemente utilizado como esqueleto biogênico de esqueletos para mais animais basais, por exemplo, esponjas calcárias, corais e equinodermes. A importância do $CaCO_3$ como biossentes para a formação de hidroxiapatita em mamíferos foi reconhecida por Müller em 2014. Foi relatado que após a exposição de células SaOS-2 ao bicarbonato de cálcio ($Ca(HCO_3)_2$) *in vitro*, ocorre um aumento significativo da formação de depósito de Ca nessas células (MÜLLER, 2014). É interessante notar que os implantes de metal, cobertos com hidroxiapatita (HA), ou enriquecidos com camadas de HA contendo carbonato ou carbonato, são altamente biocompatíveis. Pesquisas evidenciaram que amostras de cimento de fosfato de cálcio foram recuperadas 12h depois de endurecidas *in vivo* já contendo apatita carbonatada, mesmo quando a mistura de cimento inicial não continha carbonato como um dos componentes sólidos. A fração em massa de carbonato nas amostras de 12h foi de cerca de 1%. Os resultados sugerem que, sob as condições *in vivo*, o carbonato está prontamente disponível, o que permite a formação de apatita carbonatada no lugar de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) (TAKAGI et al., 2001).

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver e caracterizar compósitos contendo cerâmicas à base de polifosfato de cálcio e alginato de sódio, acrescidos de adjuvantes como $CaCO_3$ e óxido de zinco (ZnO) em sua composição, para a formulação de cimentos ósseos injetáveis.

4.3.2 Material e método

4.3.2.1 Preparo e caracterização de compósitos a base de Alginato, Polifosfato e Cálcio

Através de uma planificação qualitativa e quantitativa, misturas em meio aquoso de alginato de sódio, hexametáfosfato de sódio (PoliP, $(\text{NaPO}_3)_n$, $n=10$, Sigma-Aldrich, 96%,) e cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Dinâmica, PA) foram realizadas com o objetivo de se obter uma melhor compreensão das interações que podem ocorrer entre esses componentes. Foram preparados géis aquosos de alginato de sódio de média viscosidade (Dinâmica, pureza 90%,) nas concentrações (m/v) de 1%, 2% e 4%. Preparou-se três diferentes soluções de PoliP com concentrações (m/v) de 2%, 4% e 8%. Foram também preparadas três diferentes soluções de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações (m/v) de 1%, 20% e 40%. As misturas foram realizadas adicionando-se, inicialmente, a solução de PoliP ao gel de alginato. Em seguida, acrescentou-se aos poucos a solução de cloreto de cálcio, sob agitação com bastão de vidro. A solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1% (m/v) foi utilizada nas misturas obedecendo-se a relação Ca/P de 1,67, que é aquela encontrada na hidroxiapatita natural presente nos ossos. Todas as misturas foram realizadas em triplicata. Nas Tabelas 3 e 4, estão registradas as composições de todos os sistemas. Os compósitos obtidos foram secados em estufa a 60°C por 12h.

As amostras foram caracterizadas através de espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS).

Tabela 3 – Composição dos sistemas contendo alginato (1; 2; 4%), polifosfato (2; 4; 8%) e cálcio (1%).

COMPONENTE	LOTES DE BANCADA (A)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gel alginato 1% (m/v)	-	-	9,0 g	9,0 g	9,0 g	-	-	-	-	-	-
Gel alginato 2% (m/v)	9,0 g	9,0 g	-	-	-	9,0 g	9,0 g	9,0 g	-	-	-
Gel alginato 4% (m/v)	-	-	-	-	-	-	-	-	9,0 g	9,0 g	9,0 g
(NaPO₃)₁₀ 2% (m/v)	1,0 mL	-	1,0 mL	-	-	1,0 mL	-	-	1,0 mL	-	-
(NaPO₃)₁₀ 4% (m/v)	-	-	-	1,0 mL	-	-	1,0 mL	-	-	1,0 mL	-
(NaPO₃)₁₀ 8% (m/v)	-	1,0mL	-	-	1,0mL	-	-	1,0 mL	-	-	1,0 mL
CaCl₂.2H₂O 1% (m/v)	-	-	3,6 mL	7,3 mL	11,0 mL	3,6 mL	7,3 mL	11,0 mL	3,6 mL	7,3 mL	11,0 mL

Fonte: próprio autor.

Tabela 4 – Composição dos sistemas contendo alginato (2; 4%), polifosfato (2; 8%) e cálcio (20; 40%).

COMPONENTE	LOTES DE BANCADA (B)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Gel alginato 2% (m/v)	9,0 g	9,0 g	-	-	9,0 g	9,0 g	-	-
Gel alginato 4% (m/v)	-	-	9,0 g	9,0 g	-	-	9,0 g	9,0 g
(NaPO₃)₁₀ 2% (m/v)	1,0 mL	-	1,0 mL	-	1,0 mL	-	1,0 mL	-
(NaPO₃)₁₀ 8% (m/v)	-	1,0 mL	-	1,0 mL	-	1,0 mL	-	1,0 mL
CaCl₂.2H₂O 20% (m/v)	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL	-	-	-	-
CaCl₂.2H₂O 40% (m/v)	-	-	-	-	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL	10,0 mL

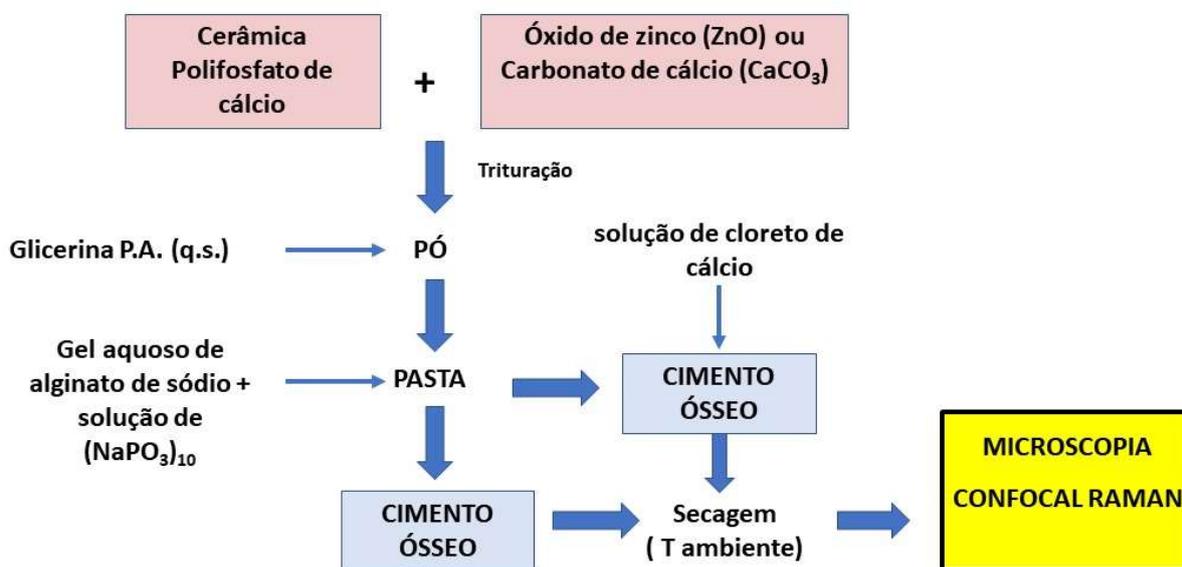
Fonte: próprio autor.

4.3.2.2 Preparo e caracterização do cimento ósseo injetável

Inicialmente, pesou-se a cerâmica de polifosfato de cálcio (PFC). Misturou-se ao PFC, óxido de zinco (ZnO, Dinâmica) ou carbonato de cálcio (CaCO₃, Dinâmica) em diferentes proporções, conforme formulações pré-definidas (Tabela 5). Os pós foram triturados juntos em almofariz e pistilo de ágata. Acrescentou-se glicerina P.A. em quantidade suficiente (q.s.) até dispersão uniforme das partículas (formação de pasta). Preparou-se gel aquoso de alginato de sódio. Acrescentou-se solução de (NaPO₃)₁₀ ao gel. Incorporou-se o gel à pasta, em proporções conforme descrito na Tabela 5. Sobre o material obtido, foi gotejada, ou não, solução de cloreto de cálcio. Na Figura 29, encontra-se representado o procedimento para preparo do cimento ósseo injetável através de um fluxograma.

Aplicou-se a técnica de microscopia confocal Raman para investigar a distribuição de seus componentes na mistura seca, uma vez que a análise qualitativa da amostra pode ser feita varrendo-se a amostra de forma tridimensional. Duas formulações de cimento ósseo foram avaliadas (amostras 4 e 6, cujas composições estão descritas na Tabela 5). Foi utilizado um equipamento Sistema confocal Witec, com laser de Ar ($\lambda = 532 \text{ nm}$) e potência variável, dependendo da intensidade do sinal da amostra. As amostras foram depositadas na forma de pó sobre lâmina de vidro e visualizadas com lente 20x. A análise dos dados foi realizada por meio do *software* Witec 2.0.

Figura 29 – Fluxograma de preparo dos cimentos ósseo injetáveis.



Fonte: próprio autor.

Tabela 5 – Composição das formulações de cimento ósseo.

Componente	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7
PFCa	0,4 g	0,4 g	0,4 g	0,4 g	1,0 g	1,0 g	1,0 g
ZnO	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	-	-	-
CaCO₃	-	-	-	-	0,4 g	0,4 g	0,4 g
Glicerina P.A. (q.s.)	0,4 g	0,8 g	0,8 g				
Gel Alginato 2% (m/v)	1,0 g	1,0 g	-	-	-	-	-
Gel Alginato 4% (m/v)	-	-	1,0 g	1,0 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
(NaPO₃)₁₀ 2% (m/v)	0,1 mL	0,1 mL	-	-	-	-	-
(NaPO₃)₁₀ 8% (m/v)	-	-	0,1 mL	0,7 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
CaCl₂.2H₂O 1% (m/v)	1,0 mL	-	-	-	-	-	-
CaCl₂ 1 mol.L⁻¹	-	-	1,0 mL	-	-	-	1,0 mL

Fonte: próprio autor.

4.3.2.3 Estudo da injetabilidade de cimentos ósseos injetáveis utilizando planejamento experimental fatorial 2^3 .

Realizou-se um estudo estatístico fatorial 2^3 para avaliar a injetabilidade de compósitos para uso como cimento ósseo injetável. A utilização do planejamento fatorial auxilia na avaliação dos efeitos que os diferentes constituintes das formulações podem exercer sobre o comportamento dos sistemas em estudo, de forma mais sistemática, confiável, rápida e a um menor custo, extraindo-se o máximo de informações. A matriz do planejamento fatorial para este experimento foi constituída de três fatores e dois níveis (Tabela 6), produzindo um fatorial completo 2^3 e resultando em um total de 8 ensaios (Tabela 7). Com o intuito de se avaliar o erro puro, inerente ao sistema, os experimentos foram realizados em duplicata, perfazendo um total de 16 ensaios. A Matriz de planejamento foi montada de acordo com Neto et al. (2002) e Box et al. (1978). O programa *Statistica*[®] 8.0 foi utilizado para a análise dos ensaios.

Tabela 6 - Fatores analisados e seus respectivos níveis.

FATORES	NÍVEL -1	NÍVEL +1
(1) Polifosfato de cálcio calcinado a 700 °C	1,5 g	2,5 g
(2) Tipo de adjuvante	CaCO ₃	ZnO
(3) Gel de alginato	2%	4%

Fonte: próprio autor.

Neste estudo, avaliaram-se os efeitos de interações entre 3 fatores. Em dois fatores (gel de alginato e pó cerâmico), avaliou-se o efeito das concentrações presentes nas formulações em dois níveis. O outro fator avaliado pelo estudo foi o efeito exercido pela presença de um ou outro tipo de adjuvante de formulação (CaCO₃ e ZnO). Os dois níveis dos componentes foram representados como -1 e +1, sendo esta uma representação padrão em ensaios fatoriais.

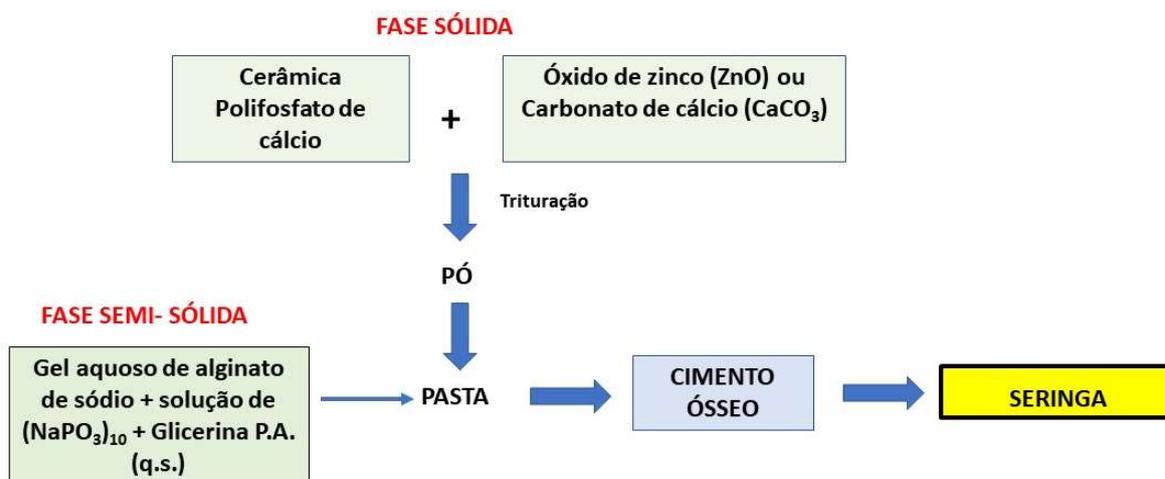
Tabela 7 - Matriz de planejamento fatorial 2³

ENSAIO	(1) Pó cerâmico	(2) Tipo de adjuvante	(3) Gel de alginato
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fonte: próprio autor.

Inicialmente, preparou-se o gel aquoso de alginato de sódio da seguinte forma: o alginato de sódio em pó foi pesado e disperso por maceração com glicerina P.A.. Em seguida adicionou-se solução de PoliP a 2%, aos poucos e sob agitação, em quantidade suficiente para completar 100 g de gel. A cerâmica de polifosfato de cálcio calcinada a 700 °C (PFCa) foi pesada e misturada ao ZnO ou CaCO₃, conforme os níveis definidos pela matriz de planejamento fatorial. Os pós foram triturados juntos em almofariz e pistilo de ágata. Acrescentou-se aos poucos 5 g do gel de alginato 2% ou 4% ao pó. Cuidadosamente para não haver a formação de bolhas, uniformizou-se o material com o auxílio de uma espátula por cerca de dois minutos até obtenção de um gel branco fluido de aspecto pastoso, uniforme e brilhante. Na Figura 30, o procedimento de obtenção das amostras avaliadas no teste de injetabilidade encontra-se representado na forma de um fluxograma. A Tabela 8 descreve as quantidades usadas no estudo da injetabilidade das formulações de cimento ósseo investigadas no presente estudo.

Figura 30 – Fluxograma do preparo das amostras avaliadas no teste de injetabilidade.



Fonte: próprio autor.

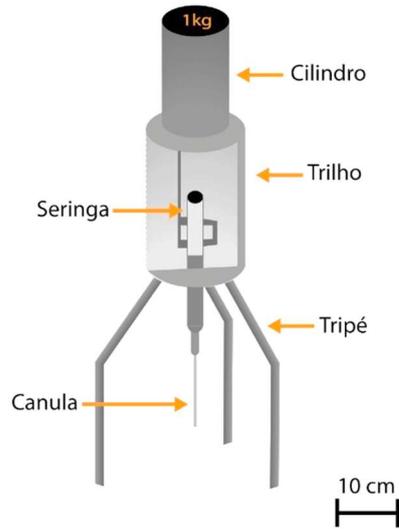
Tabela 8 – Composição das formulações de cimento ósseo injetável.

COMPONENTES	QUANTIDADES
FASE SÓLIDA	
PFCa	1,5 g (-1) ou 2,5 g (+1)
CaCO ₃ (-1) ou ZnO (+1)	0,5g
FASE SEMI-SÓLIDA (GEL)	
Alginato de sódio	2,2 g (-1) ou 4,4 g (+1)
Glicerina P.A.	2,0g
(NaPO ₃) ₁₀ 2% (m/v)	q.s.p 100 g

Fonte: próprio autor.

As misturas foram caracterizadas quanto à injetabilidade (fator variável), de acordo com técnica adaptada do trabalho desenvolvido por Alves (2005). Através de um aparato apropriado (Figura 31), foi aplicada uma força sobre o êmbolo da seringa com um peso morto cilíndrico de 1kg disposto verticalmente em um trilho sobre um suporte, onde foi conectada a seringa contendo o material teste. Deste modo, foi exercida uma força constante de 9,8 N ao êmbolo da seringa, permitindo a saída do material pelo bisel da agulha. Utilizou-se seringas descartáveis de polipropileno de 3,0 mL (marca BD) e agulhas hipodérmicas descartáveis 40x16 (marca BD, aço inoxidável, dimensões de 40 mm comprimento x 1,6 mm de diâmetro).

Figura 31 – Representação gráfica do aparato utilizado para realização do teste de injetabilidade.



Fonte: Adaptado de Alves (2005).

As seringas foram preenchidas com auxílio de uma espátula e efetuou-se leves impactos com os dedos ao corpo da seringa para acomodação do material e retirada de bolhas. Recolocou-se cuidadosamente o êmbolo e ajustou-se o volume da amostra para a marcação de 3,0 mL. Foi padronizado um tempo de 5s para aplicação da carga. Utilizou-se uma seringa para cada um dos ensaios. A ordem de realização dos ensaios foi aleatorizada. Foi realizada a pesagem prévia das mesmas vazias (M_0) e logo após o carregamento com material (M_1). Após o procedimento de injeção, realizou-se nova pesagem das seringas. Todas as medidas foram realizadas sem as agulhas. A taxa de injetabilidade de cada ensaio foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$\text{Injetabilidade (\%)} = \left(\frac{(M_1 - M_0) - (M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} \right) \times 100 \quad (3)$$

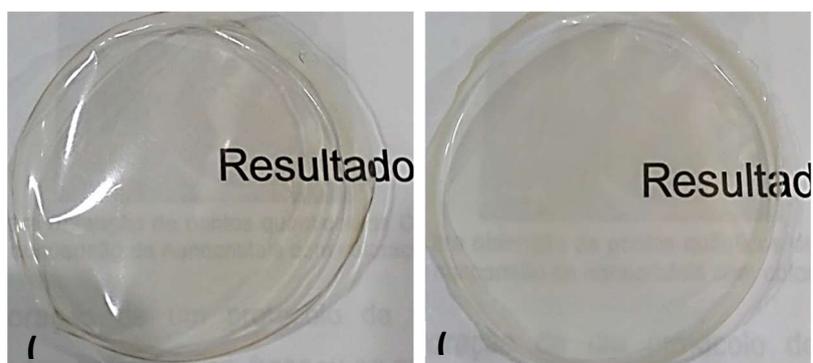
Onde, M_0 é a massa (g) da seringa vazia, M_1 é a massa (g) da seringa preenchida com o material, e M_2 é a massa (g) da seringa contendo o material residual após o processo de injeção.

4.3.3 Resultados e discussão

4.3.3.1 Compósitos à base de Alginato, Polifosfato e Cálcio

Inicialmente testou-se a compatibilidade química dos polímeros Alginato e PoliP. A secagem de solução de Alginato 2% forma uma película (filme) levemente flexível. A adição de solução de PoliP à solução de Alginato resulta uma mistura homogênea e após a secagem do filme a película fica mais levemente turva e quebradiça (Figura 32).

Figura 32 – Aspecto visual do (a) filme seco de Alginato 2% e (b) filme seco de Alginato 2% + PoliP 8%.

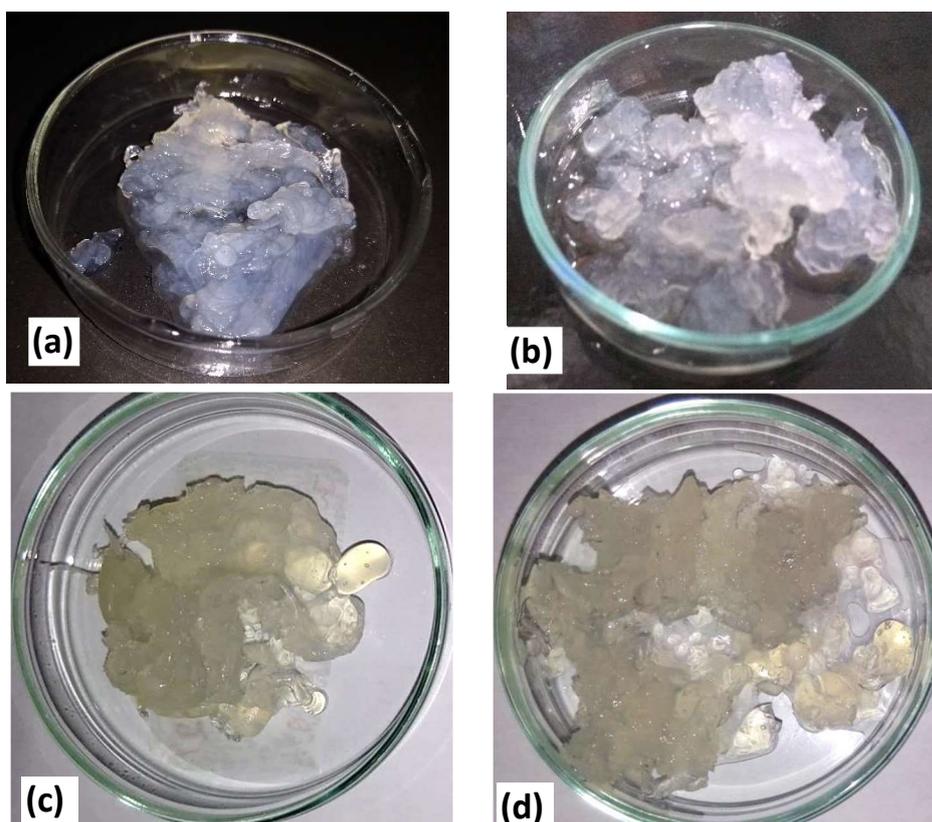


Fonte: Próprio autor.

Em seguida testou-se a interação entre os íons Ca^{2+} e as soluções contendo os poliânions Alginato e PoliP. As misturas de alginato de sódio e polifosfato de sódio (PoliP) contendo altas concentrações de Ca^{2+} em meio aquoso levou à rápida formação de um material aglutinado e enrijecido (gel), porém, flexível. Observou-se que uma maior presença de PoliP favoreceu a fragmentação do material após ser pressionado. Essa característica pode ser explicada pela competição que existe entre os dois poliânions (alginato e PoliP) na presença do cálcio. Por ambos apresentarem carga negativa, associam-se fortemente com o Ca^{2+} adicionado ao meio, o que pode gerar uma maior instabilidade na formação da rede polimérica tridimensional do gel. A Figura 33 mostra o aspecto gelatinoso da mistura resultante de quatro destes sistemas (Tabela 4) onde foram variadas as quantidades de polifosfato presente (2 ou 8%) e da solução de Ca^{2+} (20 ou 40%), mantendo-se a de alginato (2%) constante. Ao se pressionar o gel, observa-se a expulsão de líquido que fica retido no interior da malha do polímero. Através de observação qualitativa, percebe-se que os géis contendo maior concentração de PoliP apresentaram menor volume de água retida. Este fato se deve a uma maior força de aglutinação da malha polimérica

devido à forte reticulação (*cross-linking*) gerada pelas interações iônicas eletrostáticas com os íons Ca^{2+} .

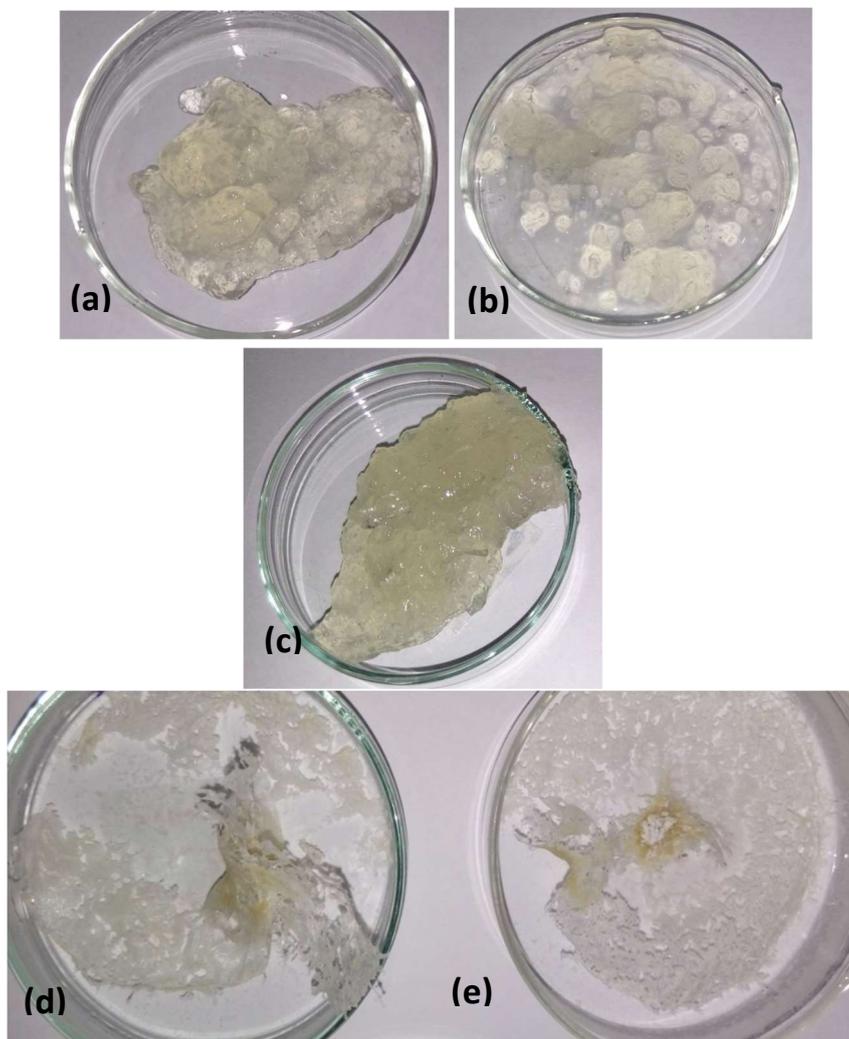
Figura 33 – Registro fotográfico do aspecto gelificado das misturas contendo (a) Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 40%; (b) Alginato 2% + PoliP 8% + Ca^{2+} 40%; (c) Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 20%; (d) Alginato 2% + PoliP 8% + Ca^{2+} 20%.



Fonte: Próprio autor.

Draget et al (2001) estudaram o intumescimento do pó seco de alginato de sódio em meio aquoso com Ca^{2+} , verificando que, quando $[\text{Ca}^{2+}] < 3 \text{ mmol.L}^{-1}$, quase todo o alginato permanecia no sobrenadante. Já quando $[\text{Ca}^{2+}] > 3 \text{ mmol.L}^{-1}$, quase nenhum alginato (1 - 3%) encontrava-se presente em solução. Com base nesse relato, pode-se sugerir que as altas concentração de Ca^{2+} adicionadas às amostras observadas (Figuras 33 a-b) se ligaram a praticamente todo o alginato presente, levando à quase imediata formação do *cross-linking*. A rede tridimensional formada pelas junções entre alginato e cátions metálicos divalentes já é conhecida e descrita na literatura como um sistema clássico (MORRIS et al., 1978). O modelo “caixa de ovo” é amplamente citado como o modo de interação responsável pelas propriedades de reticulação e formação de gel dos alginatos (GOMBOTZ; WEE, 2012).

Figura 34 – Aspecto visual das misturas recém preparadas contendo (a) Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 1% ; (b) Alginato 2% + PoliP 8% + Ca^{2+} 1%; (c) Alginato 4% + PoliP 4% + Ca^{2+} 1%. (d) Alginato 1% + PoliP 4% + Ca^{2+} 1% (seco 60°C) ; (e) Alginato 1% + PoliP 8% + Ca^{2+} 1% (seco 60°C).



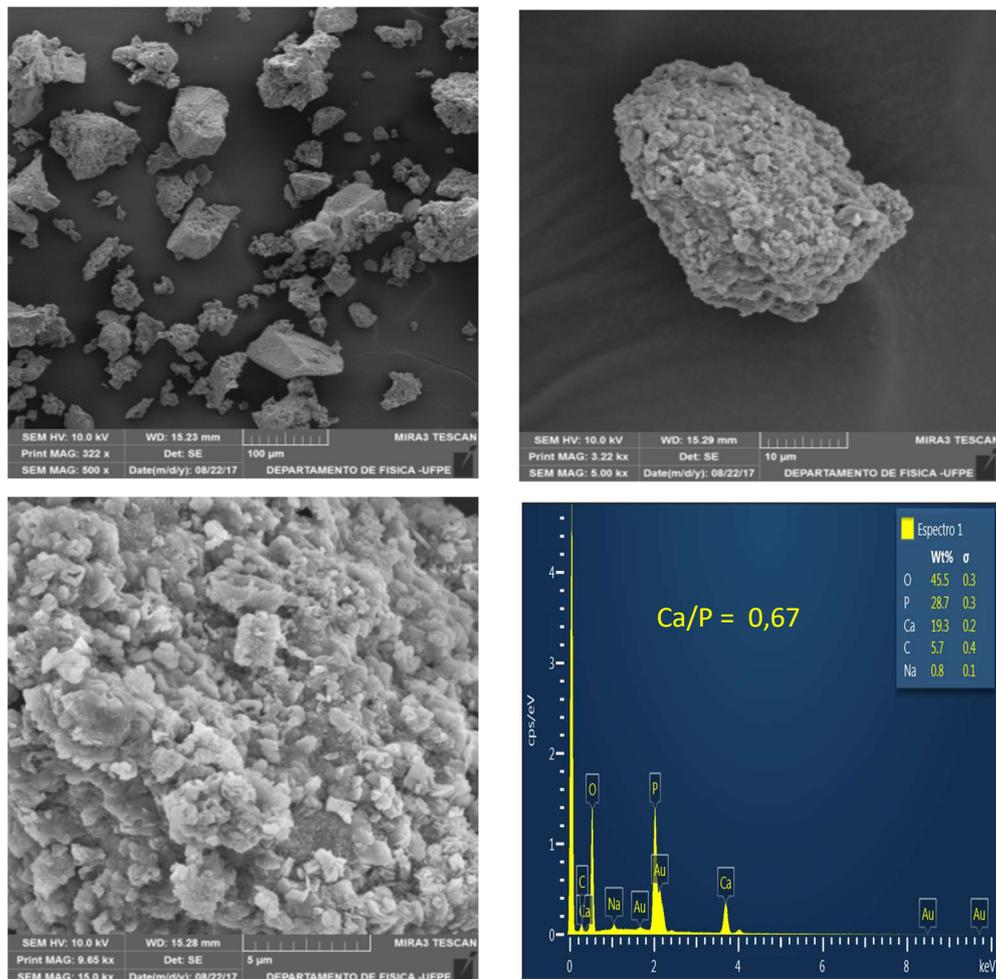
Fonte: Próprio autor.

Após secagem dos compósitos obtidos, observa-se que aqueles que apresentam maior concentração de PoliP apresentaram um aspecto visual vítreo, levemente esbranquiçado. Provavelmente, esse aspecto está relacionado a formação de estruturas de polifosfato de cálcio nas amostras. As misturas contendo Ca^{2+} em menor concentração ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1%) geraram géis homogêneos, não havendo a formação de estruturas rígidas intumescidas. Observa-se que a presença de maior quantidade de PoliP leva a geração de um aspecto grumoso, mas com caráter uniforme (Figura 34 a-b). Novamente, esse fato pode ser explicado pela competição entre os componentes na formação da rede tridimensional. Os géis de alginato de 2% e 4% contendo PoliP e Ca^{2+} formaram géis uniformes viscosos e consistentes (Figura 34 c).

Após a secagem de misturas que utilizaram soluções de alginato 1%, observou-se que, com uma maior presença de PoliP, há formação de precipitado branco aderido à estrutura do material. Sugere-se que tal composto seja majoritariamente polifosfato de cálcio. Pode-se observar o aspecto visual dos géis secos na Figura 34 (d) e (e).

A mistura Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 40% foi preparada resultando num sistema esbranquiçado, similar aos coacervatos obtidos a partir do polifosfato e Ca^{2+} . Esta mistura após ter sido seca em estufa a 60°C foi triturada e analisada por MEV. As imagens (Figura 35) mostram grãos compactos com superfície irregular. Observam-se estruturas aderidas por toda a superfície. Sugere-se que essas estruturas são resultantes de coacervatos de polifosfato de cálcio, que precipitaram ou que cresceram por toda a malha do gel. A presença de fosfato e Ca^{2+} foi confirmada por EDS e a relação $\text{Ca}/\text{P} = 0,67$ está na faixa de proporções encontradas nos coacervatos obtidos a partir de polifosfato e cálcio (estudos prévios demonstrados na Seção 3).

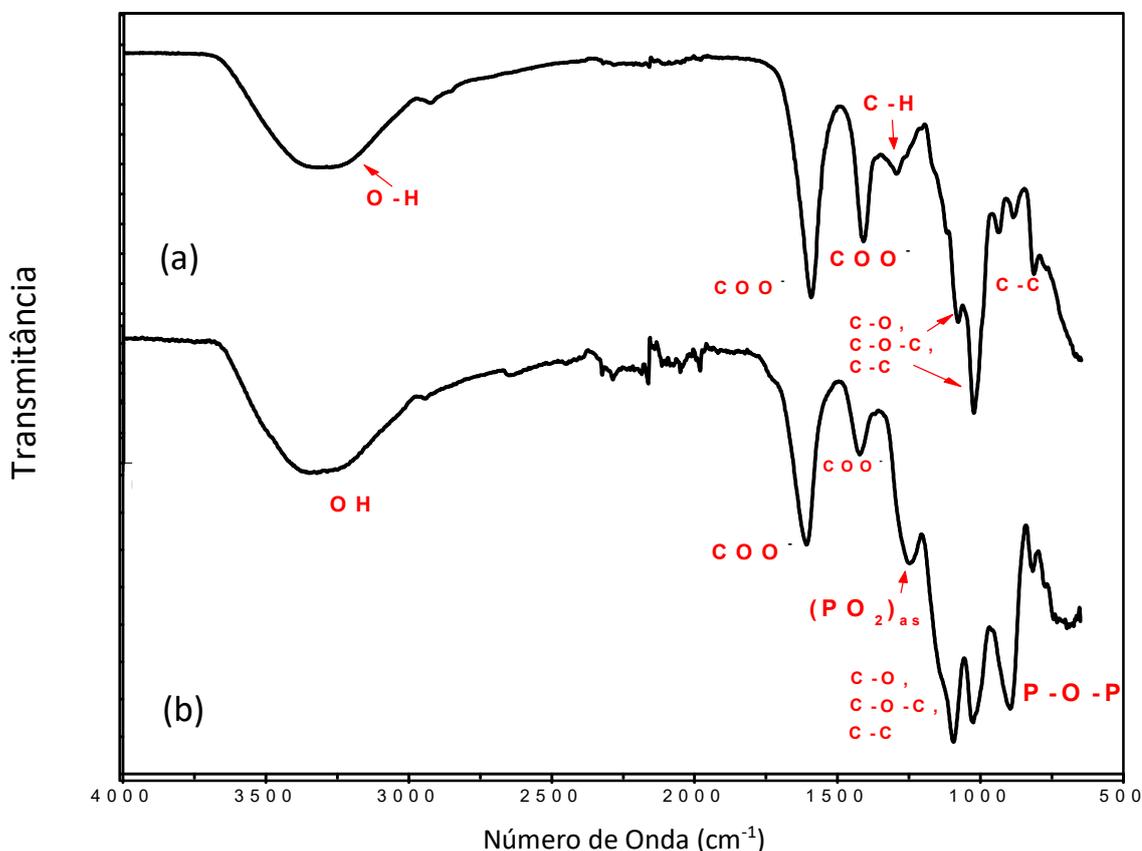
Figura 35 – MEV da mistura Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 40%. Análise elementar por EDS do material mostra uma proporção $\text{Ca}:\text{P} = 0,67$.



Fonte: Próprio autor.

Na figura 36 a, observa-se o espectro vibracional no infravermelho do alginato de sódio. Observa-se o sinal forte e largo em $3250-3370\text{ cm}^{-1}$ relacionada a ligação O-H. O sinal forte em 1610 cm^{-1} corresponde ao modo vibracional assimétrico relacionado ao grupo COO^- . O sinal em 1414 cm^{-1} refere-se ao modo vibracional simétrico de COO^- . O sinal fraco em 1320 cm^{-1} está relacionado à deformação no plano na ligação C-H. Os sinais fortes em $1030-1035\text{ cm}^{-1}$ referem-se aos estiramentos das ligações do tipo C-O, C-O-C e C-C. O sinal fraco em 780 cm^{-1} também está relacionado ao estiramento da ligação C-C. Comparando-se os grupos funcionais presentes nos espectros do Alginato de sódio com o do composto Alginato (4%) + Polifosfato (8%) + Cálcio (1%) (Figura 36 b), assinalados nos espectros vibracionais, constata-se que no composto a única alteração foi o surgimento de bandas relacionadas ao polifosfato de cálcio (PFCa). O sinal em 1257 cm^{-1} está relacionado ao modo vibracional assimétrico do grupo PO_2 de meio de cadeia. Já a banda observada em 870 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico dos modos P-O-P do meio da cadeia. Esse resultado sugere que houve a precipitação (formação) de coacervatos de PFCa entremeados à rede polimérica do gel de Alginato.

Figura 36 – Espectros vibracionais no infravermelho do Alginato de Sódio (a) e do composto seco com composição Alginato (4%) + Polifosfato (8%) + Cálcio (1%). A presença dos principais grupos funcionais encontra-se assinalada.

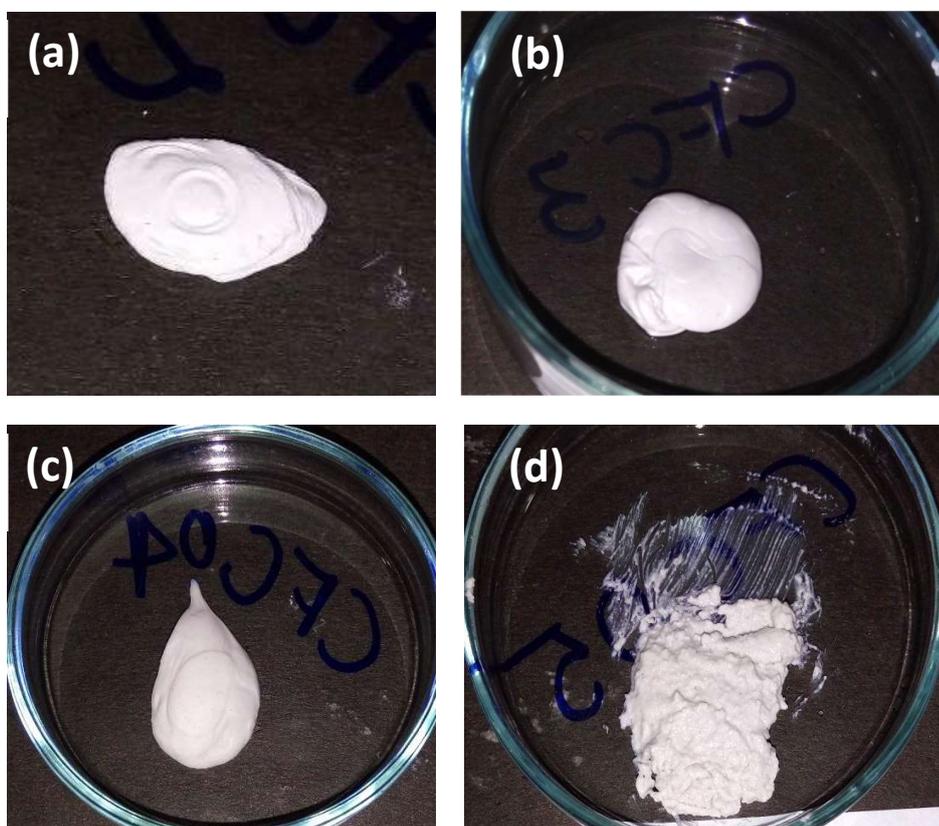


Fonte: Próprio autor.

4.3.3.2 Estudo preliminar de formulações de cimento ósseo injetável contendo cerâmica de polifosfato de cálcio

Os cimentos inicialmente preparados neste estudo utilizaram o cloreto de cálcio para a indução do *cross linking* do alginato. De fato, observou-se quase que instantaneamente, o enrijecimento das pastas, levando a um material rígido, porém flexível, com consistência semelhante à borracha (Figuras 37 a-c). A pasta preparada com um maior percentual de matéria sólida apresentou uma consistência mais rígida, porém, com aspecto visual menos uniforme (maior granulosidade) (Figura 37 d). Perez e col. (2012) demonstraram que a adição de géis de polissacarídeos, como o alginato, a materiais cerâmicos, tem a função primária de gerar macroporos na estrutura de cimentos a base de fosfato de cálcio, após endurecer. Além disso, espera-se que a adição de polímeros solúveis na fase líquida promovam a coesão e injetabilidade, devido a um aumento da viscosidade da pasta, que impede penetração do fluido circundante (PEREZ et al., 2012).

Figura 37 – Aspecto visual de diferentes composições de cimento ósseo: (a) contendo ZnO e CaCl₂ (amostra 1 – Tabela 5); (b) Cimento ósseo contendo CaCO₃ sem CaCl₂ (amostra 6) ; (c) Cimento ósseo contendo CaCO₃ e CaCl₂ (amostra 7); (d) CaCO₃ com maior percentual de fase sólida (Amostra 5).

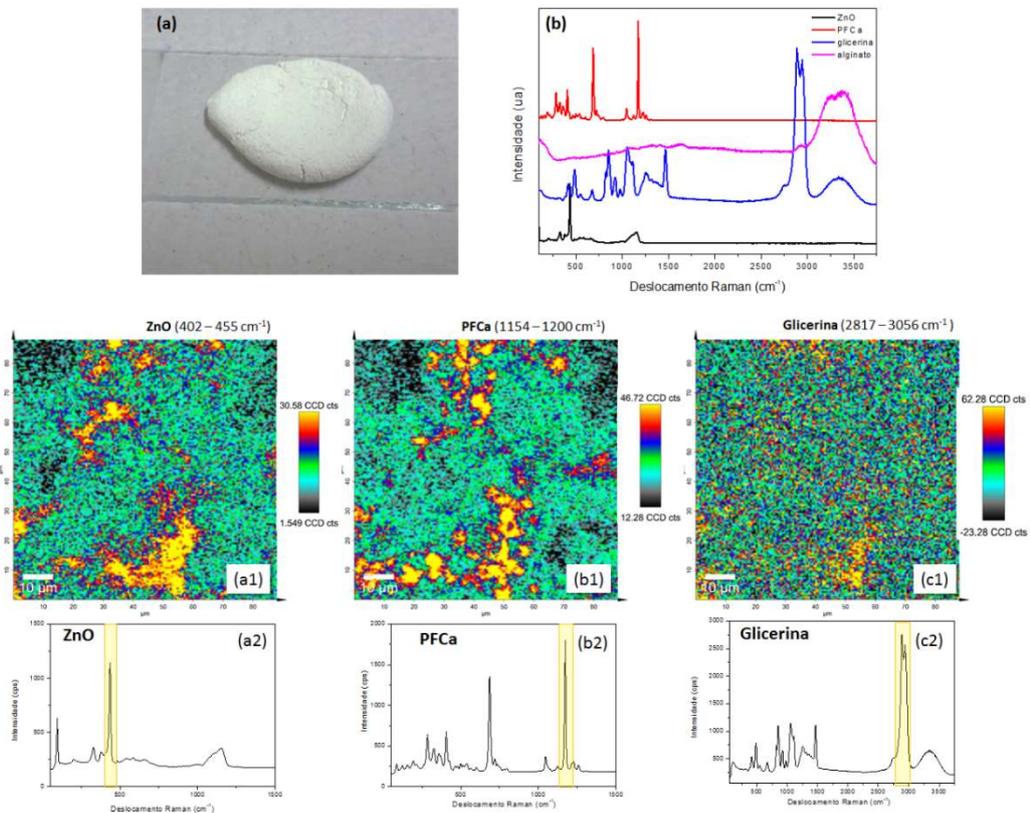


Fonte: Próprio autor.

Estudos descritos na literatura realizaram a incorporação de alginato de sódio em cimentos a base de fosfato de cálcio. Ishikawa e col. demonstraram (1997), que quando o fosfato dicálcio anidro (DCPA - monetita) + fosfato tetracálcio (TTCP) são usados como fase sólida de cimento ósseo, a incorporação de alginato aumenta o tempo de endurecimento e esse aumento depende da concentração. Resultados semelhantes foram encontrados para cimentos compostos por fosfato monocálcio monohidratado (MCPM) + CaCO_3 combinados com alginato (CHEN et al., 2011). Entretanto, o aumento nos tempos de endurecimento só foi observado quando a quantidade de alginato de sódio adicionada foi acima de 2% em massa. (ISHIKAWA, 1995).

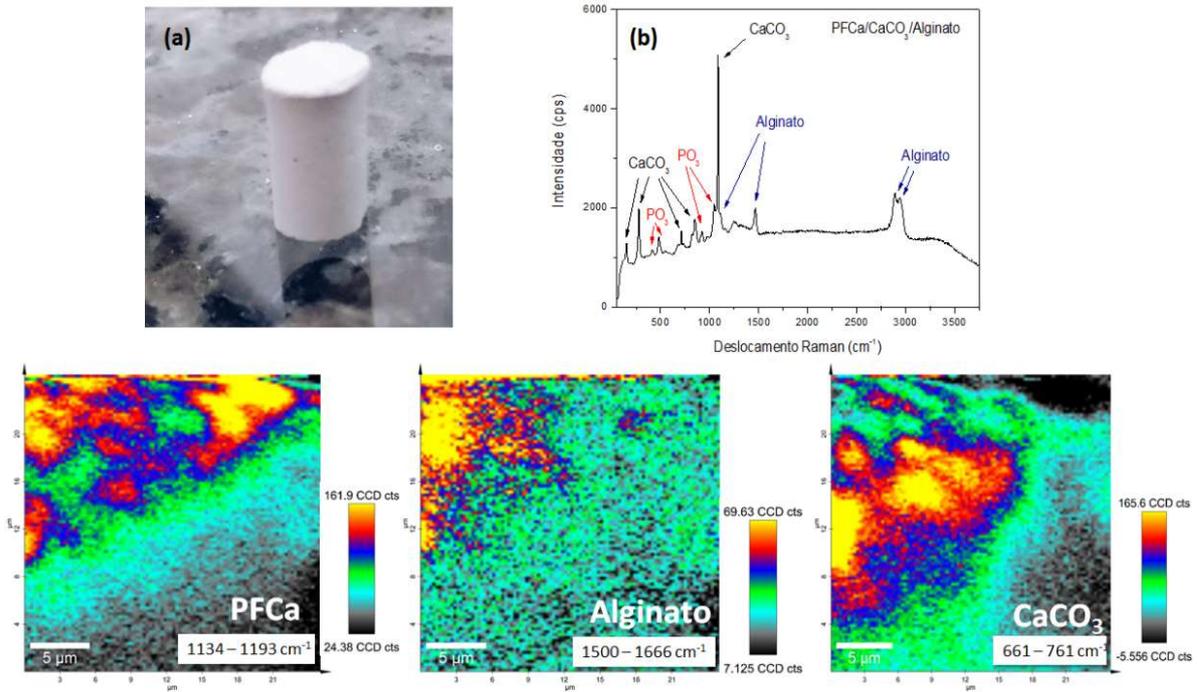
A composição de cimento ósseo utilizando os componentes ou ZnO ou CaCO_3 na fase sólida (na Tabela 5, os cimentos 4 e 6, respectivamente) resultaram em amostras com aspecto macroscópico homogêneo. A microscopia Raman foi utilizada para investigar a dispersão de compostos no corpo do cimento seco e para tanto os espectros individuais dos componentes foram analisados e utilizados para gerar as imagens observadas nas Figuras 38 (cimento 4) e 39 (cimento 6).

Figura 38 – (a) Imagem do cimento 4. (b) espectro Raman dos componentes mais abundantes no cimento 2 e imagens da distribuição dos componentes ZnO, PFCa e glicerol do cimento 4 obtidas por microscopia confocal Raman numa secção transversal com área $25 \times 25 \mu\text{m}^2$.



Fonte: próprio autor.

Figura 39 – (a) Corpo de prova preparado com o cimento 6. (b) Espectro Raman do cimento 6 e a representação dos componentes mais abundantes e as imagens da distribuição dos componentes CaCO_3 , PFCa e Alginato no cimento, obtidas por microscopia confocal Raman numa secção transversal com área $25 \times 25 \mu\text{m}^2$.



Fonte: próprio autor

O conjunto de imagens obtidos por microscopia confocal Raman permite inferir que, com excessão da glicerina, todos os demais componentes não apresentaram distribuição uniforme nas amostras. É possível observar “ilhas” mais concentradas nos mapas de intensidade. Sugere-se que a mistura manual dos componentes dos cimentos não permite uma dispersão uniforme entre a fase sólida e a fase gel. No entanto, apesar de não ter sido avaliada, acredita-se que a porosidade advinda desta heterogeneidade represente um fator favorável para o crescimento celular no desenvolvimento do osso, visto que facilitaria a permeação de fluidos fisiológicos e circulação de fatores de crescimento e quimiotáticos, além de permitir uma melhor adesão celular.

A avaliação de como a distribuição dos componentes na mistura e o grau de coesão do material interferiram sobre a injetabilidade do cimento ósseo foi realizada pelo Planejamento experimental fatorial 2^3 .

4.3.3.3 Estudo da injetabilidade de cimentos ósseos injetáveis utilizando planejamento fatorial 2³

Na Tabela 9 pode-se observar os efeitos dos componentes estudados no planejamento fatorial, bem como suas interações. Os valores exibidos dizem respeito à contribuição para o aumento da injetabilidade (valores de efeitos positivos) ou para a diminuição da injetabilidade (valores negativos). Os valores de efeito em negrito referem-se aos fatores ou interações que se apresentaram estatisticamente significativos em intervalo de confiança de 95%.

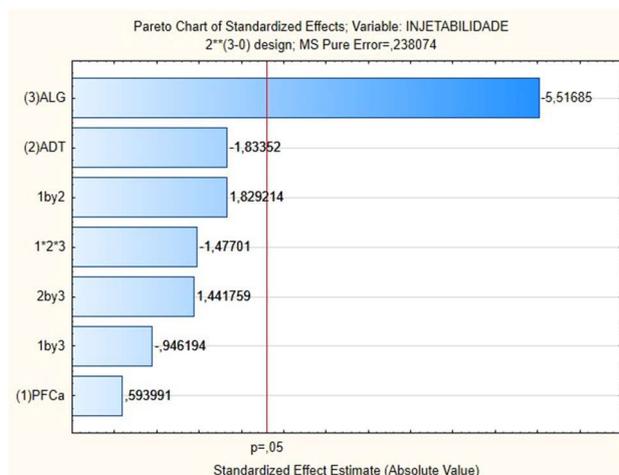
Tabela 9 - Efeitos observados dos fatores e suas interações.

FATORES E INTERAÇÕES	EFEITO	ERRO PURO	P
Média	0,72074	0,121982	0,000358
(1) cerâmica	0,14491	0,243964	0,568930
(2) adjuvante	-0,44731	0,243964	0,104075
(3) alginato	-1,34591	0,243964	0,000562
1 x 2	0,44626	0,243964	0,104763
1 x 3	-0,23084	0,243964	0,371748
2 x 3	0,35174	0,243964	0,187347
1 x 2 x 3	-0,36034	0,243964	0,177921

Fonte: próprio autor.

Pela análise dos resultados especula-se que, em um intervalo de confiança de 95%, o fator que mais contribuiu contribuição na injetabilidade dos cimentos foi a concentração do gel de alginato. O fator exerce efeito negativo significativo sobre a variável, conforme é possível observar no gráfico de pareto dos efeitos e suas interações (Figura 40).

Figura 40 - Gráfico de pareto dos efeitos e suas interações.



Fonte: próprio autor.

Observando-se o gráfico de pareto, especula-se que o uso de CaCO_3 na formulação exerce um efeito negativo sobre os valores de injetabilidade. Formulações contendo CaCO_3 tendem a apresentar valores de injetabilidade menores do que os que contem ZnO , apesar do efeito deste fator não ser significativo em intervalo de confiança de 95%.

O conjunto de resultados do planejamento fatorial permitem sugerir que os cimentos ósseos que continham uma menor concentração de alginato em sua composição apresentaram injetabilidade satisfatória para o uso pretendido. Os adjuvantes utilizados não exerceram efeitos significativos sobre este parâmetro, deste modo, podem compor as misturas para formar cimentos com adequada injetabilidade.

4.3.4 Conclusões

Através da avaliação dos compósitos Alginato-Polifosfato-Cálcio foi possível constatar que uma maior presença de PoliP conduz a uma maior friabilidade, porém, o material se apresentou com menos água retida em seu interstício. Analisando-se as micrografias da mistura Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 40%, observou-se a presença de estruturas, que podem se tratar de coacervatos de polifosfato de cálcio que aderiram a malha do gel de alginato. Esta interpretação foi corroborada pelas análises por EDS e FT-IR. As formulações de cimento ósseo injetável contendo a biocerâmica fosfatada se apresentaram fluidas e uniformes. O teste de injetabilidade através de planejamento fatorial permitiu especular, em um intervalo de

confiança de 95%, que a concentração de alginato nas formulações foi o único efeito que se mostrou significativo, exercendo ação negativa sobre a injetabilidade, ou seja, quanto maior a concentração de alginato no cimento mais dificilmente o material pode ser injetado. Os minerais CaCO_3 e ZnO podem ser utilizados satisfatoriamente na composição dos cimentos ósseos, tendo em vista que favorecem a biocompatibilidade dos materiais. A microscopia confocal Raman demonstrou que os componentes do sistema apresentam dispersão satisfatória dos componentes nas formulações de cimento, porém com certo grau de heterogeneidade que precisa ser aperfeiçoada em estudos futuros. Conclui-se que os compósitos desenvolvidos se apresentam promissores para utilização como cimento ósseo injetável.

REFERÊNCIAS

ALVES, H. L. R. **Cimento ósseo de fosfato tricálcico: síntese e influência de aditivos na sua injetabilidade**. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2005.

BEOLCHI, R. S. **Adição de complexo vitamínico em duas biocerâmicas e seu efeito na regeneração óssea**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v. 31, p. D37-D47, 2000.

BOX, G. E., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. 1 ed., New York: John Wiley & Sons, 1978. 653 p.

CARRODEGUAS, R. G. et al. Cimentos de fosfato de cálcio. **Biotecnologia**, v. 10, p. 30-2, 1999.

CHEN, C. D. et al. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate/alginate bone cement. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 334-341, 2011.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrates Polymers**. v. 8, p. 161–182, 1988.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 194-205, 2012.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A. et al. Influence of the zinc concentration of sol–gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 27, n. 17, p. 3195-3200, 2006.

HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 4, p. 234-248, 2007.

HIROTA, M. et al. Bone responses to zirconia implants with a thin carbonate-containing hydroxyapatite coating using a molecular precursor method. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1277-1288, 2014.

ISHIKAWA, K. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. **Biomaterials**, v. 16, n. 7, p. 527-532, 1995.

ISHIKAWA, K. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: Hydroxyapatite putty containing an increased amount of sodium alginate. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 36, n. 3, p. 393-399, 1997.

JALLOT, E. et al. STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, n. 3, p. 205-210, 2005.

MORRIS, E. R.; REES, D. A. Principles of biopolymer gelation: Possible models for mucus gel structure. **British medical bulletin**, v. 34, n. 1, p. 49-53, 1978.

MÜLLER, W. E. G. et al. Enzyme-accelerated and structure-guided crystallization of calcium carbonate: Role of the carbonic anhydrase in the homologous system. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 450-462, 2014.

MÜLLER, W.E.G. et al. Amorphous Ca^{2+} polyphosphate nanoparticles regulate the ATP level in bone-like SaOS-2 cells. **J Cell Sci**, v. 128, n. 11, p. 2202-2207, 2015.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2 ed. Campinas: UNICAMP, 2002. 401 p.

PEREZ, R. A.; KIM, H.; GINEBRA, M. Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements. **Journal of tissue engineering**, v. 3, n. 1, p. 204-555, 2012.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

REIS, L. P. L. et al. **Polissacarídeos de origem marinha para aplicação em estratégias de engenharia de tecidos**. In: Valorização dos Recursos Marinhos: Biomateriais em Regeneração de Tecidos e Libertação de Fármacos, p. 107-145, 2015.

SACCHETIN, P. S. C. et al. Production by emulsion method of alginate microparticles containing inactivated *Flavobacterium columnare* for oral fish vaccination. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 263-268, 2010.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 9, p. 1254-1276, 2011.

SUN, Jinchun; TAN, Huaping. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, v. 6, n. 4, p. 1285-1309, 2013.

TAKAGI, S. et al. Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 58, n. 1, p. 36-41, 2001.

TAMM, T.; PELD, M.. Computational study of cation substitutions in apatites. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 179, n. 5, p. 1581-1587, 2006.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, Michael T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics**, v. 50, n. 2, p. 175-190, 2006.

WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2133-2151, 2003.

WISE, E. R. et al. The organic–mineral interface in bone is predominantly polysaccharide. **Chemistry of materials**, v. 19, n. 21, p. 5055-5057, 2007.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto de resultados desenvolvidos na presente Tese, descritos nas conclusões de cada seção, comprovam a versatilidade do polifosfato de sódio e demonstram o grande potencial de aplicação em dois diferentes campos de atividade nas ciências da saúde.

O artigo 1 obteve as seguintes conclusões:

- ✓ PoliP de sódio ($n = 10$) pode suprir com segurança a necessidade total de fósforo em NP.
- ✓ Aplicando-se PoliP a NP 2 – 1, percebe-se um aumento na capacidade de estabilização de Ca^{2+} até 50% maior comparado aos sistemas contendo apenas PoliP – Ca^{2+} .
- ✓ PoliP não interfere nos parâmetros normais de controle de qualidade dos concentrados de hemácias e não interfere na via de coagulação extrínseca do sangue.

O artigo 2 trouxe as seguintes conclusões:

- ✓ Foi possível obter novas cerâmicas policristalinas que podem ser utilizadas na composição de biomateriais substitutos ósseos, baseadas em fosfato de cálcio, com Ca/P entre 0,5 e 1,0.
- ✓ O conjunto de resultados de avaliação estrutural (DRX e espectroscopia vibracionais) mostra um aumento do grau de cristalinidade com o aumento da temperatura de calcinação;
- ✓ Os materiais cerâmicos produzidos a partir do CaNO_3 apresentaram valores médios de área superficial cerca de 2,5 x menores do que observadas em cerâmicas obtidas com CaCl_2 ;
- ✓ Observadas por MEV, as cerâmicas que utilizaram CaCl_2 como precursor e foram calcinadas a 300°C e 500°C apresentaram cristais de fosfato de cálcio em formato de pétalas na superfície dos grãos, o que pode indicar o início de uma mudança estrutural na composição do material.

O artigo 3 chegou as seguintes conclusões:

- ✓ Através da avaliação dos compósitos Alginato-Polifosfato-Cálcio foi possível constatar que uma maior presença de PoliP facilita a fragmentação do material;
- ✓ Analisando-se as micrografias da mistura Alginato 2% + PoliP 2% + Ca^{2+} 40%, observou-se a presença de estruturas, que podem se tratar de coacervatos de polifosfato de cálcio que aderiram a malha do gel de alginato;
- ✓ O teste de injetabilidade através de planejamento fatorial permitiu especular, em um intervalo de confiança de 95%, que a concentração de alginato nas formulações foi o

único efeito que se mostrou significativo, exercendo ação negativa sobre a injetabilidade;

- ✓ A microscopia confocal Raman demonstrou que os componentes do sistema apresentam dispersão satisfatória dos componentes nas formulações de cimento, porém com certo grau de heterogeneidade que precisa ser aperfeiçoada em estudos futuros;
- ✓ Conclui-se que os compósitos desenvolvidos se apresentam promissores para utilização como cimento ósseo injetável.

Como perspectivas de continuidade dos estudos aqui apresentados, recomenda-se a realização de análises mais detalhadas para confirmação do uso de polifosfato de sódio em nutrição parenteral e aplicação como precursor de cerâmicas de fosfato de cálcio para cimentos ósseos injetáveis. As sugestões são:

- ✓ Determinação das concentrações de fósforo total, sódio e impurezas do polifosfato de sódio através da técnica de espectroscopia de absorção atômica ou de outras técnicas analíticas validadas;
- ✓ A estabilidade das soluções de polifosfato de sódio a longo prazo, de acordo com a RE Nº 01/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
- ✓ Desenvolvimento de estudos toxicológicos (DL₅₀, toxicidade aguda, sub-crônica e crônica) do polifosfato de sódio para a via de administração endovenosa;
- ✓ Teste de biocompatibilidade do cimento ósseo injetável através de observação de crescimento de tapete celular para se determinar a citotoxicidade do material.
- ✓ Novos experimentos simulando as condições reais de preparo da NP adaptando o PoliP como fonte de fósforo nas formulações. Inclusive, adicionando-se emulsão lipídica às preparações;
- ✓ Avaliação dos cimentos ósseos injetáveis pelos testes físico-químicos: (i) tempo de enrijecimento, através do metodologia de agulhas de Gilmore; (ii) testes de viscosidades, por meio de viscosímetro de *Brookfield*; (iii) Testes mecânicos de resistência a compressão e flexão.

REFERÊNCIAS

- BHARGAVA, H. N.; SRIVASTAVA, D. C.; VARMA, B. K. Molecular-weight distribution in Graham's salt: Dependence on conditions of formation. **Colloid and Polymer Science**, v. 252, n. 1, p. 20-25, 1974.
- BROW, R. K. Review: The structure of simple phosphate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 263 – 264, p. 1 - 28, 2000.
- CASTRO, E. G. et al. Novel flexible, freestanding and transparent organic/inorganic hybrid materials formed between polyaniline and polyphosphate gel. **Synthetic Metals**, v. 146, p. 57 – 62, 2004.
- CINI, N.; BALL, V. Polyphosphates as inorganic polyelectrolytes interacting with oppositely charged ions, polymers and deposited on surfaces: fundamentals and applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 209, p. 84-97, 2014.
- CHEN, K.Y. Study of polyphosphate metabolism in intact cells by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Prog. Mol. Subcell. Biol.**, n. 23, p. 253 – 273, 1999.
- CORBRIDGE, D. E. C. et al. **Phosphorus. An outline of its chemistry, biochemistry, and technology**. Elsevier Scientific Co., 1980.
- DE JAGER, H.; HEYNS, A.M. Study of the hydrolysis of sodium polyphosphate in water using Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, 1998, **52**, 808-814.
- DENNY, B.; WEST, P.; PANIGRAHI, D. Effects of permeabilizers on antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter* spp. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 36, n. 1, p. 72-76, 2003.
- DION, A. et al. Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7276-7285, 2015.
- DRIESSENS, F. C. M. et al. **Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements**. In: *Anales de química*. Springer, 1997.
- DYMSZA, H. A.; REUSSNER JR, G.; THIESSEN JR, R. Effect of normal and high intakes of orthophosphate and metaphosphate in rats. **The Journal of nutrition**, v. 69, n. 4, p. 419-428, 1959.
- GALEMBECK, A. et al. Lanthanide cryptates entrapment in aluminum polyphosphate gels. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 374, n. 1, p. 262-274, 2002.

GOSELIN, H.E. The hydrolysis and excretion of polymeric phosphate. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 180 - 192, 1952.

GOWARIKER, Vasant et al. **The fertilizer encyclopedia**. John Wiley & Sons, 2009.

GREENFIELD, S., CLIFT, M. **Analytical Chemistry of the Condensed Phosphates. International Series in Analytical Chemistry**. v. 57. New York: Pergamon Press, 1974. 155p.

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. **Chemistry of Elements**. 2ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998. 1376p.

HERNANDEZ-RUIZ, Laura et al. Inorganic polyphosphate and specific induction of apoptosis in human plasma cells. **Haematologica**, v. 91, n. 9, p. 1180-1186, 2006.

HODGE, H. C. Toxicity studies on phosphates. **Food and cosmetics toxicology**, v. 2, p. 147-154, 1964.

HONG et al., 2003. **Pharmaceutical composition or health food having antioxidizing activity comprising polyphosphate as an effective ingredient**. Patent WO Application 2004/110462A1, 2004.

HOURANT, P. General properties of the alkaline phosphates: Major food and technical applications. Proceedings of IMPHOS, Phosphorus Research Bulletin, **The Journal of Inorganic Phosphorous Chemistry**, v. 15, n.esp., p. 85 – 94, 2004.

JOVINO, C. N. **Estudo do Potencial Zeta e da Elasticidade de Eritrócitos utilizando Pinças Ópticas e Avaliação da Ação Conservante do Polifosfato de Sódio sobre Eritrócitos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Recife, 2011.

KAMEDA, Atsushi et al. A novel ATP regeneration system using polyphosphate-AMP phosphotransferase and polyphosphate kinase. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 91, n. 6, p. 557-563, 2001.

KAWAZOE, Y. et al. Induction of calcification in MC3T3-E1 cells by inorganic polyphosphate. **Journal of dental research**, v. 83, n. 8, p. 613-618, 2004.

KIM, H.; LEE, H. Y. Polyphosphate for use in promoting wound healing and scar abatement. **Patent US 2001/0043951A1**, 2001.

KULAEV, I. S., VAGABOV, V. M., KULAKOVSKAYA, T. V. **The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates**. New York: John Wiley & Sons, 2004. 277p.

KULAKOVSKAYA, Tatyana V.; VAGABOV, Vladimir M.; KULAEV, Igor S. Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine: modern state and outlook. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-10, 2012.

KUMBLE, Krishnanand D.; KORNBERG, Arthur. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 11, p. 5818-5822, 1995.

LANIGAN, R. S. Final Report on the safety assessment of sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, and sodium hexametaphosphate. **International Journal of Toxicology**, n. 20, supl. 3, p. 75 – 89, 2001.

LEYHAUSEN, G. et al. Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 5, p. 803-812, 1998.

LIMA, E. C. O.; GALEMBECK, F. Thermoreversible Gel Formation from Aqueous Aluminum Polyphosphate Solutions, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 2, p. 309 – 315, set. 1994.

LIU, J. et al. Hyperbranched polyphosphates for drug delivery application: design, synthesis, and in vitro evaluation. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 6, p. 1564-1570, 2010.

LORENZ, B. et al. Anti-HIV-1 activity of inorganic polyphosphates. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 14, n. 2, p. 110-118, 1997.

LOW, K. L. et al. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 94, n. 1, p. 273-286, 2010.

MASSON, N. C.; DE SOUZA, E. F.; GALEMBECK, F. Calcium and iron (III) polyphosphate gel formation and aging. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 121, n. 2-3, p. 247-255, 1997.

MCCULLOUGH, J. F.; WAZER, J. R. V.; GRIFFITH, E.J. Structure and properties of the condensed phosphates. XI. Hydrolytic degradation of Graham's salt. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 18, p. 4528 – 4533, 1956.

MENDES, L. G. et al. Ionic transport in aluminum polyphosphate hydrogels. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 281, n. 1, p. 99–104, 2006.

MICHELMORE, A. et al. The interaction of linear polyphosphates with titanium dioxide surfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 2, n. 13, p. 2985-2992, 2000.

MOMENI, A.; FILIAGGI, M. J. Comprehensive study of the chelation and coacervation of alkaline earth metals in the presence of sodium polyphosphate solution. **Langmuir**, v. 30, n. 18, p. 5256-5266, 2014.

NERO, J. D. et al. Dye incorporation in polyphosphate gels: Synthesis and theoretical calculations. **Material Research**, v. 6, n. 3, p. 335 -340, 2003.

OMELON, S. et al. Control of vertebrate skeletal mineralization by polyphosphates. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5634, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Normas de identidade y de pureza para los aditivos alimentarios y evaluación de su toxicidad: Emulsificantes, estabilizadores, blanqueantes y maduradores.** Sétimo Informe do Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares. Série de informes técnicos, n. 281. Genebra, 1964.

OSORIO, V. K. L.; OLIVEIRA, W. de. Polifosfatos em detergentes em pó comerciais. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 700-708, 2001.

PALAVIT, G.; MONTAGNE, L.; DELAVAL, R. Preparation of zinc-sodium phosphate glass precursors by coacervation. **Journal of Non-Crystalline Solids**, n. 189, p. 277 – 282, 1995.

PARKS, J. R.; VAN WAZER, J. R., Structure and properties of the condensed phosphates. XII. Reorganization theory and some applications. **Journal of American Chemical Society**, v. 79, p. 4890-4897, 1957.

PAVLOV, E. et al. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M109. 013011, 2010.

PEREIRA, J. C. B. **Estudo físico-químico do polifosfato de sódio visando sua aplicação em formulações para nutrição parenteral.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Recife, 2007.

PEREIRA, J. C. B. et al. Short chain polyphosphates as a strategic colloidal source of phosphate for parenteral admixtures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.558, p. 242 - 249, 2018.

PILLIAR, R. M. et al. Calcium polyphosphate particulates for bone void filler applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 4, p. 874-884, 2017.

RAO, N. N.; GÓMEZ-GARCÍA, M. R.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 605-647, 2009.

RASHCHI, F.; FINCH, J. A. Polyphosphates: a review their chemistry and application with particular reference to mineral processing. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 10-11, p. 1019-1035, 2000.

REEDY, J. S.; KUHLMAN, J. E.; VOYTOVICH, M. Microvascular Pulmonary Emboli Secondary to Precipitated Crystals in a Patient Receiving Total Parenteral Nutrition: A Case Report and Description of the High-Resolution CT Findings. **The Cardiopulmonary and Critical Care Journal**, v. 115, p. 886 – 889, out. 2005.

ROCHA, M. N. **Estudo de revestimento de fosfato de cálcio em substratos de Titânio denso e poroso.** Dissertação (Mestrado) - Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. 144p.

ROSSETO, R.; SANTOS, C. M. A.; GALEMBECK, F. Hydrous non-crystalline phosphates: Structure, function and a new white pigment. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 8, p. 1465 - 1472, 2006.

SHANJANI, Y. et al. Solid freeform fabrication of porous calcium polyphosphate structures for bone substitute applications: in vivo studies. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 6, p. 972-980, 2013.

SHIBA, T. et al. Effect of inorganic polyphosphate on periodontal regeneration. In: **Key Engineering Materials**. Trans Tech Publications, 2004. p. 1119-1122.

SHIBA, Toshikazu et al. Modulation of mitogenic activity of fibroblast growth factors by inorganic polyphosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26788-26792, 2003.

SMITH, Stephanie A. et al. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 4, p. 903-908, 2006.

SONG, W. et al. A novel strontium-doped calcium polyphosphate/erythromycin/poly (vinyl alcohol) composite for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 98, n. 3, p. 359-371, 2011.

SONG, W. et al. The study on the degradation and mineralization mechanism of ion-doped calcium polyphosphate in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 89, n. 2, p. 430-438, 2009.

TAYLOR, M.L.; MORRIS, G.E.; SMART, R.S.C. Polyphosphate interaction with aluminium doped titania pigment particles. **Colloids Surf. A**. v. 190, p. 285–94, 2001.

VAN WAZER, J.R.; CALLIS, C.F. Metal complexing by phosphates. **Chemical Review**, v. 58, p. 1011-1046, 1958.

WANG, Qianbin et al. Degradation kinetics of calcium polyphosphate bioceramic: an experimental and theoretical study. **Materials Research**, v. 12, n. 4, p. 495-501, 2009.

WEINER, M.L. et al. Toxicological review of inorganic phosphates. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 8, p. 759 – 786, 2001.

WILLOT, G. et al. Preparation of zinc sodium polyphosphates glasses from coacervates precursors. Characterisation of the obtained glasses, and their applications. **Comptes Rendus Chimie**, v. 5, n. 12, p. 899 – 906, dez. 2002.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS

Colloids and Surfaces A 558 (2018) 242–249



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

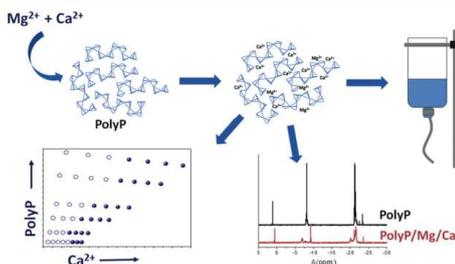
Short chain polyphosphates as a strategic colloidal source of phosphate for parenteral admixtures



J.C.B. Pereira^a, C.A. Azevedo Filho^b, V.S. de Jesus^c, J.B. de Sá^d, C.A.L. Silva^e, C.N. Jovino^f,
A. Fontes^g, B.S. Santos^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, Brazil^b Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), Caruaru, Brazil^c Laboratório Farmacêutico de Pernambuco, Recife, Brazil^d Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, Recife, Brazil^e Centro Universitário Maurício de Nassau, Caruaru, Brazil^f Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia, Recife, Brazil^g Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, Recife, Brazil

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Polyphosphate
Parenteral nutrition
³¹P NMR
Coacervates

ABSTRACT

Short chain sodium polyphosphates – (NaPO₃)₉ – PolyP – were added to 2-in-1 pediatric parenteral nutrition (PN) formulations as new alternative phosphate sources. Solutions of PolyP and Ca²⁺ in the presence of Mg²⁺, glucose, amino acids and trace elements were analyzed by electronic absorption and ³¹P NMR spectroscopies, as well as by pH measurements. Additionally, to verify the biocompatibility of short chain PolyP solutions, red blood cell (RBCs) units were evaluated by analyzing hemoglobin, hematocrit, and hemolysis. The blood clotting action of the PolyP was determined through Prothrombin time. We observed that the short chain PolyP anions did not interfere in the quality control parameters for RBCs units or in the blood extrinsic coagulation pathway. The spectral changes observed in the ³¹P NMR confirm the association of Mg²⁺ and Ca²⁺ with PolyP in the admixtures. Compatibility diagrams showed that the PolyP-Ca/Mg systems reflect a gel behavior based on the PolyP chains interaction with the incoming cations maintaining a supramolecular equilibrium until a limiting concentration. We observed that the greater the PolyP concentration, the greater the amount of Ca²⁺ that could be added to the admixture without phase separation and that the increased complexity of species (glucose, amino acid, trace elements and Mg²⁺) in the admixture favored a still higher final Ca²⁺ concentration. The overall colloidal behavior of short chain PolyPs shows that these polyanions function not only as alternative and

* Corresponding author.

E-mail addresses: beate.saegeesser@gmail.com, beate_santos@yahoo.com.br (B.S. Santos).<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.08.058>

Received 14 June 2018; Received in revised form 20 August 2018; Accepted 24 August 2018

Available online 26 August 2018

0927-7757/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

safe phosphate sources in PN formulations but also as polyanions that increase the admixture stability against phase separation by efficiently sequestering metal cations present.

1. Introduction

Parenteral nutrition (PN) is an intravenous feeding modality composed of all nutrients necessary for metabolic requirements and growth for patients unable to receive adequate enteral/oral nutrition. These formulations are commonly indicated for patients with gastrointestinal diseases/injuries (such as bowel obstruction, intestinal fistula, acute pancreatitis, stomach resection, among others) and as a perioperative treatment in malnourished patients, in shock or with severe burns, or performing radio- and chemotherapy [1]. Neonates experiencing congenital malformation of the gastrointestinal tract, respiratory distress syndrome, extreme prematurity, sepsis, malabsorption, and other pathologic conditions also require PN therapy [2]. Over the past decades, the use of PN has significantly improved the overall survival of newborns when other options of adequate nutrition support were not possible [3,4].

Nevertheless, PN formulations are one of the most complex systems administered intravenously to patients. They may contain over 40 dissolved or emulsified different species including carbohydrates, amino acids, fatty acids, electrolytes (including phosphate, calcium, magnesium, potassium, sodium, chloride, sulfate, gluconate, and trace elements such as Cr, Zn, Cu and Mn) and eventually vitamins [1,5]. While the adult formulations used for PN apply a high-fat content (as commercially oil-in-water emulsions called lipid emulsions) for the high caloric intake, the pediatric formulae incorporate this nutrient only to patients with more stable clinical condition and weight [6]. Currently, a wide variety of standard solutions for PN are commercially available today for adult patients, only a few standard admixtures are provided for infants and children. Moreover, PN formulations for preterm and neonates are prepared individually according to their specific nutritional needs and clinical state [7]. These complex intravenous formulations, kept up to 24 h in specific containers, may develop a variety of physicochemical interactions that can decrease their stability and promote a high-risk factor for the patient's health. One of the main problems observed in neonatal admixtures occurs when calcium and phosphate precipitate during preparation or infusion of the formulation [4,5,8,9] due to the low solubility product constants reported in the literature for the main species formed in pure water: $K_{sp} = 2.37 \times 10^{-7}$ for $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $K_{sp} = 2.0 \times 10^{-29}$ for $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [10,11]. There are several clinical reports describing the calcium phosphate precipitation as a cause of central venous catheter occlusion, a case of subacute interstitial pneumonitis secondary to pulmonary calcium phosphate deposition and two deaths related to pulmonary emboli containing calcium phosphate [11–13].

The calcium and phosphate compatibility in PN formulations depends on several physico-chemical factors, such as (i) calcium and phosphate relative concentration, (ii) pH, (iii) calcium and phosphate sources, (iv) magnesium concentration, (v) amino acid concentration, (vi) glucose concentration, (vii) mixing order of the substances, (viii) time period since preparation or infusion, (ix) infusion rate, (x)

temperature, and (xi) interaction with co-infused drugs [4,5]. The control of all these factors together is still a difficult task and highly decreases the safety in the daily clinical use of PN in neonatal formulations, mainly due to the high quantities required for the appropriate maintenance of newborns.

The insurance of the safe use of calcium and phosphate in PN has been compelling the search for new sources of phosphate ions. The current commercially available source of inorganic phosphate that is worldwide most used in PN is a mixture of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 referred to as potassium phosphate. In the last decades, the use of organic phosphates such as glucose-1-phosphate, glycerophosphate and fructose-1,6-diphosphate have been proposed as safer sources to use in the mixtures with calcium ions resulting in the commercially available version of glycerophosphate [4,14]. Although this source highly increased the range for safer PN admixture preparations, there is still the economical hindrance, restraining its large-scale use in public hospitals. Taking this into account, there is still a great need to improve the spectra of safe and low-cost phosphate sources. The purpose of this study is to demonstrate that PolyP [NaPO_3] $_n$ ($n = 9$) (Fig. 1) may be applied not only as a new phosphate source for PN but also to increase the physicochemical stability of PN admixtures. It has been shown that the PolyP anion interacts with metal cations such as Fe^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} and Ca^{2+} [15,16] forming unique supramolecular species, which may lead to gel formation [17,18].

Inorganic PolyP, found in all living systems (bacteria, fungi, protozoa, plants, and mammals), are responsible for numerous and varied biological functions [19]. In microorganisms, for instance, PolyP act as (i) a reservoir of energy and of phosphate anions, (ii) sequestering/chelating agent for metals (e.g. Mg^{2+} and Ca^{2+}), (iii) a buffer against alkali, and (iv) in physiologic adjustments to growth, development, stress, and deprivation [20]. Physico-chemical studies have shown that the hydrolysis of the P–O–P bond in linear PolyP liberates energy equivalent to approximately 10 kcal/mol [15], i.e. the same amount of energy liberated in the hydrolysis of the terminal phosphoric anhydride bonds in the adenosine 5'-triphosphate (ATP) molecule. Many investigators have shown that PolyP can serve as a source of phosphorus for the biosynthesis of nucleic acids and phospholipids under conditions of phosphorus starvation [21]. Several studies indicate that PolyPs can be hydrolyzed *in vivo* by enzymes with the formation of monophosphates [22,23]. Linear PolyPs were extensively hydrolyzed to orthophosphate in rats and rabbits after intravenous (IV), intraperitoneal (IP), and subcutaneous administration [23,24]. After a single IV injection of the hexametaphosphate (calcium salt) in a fasting rabbit, the serum labile P concentration increased immediately, then rapidly decreased. When sodium hexametaphosphate was given to rabbits *via* parenteral route, the increase of P in plasma concentration was slower, less pronounced, and more prolonged. Prompt and sustained increase in orthophosphate excretion by fasted rabbits was observed, as well as the relatively small amount of labile P in the urine [23].

The application of PolyP in food as antioxidants and masking agents further supports its safe use. Obeying the indicated concentration limits, the reports of the United States Food and Drug Administration (FDA), World Health Organization (WHO) and European Union (EU) consider that the use of PolyP in foods and pharmaceutical products does not offer significant risks to human health [23,24]. Thus, in view of this highly biocompatible material, we tested the interaction of short chain PolyP anions with Ca^{2+} , in the presence of several species employed in PN formulations, verifying the capability of this phosphate source in enhancing the colloidal stability of these mixtures.

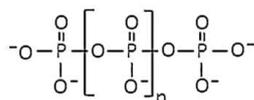


Fig. 1. PolyP anion molecular structure.

Table 1

Formulations used in the study of the compatibility of PolyP and Ca^{2+} ions in the presence of glucose, an amino acid solution (AA) and Mg^{2+} ions. A fixed amount of PolyP ($V = 6 \text{ mL}$, 20 mmol L^{-1}) was used in all experiments.

Solutions (mL)	Admixtures without Mg^{2+}				Admixtures with Mg^{2+}			
	G1	G2	A1	A2	G3	G4	A3	A4
Glu 50% (m/v)	11.0	26.2	–	–	11.0	26.2	–	–
AA 10% (m/v)	–	–	15.0	25.0	–	–	15.0	25.0
Mg 1 mEq. mL^{-1}	–	–	–	–	0.9	0.9	0.9	0.9
CaGluc 10% (m/v) [†]	0.75	0.75	0.50	0.50	0.75	0.75	0.50	0.50
Water	81.0	65.8	77.0	67.0	80.1	64.9	76.1	66.1

Glu = glucose; AA = amino acid solution; CaGluc = calcium gluconate; Mg = MgSO_4 .

[†] 0.75 aliquots of Ca^{2+} were added to the admixtures containing glucose until turbidity was observed while 0.50 aliquots of Ca^{2+} were added to the mixtures containing an amino acid solution, until turbidity was observed.

2. Experimental section

2.1. Reagents

Calcium gluconate (Halex Istar, 10% w/v); magnesium sulphate (MgSO_4 , Darrow, 2 mEq/mL); glucose solution (B. Braun, 50% m/v); amino acid solution (Aminoped[†], Fresenius-Kabi, 10% m/v); trace element ions solution (Ped-Element[†], Darrow, containing Zn^{2+} 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Cu^{2+} 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Mn^{2+} 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Cr^{3+} 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$); sterile water for injection (Fresenius-Kabi). Sodium PolyP (Aldrich, 96%); MW = 917 g mol^{-1} ; Although the general formula used for sodium polyphosphates is considered to be $\text{Na}_{(n+2)}\text{P}_n\text{O}_{(3n+1)}$, as the polyphosphate chain grows in size, the $(3n+1/n)$ value approaches 3, and the formula reaches that of the polymetaphosphates $[\text{PO}_3]_n$ [25]. This approximation also used for the cyclic metaphosphate general formula $([\text{NaPO}_3]_n)$ was applied in the present study; in our case we estimated – from ^{31}P NMR data – $n = 9$. Furthermore, also applying ^{31}P NMR analysis, we estimated that the free phosphate molar fraction in the polyphosphate freshly prepared solution was ca. 10% and all the solutions prepared thereafter contained the corrected amount of polyphosphate.

2.2. Gelation point determination of the mixtures

The determination of the gelation point (defined as the point in which the admixture had a detectable cloudiness) was performed by observing changes in the absorbance value at $\lambda = 500 \text{ nm}$ (Spectrophotometer Perkin-Elmer Lambda 6), where none of the components present absorption. Aqueous solutions with five different concentrations of sodium PolyP (concentrations in terms of $-\text{PO}_3^-$ groups in the range of 9–180 mmol L^{-1}) were prepared and a fixed volume of 5 mL was placed in a vial flask. Aliquots ($v = 10 \mu\text{L}$) of calcium gluconate (10% w/v) were added until the baseline of the spectrum showed the first sign of scattering. To observe the influence of Mg^{2+} ions in the Ca-PolyP gelation point, a fixed amount of Mg^{2+} ions was mixed with PolyP with an initial concentration of $[\text{Mg}^{2+}] = 4.46 \text{ mmol L}^{-1}$ prior to the addition of calcium gluconate aliquots. The amount of Mg^{2+} ions was defined taking into account the maximum amount of MgSO_4 recommended in neonate parenteral nutrition admixtures [2].

The influence of the other components (such as glucose, amino acids, oligoelements) on the Ca-PolyP gelation point was determined by adding them to the PolyP solutions in increasing order of complexity (Tables 1 and 2).

2.3. pH measurements

pH measurements were performed after each addition of Ca^{2+} to the solutions using a WTW 303 pHmeter (using the same formulations described in Table 1). All measurements were performed at $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Table 2

Admixtures applied in the study of the compatibility of PolyP and Ca^{2+} ions in the presence of glucose, an amino acid solution (AA), Mg^{2+} , and trace element ions. We applied a fixed amount of PolyP (6 mL, 20 mmol L^{-1}) in all the admixtures and the corresponding water volume to complete 98 mL.

Components / Volume (mL)	Admixtures								
	GA1	GA2	GA3	GA4	GA5	GA6	GA7	GA8	GA9
Glu 50% (m/v)	11.0	26.2	11.0	11.0	26.2	11.0	11.0	26.2	11.0
AA 10% (m/v)	15.0	15.0	25.0	15.0	15.0	25.0	15.0	15.0	25.0
Mg 1 mEq. mL^{-1}	–	–	–	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Trace elements	–	–	–	–	–	–	0.4	0.4	0.4
CaGluc 10% (m/v)	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Glu = glucose; AA = an amino acid solution; CaGluc = calcium gluconate; Mg = MgSO_4 .

[†] 1 mL aliquots of Ca^{2+} were added to the admixtures until turbidity was observed.

2.4. ^{31}P NMR of the calcium-PolyP mixtures

The NMR spectra were obtained using a Varian spectrometer (300 MHz, Field = 7 T). The spectra were acquired after ca. 5 min of the addition of calcium to a PolyP solution containing either one or more of the following compounds - glucose, amino acids, magnesium, and oligoelements in concentrations described in Table 3. In all the mixtures studied, freshly prepared PolyP solutions were applied. The polymerization degree of the PolyP chain was determined by using the relation described by Greenfield and Clift (1974) [26,25], represented by:

$$n = (2 \text{AQ}^2/\text{AQ}^1) + 2 \quad (1)$$

where AQ^1 and AQ^2 refer to the integrated area of the end-chain and the mid-chain phosphorus nuclei spectral signal, respectively. The sodium PolyP salt used in the present study showed a polymerization degree of $n = 9$. This value was taken into account in all the phosphorus and phosphate concentrations.

2.5. Evaluation of the PolyP on the RBC sample quality

For a blood control quality evaluation, three red blood cell (RBC) units were obtained from healthy donors at the Foundation of Hematology and Hemotherapy of Pernambuco (HEMOPE - Ethics Committee - CAEE 41109115.6.3001.5195). RBCs were collected in CPD/SAG-M (Fresenius Kabi) and, at the same day, each unit was split into two portions. One of them received a freshly prepared PolyP solution (0.4 mmol L^{-1}) while the other portion was considered as control. All manipulations were performed via sterile connecting devices, and units were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. All samples, with or without the PolyP were analyzed by the quality control service, on the 35th day of storage,

Table 3
Admixtures used in the ^{31}P NMR evaluation.

Solutions (mL)	Admixtures					
	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0	6.0
PolyP 20 mmol L $^{-1}$	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0	6.0
Glu 50% (m/v)	–	–	–	–	5.0	26.2
AA 10% (m/v)	–	–	–	–	5.0	25.0
Mg 1 mEq. mL $^{-1}$	–	0.15 ^a	–	0.045 ^c	–	0.9 ^d
Trace elements	–	–	–	–	–	0.4
CaGlu 10% (m/v)	–	–	0.42 ^b	0.42 ^b	–	2.0 ^e

Glu = glucose; AA = an amino acid solution; CaGlu = calcium gluconate; Mg = MgSO $_4$.

^a P/Mg = 12.

^b P/Ca = 9.

^c P/Mg = 40.

^d P/Mg = 2.4.

^e P/Ca = 2.35.

at HEMOPE, by evaluating hemoglobin, hematocrit, and hemolysis by the XS-1000i-Hematology-Analyzer[®] (Sysmex) and absorption spectroscopy. Reference values are hemoglobin > 45 g/unit, hematocrit 50–70% and hemolysis < 0.8%. Microbiological tests were also performed using BACT/ALERT[®] culture media (BioMérieux).

2.6. Evaluation of the PolyP on the blood coagulation

The blood clotting action of the PolyP ($n = 9$) was evaluated through Prothrombin Time (PT) in order to verify possible variations in the extrinsic coagulation pathway. This coagulation monitoring test involves the clotting cascade activation artificially induced, and measures the time elapsed until clot formation. For this, coagulation times were obtained for plasma samples, collected in sodium citrate, from four different healthy donors, incubated with PolyP solutions of increasing concentrations (0.1; 0.2; 0.4 and 1.0 mmol L $^{-1}$.) and compared to the control. Clotting time analyses were performed in an Automated Coagulometer ACL 7000[®] (Instrumentation Laboratory), with reference values 10.8 s for PT. Biotécnica[®] kits specific for PT determination were used.

3. Results and discussion

3.1. PolyP metal cations interactions in the admixtures

Since parenteral nutrition formulations are intrinsically meta-stable systems, all the possible interactions between the species must be anticipated. In this sense, it is important to understand how the PolyP anions interact with the other components especially with the Ca $^{2+}$ and Mg $^{2+}$ ions. The nature of the interaction of metal ions and the PolyP anion and the nature of their phase separation processes are not completely understood, but several assumptions have been proposed in the literature in the past decades. The formation constants for PolyP-M (where M = Ca, Fe, Mg, Al, etc) described in the literature indicate that the polyanion chains associate strongly through partially ionic and covalent bindings [16]. In the late 40s, several reports suggested that the formation of highly hydrated PolyP-M chelates would produce an aqueous dense phase within the aqueous solution acting as a colloidal liquid-liquid immiscibility. This system was called a coacervate and its formation was denominated coacervation process [27,26]. Pfanstiel and Iler preparing highly concentrated Mg $^{2+}$ polymetaphosphate mixtures suggested that this coacervate phase was composed of a tangled structure of thread-like hydrated magnesium PolyP molecules [18]. It was much later independently suggested by Masson, Souza, and Galembeck and Khokhlov and Kramarenko that the collapse of polyelectrolyte gel systems with increasing charge occur due to the increase of the ionic attraction between the charged species. This would result in the exclusion of water molecules of the coordinating layer of the

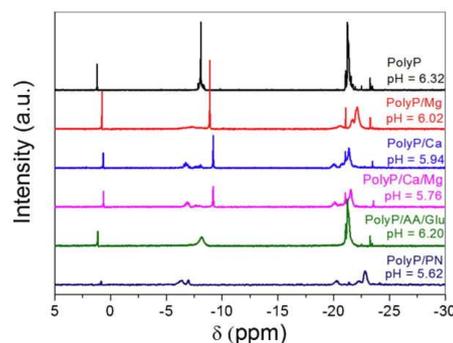


Fig. 2. ^{31}P RMN aqueous admixture of polyphosphates (PolyP) and solutions containing Mg $^{2+}$, Ca $^{2+}$, Ca $^{2+}$ /Mg $^{2+}$, glucose/amino acid solution and PolyP / PN (all the components including trace elements) were no phase separation is observed. A complete description of the amounts applied are described in Table 3.

tangled systems leading to a decrease of the electrical constant and the increase of their electrostatic potentials. The water removal would proceed until the equilibrium was reached, with the formation of aggregates, which may be described as swollen cross-linked structures with a low water content [17,28,27].

We investigated the chemical interactions of the PolyP chains with all components in the admixtures by monitoring the ^{31}P NMR changes in the phosphate nuclei and Fig. 2 presents a representative set of all the features observed in the spectra. It is well known that PolyP chains with $n > 6$ exhibit ^{31}P NMR spectra composed of essentially a set of peaks characterized by three main features [28,29]. The first one observed at approximately $\delta = 1.0$ ppm shows a singlet peak which refers to the orthophosphate species (Q^0). By analyzing the integration area of the corresponding peak we estimate the amount of 10% molar fraction of free phosphate ions in the PolyP solution we used in the present study. The second feature shows a multiplet peak around $\delta = -8.0$ ppm, which characterizes the end-chain phosphate groups (Q^1) while the third set of peaks in the $\delta = -21.0$ to -22.0 ppm range is related to the middle-chain phosphorus nuclei (Q^2). We observe all these features in the PolyP ^{31}P NMR spectrum as shown in Fig. 2. The analysis of the PolyP polymerization degree (n) by applying Eq. (1) resulted in $n = 9$. According to Kulaev et al. PolyP chains greater than $n = 5$ correspond to a mixture of condensed PolyPs with a varying chain size with, not only linear polymers, but also free orthophosphates and cyclic PolyPs. The same authors mention the presence of branched PolyPs. These are very unstable in water and suffer hydrolysis, resulting the corresponding linear chain [15]. Lima & Galembeck applied the method of Wazer & Campanella to a sodium PolyP with a polymerization number $n = 10.5$ and the fractioning procedure associated to ^{31}P NMR analysis showed that the size range of the chains varied from 2 to ca. 20 phosphate units [30,31].

Fig. 2 shows the ^{31}P NMR spectra of PolyP and the solutions containing PolyP and Mg, Ca, Mg + Ca, amino acid and glucose and the most complex admixture containing all these species including the trace element solution (see Table 3).

We observe that the presence of metallic cations leads to the broadening of some spectral features related to the middle and end-chain phosphates. This is a very characteristic spectral change that results from differences in the electronic delocalization of the P nuclei coordinated to the cations, shifting the original peak in the spectra [28,29]. Analyzing the PolyP-cation spectra we observe that the spectral shift is similar but not equivalent for PolyP-Mg $^{2+}$ and PolyP-Ca $^{2+}$. There is a more expressive spectral change (observed for Q^1 and Q^2

regions) for the admixtures containing Ca^{2+} ions. This is probably related to the greater amount of this cation (in relation to P) compared with Mg^{2+} (i.e. $\text{P}/\text{Ca} = 9$ while $\text{P}/\text{Mg} = 12$) allowing a greater number of interactions. The spectral region corresponding to the middle-group nuclei in the PolyP-cations spectra shows two broadened peaks with maxima at $\delta = -19.6$ and -21.8 ppm (for Mg^{2+}) and $\delta = -19.5$ to -22.4 (for Ca^{2+}) ppm, while for the end-group nuclei we observe a set of two broadened peaks from $\delta = -5.8$ to -8.5 ppm (for Mg^{2+}) and from $\delta = -6.1$ to -8.3 ppm (for Ca^{2+}). We may consider that the interaction of the metallic cations and the PolyP chains may occur with either one or more phosphate groups of the same polyelectrolyte chain or with phosphate groups of different PolyP chains, promoting a greater electronic delocalization and thus to a greater deshielding of the nuclei. The chemical shift observed for the admixture containing both metallic cations shows a greater resemblance to the spectrum of the PolyP- Ca^{2+} , most probably due to the greater amount of Ca^{2+} ions ($\text{Ca}/\text{Mg} = 4.4$). A more pronounced spectral modification is observed in the PolyP spectrum with the PN admixture, most probably related to the presence of trace elements (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+}) which add more possibilities of interchain interactions. In contrast, we observe that the spectrum of the PolyP - glucose and AA mixture (Fig. 2) shows no noticeable alterations when compared to the PolyP spectrum indicating, as expected, in-existent interactions between the anions and/or the glucose molecules.

The thin peak observed in -21.1 ppm is related to a small fraction of cyclic trimetaphosphate in the sample. It has been shown that cyclic metaphosphates interact sparingly with divalent metallic ions [29,30,32] but they can show pH related chemical shifts. In our study we observed that the final admixtures presented a pH in the range of

pH = 5.62 – 6.32. The orthophosphate chemical shift, in this case, can be used to monitor the pH chemical environment. For the PolyP solution and its admixture with AA and GLU the Q° signal shows the same spectral shift ($\delta = 1.1$ ppm). For all the metal containing admixtures the pH value decreases slightly (Fig. 2) and we observe a spectral shift of $\Delta\delta = 0.5 - 0.8$ ppm, more pronounced for the lower pH value.

3.2. Ca-PolyP and Ca-PolyP-Mg stability diagram

In the present study, we aimed determining the safe concentration region of PolyP anions in the presence of Ca^{2+} , but also in the $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ admixture. The data obtained from the absorption spectroscopy measurements were used to construct diagrams correlating the calcium (Ca^{2+}) and the PolyP (displayed as PO_3^-) solution concentrations in the presence or not of Mg^{2+} ions. These diagrams presented in Fig. 3(a) and (b) show the concentration region where the PolyP - Ca^{2+} species remained as homogeneous solutions and the concentration threshold where phase separation was observed at 25 °C.

The compatibility diagrams, shown in Fig. 3(a) and (b), suggest that the PolyP-Ca and PolyP-Ca-Mg systems reflect the gel behavior described previously. The PolyP chains interact with the incoming cations maintaining a supramolecular equilibrium until a limiting concentration. We observed that the greater the concentration of PolyP the greater the capability of retaining more cations in solution. On the other hand, the presence of Mg^{2+} slightly decreases the capability of Ca^{2+} retention by the coacervate system. Fig. 3(c) and (d) show how the pH varies throughout the mixtures with the increase of the Ca^{2+} concentration. Two main observations can be made. First of all the overall pH behavior observed is understood as the competing hydrolysis of

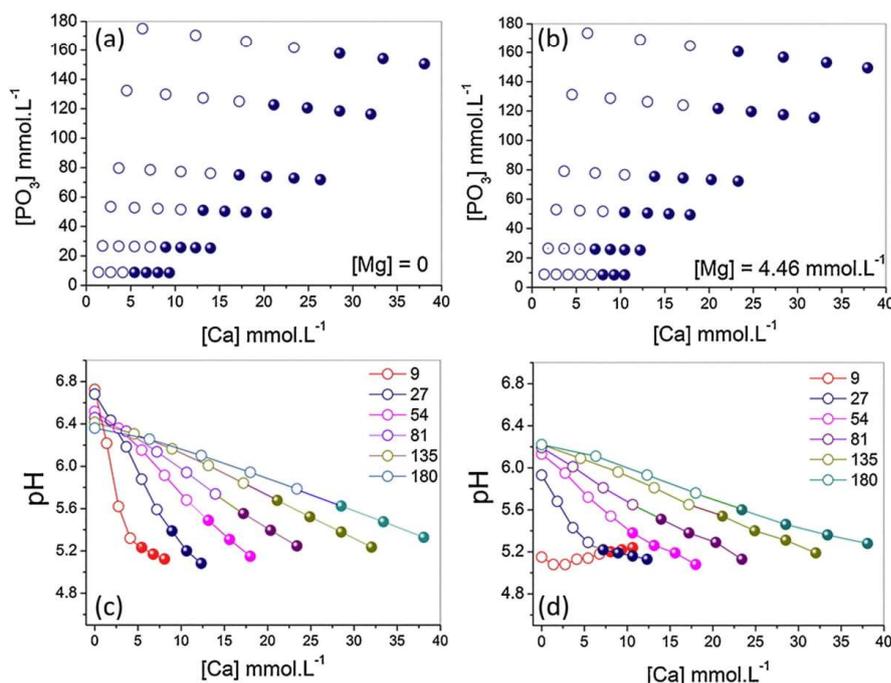


Fig. 3. Compatibility diagram of (a) PolyP and Ca^{2+} ions and (b) PolyP and Ca^{2+} in the presence of a previous amount of Mg^{2+} ions. Plots (c) and (d) refer to the corresponding pH variation of the PolyP solution ($[\text{PO}_3^-] = 9\text{--}180 \text{ mmol L}^{-1}$) with increasing Ca^{2+} solution. (O) no detectable cloudiness; (●) detectable cloudiness.

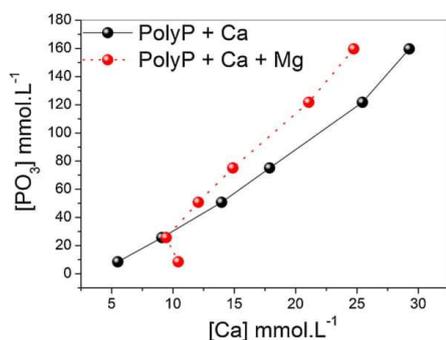


Fig. 4. Ca^{2+} and PO_3^- concentration values at the point where turbidity (named here as gel point) was first detected.

different species. Ca^{2+} and Mg^{2+} tend to decrease the pH while the gluconate anions and, in a smaller degree the PolyP anions, tend to increase the pH. The resulting effect is an overall decrease from ca. 6.8 to 5.2. In the system where Mg^{2+} was added prior to Ca^{2+} ions in the lowest PolyP concentration, the initial pH decreased down to $\text{pH} < 5.2$ demonstrating the greater hydrolytic capacity of MgSO_4 and its influence in the ionization of the polyanion chains and, consequently, a reduced probability of phase separation. At higher PolyP concentrations its buffering capability seems to predominate and the pH decrease is determined by the $[\text{Ca}^{2+}]$ increase.

An important relation obtained from these diagrams is the gel point determination, defined as the PO_3^-/Ca molar ratio at the first visual change in the optical density of the admixtures determined by absorption spectroscopy (described in the Experimental Section). Fig. 4 compares the concentrations of Ca^{2+} and $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ that represent the maximum amounts in the presence of the PolyP chains that can be added until the phase separation was observed.

The analysis of the gel point plot depicted in Fig. 4 shows two tendencies regarding the gel formation process for the mixtures containing PolyP and Ca^{2+} : (1) the greater the net concentration of PolyP in the solution, more Ca^{2+} is necessary to start the phase separation process and (2) the stabilization capability of PolyP – Ca^{2+} is slightly decreased in the presence of a certain amount of Mg^{2+} ions in the mixture. Analyzing the gel system formation of PolyP-Ca solutions containing a fixed amount of Mg^{2+} ions added previously we observe that the overall tendency of the solution to stabilize Ca^{2+} is greater for $[\text{PO}_3^-] < 27 \text{ mmol L}^{-1}$ and decreased for PolyP concentrations greater than 3 mmol L^{-1} (i.e. $[\text{PO}_3^-] = 27 \text{ mmol L}^{-1}$). This behavior is probably related to the low pH observed for this system (Fig. 3d). Moreover, an amount of Ca^{2+} greater than 2.5 times of Mg^{2+} was necessary to promote phase separation. The 1 mmol L^{-1} PolyP solution means a 1:2 molar relation of $\text{Mg}^{2+}:\text{PO}_3^-$ groups, which hypothetically represents the equivalence point of the two ionic species. The formation constant

of PolyP-Mg is reported to be greater than the PolyP-Ca complex association constant [31], so that one may speculate that the presence of Mg^{2+} favors the maintenance of calcium as free ions in solution, creating an environment of chemical competition. Explaining in terms of the coacervate colloidal systems, the PolyP-Mg macromolecules are not expected to show interchain reticulation, which may occur with the PolyP-Ca species. The Ca^{2+} ions added to this system would further associate to the available sites in the PolyP chains resulting in intermolecular bridges between the pre-formed coacervate moieties, constituting more complex structures. The increase in the electrostatic potential of this system would overcome its solvation capacity leading to phase separation. Thus, for the phase separation process to occur one has to increase the PolyP and the Ca^{2+} concentration, which is in agreement with the tendency observed in Fig. 4.

3.3. Ca-PolyP-glucose and Ca-PolyP-amino acid solution stability in the presence or not of Mg^{2+}

The effect of the addition of other main components of the 2-in-1 PN formulation in the capability of maintaining the supramolecular system of PolyP and Ca was assessed by the Ca-PolyP gel point determination of the admixtures. As the other components were added in a fixed concentration, we analyzed the gel point only for the lowest PolyP concentration (i.e. $[\text{PolyP}] = 1.2 \text{ mmol L}^{-1} \Rightarrow [\text{PO}_3^-] = 10.8 \text{ mmol L}^{-1}$). We first added the glucose solution, applying two different concentrations, with and without the presence of a fixed amount of Mg^{2+} ions. The same procedure was performed with the amino acid solution. Then, we observed the gel formation point for the admixtures containing both components with and without Mg^{2+} . Finally, trace elements were added to the admixtures and the overall tendency was observed. All the amounts of the components used in these experiments are described in Tables 1 and 2.

The gelation points observed for all the admixtures are plotted as a column chart graph in Fig. 5. To compare the gelation point behavior of the previously described PolyP with Ca^{2+} or $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$, we added these results observed in Fig. 3(a) and (b), for $[\text{PolyP}] = 1.2 \text{ mmol L}^{-1}$.

Observing the pattern of the starting point where phase separation is first observed for all the systems we point out as the main feature: the increase in the complexity of components in the admixtures enhances the overall capability of Ca^{2+} incorporation. This tendency is probably due to the greater competition among Mg^{2+} ions, AA and PolyP species that hinders the Ca-PolyP maximum interaction. In the glucose + AA + trace + Mg admixture (Fig. 5, group Glu + AA + Trace + Mg, composition GA8, for instance, we could add 53% more Ca^{2+} than the original Ca^{2+} -PolyP admixture.

The striking difference observed in the admixtures containing glucose compared to those containing glucose + Mg^{2+} may be understood when we measure the pH values of these systems. The initial pH values of the glucose/PolyP solutions lie within 6.4–6.5 while the same solutions where a fixed amount of MgSO_4 solution was initially added showed initial pH values ranging from 5.1–5.2. The addition of calcium gluconate in the mixture did not vary the pH which stabilized at

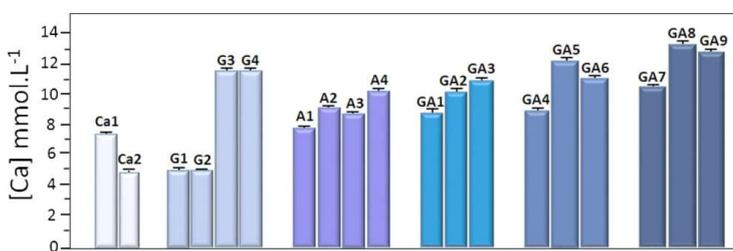


Fig. 5. Calcium concentration at the first observation of turbidity in the PolyP solution (1.2 mmol L^{-1}). Ca1 and Ca2 represent systems where only PolyP is present. G1 and G2 contain glucose, while G3 and G4 contain glucose and MgSO_4 . A1 and A2 contain amino acid solution, while A3 and A4 also contain MgSO_4 solution; GA1, GA2 and GA3 contain glucose, amino acid; GA4, GA5 and GA6 contain glucose, amino acid and MgSO_4 solution, while GA7, GA8 and GA9 contain glucose, amino acid, MgSO_4 and trace element solution. The amounts are described in Tables 1 and 2.

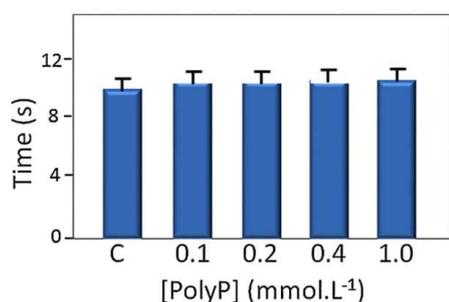


Fig. 6. Prothrombin time values for blood at various concentrations of PolyP. C = Control.

pH = 5.1. On the other hand, the different initial glucose concentrations did not show any influence on the pH values. For the amino acid solutions, we observed a pH range 6.0–6.2, which is almost the AA original pH value (pH 5.7–6.3). The buffering capability of the amphoteric amino acids is already known to act in the stabilization of PN formulations. In fact, the addition of Mg^{2+} in the mixtures containing AA + PolyP showed only a slight decrease (pH 5.7–5.9). It is worthwhile to mention that the gel points of all the amino acid and glucose mixtures, with or without Mg^{2+} occurred at a pH range 5.1–5.7.

The increase in the capability of Ca^{2+} incorporation maintaining a stable colloidal system is attributed to the PolyP chains. We suggest that this results from the PolyP-Ca massive reticulation promoted by the dislocation of OH^- ions bound to Ca^{2+} and Mg^{2+} by the excess H^+ ions leading to the instability of the coacervate systems. As described by Masson and colls., studies on the interactions of Fe^{3+} and Ca^{2+} ions with PolyP chains suggested that the hydration degree of the swollen structures also play a fundamental role in the phase separation mechanism; the greater capability of hydration by the ions, the smaller interfacial tension and the greater stability towards phase separation. The same authors stated that the water removal due to the metal-PolyP anions interaction is a continuum process which occurs until the equilibrium is reached, with the formation of swollen cross-linked structures with low water content aggregates, leading to phase separation [17].

3.4. Evaluation of the PolyP on the RBC sample quality and blood coagulation

The quality control tests showed acceptable results considering the parameters established by blood banks [32,34]. The presence of PolyP, determined on day 35 of storage, did not significantly modify the total amount of free hemoglobin levels, the hematocrit, and the hemolysis. Mean values for hemoglobin, hematocrit, and hemolysis were (51.8 ± 0.3) g/unit, (59.2 ± 0.6)% and (0.6 ± 0.02)%, respectively. Microbiological tests were also negative for all units.

The Prothrombin Time (PT) test results (Fig. 6) showed that the presence of PolyP ($n = 9$) did not interfere in the extrinsic coagulation pathway of human blood ($p > 0.4$). Results for control samples were in accordance to the reference value. It has been shown that PolyP anions modulate blood coagulation [35,33]. One of the accepted hypotheses suggests that these polyanions interfere directly on thrombin action through electrostatic interaction [36,33]. The greater the size of the PolyP chain, the higher the coagulation rate is observed. Smith and coll. (2010) showed that polymers with $n \geq 500$, such as those excreted by microorganisms, were effective in the optimal activation of the contact pathway, while polymers $\sim n = 100$, were sufficient to accelerate factor V activation and hinder the anticoagulant function of the tissue factor pathway inhibitor [37,34]. The present results show that the

short chain PolyPs used in the study were not able to trigger the coagulant activity.

4. Conclusion

The purpose of this study was to demonstrate the physico-chemical stability of PN pediatric admixtures using short PolyP chains $[NaPO_3]_n$, where $n = 9$, as the phosphate sources. We observed that these PolyP anions did not interfere in the normal quality control parameters of RBCs units and did not interfere in the blood extrinsic coagulation pathway. Applying PolyP to 2-in-1 pediatric PN admixtures we were able to increase the amount of Ca^{2+} ions by a factor of 50% compared to the PolyP – Ca^{2+} systems and this behavior is attributed to the interchain supramolecular interactions of the PolyP anions and the cationic metallic ions. One of the greatest advantages observed for the substitution of phosphate by PolyP as P source is that the greater the concentration of PolyP the greater the capability of retaining more cations in solution without phase separation, enabling a more flexible, low cost and safe option for pediatric PN admixtures.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. André Galembeck and Msc. Demóstenes Marques Cavalcanti da Silva for the helpful discussions and to Prof. Ricardo Oliveira for the ^{31}P NMR measurements. We acknowledge the financial agencies PROPESQ/UFPE, FACEPE and CAPES.

References

- [1] M. Stawny, R. Olijarczyk, E. Jaroszkiwicz, A. Jelińska, Pharmaceutical point of view on parenteral nutrition, *Sci. World J.* 2013 (2013), <https://doi.org/10.1155/2013/415310> Article ID 415310.
- [2] E. Brine, J.A. Ernst, Total parenteral nutrition for premature infant, *Newborn and Infant Nursing Reviews* 4.3, (2004), pp. 133–155.
- [3] M.H. DeLorge, Parenteral nutrition therapy over the next 5–10 years: where are we heading? *J. Parenter. Enter. Nutr.* 36 (Suppl. (2)) (2012) 56S–61S.
- [4] L. Pereira-da-Silva, I. Macedo, M.L. Rosa, K.M. Bridges, Calcium and phosphorus intake by parenteral nutrition in preterm infants, *Diet Nutr. Crit. Care* (2014) 1–14.
- [5] D. Zenoni, S. Loiacono, Experience of compounding total parenteral nutrition admixtures for preterm infants in a hospital pharmacy: evidence of calcium and phosphate compatibility problem, *Eur. J. Hosp. Pharm.* (2017).
- [6] A.B. Blackmer, M.L. Partipilo, Three-in-one parenteral nutrition in neonates and pediatric patients: risks and benefits, *Nutr. Clin. Pract.* 30 (3) (2015) 337–343.
- [7] P. Ayers, J. Boullata, G. Sacks, Parenteral Nutrition Safety: the story continues, *Nutr. Clin. Pract.* 33 (1) (2018) 46–52.
- [8] T. Gonyon, P.W. Carter, G. Phillips, H. Owen, D. Patel, P. Kotha, J.B.D. Green, Probability-based compatibility curves for calcium and phosphates in parenteral nutrition formulations, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 38 (6) (2014) 717–727.
- [9] R.K. Huston, J.M. Christensen, S.M. Alshahrani, S.M. Mohamed, C.F. Heisel, Calcium chloride and calcium gluconate in neonatal parenteral nutrition solutions without cysteine: compatibility studies using laser light obscuration methodology, *Nutrients* 10 (2) (2018) 208.
- [10] J.A. Dean, *Lange's Handbook of Chemistry*, 1st ed., McGraw-Hill, New York, 1973.
- [11] American Society Of Parenteral And Enteral Nutrition (ASPEN), Safe practices for parenteral nutrition formulations, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 22 (1998) 49–66.
- [12] C.M. Dollery, Pulmonary embolism in parenteral nutrition, *Arch. Dis. Child.* 74 (2) (1996) 95.
- [13] S.E. Hill, L.S. Heldman, E.D. Goo, P.E. Whippo, J.C. Perkinson, Fatal microvascular pulmonary emboli from precipitation of a total nutrient admixture solution, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 20 (1) (1996) 81–87.
- [14] Collin Anderson, Mark MacKay, Physical compatibility of calcium chloride and sodium glycerophosphate in pediatric parenteral nutrition solutions, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 40 (8) (2016) 1166–1169.
- [15] I.S. Kulaev, V. Vagabov, T. Kulakovskaya, *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*, John Wiley & Sons, 2005.
- [16] J.R. Van Wazer, C.F. Callis, Metal complexing by phosphates, *Chemical Reviews* 58 (6) (1958) 1011–1046.
- [17] N.C. Masson, E.F. de Souza, F. Galembeck, Calcium and iron (III) polyphosphate gel formation and aging, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 121 (2–3) (1997) 247–255.
- [18] R. Pfanstiel, R.K. Iler, Magnesium Polymetaphosphate, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (21) (1956) 5510–5511.
- [19] A. Kornberg, N.N. Rao, D. Ault-Riche, Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1) (1999) 89–125.
- [20] I. Kulaev, T. Kulakovskaya, Polyphosphate and phosphate pump, *Ann. Rev. Microbiol.* 54 (1) (2000) 709–734.
- [21] F.M. Harold, Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and

- function, *Bacteriol. Rev.* 30 (4) (1966) 772.
- [22] H.E. Gosselin, A. Rothstein, G.J. Miller, H.L. Berke, The hydrolysis and excretion of polymeric phosphate, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 106 (2) (1952) 180–192.
- [23] R.S. Lanigan, Final report on the safety assessment of Sodium Metaphosphate, Sodium Trimetaphosphate, and Sodium Hexametaphosphate, *Int. J. Toxicol.* 20 (2001) 75–89.
- [24] M. Weiner, W.F. Salminen, P.R. Larson, R.A. Barter, J.L. Kranetz, G.S. Simon, Toxicological review of inorganic phosphates, *Food Chem. Toxicol.* 39 (8) (2001) 759–786.
- [25] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of Elements*, 1st ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 1998.
- [26] S. Greenfield, M. Clift, *Analytical Chemistry of the condensed phosphates*, International Series in Analytical Chemistry, 57, Pergamon Press, New York, 1974.
- [27] D.M. Pickup, R.J. Newport, E.R. Barney, J.Y. Kim, S.P. Valappil, J.C. Knowles, Characterisation of phosphate cocervates for potential biomedical applications, *J. Biomater. Appl.* 28 (8) (2014) 1226–1234.
- [28] A.R. Khokhlov, E.Y. Kramarenko, Weakly charged polyelectrolytes: collapse induced by extra ionization, *Macromolecules* 29 (2) (1996) 681–685.
- [29] T. Glonek, A.J.R. Costello, T.C. Myers, J.R. Van Wazer, Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies on condensed phosphates. III. Polyphosphate spectra, *J. Phys. Chem.* 79 (12) (1975) 1214–1218.
- [30] E.C.D.O. Lima, F. Galembeck, Thermoreversible gel formation from aqueous aluminum polyphosphate, *J. Coll. Interface Sci.* 166 (2) (1994) 09–315.
- [31] J.R.V. Wazer, D.A. Campanella, Structure and properties of the condensed phosphates. IV. Complex ion formation in polyphosphate solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (2) (1950) 655–663.
- [32] A.J.R. Costello, T. Glonek, T.C. Myers, J.R. Van Wazer, Structure and properties of the condensed phosphates. XVIII. Ring-chain and other equilibria in organic solvents, *Inorg. Chem.* 13 (5) (1974) 1225–1230.
- [33] E.C.O. Lima, J.M.N. Neto, F.Y. Fujiwara, F. Galembeck, Aluminum polyphosphate thermoreversible gels: a study by ^{31}P and ^{27}Al NMR spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 176 (2) (1995) 388–396.
- [34] European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components, Recommendation No. R (95) 15, Council of Europe, 2015.
- [35] S.A. Smith, N.J. Mutch, D. Baskar, P. Rohloff, R. Docampo, J.H. Morrissey, Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (4) (2006) 903–908.
- [36] N.J. Mutch, T. Myles, L.L.K. Leung, J.H. Morrissey, Polyphosphate binds with high affinity to exosite II of thrombin, *J. Thromb. Haemost.* 8 (3) (2010) 548–555.
- [37] S.A. Smith, S.H. Choi, R. Davis-Harrison, J. Huyck, J. Boettcher, C.M. Rienstra, J.H. Morrissey, Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size, *Blood* 116 (20) (2010) 4353–4359.