



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Pós-graduação em Processos Interativos
dos Órgãos e Sistemas**

GUILLERMO ALBERTO LÓPEZ

**QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE ESTRÔNCIO E
ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA, EM ÓRGÃOS DE RATO,
DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ENTERAL DE
FÁRMACOS PARA A REGENERAÇÃO ÓSSEA**

SALVADOR

2018

GUILLERMO ALBERTO LÓPEZ

**QUANTIFICAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE ESTRÔNCIO E
ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA, EM ÓRGÃOS DE RATO,
DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ENTERAL DE
FÁRMACOS PARA A REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Professora Dra. Fabiana Paim Rosa

Coorientadora: Professora Dra. Rita Nano

Salvador

2018

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

López, Guillermo Alberto

Quantificação da deposição de estrôncio e análise histomorfológica, do efeito da administração enteral de fármacos para a regeneração óssea em ratos ./ [Manuscrito]. Guillermo Alberto López. Salvador, 2018.

119f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita Maria Weste Nano.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2018.

1. Biomateriais. 2. Estrôncio. 3. Toxicidade 4. Histologia. 5. Espectometria.

I. Rosa, Fabiana Paim. II. Nano, Rita Maria Weste. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título

CDD – 617 21. ed.

López, Guillermo Alberto. Avaliação sistêmica do estrôncio utilizado na regeneração de defeito ósseo crítico em rato. Salvador, Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

RESUMO

- **Introdução:** O estrôncio (Sr) promove a estimulação dos efeitos metabólicos que ocorrem durante a formação do tecido ósseo, estimula os osteoblastos e produz um efeito inibitório sobre os osteoclastos, assim como a capacidade de substituir cálcio na rede cristalina de hidroxiapatita. Foi incorporado na estrutura de novos materiais bioativos, além de ser usado como um fármaco, na forma de ranelato de estrôncio, para aumentar a densidade do osso em pacientes com osteoporose, artrite reumatoide e doenças metastásicas ósseas. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi quantificar, pela técnica de espectrofotometria com absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), e avaliar histologicamente o efeito do depósito de estrôncio em fígado e rins de ratos, após administração enteral de fármacos contendo estrôncio, para a regeneração óssea. **Materiais e métodos:** Foram utilizados ratos Wistar entre 350 e 480 gramas de peso, divididos em grupos: Protos1 (GP1), Protos 2 (GP2), Fármaco (GF) e Controle (GC) com seus pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias. **Resultados:** Os resultados obtidos histologicamente, tiveram como resposta, alterações histológicas no fígado e rim. As concentrações depositadas de Sr em fígado de rato também foi evidenciado. **Conclusão:** Conclui-se que a avaliação histológica evidenciou alterações celulares no fígado e no rim, sendo compatíveis com o aumento da concentração de Sr. O grau de concentração de Sr, foi significativo para 15 e 60 dias, devido a alta deposição no fígado atestando toxicidade.

Palavras Chaves: Biomateriais, Estrôncio, Toxicidade, Histologia, Espectrometria.

López, Guillermo Alberto. Systemic evaluation of strontium used in the regeneration of a critical bone defect in rat. Salvador, Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

ABSTRACT

Introduction: Strontium (Sr) promotes the stimulation of the metabolic effects that occur during the formation of bone tissue, stimulates osteoblasts and produces an inhibitory effect on osteoclasts, as well as the ability to replace calcium in the crystal lattice of hydroxyapatite. It has been incorporated into the structure of novel bioactive materials as well as being used as a drug in the form of strontium ranelate to increase bone density in patients with osteoporosis, rheumatoid arthritis and bone metastatic diseases. **Objective:** The objective of this work was to quantify by the technique of spectrophotometry with atomic absorption with graphite furnace (GFAAS) and to evaluate histologically the effect of strontium deposition in liver and kidney of rats, after enteral administration of drugs containing strontium, for the bone regeneration. **Materials and methods:** Wistar rats were used between 350 and 480 grams in weight, divided into groups: Protos1 (GP1), Protos 2 (GP2), Drug (GF) and Control (GC) with their biological points of 15, 30 and 60 days. **Results:** The histological results were histologically altered in the liver and kidney. The deposited concentrations of Sr in mouse liver were also evidenced. **Conclusion:** It was concluded that the histological evaluation evidenced cellular alterations in the liver and kidney, being compatible with the increase of the concentration of Sr. The degree of Sr concentration was significant for 15 and 60 days, due to the high liver deposition attesting toxicity.

Keywords: Biomaterials, Strontium, Toxicity, Histology, Spectrometry.

DEDICATÓRIA

A minha família, por contribuir sempre com meu crescimento, em todo momento com todo o amor. A vocês, dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos meses de trabalho que resultaram nesta tese, pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós, deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” (Antoine de Saint-Exupéry).

Estes meses em que fiz esta pesquisa foram uma árdua jornada de desafio, construção e amadurecimento. Nenhum empreendimento é realizado de forma fácil e sem esforço. Os grandes empreendimentos são construídos em meio a muitas dificuldades: “Ser herói não significa acertar constantemente. É muito mais que isso. O verdadeiro espírito de um herói encontra-se na intensa convicção de enfrentar e vencer as dificuldades em vez de desistir de tudo. Na vida de todos nós poderão surgir situações inesperadas. Poderão manifestar obstáculos ou problemas que jamais havíamos imaginado. É justamente nesses momentos que revelamos o que verdadeiramente carregamos no coração.”

“Nós aprendemos ao longo dos anos que a justiça só é feita no coração, eu só sei que o amor é tenaz e sai de novo como o sol, neste mundo aprendemos a executar um ilegal sem documentos e perdoar aquele que tem licença para matar, os fatos superam as palavras e atropelam a inocência de nossos filhos, mais sob a pesada pedra do tempo, a flor nos dará seu escândalo”.

Quero agradecer eternamente a minha querida esposa Josi, sem você não teria conseguido, minha musa inspiradora, sem você do meu lado estaria vazio, a meus filhos Lucas e Zoe, vocês são a fonte inspiradora e minha energia para seguir em frente.

A minha orientadora, Fabiana Paim Rosa, sem tua ajuda, paciência, bondade e colaboração não poderia ter dado continuidade a esta etapa da minha vida, agradecido infinitamente por esta oportunidade e tenho certeza de que ela sente a importância que teve e tem para mim não só na condução do trabalho, mas também como conselheira e até nas horas em que parece que nada está dando certo, com sua positividade e perseverança termina dando. Meu muito obrigado.

A minha co-orientadora Rita Nano, pelo grande aporte e ajuda, peça fundamental que com excelência contribuiu maravilhosamente para poder realizar esta pesquisa.

A Professora Vagna Piler por sua gentil disposição para dar sua contribuição e enriquecer este trabalho.

Ao pessoal do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, especialmente a Junior pela paciência.

Agradeço ao Professor Aryon do IPAC, pela grande contribuição que ofereceu a meu trabalho. As técnicas do IPAC pela ajuda, Elisângela e Cristina, muito obrigado.

Ao Laboratório de Química do IFBA, aos colaboradores Emanuel e Yasmin, foram peças insubstituíveis nesta tarefa, muito agradecido com vocês pelo seu tempo e dedicação.

Ao pessoal do Laboratório da UNEB, Priscila obrigado pelo tempo prestado.

A meus amigos e colegas de trabalho, Marcus, Maurício, Juliana, Paulo, sem sua ajuda e colaboração, nada tivesse dado certo, meu obrigado a vocês.

A Ivone por sua colaboração, muito obrigado.

A Professora Vera, muito obrigado por sua contribuição, sua ajuda foi muito valiosa.

Ao grupo do LBTB, Renata, Iorrana, Flávia, pelo trabalho e contribuição enorme, sem vocês estaria perdido.

A Embrapa pela contribuição enorme com a pesquisa.

Ao IFBA, por permitir e concretizar este sonho. Muito obrigado a esta Instituição que me concedeu esta oportunidade para evoluir.

A todos que contribuíram direta e indiretamente meu mais nobre Obrigado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1. Evolução da funcionalidade e da capacidade degenerativa dos biomateriais ao longo do seu desenvolvimento.....	28
Figura 2. Etapas do ciclo de vida de um biomaterial.....	29
Figura 3. Estrutura da Hidroxiapatita dopada com Estrôncio.....	39
Figura 4. Mecanismo de ação do Estrôncio.....	41
Figura 5. Estrutura hierárquica do osso demonstrando os níveis.....	43

Artigo 1

Figura 1. Fígado de GP1 aos 60 dias.....	53
Figura 2. Fígado de GP1 aos 60 dias.....	53
Figura 3. Fígado de GP1 aos 60 dias.....	54
Figura 4. Fígado de GP1 aos 60 dias.....	54
Figura 5. Pele do GP1 aos 60 dias	55
Figura 6. Pele do GP1 aos 60 dias.....	55
Figura 7. Fígado do GF aos 60 dias.....	57
Figura 8. Fígado do GF aos 60 dias.....	57
Figura 9. Fígado do GF aos 60 dias.....	58
Figura 10. Fígado do GF aos 60 dias.....	58
Figura 11. Fígado do GF aos 60 dias.....	59
Figura 12. Fígado do GF aos 60 dias.....	59
Figura 13. Fígado do GF aos 60 dias.....	60
Figura 14. Fígado do GF aos 60 dias.....	60
Figura 15. Fígado do GF aos 60 dias.....	61
Figura 16. Fígado do GF aos 60 dias.....	61
Figura 17. Fígado do GF aos 60 dias.....	62
Figura 18. Fígado do GF aos 60 dias.....	62
Figura 19. Rim do GF aos 60 dias.....	63

Figura 20. Rim do GF aos 60 dias.....	64
Figura 21. Rim do GF aos 60 dias.....	64
Figura 22. Fígado do GC aos 60 dias.....	65
Figura 23. Fígado do GC aos 60 dias.....	66
Figura 24. Rim do Grupo GC aos 60 dias.....	66
Figura 25. Rim do Grupo GC aos 60 dias.....	67
Figura 26. Imagem de Histomorfometria	72

ARTIGO 2

Figura 1. Liofilizador LIOTOP L101.....	85
Figura 2. Moagem dos órgãos fígado e rim.....	85
Figura 3. Forno micro-ondas com amostras.....	86
Figura 4. GFAAS.....	88
Figura 5. Comparação da concentração entre os grupos analisados, no período de 15, 30 e 60 dias.....	89
Figura 6. Comparação da concentração no fígado entre os grupos analisados no período de 30 dias.....	91
Figura 7. Comparação da concentração no fígado entre os grupos analisados no período de 60 dias.....	92

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1. Propriedades físicas do Magnésio do Cálcio e do Estrôncio, dos elementos biologicamente importantes do grupo 2 do sistema periódico e sua distribuição no corpo de um homem padrão de 70 kilogramas.....	30
--	----

Artigo 1

Tabela 1. Grupo de ratos e seus pontos biológicos em días.....	50
Tabela 2. Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Protos 1 (GP1) quanto a presença de alterações no fígado.....	68
Tabela 3. Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Fármaco (GF) quanto a presença de alterações no fígado.....	69
Tabela 4. Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Protos 2 (GP2) quanto a presença de alterações no fígado.....	70
Tabela 5. Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Protos 1 (GP1), Controle (GC) e Protos 2 (GP2), quanto a presença de alterações no rim.....	70
Tabela 6. Comparação entre os animais dos Grupos Controle (GC) e Fármaco (GF), Controle (GC) e Protos 1 (GP1), Controle (GC) e Protos 2 (GP2), quanto a presença de alterações na pele.....	71
Tabela 7. Percentual de alterações analisadas no fígado e no rim segundo os grupos analisados com histomorfometria.....	72

Artigo 2

Quadro 1. Grupos GP, GF e GC com seus respectivos pontos biológicos.....	83
Tabela 1. Valores informativos para a fração massa (na base seca) atribuídos aos elementos determinados no RM-Agro E3001a.....	87
Tabela 2. Programação do GFAAS para detecção do Sr.....	87

Tabela 3. Média e coeficiente de variação da quantidade de concentração encontrada no fígado com p-valor do teste não paramétrico de Kruskal Wallis.....90

Tabela 4. Valor da média, desvio padrão o valor mínimo e máximo da concentração (ug/g)90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
Ca	Cálcio
CaCl	Cloreto de Cálcio
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CG	Cápsula de Glisse
CK	Célula de Kupffer
CS	Congestão Sinusoide
CP	Crista Papilar
DL	Dose Letal
DTSBio	Departamento de Tecnologia em Saúde e Biologia
Etc	Etecetera
E	Epiderme
F	Fibrose
g	Gramas
GI	Grupo 1
GII	Grupo 2
GIII	Grupo 3
GC	Grupo Controle
GF	Grupo Fármaco
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
GP	Grupo Protos
GS	Glândula Sudorípara

GSb	Glândula Sebácea
h	horas
H	Hepatócito
HA	Hidroxiapatita
HASr	Hidroxiapatita dopada com Estrôncio
H₂O	Água
IFBA	Instituto Federal da Bahia
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
Kg	Kilograma
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
ME	Microesteatose
Mg	Miligramas
mL	mililitros
mm	milímetros
Mpixels	Mega pixels
N/cm	Newton por centímetro quadrado
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fósforo
PFD	Proliferação de Fibrose Dérmica
PD	Papila Dérmica
RPM	revoluções por minuto
S	Sinusoide
Si	Silício

SI	Sulco Interpapilar
Sr	Estrôncio
Sr(NO₃)₂	Nitrato de estrôncio
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VCL	Veia Central Lobular
X	Vezes
Zn	Zinco
°C	Graus Celsius/ Centígrados
µg	Micrograma
µm	micrómetro
>	Maior
<	Menor
®	Marca Registrada
%	por cento

SUMARIO

1. Introdução.....	20
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivo específico.....	25
3. Refêrencial Teórico.....	26
3.1 Os Biomateriais: histórico.....	26
3.2 O Estrôncio.....	30
3.2.1 Toxicidade do Estrôncio.....	31
3.2.2 Absorção Intestinal.....	32
3.2.3 O estrôncio no rim.....	32
3.2.4 O estrôncio em endocrinologia.....	33
3.2.5 O estrôncio nos ossos.....	33
3.2.6 Níveis de riscos mínimos (NRMs) orais de estrôncio estável.....	35
3.2.7 Efeitos in vivo do estrôncio: ações benéficas e efeitos secundários indesejáveis.....	38
3.3 O tecido ósseo.....	42
4. Artigos.....	44
4.1 Artigo 1.....	45
4.2 Introdução.....	48
4.3 Materiais e Métodos.....	49
4.4 Resultados.....	52

4.5	Discussão.....	74
4.6	Conclusão.....	77
5.	Artigo 2.....	78
5.1	Introdução.....	81
5.2	Materiais e Métodos.....	82
5.2.1	Fármacos.....	83
5.2.2	Preparos das amostras.....	84
5.2.3	Digestão.....	86
5.2.4	Análise Estatística.....	88
5.3	Resultados e Discussão.....	89
5.4	Conclusão.....	95
6.	Conclusão Geral.....	96
	Referências.....	98
	Anexos.....	111

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia dedica-se ao estudo de biomateriais naturais ou artificiais, com a finalidade de contribuir, de forma parcial ou total, nos sistemas biológicos, com o objetivo de substituí-los ou tratá-los.¹ Dentre as características essenciais desses materiais estão a biocompatibilidade com o tecido, a atoxicidade, o pouco peso e o baixo custo.

O intenso crescimento observado no mercado de biomateriais pode ser atribuído a três motivos principais: 1) o envelhecimento da população mundial, com a elevação da expectativa de vida; 2) o aumento do poder aquisitivo e do padrão de vida nos países em desenvolvimento, que facilitam o acesso ao tratamento de diversos tipos de enfermidades; e 3) as melhorias tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente consideradas não tratáveis. O aspecto do envelhecimento populacional demanda particular atenção, visto que, com base nas estimativas, no ano 2050, uma fração igual a 21,1% da população global terá mais que 60 anos, correspondendo a mais de 2 bilhões de pessoas.²

Pode-se esperar, nos próximos anos, um aumento ainda mais apreciável da demanda de biomateriais e mesmo de novas abordagens terapêuticas mais consolidadas para atender às necessidades dessas pessoas.³

Atualmente, os biomateriais mais requisitados no mercado são os polímeros e os cerâmicos, pois tanto podem substituir o tecido vivo sem função, como também estimular o crescimento de um novo tecido. Esses biomateriais devem apresentar boa aceitação por parte do organismo humano, sem desencadeamento de reações adversas. Como tais elementos se caracterizam pela ausência de citotoxicidade e da ativação do sistema imunológico, refletirão no não surgimento de tumores e de reações inflamatórias que causam a rejeição do material implantado.⁴

De acordo com a literatura, observa-se que os biomateriais são amplamente utilizados no tecido ósseo para que sua regeneração aconteça de forma completa, implementando, assim, um arcabouço perfeito para a sua funcionalidade.⁵⁻⁷

O equilíbrio estabelecido entre a formação e a absorção óssea pode ser afetado por uma variedade de agentes físico-químicos tais como: íons orgânicos, fatores de crescimento e hormônios. Nesse sentido, íons como cálcio (Ca), fósforo (P), estrôncio (Sr) e zinco (Zn) promovem a estimulação dos efeitos metabólicos que ocorrem durante a formação do tecido ósseo.⁷

O estrôncio demonstrou efeito estimulador *in vitro* sobre osteoblastos, juntamente com um efeito inibitório sobre os osteoclastos, assim como a capacidade de substituir cálcio na rede cristalina de hidroxiapatita. Recentemente, foi incorporado na estrutura de novos materiais bioativos, além de ser usado como um fármaco, na forma de ranelato de estrôncio, para aumentar a densidade do osso em pacientes com osteoporose, artrite reumatoide e doenças metastásicas ósseas.⁶ O ranelato de estrôncio também inibe a perda óssea. Outros agentes farmacológicos (biofosfanatos e hormônios) são, igualmente, utilizados para minimizar a reabsorção óssea e estimular o aumento da densidade óssea.⁷

Sabe-se que o Sr em grandes quantidades produz toxicidade em seres vivos, e sua ingestão diária estimada para humanos adultos é de cerca de 4 mg em muitas partes do mundo.⁸ Existe uma relação entre as concentrações de Sr e doenças associadas, como raquitismo e osteomalácia.⁹

Em ratos, a administração oral de doses baixas de Sr pode estimular a formação óssea. Quando administrado em doses elevadas, pode induzir uma mineralização óssea defeituosa, expressa por baixa densidade e diminuição do tamanho da apatita óssea.¹⁰

Em geral, os estudos com animais têm se concentrado na avaliação dos efeitos esqueléticos. Em roedores jovens, os efeitos típicos do excesso de estrôncio incluem um alargamento anormal dos discos epifisários dos ossos longos, uma falta de calcificação óssea e deposição anormal de matriz óssea não mineralizada ou osteóide.¹¹

A equipe de Meunier, em artigo publicado em 2004, demonstrou os efeitos positivos do ranelato de estrôncio como medicamento antiosteoporótico e concluiu que parece ser um tratamento seguro e eficaz para osteoporose pós-menopáusia, sendo capaz de reduzir o risco de fraturas vertebrais.^{11,12}

Desde então, os efeitos benéficos do estrôncio têm sido repetidamente realçados e não deixam dúvidas quanto à sua dupla ação sobre a formação óssea e a reabsorção óssea *in vivo*.¹²

Além disso, observou-se que o ranelato de estrôncio evita a perda óssea em ratos ovariectomizados, aumenta a massa óssea em animais osteopênicos e aumenta a resistência óssea em animais normais.¹³

As propriedades mecânicas da hidroxiapatita pura, não são ideais quando utilizadas como substituto ósseo. De modo geral, a hidroxiapatita apresenta as vantagens de ser bioativa e osteocondutora, possui alta resistência à corrosão e à compressão. Como muitos cerâmicos, apresenta as desvantagens da baixa ductilidade e da alta densidade.¹⁴ O estrôncio é um dos elementos do organismo que pode substituir a posição do cálcio na estrutura molecular da hidroxiapatita, e, de acordo com as pesquisas de Grynblas¹³, baixas doses de estrôncio podem demonstrar o incremento de formação óssea e de densidade no osso trabecular em roedores.¹⁵

Normalmente, a discriminação Ca/Sr ocorre sob condições fisiológicas circunstanciais para as seguintes funções: absorção gastrointestinal, excreção renal, transferência placentária e secreção mamária.¹⁶ Geralmente, o Sr é mal-absorvido no trato intestinal. A absorção intestinal do Sr em ratos diminui com a idade, mas, no caso dos seres humanos, isso é desconhecido.¹⁸

Segundo um estudo de Morohashi¹⁹, uma grande quantidade de estrôncio perturba o metabolismo do cálcio produz inibição de efeitos no metabolismo do cálcio, como diminuição de sua absorção, diminuição da formação óssea e da reabsorção, balanço negativo de cálcio e diminuição do cálcio no conteúdo em osso.¹⁸

Na literatura disponível, a concentração farmacológica indicada para ratos é alta comparada com os níveis farmacológicos indicados para humanos, o que se justifica em virtude da menor absorção intestinal nos animais e seus consequentes níveis plasmáticos se mostrarem mais baixos do que os de humanos.^{19,20}

Desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o estrôncio na forma sistêmica em órgãos de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação sistêmica do estrôncio utilizado na regeneração de defeito ósseo crítico em rato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1:

Avaliação histomorfológica do fígado e rins de rato após administração enteral de estrôncio.

Artigo 2:

Quantificação do depósito de estrôncio, mediante a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), em órgãos-alvos de ratos utilizando dois fármacos.

3 REFERENCIAL TEORICO

3.1 Os biomateriais: histórico

A ideia de se utilizarem materiais para substituir partes do corpo humano já é antiga, e, historicamente, os biomateriais são tão antigos quanto o homem. Há registros de sua utilização há pelo menos 2000 anos. Os primeiros implantes foram sentenciados ao fracasso uma vez que ainda não eram conhecidos os conceitos relativos à infecção, a materiais e à reação biológica.¹

Durante muito tempo quando um tecido ou órgão estava afetado, não existia muita alternativa e se optava pela amputação de um membro ou extirpação do tecido ou órgão. O desenvolvimento dos biomateriais no século 20 oferece soluções para tratamentos. No período da Segunda Guerra Mundial, constatou-se, por exemplo, que ligas de cromo-cobalto-molibdênio, tântalo e titânio eram compatíveis com tecidos vivos.² Em 1951, a utilização de titânio em manufatura de parafusos e placas, impulsionou a utilização dos biomateriais.²

Hoje em dia, a busca de materiais fidedignos para a utilização como biomateriais é necessária, em relação a propriedades mecânicas e químicas.³ Com o decorrer do tempo, o objetivo passou a ser a bioatividade dos biomateriais, e, atualmente, o propósito tem sido a criação de um tecido funcional, com foco, então, em sua apresentação biológica.⁴

Conhecem-se quatro gerações de biomateriais. A primeira se caracteriza pela utilização para reposição de dentes em ouro e marfim, para restituição do globo ocular em vidro e para a elaboração de próteses de membros em aço ou madeira. Os de segunda geração são materiais estruturais, como por exemplo a liga de titânio, lentes acrílicas e teflon. A terceira se caracteriza pelo aprimoramento dos materiais, com o desenvolvimento de materiais com características específicas de acordo com a aplicação (válvulas cardíacas e marca-passos). E os biomateriais de quarta geração utilizam os conceitos de biomimética e engenharia de tecidos. A biomimética busca reproduzir as formas e/ou funções de tecidos biológicos. A engenharia de tecidos, desenvolve estruturas capazes de formar um novo tecido e, assim, fundamentar o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar funções de diferentes tecidos ou órgãos.⁵

Se, inicialmente, pesquisavam-se materiais biocompatíveis, posteriormente, procurou-se aumentar a vida do implante por sua interação com a interface do tecido hospedeiro; em seguida, focou-se no desenvolvimento de materiais biodegradáveis, e, mais recentemente, com o conceito de biomimética.⁵

Tal conceito evolutivo no desenvolvimento e utilização de biomateriais indica, também, que os materiais mais utilizados clinicamente na atualidade são, majoritariamente, biocompatíveis, bioativos e biodegradáveis, e os mais pesquisados, os bioativos, os biodegradáveis e os biomiméticos⁵ (FIGURA 1).

Figura 1 - Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais ao longo de seu desenvolvimento

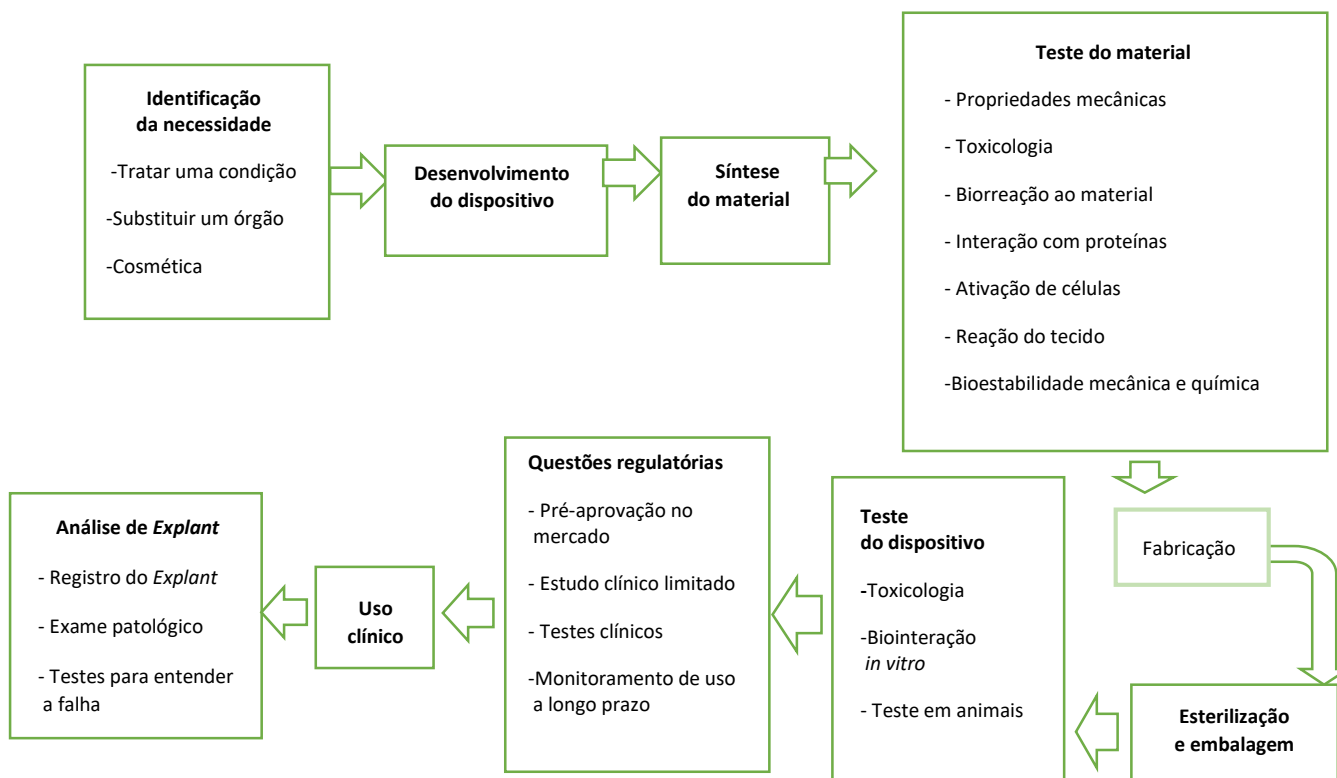


Fonte: Adaptado de Holzapfel et al., 2012, p. 1.

A sequência para a sua utilização começa com a detecção da necessidade de um biomaterial para uma determinada aplicação, como o tratamento de uma doença, até a substituição de um órgão (FIGURA 2). Nesse sentido, salienta-se as qualidades biológicas referentes as seguintes propriedades: 1) biocompatibilidade, associada, com frequência, a hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade, estimulação de adesão e proliferação celular; 2) físicas, como morfologia da superfície, energia superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, cor, transparência e permeabilidade; 3) mecânicas, como tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade; e 4) químicas, como densidade, estabilidade,

resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo.⁶

Figura 2 - Etapas do ciclo de vida de um biomaterial, desde sua concepção baseada em uma necessidade específica até seu uso clínico e avaliação posterior



Fonte: Adaptado de Pires, 2015, p. 2.

O intenso crescimento observado no mercado de biomateriais é atribuído a três motivos principais: o envelhecimento da população mundial, com a elevação da expectativa de vida; o aumento do poder aquisitivo e do padrão de vida nos países em desenvolvimento, que facilitam o acesso ao tratamento de diversos tipos de enfermidades; e as melhoras tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis. O aspecto do envelhecimento populacional demanda particular atenção, vez que, com base nas estimativas de que, no ano 2050, uma fração igual a 21,1% da população global terá mais de 60 anos, correspondendo a mais de 2 bilhões de pessoas, pode-se esperar, nos próximos anos, um aumento ainda mais apreciável da demanda por biomateriais e mesmo de novas e mais

consolidadas abordagens terapêuticas para atender às necessidades dessas pessoas.⁷

3.2 O estrôncio

Descoberto em 1790 em uma mina perto da Aldeia Scottish Strontian e isolado em 1808, o estrôncio (Sr) é um dos metais alcalinos terrestres. Nunca está livre na natureza, porque oxida-se facilmente formando óxido de estrôncio, tem uma cor amarelada e é bem conhecido a partir dos minerais celestite (SrSO₄) e estrontianite (SrCO₃). O Sr natural é uma mistura de quatro isótopos estáveis: ⁸⁴Sr (0,56%), ⁸⁶Sr (9,86%), ⁸⁷Sr (7,02%) e ⁸⁸Sr (82,56%). Os elementos do grupo 2 do sistema periódico, ao qual o Sr pertence juntamente com o Ca e o Mg, formam cátions divalentes em fluidos biológicos e têm graus variáveis de ligação a proteínas em fluidos biológicos como soro ou plasma. A ligação proteica de Sr no soro ou no plasma está na mesma ordem de magnitude que a do Ca. Se o elemento desempenha um papel essencial no metabolismo ósseo ainda não está completamente esclarecido.⁸

Algumas diferenças importantes entre o Mg, o Ca e o Sr estão listadas na Tabela 1, podendo-se observar que o Sr é um metal com traço no corpo humano. Os dados para um homem tomado como referência (70 kg) podem ser resumidos em (mg Sr por dia): ingestão por alimentos e fluidos: 1,9; perda na urina: 0,34; perda nas fezes: 1,5; outras perdas, por exemplo, em suor: 0,02 e em cabelo: 0,2x 10⁻³.⁹

Tabela 1 - Propriedades físicas do magnésio, do cálcio e do estrôncio, elementos biologicamente importantes do grupo 2 do sistema periódico, e sua distribuição no corpo de um homem padrão de 70 kg

Elemento	Número atômico	Peso atômico	Quantidade (g)	% de massa corpórea
Mg	12	24.32	19	0,027
Ca	20	40.08	1000	1,4
Sr	38	87.63	0.32	0,00044

Fonte: Adaptado de Nielsen, 2004, p. 3.

Em ratos, a administração oral de doses baixas de Sr pode estimular a formação óssea. Quando administrado em doses elevadas, no entanto, o Sr pode induzir uma mineralização óssea defeituosa, expressa por uma diminuição da densidade mineral óssea e do tamanho da apatita óssea.¹⁰

A concentração de Sr no solo e na água potável varia entre 0,001 e 39 mg/L. Nos Estados Unidos, a concentração de Sr na água potável é <1 mg/L. Uma dieta normal contém de 2-4 mg de Sr/dia, a maioria derivada de vegetais e cereais. Assim, a quantidade de Sr em alimentos é insignificante em comparação com a do Ca. De acordo com estimativas, a abundância relativa global de Sr na crosta terrestre é de cerca de 8 mg para 1.000 mg de Ca.⁶

O Sr nunca foi considerado um elemento essencial, mas pode promover o crescimento em algumas plantas.¹¹

A administração de Sr em doses moderadas impediram a cárie em ratos.¹²

3.2.1 Toxicidade do estrôncio

As pessoas podem estar expostas a pequenos níveis de estrôncio radioativo por respirar ar e poeira, alimentar-se, beber água, ou por contato com o solo que contém estrôncio, embora seja mais provável entrar-se em contato com esse elemento comendo-se ou bebendo-se. As concentrações de estrôncio nos alimentos contribuem para que ele se acumule no corpo humano. Produtos comestíveis que contêm concentrações de estrôncio são os cereais, vegetais folhosos e laticínios.

Alguns animais foram estudados intensivamente. A dieta de Sr pode variar amplamente sem a manifestação de sintomas tóxicos. Em porcos jovens alimentados com 6.700 ppm de Sr e 0,16% de Ca, manifestaram-se incoordenação e fraqueza seguidas de paralisia. Galinhas adultas demonstraram ser mais resistentes; o peso e a produção dos ovos não foram afetados por uma concentração da dieta de Sr de até 30.000 ppm, mas essas variáveis foram reduzidas de 50.000 ppm.¹¹

3.2.2 Absorção intestinal do estrôncio

Normalmente, a discriminação Ca/Sr ocorre sob condições fisiológicas circunstanciais para as seguintes funções: absorção gastrointestinal, excreção renal, transferência placentária e secreção mamária.¹³ Geralmente, o Sr é mal absorvido no trato intestinal. Em ratos, sua absorção intestinal diminui com a idade, mas, em seres humanos, isso ainda é desconhecido.¹⁴

A vitamina D promove a absorção intestinal do Sr e inibe a do Ca. A lactose e outros carboidratos podem promover a absorção de Sr e de Ca. Em experiências com animais, a maioria das dietas com Sr são absorvidas a partir do jejuno, ou seja, 62% de uma dose líquida e 88% a partir de uma dose sólida.¹⁴

A preferência pela absorção de Ca (discriminação agonista do Sr) pode ser atribuída ao tamanho relativamente menor do átomo de Ca.¹⁵

Na literatura, a concentração farmacológica indicada para ratos é de 625 mg/kg/dia, uma concentração alta comparada aos níveis farmacológicos indicados para humanos (2 g/dia), sendo justificado em virtude da menor absorção intestinal nos animais e conseqüente níveis plasmáticos se mostrarem próximos aos de humanos.¹⁶

3.2.3 O estrôncio nos rins

Ca e Sr parecem compartilhar um caminho de transporte tubular comum nos túbulos renais.¹⁷

O Sr em suspensão nas células tubulares renais do tubo proximal inibe a produção de 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc) dependente de hormônio da paratireoide (PTH), como age o Ca, em concentrações até 10 milimoles (mM).¹⁸

A depuração renal de Sr é cerca de três vezes a de Ca, graças, talvez, à menor reabsorção tubular, o que pode ser atribuído ao tamanho maior do átomo de Sr em relação ao de Ca.¹⁹

Em estudo de Schrooten e colaboradores, a concentração de estrôncio para um grupo em tratamento conservador de diálise foi estatisticamente diferente da obtida no grupo controle e mais alta que a obtida por Schrooten et al., dados esses que comprovam que ocorre elevação do estrôncio sérico em decorrência da diminuição da função renal.¹⁰

A absorção máxima do Sr se dá em torno de 3-5 horas após sua ingestão, podendo ser reduzido pela influência da ingestão de alimentos (cálcio, magnésio e

alumínio), atingindo seu estado de equilíbrio duas semanas após o início do tratamento. A permanência do estrôncio no organismo (meia-vida) é em torno de 60 horas, e sua excreção é feita por via renal e pelo trato gastrointestinal. A curto prazo, o estrôncio se deposita sobre cristais de hidroxapatita e, a longo prazo, permuta com o cálcio, mantendo-se ligado com o tecido ósseo.²⁰

3.2.4 O estrôncio em endocrinologia

Em investigações de corpo inteiro, o Sr age frequentemente de forma semelhante ao Ca, como comprovam os seguintes exemplos: doses farmacológicas de Sr em suínos aumentam a secreção de calcitonina após a infusão; em ratos tireoparatiroidectomizados, a calcitonina resulta não somente em hipocalcemia mas também em hipoestroncionemia; o glucagon, um conhecido secretagogo da calcitonina, provoca não só hipocalcemia como também hipoestroncionemia em ratos.²¹

3.2.5 O estrôncio nos ossos

Tanto o estrôncio estável como o estrôncio radioativo entram e saem do organismo da mesma maneira. Se uma pessoa respira vapores ou poeira contendo uma forma química de estrôncio que é solúvel em água, o produto químico dissolve-se na superfície úmida dentro dos pulmões, e o estrôncio entra na corrente sanguínea de modo relativamente rápido. Se a forma química do estrôncio não se dissolve facilmente em água, as partículas podem, então, permanecer no pulmão por algum tempo. Quando se ingerem alimentos ou água que contêm estrôncio, apenas uma pequena porção deixa os intestinos e entra na corrente sanguínea. Estudos em animais sugerem que os filhotes podem absorver mais estrôncio nos intestinos do que os adultos. Se uma mistura fluida de um sal de estrôncio for colocada na pele, o estrôncio passa pela pele muito lentamente e entra na corrente sanguínea, mas, se a pele tem arranhões ou cortes, pode atravessá-la muito mais rapidamente.²²

Uma vez tendo entrado na corrente sanguínea, o estrôncio é distribuído por todo o organismo, podendo penetrar e deixar as células com bastante facilidade. No corpo humano, o comportamento do Sr é muito semelhante ao do Ca, e uma grande

porção desse elemento se acumula nos ossos, sobretudo em adultos. O Sr é eliminado do organismo por meio da urina, das fezes e do suor; no primeiro caso, isso pode ocorrer durante longos períodos, quando pequenas quantidades são liberadas, e os ossos não conseguem recapturar essa perda. Quando o Sr é ingerido por via oral, a porção que não passa através da parede intestinal para entrar na corrente sanguínea é eliminada pelas fezes durante o primeiro dia ou após a exposição.²²

Na, Pb e Sr podem ser substituídos na posição do Ca na apatita.²³

Não há efeitos nocivos do Sr estável nos seres humanos nos níveis normalmente encontrados no ambiente. A única forma química de Sr estável muito prejudicial por inalação é o cromato de estrôncio, mas isso se deve ao cromo tóxico e não propriamente ao Sr. Problemas com o crescimento ósseo podem ocorrer em crianças que comem ou bebem níveis elevados de Sr, especialmente se a dieta é baixa em cálcio e proteína. Os sais comuns de Sr não são nocivos quando inalados ou colocados sobre a pele.²⁴

Estudos em animais mostraram que comer ou beber quantidades muito grandes de Sr estável pode ser letal. Nessas quantidades altas, o Sr levado para os ossos em vez do Ca pode causar o enfraquecimento dos ossos em crescimento. O Sr tem efeitos mais graves no crescimento ósseo em animais jovens do que em adultos.²³

Estudos com animais admitem a identificação do osso como o alvo mais sensível da toxicidade do Sr. Doses relativamente elevadas desse elemento (≥ 500 mg/kg/dia) causaram uma redução na mineralização óssea (peso de cinzas) e uma alteração na composição química da matriz óssea orgânica. Além disso, as zonas hipertróficas das placas de crescimento epifisário dos ossos longos se tornaram anormalmente profundas e largas, uma vez que a calcificação não ocorreu. O enfraquecimento severo dos ossos resultou do raquitismo, pois o esqueleto não podia suportar o corpo adequadamente, e a deformidade da cabeça do fêmur pode ter contribuído para a paralisia dos membros posteriores em alguns casos. Os animais jovens foram mais sensíveis ao efeito do excesso de Sr do que os animais mais velhos, possivelmente porque sua absorção e retenção foram maiores nos jovens. Além disso, a insuficiência de Ca e de vitamina D na dieta aumentou a gravidade dos efeitos esqueléticos.²³

Um sugestivo estudo epidemiológico com crianças do Peru mostrou que o aumento da ingestão de Sr contribuiu para o aumento da prevalência de sinais de raquitismo (craniomalácia, rosário raquítico, abaulamento no pulso, deformidades ósseas da perna e fechamento tardio das fontanelas). Um aumento significativo da incidência de raquitismo foi associado a uma dieta restrita à água e aos cereais cultivados localmente em solos com concentrações de Sr superiores a 350 mg/kg.²³

3.2.6 Níveis de riscos mínimos (NRMs) orais de estrôncio estável

Está convencionado um NRM de 2,0 mg/kg/dia para exposição oral de duração intermédia (15-364 dias) para o Sr estável e seus compostos.

Os efeitos mais consistentes da exposição oral ao Sr estável em excesso são raquitismo (diminuição da calcificação da cartilagem) e osteomalácia (diminuição da mineralização óssea), especialmente em jovens.

Um estudo epidemiológico turco forneceu evidências indiretas de que o excesso de exposição oral ao Sr (na presença de outros fatores predisponentes) pode contribuir para o desenvolvimento de raquitismo em crianças.²³

Em geral, estudos com animais concentram-se na avaliação dos efeitos esqueléticos, com consideração ocasional ao peso corporal e à química sérica. Em roedores jovens, os efeitos típicos do excesso de Sr incluíram um alargamento anormal das placas epifisárias cartilaginosas dos ossos longos, uma falta de calcificação óssea e deposição anormal de matriz óssea não mineralizada ou osteoide.^{25,26,27,28,29}

Sabe-se que os efeitos esqueléticos do Sr estão relacionados com a sua similaridade química com o Ca e com a sua supressão do metabolismo da vitamina D e da absorção intestinal de Ca.³⁰ Os efeitos são mais graves em ratos jovens do que em adultos, uma vez que a taxa de incorporação esquelética de Sr é mais elevada em animais jovens. Um baixo nível de efeito adverso observado (*a lowest-observed-adverse-effect level* - LOAEL) de 550 mg de estrôncio/kg/dia foi identificado para anormalidades de mineralização óssea em ratos desmamados expostos a carbonato de estrôncio dietético por 20 dias.³¹

O estudo permitiu as constatações que seguem. As placas epifisárias dos ossos longos tornaram-se irregulares e anormalmente grossas. Além disso, áreas de matriz óssea não calcificada foram depositadas nas extremidades distais das

trabéculas metafisárias e extremidade proximal das diáfises. Irregularidades na organização das células da zona hipertrófica, no padrão de calcificação e na deposição de osteoide foram mais evidentes com o aumento da dose. Nas tíbias, o peso seco, o peso de cinzas, a porcentagem de cinzas e o cálcio em cinzas reduziram-se significativamente com o aumento da ingestão de Sr. Não ocorreram efeitos sobre a mineralização óssea em ratos desmamados que ingeriram 140 mg de estrôncio/kg/dia, e não se observaram níveis de efeitos adversos (*no-observed-adverse-effect levels* - NOAELs) para exposição à duração intermediária. Em ratos adultos, os efeitos da ingestão de Sr foram menos graves e doses mais elevadas foram necessárias para produzir o mesmo efeito causado em animais jovens.

O nível de 690 mg de estrôncio/kg/dia não originou efeitos em adultos, o que foi superior ao LOAEL para o desmame. Em adultos, alterações na histologia da tíbia, tais como espessamento anormal das cartilagens epifisárias e costuras osteoides metafisárias anormalmente alargadas, foram observadas com a ingestão de 1.370 mg de estrôncio/kg/dia ou acima dessa dosagem. Aos 2.750 mg de estrôncio/kg/dia, o tecido ósseo foi depositado perto dos canais vasculares, e as áreas de reabsorção óssea foram reduzidas. Nas tíbias de ratos adultos, o peso seco, o peso de cinzas, a porcentagem de cinzas e o cálcio nas cinzas foram apenas significativamente afetados na dose mais elevada. Este estudo demonstra a diferença na sensibilidade ao estrôncio entre animais jovens e adultos que é causada pela maior taxa de incorporação de estrôncio no esqueleto em desenvolvimento em animais jovens.³¹

Os níveis de dose crítica identificados no estudo de Storey acima mencionado são corroborados por outros estudos em roedores. Determinados LOAELs (500-565 mg de estrôncio/kg/dia) para mineralização óssea anormal são identificados em vários estudos sobre ratos desmamados expostos a carbonato de estrôncio^{30,28}, ou a uma forma não especificada de estrôncio.²⁹ Foram observados ligeiros efeitos esqueléticos em ratinhos expostos a 350 mg de estrôncio/kg/dia com o cloreto de estrôncio.²⁶ Além disso, níveis semelhantes de efeito adverso não observado (NOAELs) na gama de 110-168 mg estrôncio/kg/dia para efeitos esqueléticos foram identificados a partir de estudos em ratos desmamados expostos a uma forma não especificada de estrôncio²⁷, hexahidrato de cloreto de estrôncio³² ou carbonato de estrôncio.³³

O estudo de Storey é considerado como básico para o LMR intermediário por terem sido testados tanto animais jovens como adultos, as doses administradas incluíram NOAELs e LOAELs para ambos os grupos etários, e a avaliação de efeitos esqueléticos levou em conta a análise histopatológica.

Outros estudos apresentam deficiências graves que os tornam inadequados para derivar um NRM. Dois estudos administraram doses únicas de 166-168 mg/kg, mas não relataram efeitos adversos.^{28,32} Embora os resultados apoiem os NOAELs estabelecidos por Storey, a falta de doses mais altas que causam resultados positivos aumenta a incerteza sobre as experiências. O estudo de Johnson e colaboradores administrou uma dose única de 565 mg/kg e obteve um LOAEL grave.^{33,34}

Três dos outros estudos apresentaram deficiências que os tornam, igualmente, menos adequados do que o de Storey. A pesquisa de Morohashi e colaboradores não analisou a histopatologia óssea. Os estudos de Marie e Hott e de Neufield e Boskey administraram doses únicas de 350 e 500 mg/kg, respectivamente, que foram LOAELs para efeitos esqueléticos, mas nenhuma informação foi fornecida sobre os níveis de efeito ou os efeitos em doses mais elevadas. Por conseguinte, o NOAEL de 140 mg de estrôncio/kg/dia para efeitos esqueléticos em ratos desmamados parece ser a base mais adequada para calcular um NRM intermédio. O NOAEL de 140 mg de estrôncio/kg/dia foi dividido por um fator de incerteza de 30 (10 para extrapolação de animal para humano e 3 para variabilidade humana) e um fator modificador de 3 (para duração curta do estudo e exame de ponto final limitado). Um fator de incerteza parcial foi usado para explicar a variabilidade humana porque o NOAEL selecionado baseou-se na resposta de jovens, que, entre os homens, é também o grupo mais sensível. O NRM resultante é calculado como sendo 2,0 mg de estrôncio/kg/dia, o que é aproximadamente 40 vezes maior do que a exposição diária total estimada para o estrôncio estável de 0,047 mg/kg/dia. O NRM representa uma estimativa da exposição humana diária que provavelmente não terá um risco apreciável de efeitos adversos para a saúde. Uma vez que o NRM é baseado em efeitos em ratos jovens, é considerado como protetor de crianças, que apresentam semelhanças em relação à imaturidade do esqueleto e a altas taxas intestinais de absorção de estrôncio.^{33,34}

Os NRM não foram derivados para exposições orais agudas ou crônicas ao estrôncio estável. Os dados agudos relevantes estão limitados a dois estudos de

letalidade em ratinhos^{67,68} e a dois estudos de toxicidade em ratos.^{35,36} Os estudos com ratos não foram considerados adequados para a derivação de NRM. No estudo de Kshirsagar, a única dose administrada, 3.000 mg de estrôncio por kg/dia sob a forma de fosfato de estrôncio, resultou em efeitos graves de peso corporal (62% de redução no ganho de peso) e foi superior aos valores de DL50 relatados para camundongos.^{33,34} O estudo de Kroes e colaboradores não identificou um nível de efeitos adversos, tendo como resultados dados limitados sobre a toxicidade.³⁵

3.2.7 Efeitos *in vivo* do estrôncio: ações benéficas e efeitos secundários indesejáveis

Em estudo datado de 2004, a equipe de Meunier demonstrou os efeitos positivos do ranelato de estrôncio como medicamento antiosteoporótico. O número de novas fraturas vertebrais foi reduzido em 49% durante o primeiro ano e em 41% durante o período do estudo. A densidade mineral óssea foi aumentada no final do estudo em 14,4% para a coluna lombar e em 8,3% para o colo do fêmur. O ranelato de estrôncio parece prover um tratamento seguro e eficaz da osteoporose pós-menopáusia, capaz de causar uma redução rápida e prolongada no risco de fraturas vertebrais.²³

Desde então, os efeitos benéficos de estrôncio têm sido repetidamente realizados e não deixam dúvidas quanto à sua dupla ação sobre a formação óssea e a reabsorção óssea *in vivo*.

O ranelato de estrôncio evita a perda óssea em ratos ovariectomizados, aumenta a massa óssea em animais osteopênicos e aumenta a resistência óssea em animais normais.²¹

As propriedades mecânicas da hidroxiapatita pura não são ideais quando utilizada como substituto ósseo. O Sr é um dos elementos do organismo e pode substituir a posição do Ca na estrutura molecular da hidroxiapatita.³⁷ De acordo com as pesquisas de Grympas, baixas doses de estrôncio podem demonstrar o incremento de formação óssea e a densidade no osso trabecular em roedores.³²

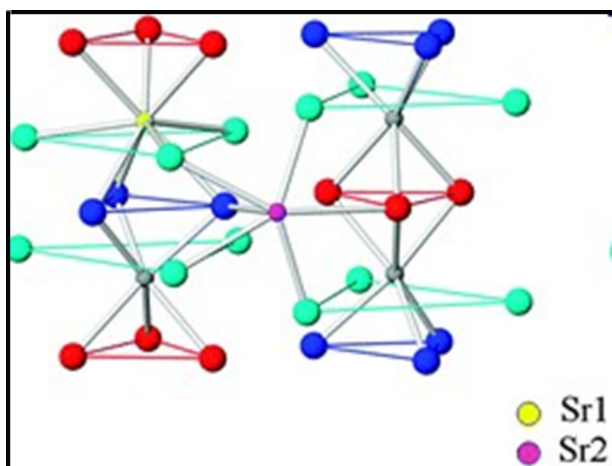
A estrutura da hidroxiapatita permite alterações catiônicas e aniônicas isomórficas que preservam sua estrutura hexagonal. O íon Ca^{2+} pode ser substituído por cátions tais como o Sr (FIGURA 3) Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+} , Nn^{2+} , Si^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} . O sítio da hidroxila OH^- , pode ser substituído por ânions tais

como F^- , Cl^- ou CO_3^{2-} , e o sítio de ligação do PO_4^{3-} é substituído geralmente por ânions tais como VO_4^{3-} ou CO_3^{2-} .

As modificações na estrutura tridimensional da hidroxiapatita pela incorporação de íons alteram o comportamento biológico, a cristalinidade, a solubilidade, as propriedades físico-químicas e mecânicas.^{38,39,40} E, quando presentes simultaneamente, os substitutos podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos nas suas propriedades⁴¹ (FIGURA 3).

As substituições catiônicas de íons de Ca^{2+} podem ter comportamentos diversificados: Sr^{2+} , Mg^{2+} causam uma maior solubilidade nas apatitas, com alterações na estabilidade térmica e na reatividade superficial; os metais Pb^{2+} e Cd^{2+} induzem ação tóxica no tecido, no entanto, por íons Zn^{2+} e Sr^{2+} , estimulam a regeneração óssea, com diminuição da reabsorção óssea pelos osteoclastos e aumento na diferenciação de osteoblastos que favorecem a neoformação óssea.⁴²

Figura 3 - Estrutura da hidroxiapatita dopada com estrôncio



Fonte: Terra et al., 2010, p. 9.

Segundo Stepan, o Sr substitui o Ca na malha de hidroxiapatita dos minerais dos ossos. No entanto, quando a massa óssea é medida por densidade mineral óssea (DMO), os átomos de Sr presentes no osso atenuam os raios X mais fortemente do que os átomos de Ca, sendo mais denso, por ter o dobro do número atômico.⁴³

Novos estudos são, no entanto, oportunos para determinar se a eficácia antifratura do estrôncio tem necessariamente como consequência a mudança na composição e na cristalinidade do osso. Esses elementos diferentes sobre a

adsorção de Sr ou a qualidade dos cristais de apatita do osso podem, pelo menos em parte, explicar os efeitos benéficos do Sr na redução do risco de fraturas, mas o mecanismo desses efeitos ainda exige estudos adicionais para que seja mais bem compreendida a sua sinalização intracelular.

A ação do Sr na osteoclastogênese tem sido repetidamente demonstrada, manifestando a inibição da diferenciação de osteoclastos, a sua actividade e também de reabsorção do osso.⁴⁴

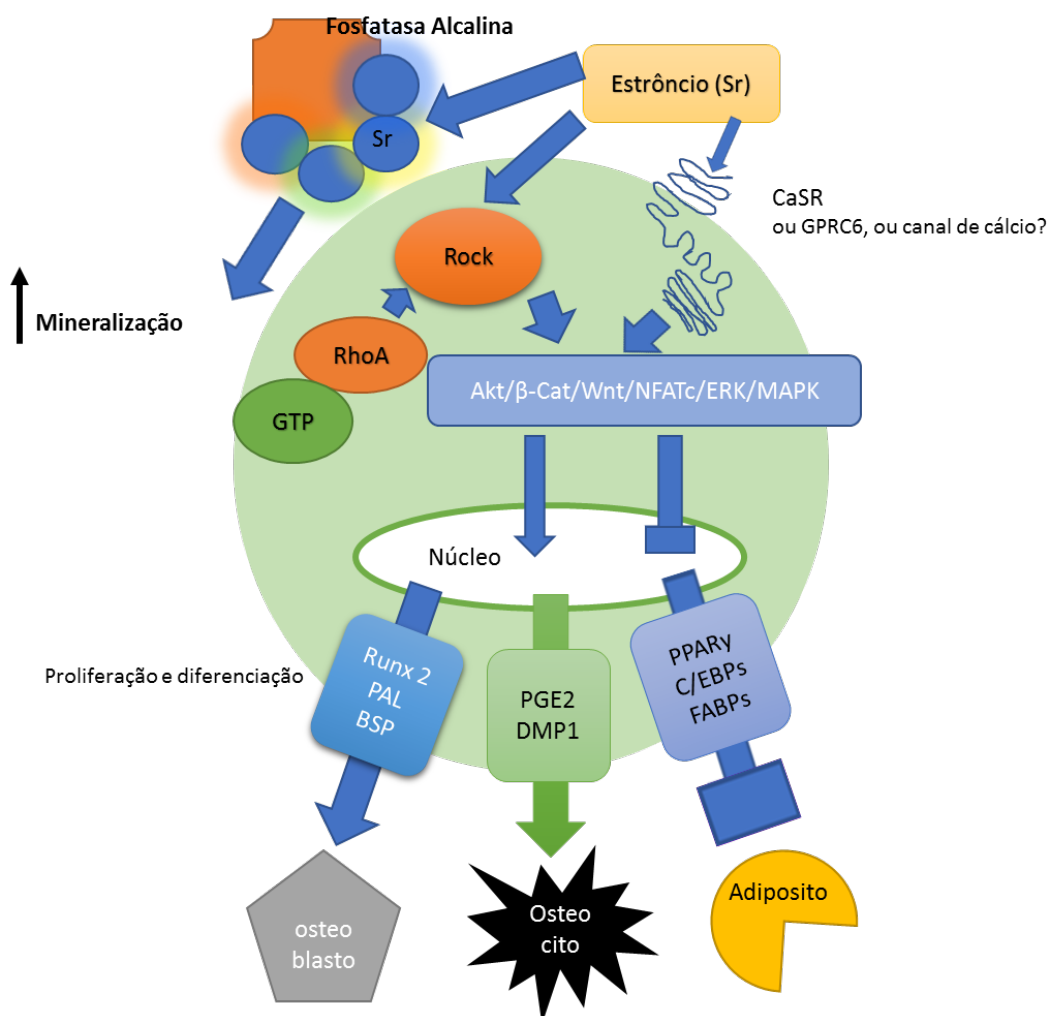
Estudos mais recentes explicam a ação molecular para essa inibição, estabelecendo que o Sr reduz a capacidade de adesão dos osteoclastos ao osso, alterando a actina da área de vedação, quando acontece a remodelação óssea.⁴⁵

Também desempenha um papel na via do fator nuclear Kappa-B (NF- κ B)⁴⁶ inibindo a osteoclastogênese, bem como sobre o número e a atividade dos osteoclastos.⁴⁷ Além disso, no caso de dosagem elevada, induz a apoptose de osteoclastos pelo caminho PKC β II.⁴⁶ As taxas nessas experiências são semelhantes às que podem ser encontradas adsorvidas na superfície do osso tratado com Sr⁴⁸ e, assim, demonstrar seu efeito antirreabsorção. O Sr se caracteriza como ativador da osteogênese, pois tem a particularidade de atuar tanto sobre as células de reabsorção, como em células de formação óssea (FIGURA 3). Assim, tem-se mostrado como um indutor de replicação de preosteoblastos e da função dos osteoblastos maduros e aumentar a síntese da matriz óssea.⁴⁹

O ranelato de estrôncio possui um duplo mecanismo de ação, ativando a formação óssea e diminuindo a reabsorção óssea. Os bisfosfonatos produzem uma diminuição significativa na remodelação óssea, e o ranelato de estrôncio aumenta a formação óssea e diminui a reabsorção óssea.⁵⁰

Os osteoblastos e adipócitos são derivados a partir das mesmas células estaminais mesenquimais na medula óssea. O Sr age sobre o comprometimento e a diferenciação dessas células, ativando osteoblastogênese e inibindo a adipogênese como evidenciado pela inibição de genes característicos da diferenciação adipogênica: PPAR-gama, C / EBP α e LPL (lipoproteína lipase)^{51,52,53} (FIGURA 4).

Figura 4 - Mecanismo de ação do estrôncio



Fonte: Adaptado de Fournier et al., 2012, p. 502.

3.3 O tecido ósseo

O tecido ósseo cresce continuamente, remodelando-se e reparando-se. Contribui para a homeostase do corpo, fornecendo suporte e proteção, produzindo células sanguíneas e armazenando minerais e triglicerídeos. O osso é composto de vários tecidos diferentes trabalhando em conjunto: tecido ósseo, cartilagem, tecido conjuntivo denso, epitélio, tecido adiposo e tecido nervoso. Por esse motivo, cada osso, individualmente em seu corpo, é considerado um órgão. O tecido ósseo, um tecido vivo complexo e dinâmico, envolve-se continuamente no processo de remodelação — construção de tecido ósseo novo e quebra de tecido ósseo antigo —

compõe cerca de 18% do peso do corpo humano e armazena vários minerais, especialmente cálcio (cerca de 99%) e fósforo, que contribuem para a força do osso.

Em uma descrição do osso do seu aspecto macroscópico ao microscópico devem ser nomeados o tecido compacto e o tecido esponjoso.⁵⁴ (FIGURA 5).

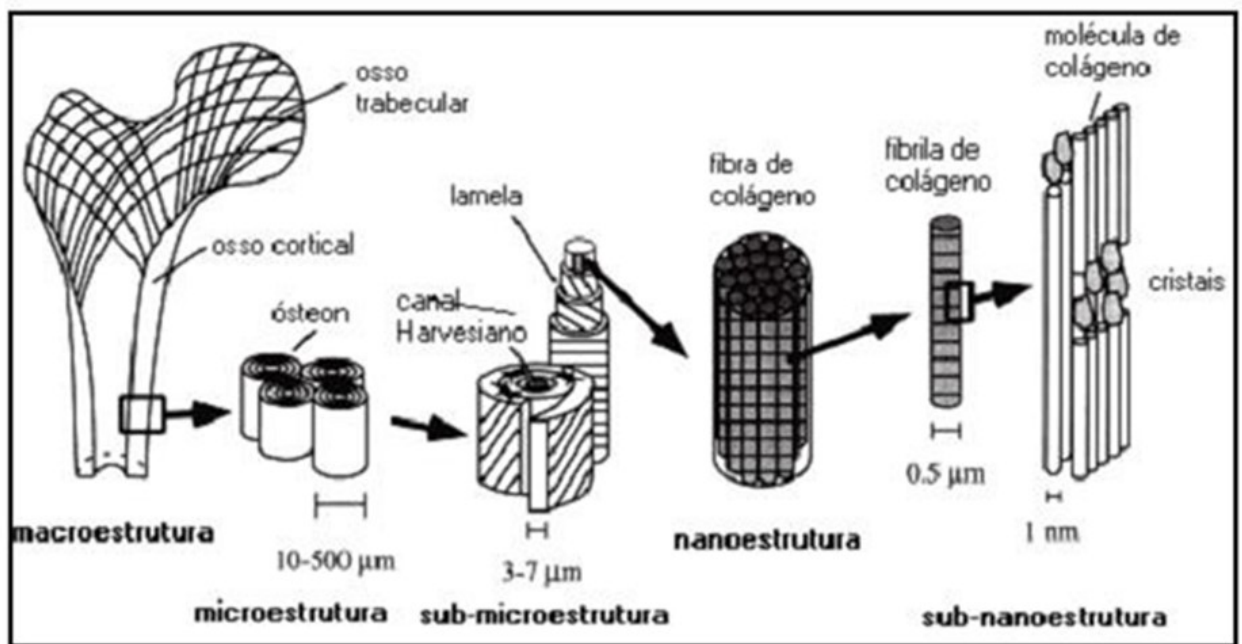
O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado mineralizado, dinâmico, formado por uma parte orgânica e outra parte mineral, que lhe conferem características importantes para cumprir com suas funções de proteção, locomoção e de armazenamento de íons importantes para a homeostase.^{55,56}

A fase mineral, formada especialmente por hidroxiapatita, contribui para o aumento de sua resistência mecânica, enquanto a fase orgânica, formada sobretudo por células e colágeno tipo I, é responsável pela manutenção de sua vitalidade e por sua plasticidade.^{55,56,57}

A remodelação e a regeneração óssea ocorrem de forma ativa durante toda a vida do indivíduo e são dependentes da diferenciação de células mesenquimais para a formação dos osteoblastos, encarregados de sintetizar e secretar a matriz osteoide. A regulação destes processos é mediada por uma sequência de sinais moleculares geneticamente controlados, porém influenciados pelo meio.^{57,58}

Quando os osteoblastos ficam aprisionados no interior desta matriz, passam a ser denominados de osteócitos. Estas células ocupam as lacunas do tecido ósseo e, por intermédio de prolongamentos citoplasmáticos nos canalículos ósseos, são capazes de responder à transmissão de estímulos internos e externos, e desencadear uma cascata de sinalização que irá resultar em reabsorção ou neoformação óssea.^{57,59}

Figura 5 - Estrutura hierárquica do osso demonstrando os níveis



Fonte: Rho, Kuhn-Spearing, Zioupos, 1998, p. 4.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1

**Avaliação histomorfológica
após administração sistêmica de estrôncio em órgãos de ratos**

Guillermo Alberto López¹, Rita Weste Nano², Alexandre Malta Rossi³,
Aryon de Almeida Barbosa Junior⁴, Iorrana Indira dos Santos⁵, Fabiana Paim Rosa⁶

¹Mestre em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Professor do Departamento de Tecnologia em Saúde e Biologia (DTSBio), Instituto Federal da Bahia (IFBA); ²Doutora em Química, Professora do Departamento de Química do Instituto Federal da Bahia (IFBA); ³Doutor em Física da Matéria Condensada, Coordenador dos Laboratórios de Biomateriais e de Cultura Celular e Nanotoxicidade, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF); ⁴Doutor em Medicina, Médico Patologista do Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC); ⁵Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas (LBTB-ICS-UFBA); ⁶Doutora em Odontologia, Coordenadora do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Resumo

Introdução: O Estrôncio (Sr) em grande parte se localiza no osso. Doses relativamente elevadas de Sr causaram uma redução na mineralização óssea. O objetivo deste estudo tem como finalidade avaliar histologicamente alterações que podem ser provocadas pela administração sistêmica de Sr. Material e Métodos Foram utilizados ratos do tipo Wistar entre 380 e 480 gramas, separados em grupos: Protos 1, (GP1), Protos 2 (GP2), Fármaco (GF) e Controle (GC), com seus respectivos pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias. Os resultados obtidos foram no Grupo Protos (GP 1), com administração do biomaterial de forma sistêmica durante 15 dias no fígado: se encontraram congestão centrolobular discreta, peliose, congestão de sinusoides, microesteatose, variação anisocariose, mobilização das células sinusoidais, áreas de necrose hepatocelular. No Grupo GP 2 (Grupo Protos 2), com administração do biomaterial de forma sistêmica durante todos os dias, no fígado tiveram congestão centrolobular discreta. No órgão rim, nefrite. No grupo GF, (Grupo Fármaco) ponto biológico de 15, 30 e 60 dias, com administração do biomaterial de forma sistêmica durante 15 dias, foram obtidos os seguintes resultados: No órgão fígado observou-se alterações com apresentações de arquitetura hepática preservada, congestão sinusoidal, necrose hepato-celular isolada, mobilização das células sinusoidais, discreto infiltrado inflamatório morfonuclear nos espaços porta, células de Kupffer em mobilização e peliose. No órgão rim observou-se acúmulos focais de morfonucleares na região cortical, infiltrado inflamatório glomerular e acúmulo focal de infiltrado na região cortical e nefrite intersticial. No GC, (Grupo Controle) os resultados foram sem particularidades. Os achados encontrados nesse estudo possibilitaram uma

avaliação do comportamento do Sr em nível sistêmico com suporte das análises histológicas. Após estes resultados, concluímos que a administração de Sr de forma sistêmica em ratos durante 60 dias, pode proporcionar alterações em fígado e rim a nível histológico.

Palavras-chave: Biomaterial. Estrôncio. Histologia

ABSTRACT

Introduction: Strontium (Sr) is largely located in the bone. Relatively high doses of Sr caused a reduction in bone mineralization. The objective of this study was to evaluate histologically changes that can be caused by the systemic administration of MATERIALS AND METHODS Wistar rats between 380 and 480 grams were used, separated into groups: Protos 1, (GP1), Protos 2 (GP2), Drug (GF) and Control (GC), with their respective biological points of 15, 30 and 60 days. The results were obtained in the Protos Group (GP 1), with systemic administration of the biomaterial

for 15 days in the liver: discrete centrilobular congestion, peliosis, sinusoid congestion, microasatosis, anisocariasis variation, mobilization of sinusoidal cells, areas of necrosis hepatocellular. In Group GP 2 (Protos 2 Group), with administration of the biomaterial in a systemic way during the day, in the liver they had discrete centrilobular congestion. In the kidney organ, nephritis. In the GF group, the biological point of 15, 30 and 60 days, with administration of the biomaterial in a systemic way for 15 days, the following results were obtained: In the liver organ it was observed alterations with presentations of preserved hepatic architecture, congestion sinusoidal, isolated hepato-cellular necrosis, mobilization of sinusoidal cells, discrete morpho-nuclear inflammatory infiltrate in portal spaces, Kuppfer cells in mobilization and peliosis. In the kidney organ were focal accumulations of morphonuclear cortical region, inflammatory glomerular infiltrate and focal accumulation of infiltrate in the cortical region and interstitial nephritis. In GC (Control Group) the results were without particularities. The findings found in this study allowed an evaluation of the behavior of the SR at the systemic level supported by the histological analyzes. After these results, we conclude that the administration of Sr systemically in rats for 60 days can provide liver and kidney changes at histologic level.

Keywords: Biomaterial. Strontium. Histology.

4.2 INTRODUÇÃO

O termo biomaterial é utilizado para indicar qualquer substância ou mistura de substâncias, naturais ou não, usadas em aplicações biomédicas, tais como partes de implantes médicos ou próteses, que interagem com os sistemas biológicos, com o objetivo de tratar, expandir ou substituir quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo. Os biomateriais de origem natural podem ser obtidos a partir de diversos organismos, desde bactérias a mamíferos, como por exemplo, alginato, colágenos, algas, quitosana e ácido hialurônico. Os biomateriais de origem sintética têm a sua origem essencialmente no petróleo ou em misturas de vários compostos químicos,

como exemplo, carbonatos de cálcio, fosfatos de cálcio, ácidos poli lácticos e poli glicólicos.

Os requisitos gerais dos biomateriais para aplicações médicas são: biocompatibilidade, facilidade de obtenção, elevada variedade de materiais disponíveis, a densidade dos materiais usados é próxima dos meios biológicos e a esterilidade. Entre estes requisitos, a biocompatibilidade é fundamental, porque um biomaterial não deve reagir com os tecidos, não deve sofrer desgaste ou corrosão, não deve ser carcinogênico, não pode ser tóxico e deve provocar o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias.¹

A hidroxiapatita (HA) é um dos cerâmicos mais utilizados na regeneração óssea, apresenta excelente biocompatibilidade e bioatividade, sendo capaz de se ligar quimicamente ao osso, tendo, porém, pouca resistência e, por isso, se complementa com outros minerais como, por exemplo, o estrôncio.²

O estrôncio (Sr) é um metal da terra dos elementos alcalinos terrosos e assemelha-se, em grande parte, ao cálcio (Ca), estando 99% da carga corporal total de Sr localizada no osso.³

Sintomas tóxicos em decorrência de superdosagem de Sr não foram relatados no homem, contudo, a administração intravenosa de altas doses induz hipocalcemia consequente ao aumento da excreção renal de Ca.⁴

Quando o estrôncio é ingerido por via oral, a porção que não passa pela parede intestinal para entrar na corrente sanguínea é eliminada nas fezes.³

Doses relativamente elevadas de estrôncio (≥ 500 mg / kg / dia) podem causar redução na mineralização óssea e alteração na composição química da matriz óssea orgânica em ratos. Além disso, as zonas hipertróficas das placas de crescimento epifisário dos ossos longos tornam-se anormalmente profundas e largas, por não ter ocorrido a calcificação. Os efeitos mais consistentes da exposição por via oral ao estrôncio estável em excesso são raquitismo (diminuição da calcificação da cartilagem) e osteomalácia (diminuição da mineralização óssea), especialmente em ratos jovens.⁴

Sabe-se que os efeitos esqueléticos do estrôncio estão relacionados com a sua similaridade química com o cálcio e com a supressão do metabolismo da vitamina D e da absorção intestinal de cálcio.^{5,6}

O objetivo deste trabalho tem como finalidade analisar histologicamente órgãos de rato para avaliar prováveis alterações celulares devido ao depósito de Sr.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar, com peso aproximado entre 350 e 480 gramas, e a amostra, constituída de 60 animais, foi distribuída para a composição de quatro grupos, com 15 animais em cada um deles: grupo I (GP 1), cujos defeitos foram preenchidos apenas por coágulo sanguíneo, tendo sido ofertado o medicamento Protos® durante 15 dias nos subgrupos de 15, 30 e 60 dias; grupo II (GP 2) defeitos preenchidos apenas por coágulo sanguíneo e ofertado o medicamento Protos® todos os dias em cada um dos três subgrupos; grupo III (GF), defeitos preenchidos apenas por coágulo sanguíneo e foram ofertadas microesferas de hidroxiapatita dopadas com estrôncio e alginato [HASr-Alg] durante 15 dias nos subgrupos de 15, 30 e 60 dias; e grupo controle (GC), defeitos foram preenchidos apenas por coágulo sanguíneo, tendo sido unicamente ofertada ração. Esses dados se reúnem na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos de ratos e seus pontos biológicos em dias

Ponto biológico \ Grupo	GI GP 1	GII GP 2	GIII GF	GIV GC	Total
15	5	5	5	5	20
30	5	5	5	5	20
60	5	5	5	5	20
Total	15	15	15	15	60

Fonte: Dados da pesquisa.

Inicialmente, para síntese do compósito HASr-Alg, foi sintetizado o fosfato de cálcio em pós nanométricos com cristais de dimensões inferiores a 10 nm, por meio

de rotas de precipitação em via úmida, ácida e alcalina, com controle dos parâmetros de preparação: concentração dos reagentes, temperatura de precipitação e digestão, pH, velocidade de adição dos reagentes, velocidade de agitação do meio reacional, tempo de digestão. O pó de nanoHA obtido foi submetido a um processo de desaglomeração mediante tratamento com ultrassom de alta potência e material desaglomerante com condições controladas de pH. Para a formação das esferas de nanoHA e alginato, essa mistura foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio, com a formação de esferas com diâmetros entre 1.000 e 2.000 μm , que foram lavadas em água destilada e secas. Posteriormente, adicionou-se nitrato de estrôncio $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, na concentração de 50%. A síntese e as caracterizações desse compósito foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas no Rio de Janeiro (CBPF/RJ).

O fármaco, ranelato de estrôncio, foi incorporado à dieta com ração pastosa, na proporção de 900 mg/Kg/dia/rato, conforme protocolo modificado a partir do descrito por Ammann et al.² Como os animais apresentavam peso médio de 375 g, calculou-se uma dose média de 337,5 mg de ranelato de estrôncio anidro, que correspondeu à dose diária de 675 mg de pó do Protos® fracionada em tubos plásticos. A administração do fármaco por via oral na dieta iniciou-se no segundo dia do pós-operatório, estendendo-se até o período dos respectivos pontos biológicos. Uma porção da ração sólida (aproximadamente 8 g) foi triturada e misturada com 5 mL de água filtrada para formar dieta pastosa, à qual se acrescentou a dose diária do ranelato de estrôncio.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em caixas plásticas identificadas conforme o grupo e o ponto biológico, autoclavadas, forradas com maravalha de pinus autoclavada e trocada diariamente. Na ficha de identificação, ainda constavam a massa corporal do animal, a data da cirurgia e do sacrifício e o nome do pesquisador.

Os animais foram alimentados com ração sólida e água *ad libitum*, mantidos em condições ambientais adequadas de temperatura e luminosidade.

Para confecção do defeito ósseo crítico, com aproximadamente 8,5 mm de diâmetro, na porção mediana da calvária, utilizou-se fresa trefina acoplada a um motor cirúrgico para implantes com rotação de 1500RPM, torque de 55 N/cm, sob constante irrigação com solução fisiológica estéril e o fragmento foi removido, juntamente com a dura-máter, e o defeito preenchidos por coágulo.

Após os pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados com a dose letal do anestésico, e os órgãos fígado e rim direito foram removidos e separados da forma que segue.

O fígado foi seccionado em corte axial, em sentido látero-medial para separar a parte superior e a inferior. O fragmento superior foi colocado em frasco estéril em formol tamponado a 4%, durante 48 horas, e o fragmento inferior foi inserido em frasco estéril congelado a -35°C .

O rim direito foi seccionado em corte axial, em sentido látero-medial, para separar a parte superior e a inferior. O fragmento superior foi colocado em frasco estéril em formol tamponado a 4%, durante 48 horas, e o fragmento inferior foi inserido em frasco estéril congelado a -35°C .

Os espécimes obtidos foram avaliados macroscopicamente e colocados em recipientes plásticos identificados, contendo solução de formol tamponado a 4% para fixação durante 48 horas. No Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC), Salvador, Bahia, procedeu-se ao processamento desses espécimes em um processador automático de tecido (Leica®-Alemanha), utilizando-se a sequência de álcool em diferentes concentrações, xilol e parafina.

Subsequentemente, foi realizada a inclusão das amostras em blocos de parafina, as lâminas foram previamente lavadas com detergente neutro, água destilada, solução de ácido clorídrico (1 N), solução de álcool absoluto e ácido acético na proporção de 3:1. Em seguida, foram previamente silanizadas, de maneira sequencial, em solução de organosilano a 2% diluído em acetona pura e, por último, lavadas com água destilada. Os cortes histológicos seriados de 5 μm de espessura, realizados em micrótomo (Leica®-Heilderberg-Alemanha) e navalha específica para parafina, foram dispostos nessas lâminas e corados por hematoxilina e eosina. As imagens foram obtidas por meio de uma câmera de vídeo digital (Leica DFC310 FX; Resolução 1392 x 1040 *pixels* -1,4 Mpixels-LEICA® - Heerbrugg-Suíça), acoplada a um microscópio de luz polarizada (Leica DM100, LEICA® - Alemanha), utilizada para captura das imagens no sistema de análise de processamento de imagens (Software Leica QWin Plus, 2011, LEICA® - Alemanha), calibrada com 1 *pixel* = 2,46 μm e *zoom* de 0,56x.

Foi realizado o teste exato de Fisher para verificar se as amostras diferiam entre si, comparando-se as proporções das unidades amostrais nos grupos.

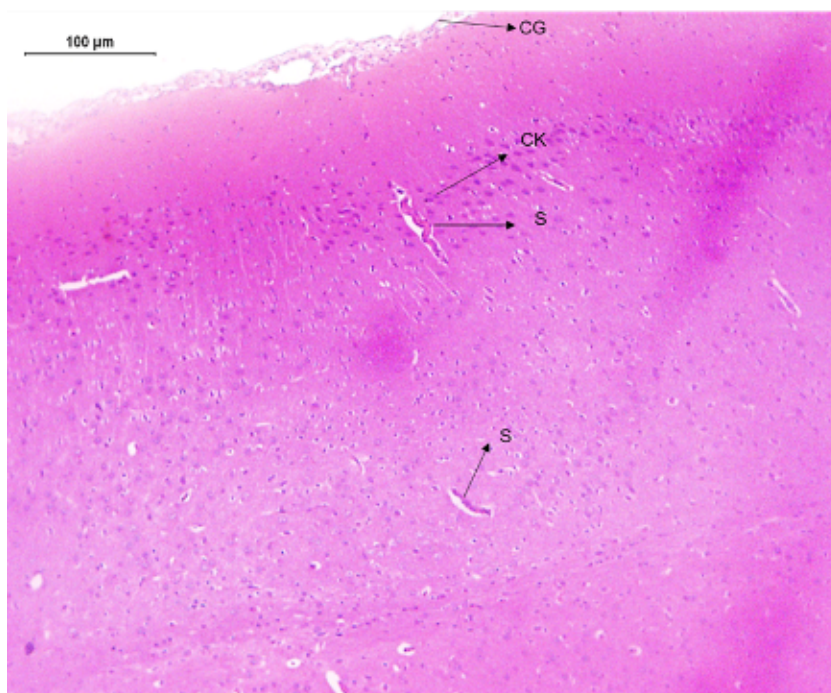
4.4 RESULTADOS

Dos resultados histológicos do grupo Protos 1 (GP 1) nos pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, com administração do biomaterial em forma sistêmica durante 15 dias, obtiveram-se os resultados descritos a seguir.

No órgão pele, não se registraram alterações, conforme esperado, por consequência do preenchimento do defeito ósseo apenas por coágulo; uma única amostra do subgrupo de 60 dias apresentou alteração com proliferação de fibrose dérmica relacionada com um ponto de sutura e, no subgrupo de 30 dias, apenas uma apresentou exulceração com crostícula, devido ao comportamento dos roedores de raspar a cabeça com as patas na área em que foi realizado o defeito ósseo.

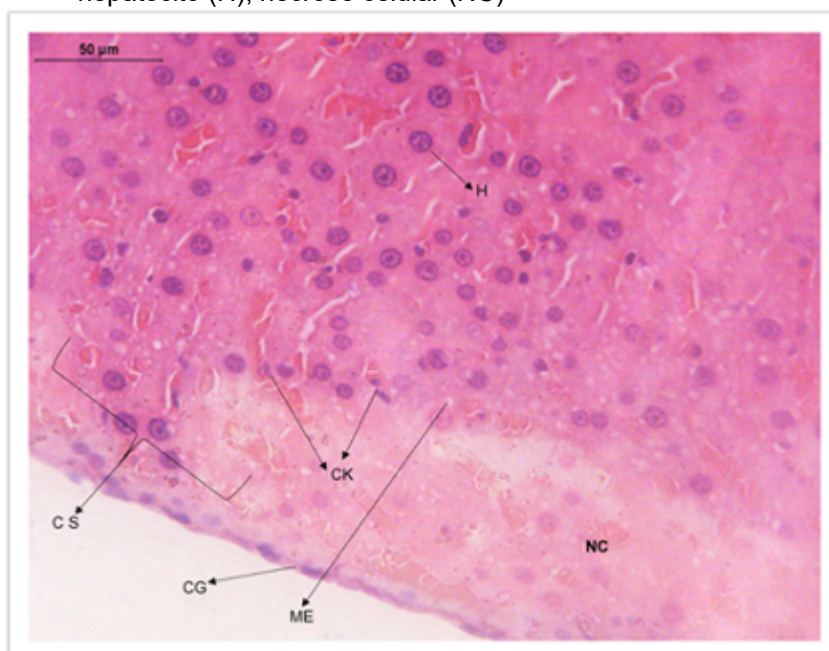
No órgão fígado do subgrupo de 60 dias, observaram-se alterações em todas as amostras, apresentando-se congestão de sinusoides, microesteatose (gordura), congestão geral do fígado, congestão centrolobular, variação anisocariose (variação dos núcleos dos hepatócitos), mobilização das células sinusoidais, áreas de necrose hepatocelular (FIGURAS 1 a 4). No subgrupo de 30 dias, somente uma amostra demonstrou congestão centrolobular discreta. No subgrupo de 15 dias, três amostras tiveram congestão centrolobular discreta, e uma amostra, peliose.

Figura 1 - Fígado do GP 1 aos 60 dias, destacando-se sinusoide (S), cápsula de Glisson, fibras colágenas revestidas pelo peritônio (CG), células de Kupffer (CK)



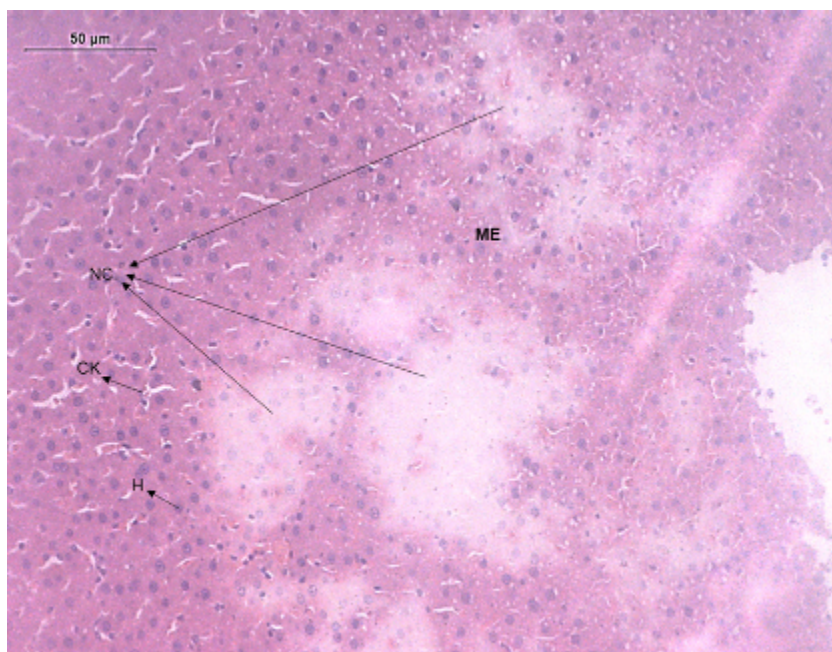
Fonte: Aatoria própria.

Figura 2 - Fígado do GP 1 aos 60 dias, destacando-se cápsula de Glisson (CG), microesteatose (ME), congestão de sinusoides (CS), células de Kupffer (CK), hepatócito (H), necrose celular (NC)



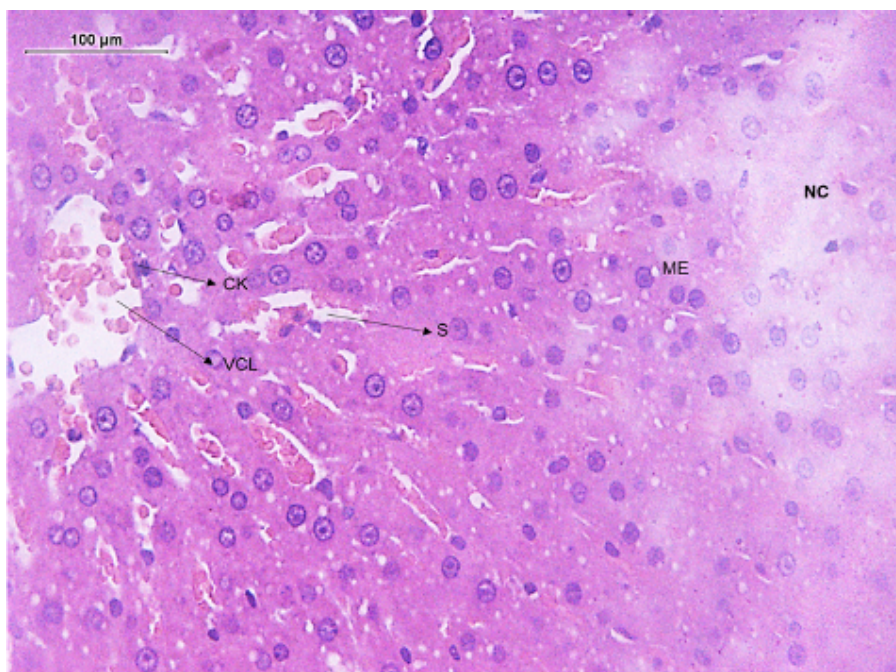
Fonte: Aatoria própria.

Figura 3 - Fígado do GP 1 aos 60 dias, destacando-se cápsula de Glisson (CG), microesteatose (ME), congestão de sinusoides (CS), células de Kupffer (CK), hepatócito (H), necrose celular (NC)



Fonte: Autoria própria.

Figura 4 - Fígado do GP 1 aos 60 dias, destacando-se veia central lobular (VCL), célula de Kupffer (CK), sinusoide (S), microesteatose (M), necrose celular (NC)

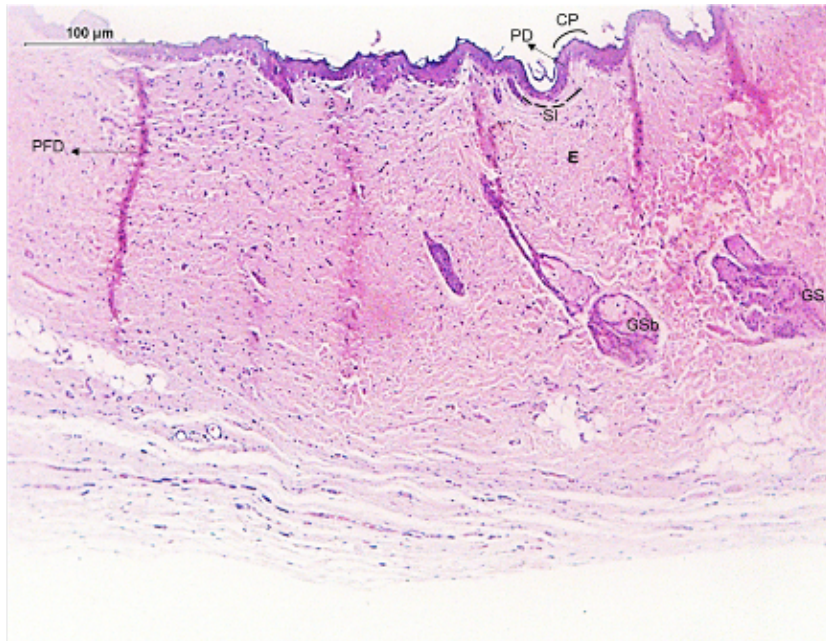


Fonte: Autoria própria.

No órgão pele, somente uma amostra no subgrupo de 30 dias teve exulceração com crostícula (FIGURAS 5 e 6).

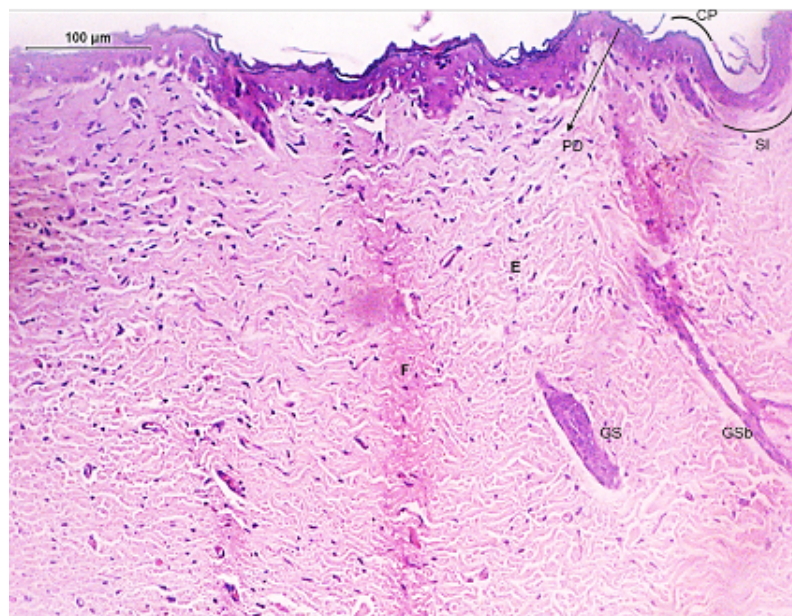
Figura 5 - Pele do GP1 aos 60 dias, destacando-se proliferação de fibrose dérmica (PFD), papila dérmica (PD),

crista papilar (CP), sulco interpapilar (SI), epiderme (E), glândula sebácea (GSb), glândula sudorípara (GS)



Fonte: Autoria própria

Figura 6 - Pele do GP1 aos 60 dias, destacando-se crista papilar (CP), sulco interpapilar (SI), papila dérmica (PD), epiderme (E), fibrose (F), glândula sudorípara (GS), glândula sebácea (GSb)



Fonte: Autoria própria

No grupo Protos 2 (GP 2) com pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, com administração do biomaterial de forma sistêmica durante todos os dias, obtiveram-se os resultados descritos a seguir.

Em relação ao fígado, no subgrupo de 15 dias, duas amostras tiveram congestão centrolobular discreta, e três não apresentaram alterações; nos subgrupos de 30 e 60 dias, uma amostra de cada subgrupo demonstrou congestão centrolobular discreta.

No órgão rim, uma amostra do subgrupo de 30 dias teve nefrite.

No órgão pele, três amostras tiveram exulceração com crostícula no subgrupo de 30 dias.

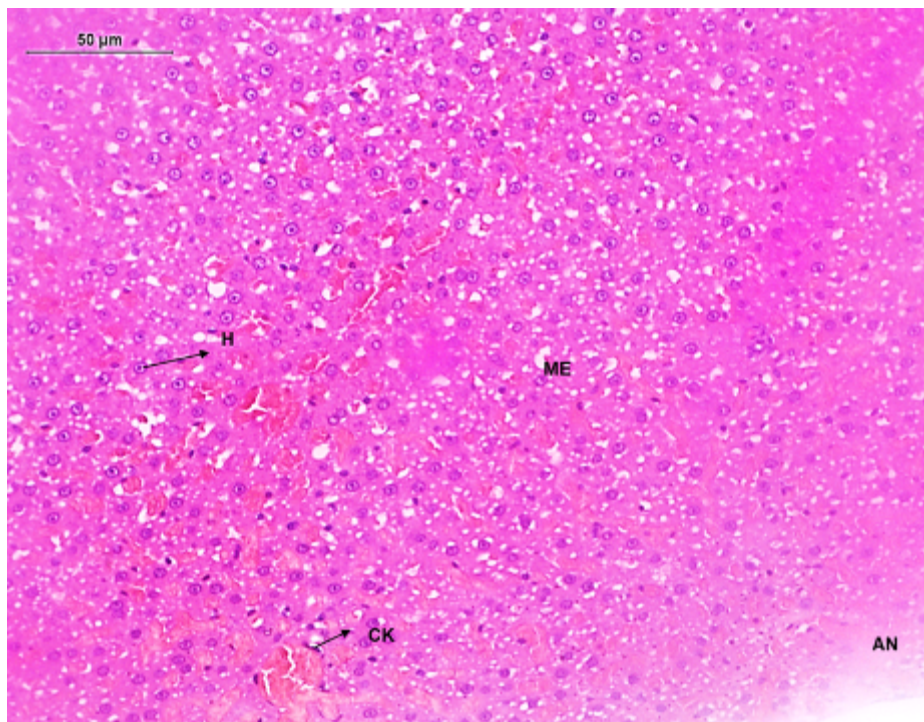
No órgão cérebro, nos três subgrupos, os resultados não apresentaram alterações.

No Grupo Fármaco (GF), com pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, com administração do biomaterial de forma sistêmica durante 15 dias, foram obtidos os seguintes resultados.

No órgão pele dos três subgrupos, os resultados foram, sem alterações, conforme esperado; apenas uma amostra apresentou alteração com área de fibrose dérmica no subgrupo de 60 dias; e, no de 15 dias, constataram-se fibrose dérmica em duas amostras e exulceração com crostícula em uma amostra.

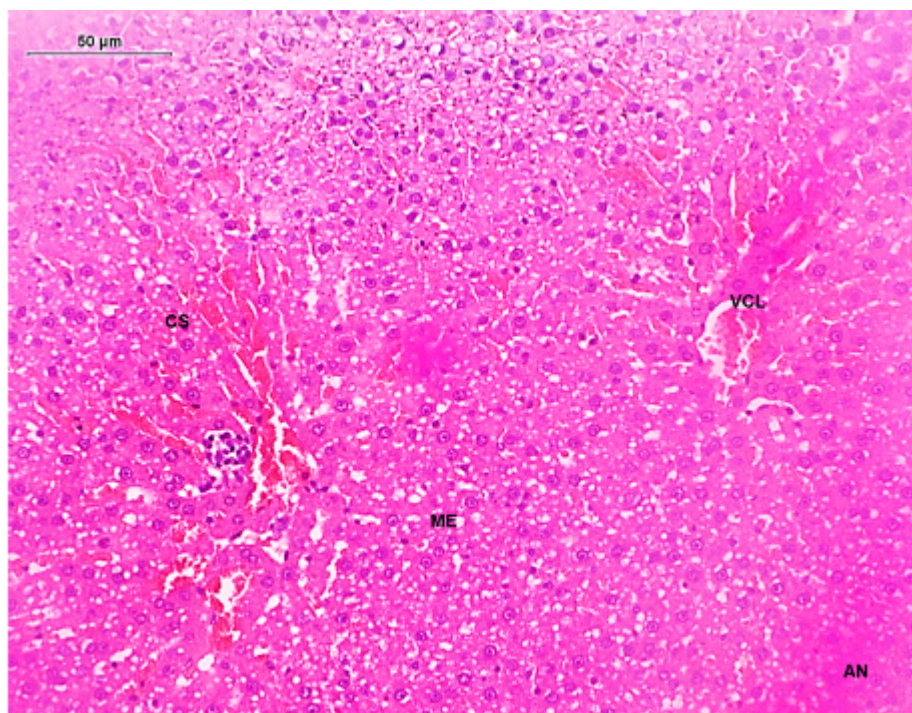
No órgão fígado do subgrupo de 60 dias, observaram-se alterações em todas as amostras com apresentação de arquitetura hepática preservada, congestão sinusoidal, necrose hepatocelular isolada, mobilização das células sinusoidais, discreto infiltrado inflamatório morfonuclear nos espaços porta, células de Kupffer em mobilização (FIGURAS 7 a 18) no subgrupo de 15 dias, constataram-se três amostras com congestão sinusoidal, uma com infiltrado inflamatório morfonuclear e quatro com peliose; e, no subgrupo de 30 dias, cinco amostras apresentaram congestão centrolobular.

Figura 7 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se hepatócito (H), célula e Kupffer (CK), área de necrose (NA), microesteatose (ME)



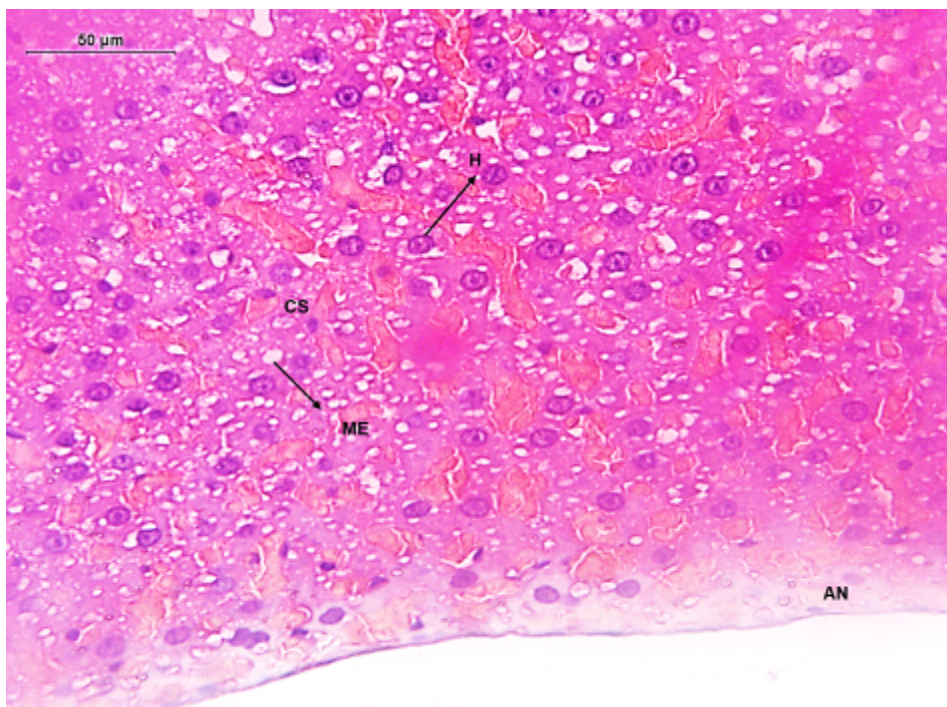
Fonte: Autoria própria

Figura 8 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se congestão de sinusoides (CS), veia central lobular (VCL), área de necrose (NA), microesteatose (ME)



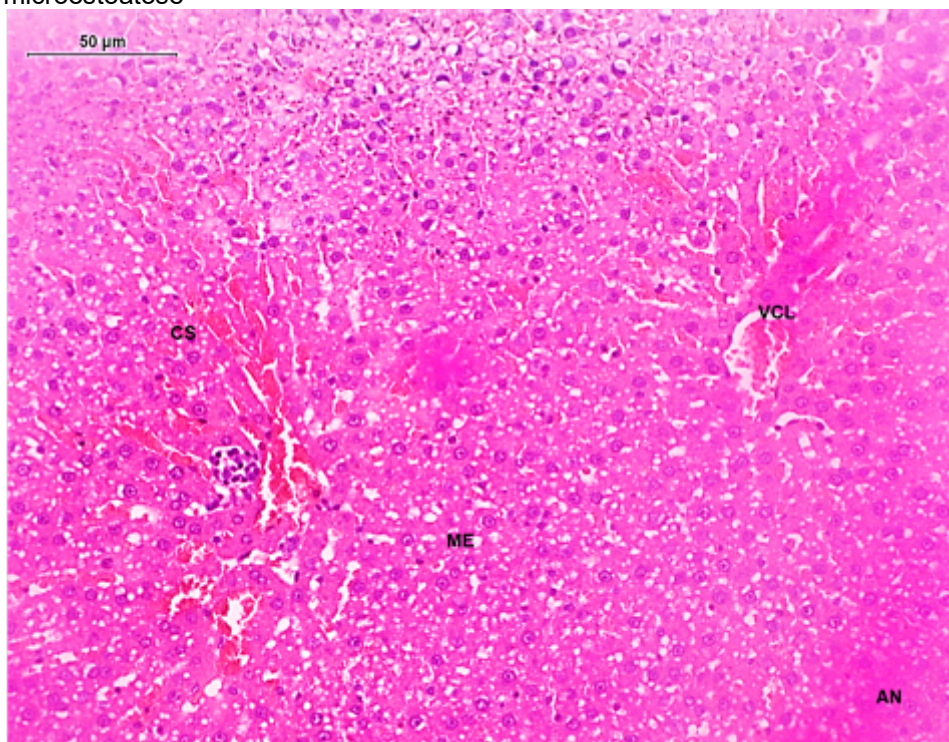
Fonte: Autoria própria.

Figura 9 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se congestão sinusoidal (CS), área de necrose (AN), microesteatose (ME)



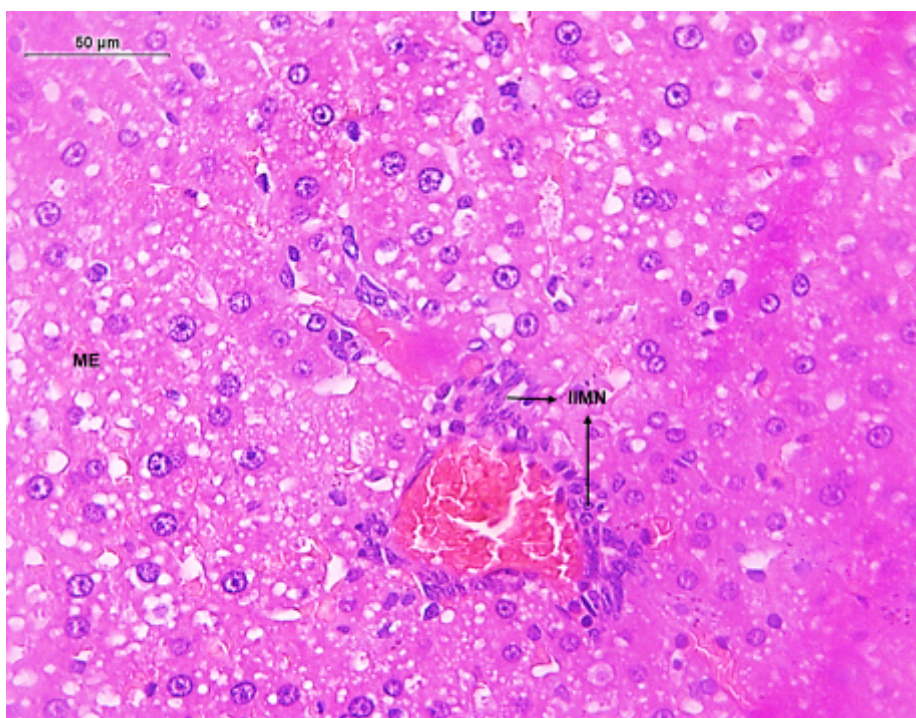
Fonte: Autoria própria.

Figura 10 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se congestão sinusoidal (CS), veia central lobular (VCL), área de necrose (AN), microesteatose



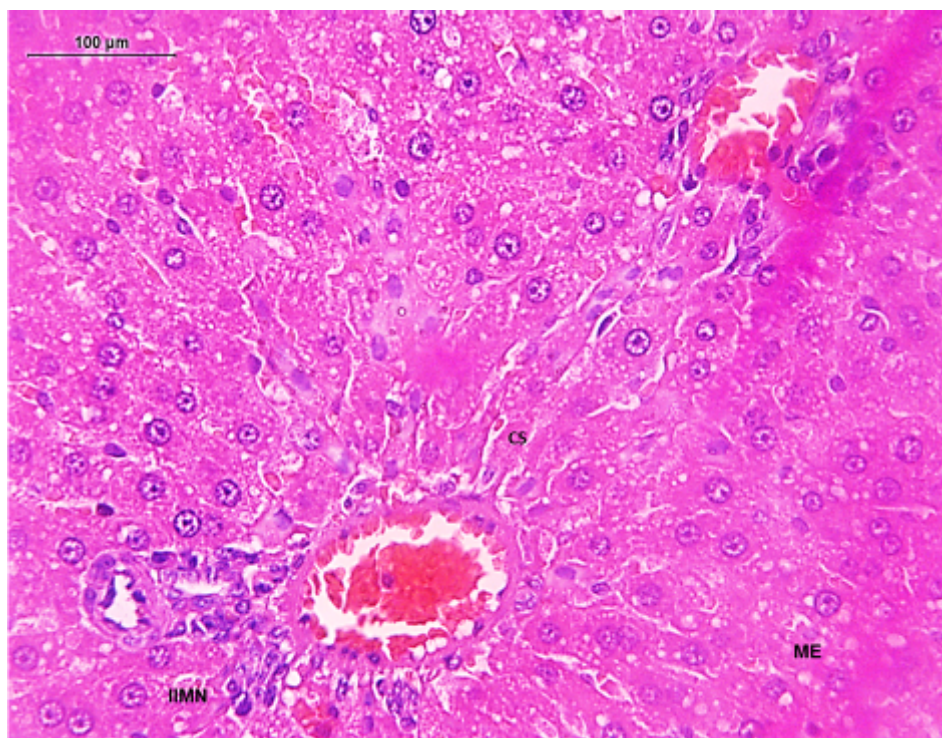
Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se infiltrado inflamatório morfonuclear, microesteatose (ME)



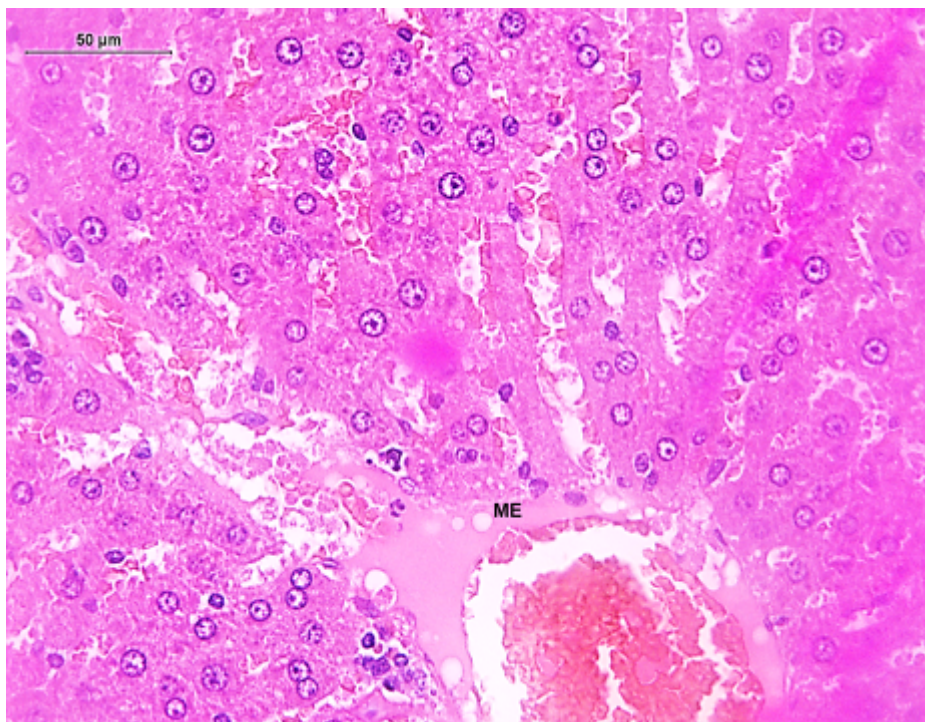
Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se infiltrado inflamatório morfonuclear, congestão sinusoidal (CS), microesteatose (ME)



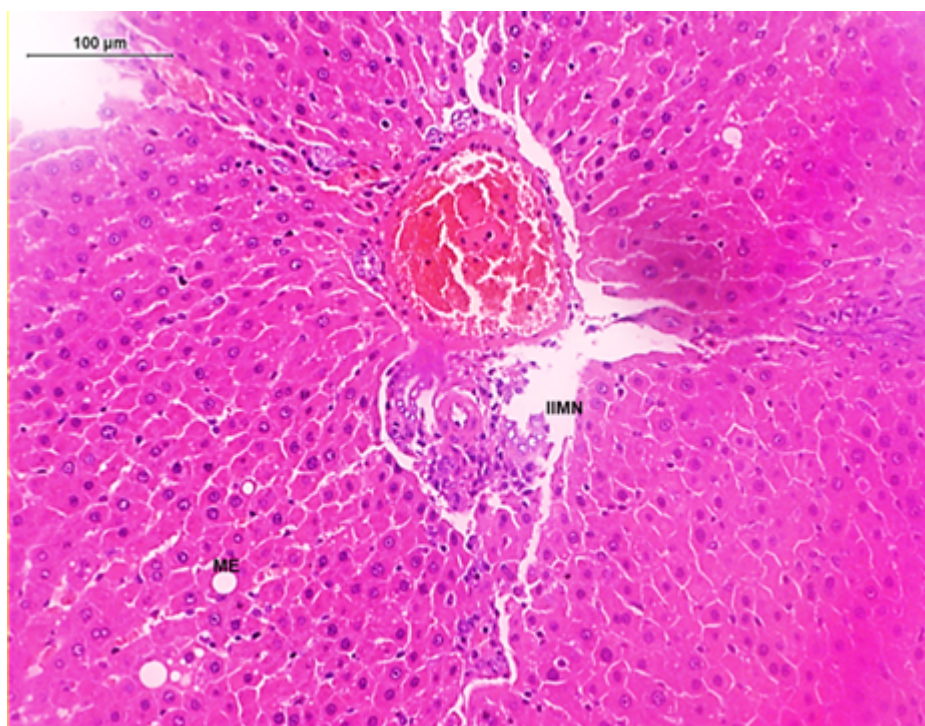
Fonte: Autoria própria.

Figura 13 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se microesteatose (ME)



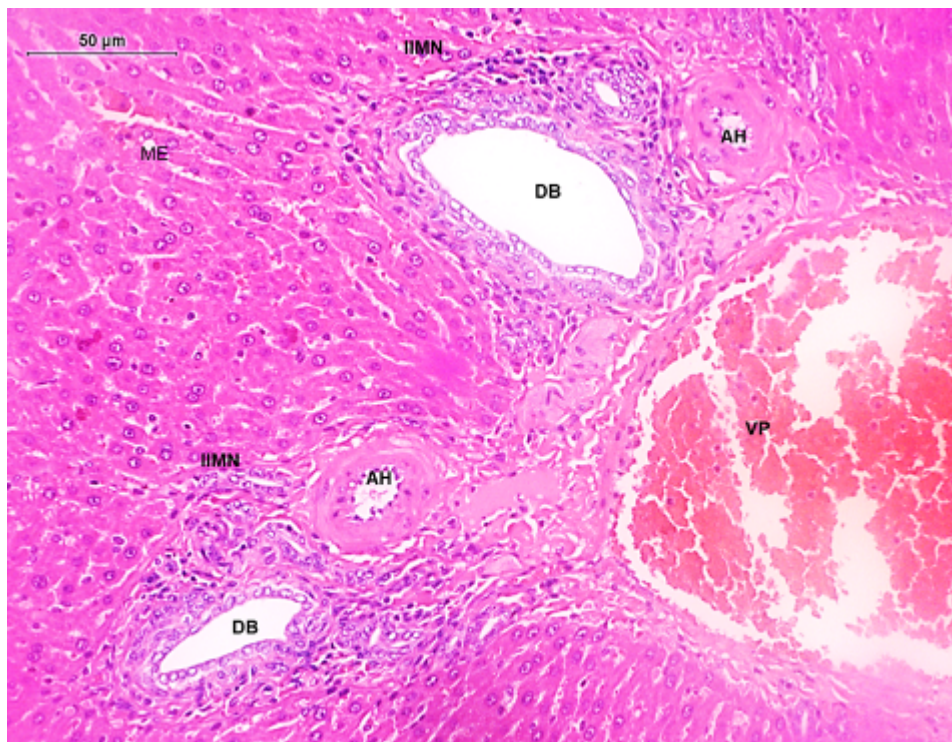
Fonte: Autoria própria

Figura 14 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se infiltrado inflamatório morfonuclear no espaço porta (IIMN), microesteatose (ME)



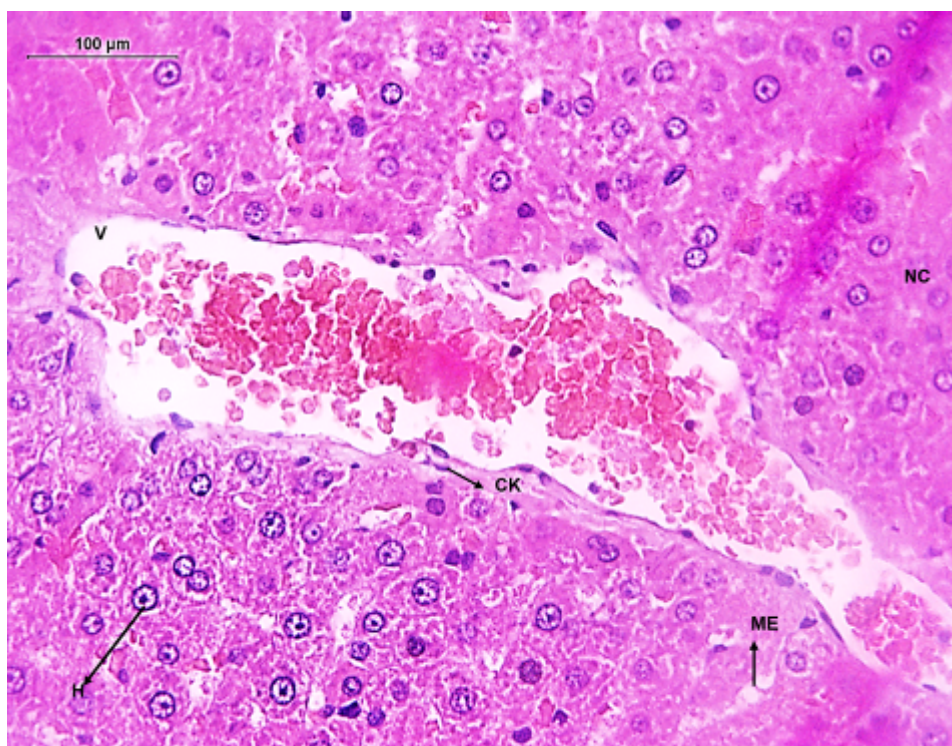
Fonte: Autoria própria

Figura 15 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se microesteatose (ME), infiltrado morfonuclear (IMN), ducto biliar (DB), artéria hepática (AH), veia porta (VP)



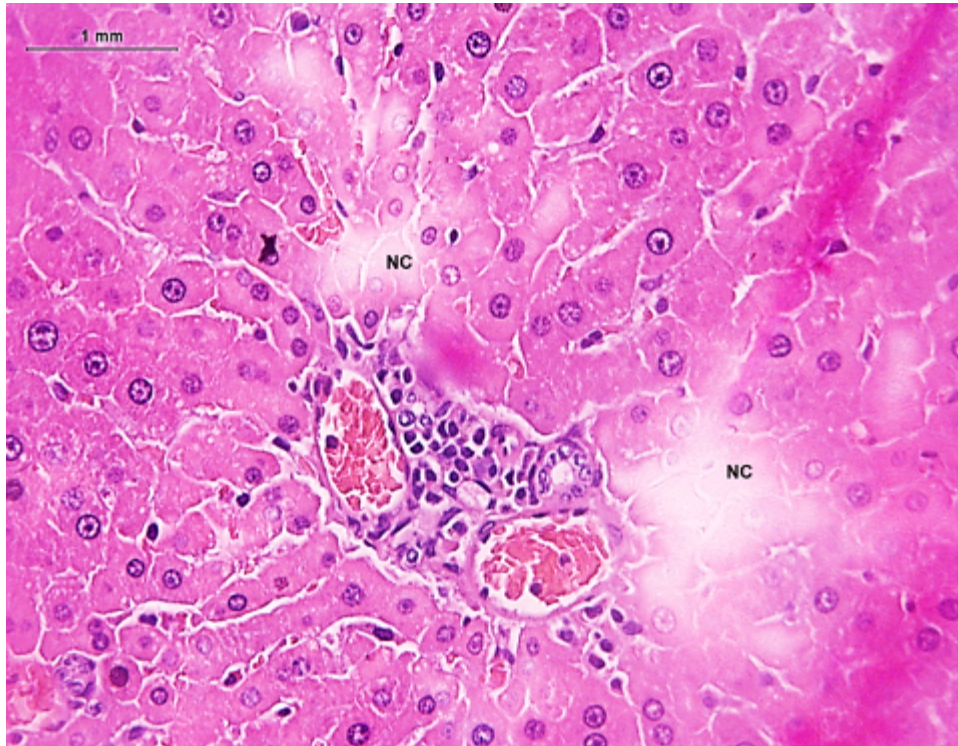
Fonte: Autoria própria

Figura 16 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se vaso (V), necrose celular (NC), célula de Kupffer (CK), hepatócito (H), microesteatose (ME)



Fonte: Autoria própria.

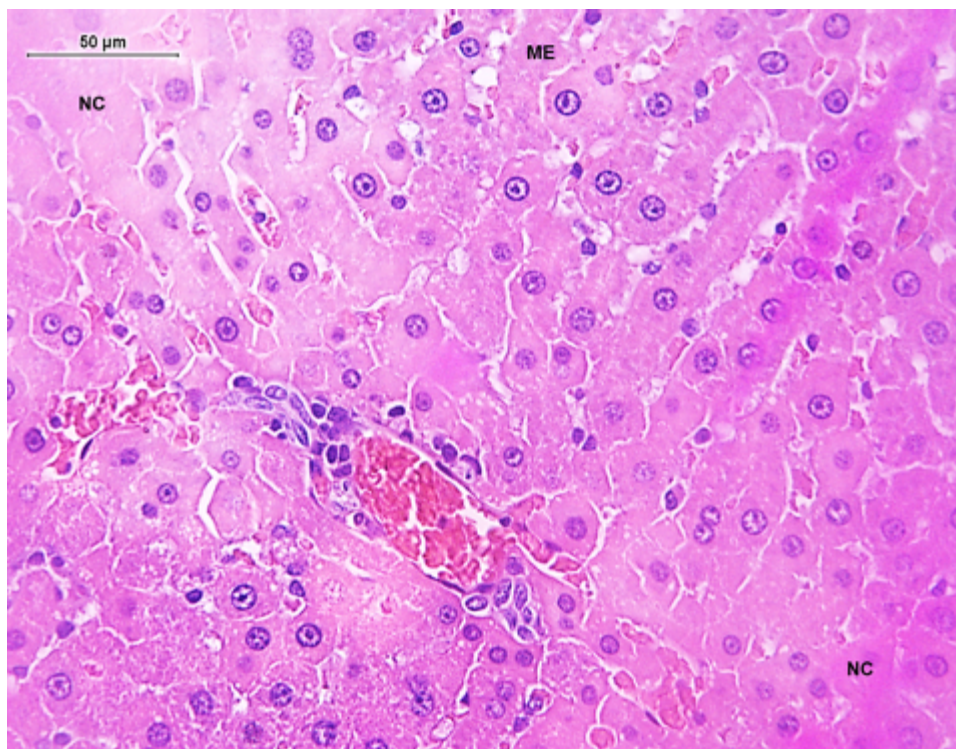
Figura 17 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se necrose celular



Fonte: Autoria própria.

Celular

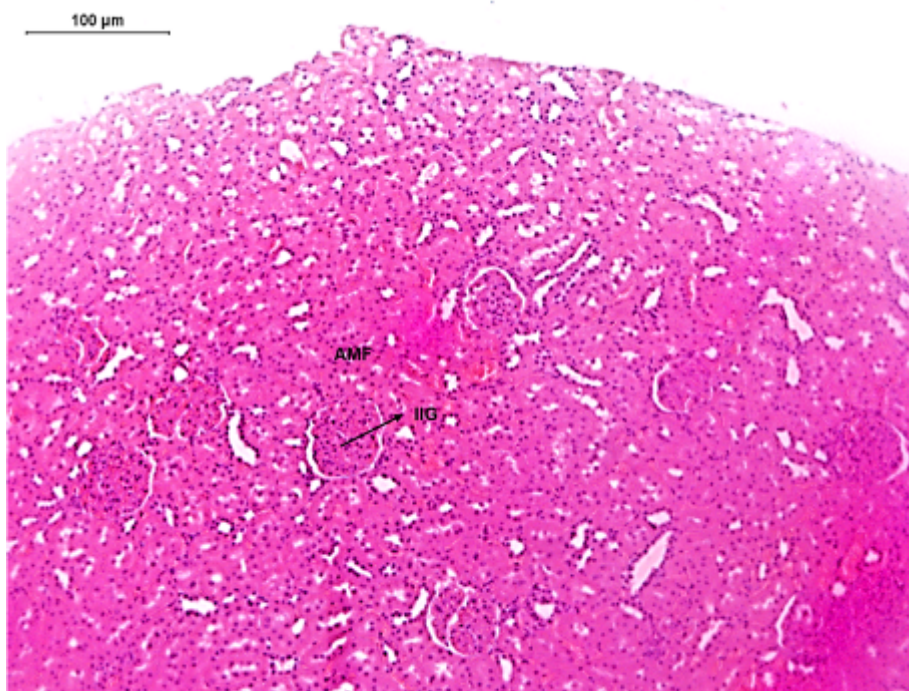
Figura 18 - Fígado do GF aos 60 dias, destacando-se necrose celular (NC), microesteatose (ME)



Fonte: Autoria própria.

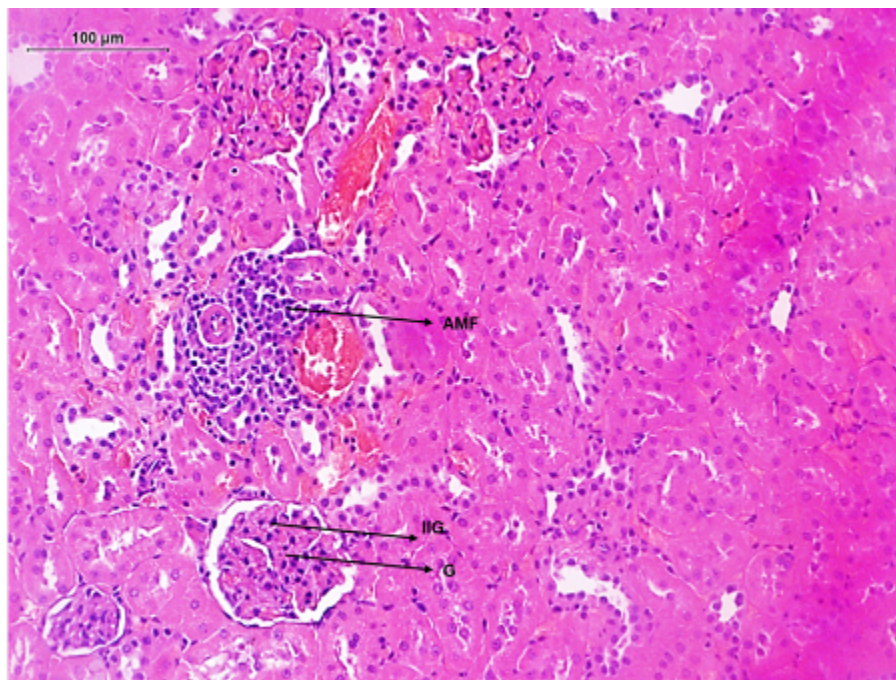
No órgão rim do subgrupo de 60 dias, observaram-se acúmulos focais de morfonucleares na região cortical, infiltrado inflamatório glomerular (que pode sugerir possível glomerulonefrite) (FIGURAS 19 a 21); no subgrupo de 15 dias, constataram-se duas amostras com acúmulo focal de infiltrado na região cortical, acúmulo de morfonucleares e nefrite intersticial; o subgrupo de 30 dias não apresentou alterações.

Figura 19 - Rim do GF aos 60 dias, destacando-se acúmulo de morfonucleares (AMF), infiltrado inflamatório glomerular (IIG)



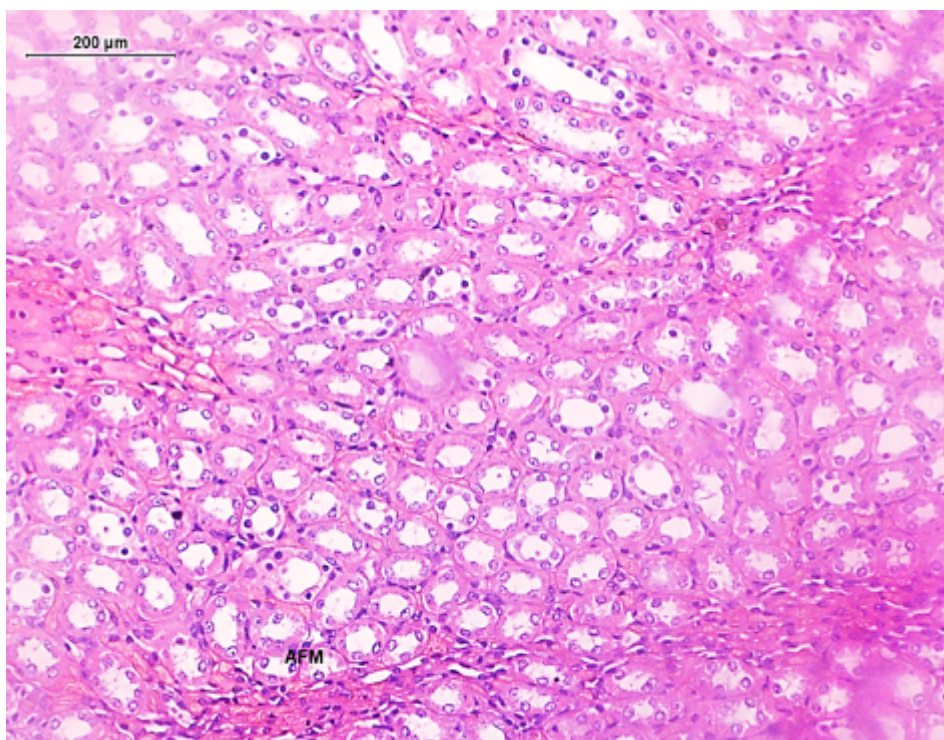
Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Rim do GF aos 60 dias, destacando-se acúmulo de morfonucleares (AMF), infiltrado inflamatório glomerular (IIG), glomérulo (G)



Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Rim do GF aos 60 dias, destacando-se acúmulos focais de morfonucleares



Fonte: Autoria própria.

No órgão cérebro dos três subgrupos, não se observaram alterações, caracterizando-se como sem anormalidades.

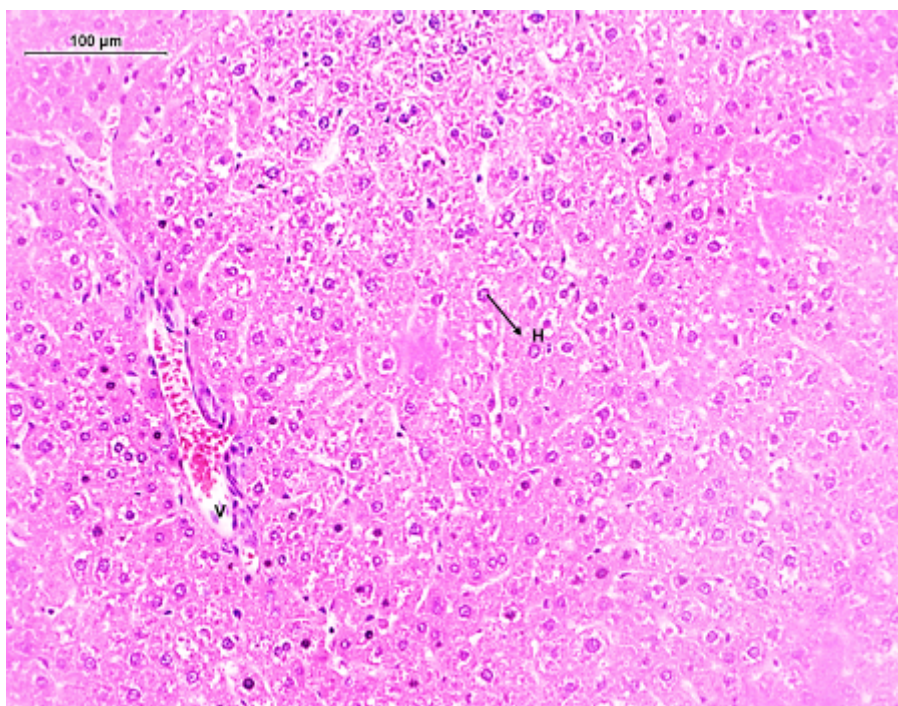
No órgão pele, duas amostras apresentaram fibrose dérmica e uma exulceração com crostícula no subgrupo de 15 dias.

No Grupo Controle (GC) com pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, foram obtidas as seguintes leituras.

No órgão pele dos três subgrupos os resultados foram sem particularidades, sem alterações inflamatórias, fibrose ou neoplasia; observou-se, também, nos três subgrupos, músculo estriado esquelético, sem particularidades e/ou anormalidades.

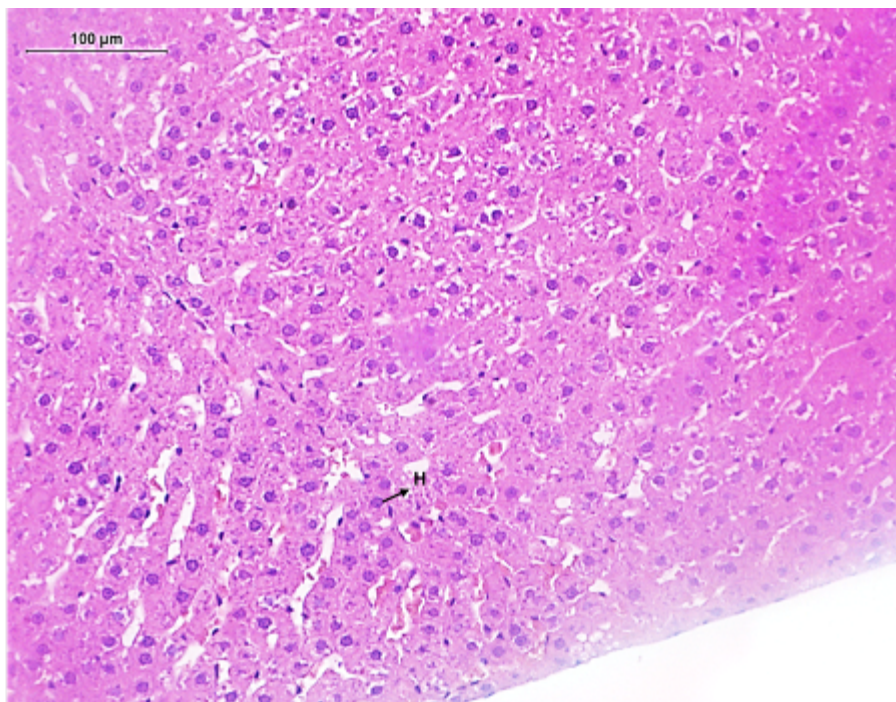
No órgão fígado dos três subgrupos, os resultados demonstraram arquitetura lobular preservada, sem aspecto inflamatório, gordura ou pigmentação anormal e células sinusoidais sem anormalidades (FIGURAS 22 e 23); somente uma amostra apresentou congestão centrolobular discreta no subgrupo de 15 dias.

Figura 22 - Fígado do GC aos 60 dias, destacando-se hepatócito (H), vaso (V), sem alterações



Fonte: Autoria própria.

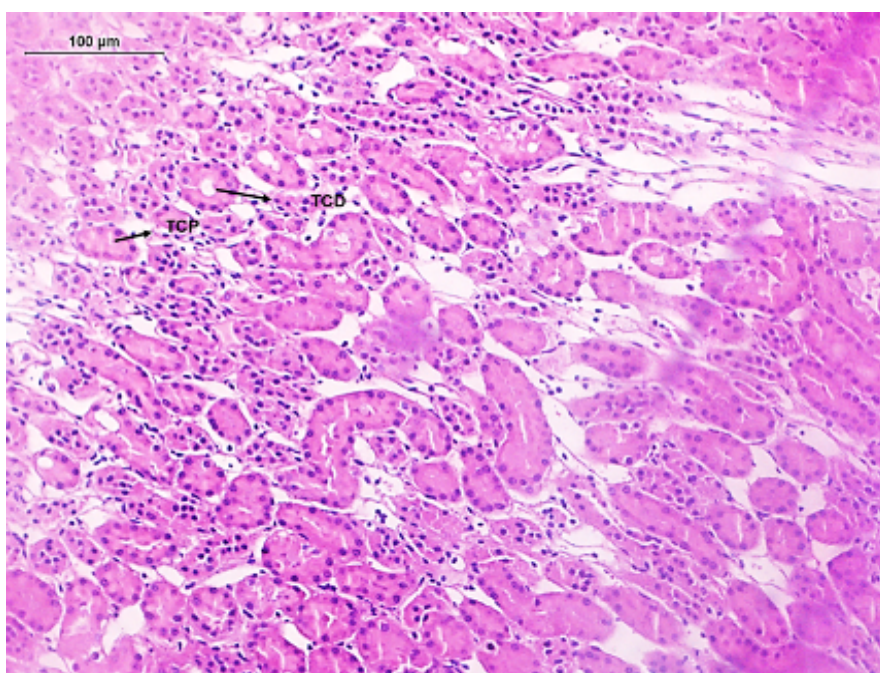
Figura 23 - Fígado do GC aos 60 dias, destacando-se heaptócitos sem alterações (H)



Fonte: Autoria própria

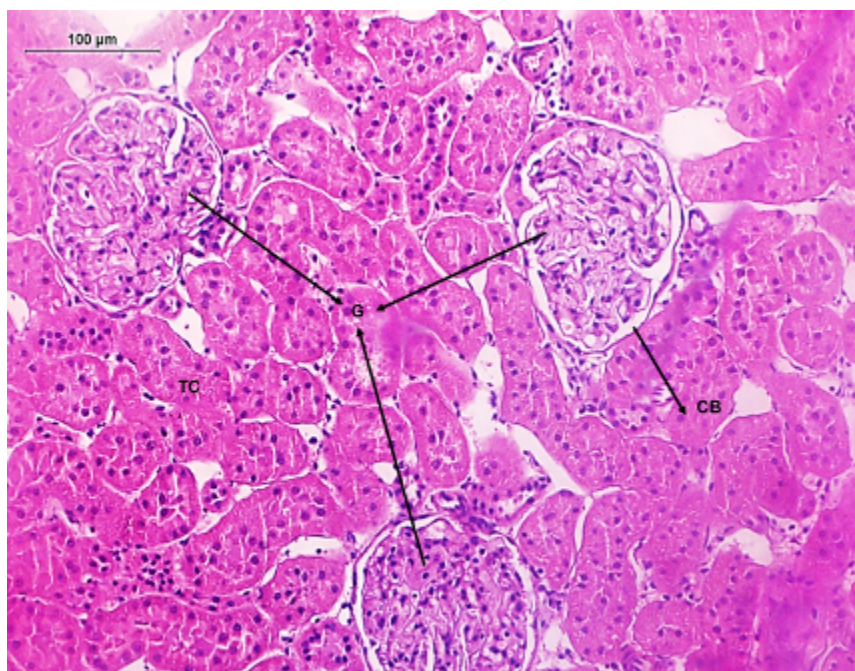
No órgão rim dos três subgrupos, os resultados foram sem alterações arquiteturais e inflamatórias, não se tendo observado anormalidades histológicas (FIGURAS 24 e 25).

Figura 24 - Rim do GC aos 60 dias, destacando-se túbulo contorcido distal (TCD), túbulo contorcido proximal sem alterações (TCP)



Fonte: Autoria própria

Figura 25 - Rim do GC aos 60 dias, destacando-se glomérulo (G), cápsula de Bowmann (CB), túbulo contorcido sem alterações (TC)



Fonte: Autoria própria

No órgão cérebro dos três subgrupos, os resultados não apresentaram anormalidades.

Realizou-se o teste exato de Fisher, como consta nas Tabelas 2 a 6.

Tabela 2 - Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Protos 1 (GP 1) quanto à presença de alterações no fígado

Variáveis	Grupos				p-valor*
	Controle (GC) n (N=15) %		Protos 1 (GP 1) n (N=15) %		
Congestão centrolobular (discreta)					
Não	14	93,3	10	66,7	0,17
Sim	1	6,7	5	33,3	
Congestão centrolobular					
Não	14	93,3	11	73,3	0,33
Sim	1	6,7	4	26,7	
Congestão sinusoidal					
Não	15	100,0	14	93,3	1,0
Sim	0	0,0	1	6,7	
Microesteatose					
Não	15	100,0	13	86,7	0,48
Sim	0	0,0	2	13,3	
Mobilização de células sinusoidais					
Não	15	100,0	12	80,0	0,22
Sim	0	0,0	3	20,0	
Anisocariose					
Não	15	100,0	14	93,3	1,0
Sim	0	0,0	1	6,7	
Pigmentação nuclear					
Não	15	100,0	14	93,3	1,0
Sim	0	0,0	1	6,7	
Área de necrose					
Não	15	100,0	14	93,3	1,0
Sim	0	0,0	1	6,7	

Fonte: Dados da pesquisa.

*p-valor refere-se ao teste exato de Fisher com significância de 5%.

Tabela 3 - Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Fármaco (GF) quanto à presença de alterações no fígado

Variáveis	Grupos				p-valor*
	Controle (GC) n (N=15) %		Fármaco (GF) n (N=15) %		
Congestão centrolobular (discreta)					
Não	14	93,3	10	66,7	1,0
Sim	1	6,7	5	33,3	
Congestão centrolobular					
Não	14	93,3	10	66,7	0,17
Sim	1	6,7	5	33,3	
Congestão sinusoidal					
Não	15	100,0	7	46,7	0,002
Sim	0	0,0	8	53,3	
Microesteatose					
Não	15	100,0	12	80,0	0,22
Sim	0	0,0	3	20,0	
Mobilização de células sinusoidais					
Não	15	100,0	10	66,7	0,04
Sim	0	0,0	5	33,3	
Microesteatose pericentrolobular					
Não	15	100,0	12	80,0	0,22
Sim	0	0,0	3	20,0	
Área de necrose					
Não	15	100,0	12	80,0	0,22
Sim	0	0,0	3	20,0	
Infiltrado inflamatório morfonuclear					
Não	15	100,0	9	60,0	0,017
Sim	0	0,0	6	40,0	
Células de Kupffer em mobilização					
Não	15	100,0	14	93,3	1,0
Sim	0	0,0	1	6,7	
Peliose					
Não	15	100,0	12	80,0	0,22
Sim	0	0,0	3	20,0	

Fonte: Dados da pesquisa.

*p-valor refere-se ao teste exato de Fisher com significância de 5%.

Tabela 4 - Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Protos 2 (GP2) quanto à presença de alterações no fígado

Variáveis	Grupos				p-valor*
	(GC) Controle n (N=15) %		(GP 2) Protos n (N=15) %		
Congestão centrolobular (discreta)					
Não	14	93,3	15	100,0	0,17
Sim	1	6,7	0	0	
Congestão centrolobular					
Não	14	93,3	15	100,0	1,0
Sim	1	6,7	0	0	

Fonte: Dados da pesquisa.

*p-valor refere-se ao teste exato de Fisher com significância de 5%.

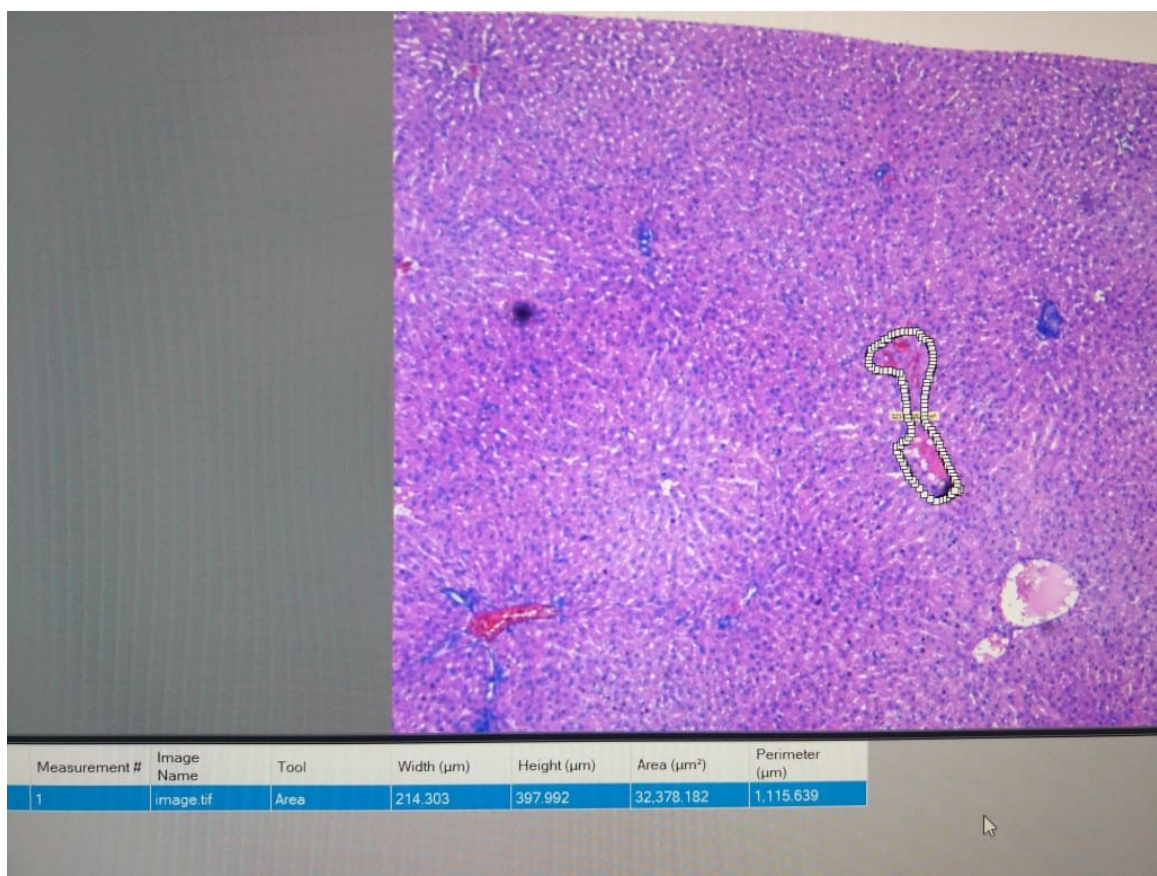
Tabela 5 - Comparação entre os animais dos grupos Controle (GC) e Protos 1 (GP 1), Controle (GC) e Protos 2 (GP 2), quanto à presença de alterações no rim

Variáveis	Grupos				p-valor*
	GC Controle n (N=15) %		GP 1 Protos n (N=15) %		
Congestão no rim					
Não	15	100,0	10	66,7	0,04
Sim	0	0	5	33,3	
Nefrite intersticial focal no rim					
	GC Controle		GP 2 Protos		
Não	15	100,0	14	93,3	1,0
Sim	0	0	1	6,7	

Fonte: Dados da pesquisa.

*p-valor refere-se ao teste exato de Fisher com significância de 5%.

Figura 26: Imagem de histomorfometria



Fonte: Autoria própria

Tabela 7: Percentual de alterações analisadas no fígado e no rim segundo os grupos analisados com histomorfometria.

ALTERAÇÕES	GRUPOS		
	GP1	GP2	GF
Peliose no Fígado	0,33%	-----	1,47%
Necrose no fígado	4,97%	2,78%	6,83%
Esteatose no fígado	38,84%	12,24%	41,79%
Infiltrado Inflamatório Morfonuclear no fígado	0,93%	5,95 %	18,49%
Nefrite no Rim	-----	4,72%	-----
Infiltrado Morfonuclear na Cortical do Rim	-----	-----	7,33%

Fonte: Dados da pesquisa

4.5 DISCUSSÃO

Sabe-se que os biomateriais experimentais ora avaliados foram desenvolvidos a partir de arcabouços auxiliares à regeneração óssea, facilmente degradados em contato com fluidos fisiológicos e capazes de liberar íons bioativos e osseointutores quando implantados *in vivo*. Dessa forma, sugere-se, preliminarmente, que, segundo os resultados do grupo Protos 1 (GP 1), por exemplo, as modificações no fígado se devem, provavelmente, à ingestão de Sr no alimento fornecido aos roedores.

As análises histológicas dos órgãos estão entre os parâmetros mais importantes para caracterização de toxicidade, pois são a base para detecção dos órgãos-alvo e da toxicidade sistêmica que pode ser provocada pela ingestão da substância ofertada.^{4,5} Dessa forma, ressalta-se que as alterações no fígado correspondem, principalmente, às seguintes apresentações: congestão centrolobular discreta, congestão sinusoidal, mobilização de células sinusoidais, microesteatose, anisocariose, pigmentação nuclear em alguns núcleos.

Em relação ao fígado — órgão que retém uma considerável quantidade de metais, provocando efeitos hepatotóxicos —, a lesão hepática mais evidente foi a acumulação de gordura em suas células, alteração que pode ter sido causada por toxinas. Entretanto, a esteatose hepática é uma alteração associada a uma variedade de desordens metabólicas.⁷⁻¹² Entre as desordens metabólicas encontradas neste estudo, relata-se, no GP 1, a microesteatose em 40%, destacando-se como achado relevante. A mobilização de células sinusoidais representa um padrão importante de resposta tissular, com migração de células para o local com processo inflamatório. A congestão sinusoidal geralmente, pela retenção de sangue no interior dos capilares sinusoides.

No metabolismo, com respeito a toxinas, existem dois caminhos que induzem a lesão celular. Algumas substâncias químicas atuam diretamente pela combinação com um componente molecular crítico ou com uma organela celular, que pode se ligar a proteínas de membrana celular, causando inibição do transporte dependente de ATP e aumento da permeabilidade da membrana.¹² Como o hepatócito contém muitos ribossomos, pode diminuir o processo de formação de ATP e chegar à morte celular, o que pode ter acontecido, pois foram identificadas várias áreas de necrose celular no grupo Fármaco (GF) aos 60 dias. Outras substâncias químicas não são ativas, e devem ser convertidas a metabólitos tóxicos reativos, que irão agir sobre a célula-alvo. Essa modificação é realizada pelo citocromo P-450, no retículo

endoplasmático agranular do fígado, causando danos à membrana, lesão celular e formação de radicais livres, podendo formar esteatose.¹³⁻¹⁷ Essa pode ter sido uma das causas da obtenção de microesteatose nos grupos analisados no presente trabalho.

No grupo Fármaco (GF), os resultados mais sugestivos foram constatados no fígado e no rim, que se mostraram significativamente alterados.

Dentre as células sinusoidais, estão as células endoteliais e as células de Kupffer. As células endoteliais formam a parede do sinusóide e apresentam poros que permitem a troca de fluidos e partículas entre o sangue e o espaço de Disse. As células de Kupffer são macrófagos que residem no lúmen dos sinusóides. Diversos estímulos, como, por exemplo, as infecções, levam à hipertrofia e à hiperplasia dessas células, que passam a realizar endocitose e secretar várias substâncias, como citocinas e várias enzimas.¹⁸⁻²²

A esteatose é uma lesão caracterizada pela visualização microscópica de áreas citoplasmáticas negativas à coloração por HE. Essas áreas se apresentam como pequenas vesículas citoplasmáticas de número e tamanho variável, algumas vezes conferindo à célula aspecto em flor. Outras vezes, esse material apresenta-se como um grande vacúolo associado ao aumento de volume e balonização dos hepatócitos e deslocamento do núcleo para a periferia, dando à célula o aspecto de um anel (anel de sinete). A esteatose é uma condição histopatológica caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídeos dentro dos hepatócitos. Os triglicerídeos são os lipídeos mais frequentemente envolvidos na esteatose hepática, a qual, histopatologicamente, pode ser classificada como macrovesicular ou microvesicular, dependendo do tamanho dos vacúolos lipídicos. Na esteatose microvesicular, ocorre alargamento das células em consequência do acúmulo citoplasmático de pequenas vesículas lipídicas²³. Esses quadros estiveram presentes em todos os grupos experimentais do presente estudo, não tendo sido visualizados, porém, no grupo Controle (GC). Em condições normais, os hepatócitos retiram da circulação ácidos graxos e triglicerídeos provenientes da absorção intestinal e da lipólise no tecido adiposo. Os glicerídeos absorvidos e os sintetizados no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos aí permanecem até serem transportados em vesículas ao complexo de Golgi, para formar as lipoproteínas e ser excretados¹⁷.

Os animais dos grupos Protos 1 (GP 1) e Protos 2 (GP 2) apresentaram menor frequência de esteatose quando comparados aos do grupo Fármaco (GF). A

congestão sinusoidal foi mais evidente no neste último. Em resposta a um estímulo inflamatório, células sanguíneas aderem ao endotélio e migram dos vasos sanguíneos para os sítios de inflamação. Esse processo é mediado por citocinas inflamatórias e quimiocinas que regulam a expressão de moléculas de adesão que se ligam a receptores específicos nas células endoteliais e nos componentes da matriz extracelular.²⁴

A literatura registra que o fígado e o rim são substratos mais amplamente empregados no diagnóstico de contaminação ambiental por metais pesados.^{25,26}

Entre os organismos, a toxicidade varia com as propriedades físico-químicas de cada metal e com fatores ambientais. Destaca-se, dentre os efeitos tóxicos dos metais, o rompimento da integridade da membrana celular, acarretando falência de órgãos.²⁷

O ensaio para determinação da toxicidade aguda é uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas de uma substância, fornecendo dados a partir da exposição de roedores a doses repetidas e de curta duração.²⁸

Realizou-se o teste de Fisher para comparação dos grupos e verificação das variáveis significativas, obtendo-se os seguintes resultados:

- 1) Nos grupos Protos 1 (GP 1) e Controle (GC), para os quais nenhuma variável foi estatisticamente significativa no nível de 0,05 de significância, a proporção de alterações no fígado não difere entre esses dois grupos.
- 2) Nos grupos Fármaco (GF) e Controle (GC), as variáveis congestão sinusoidal, microesteatose, mobilização de células sinusoidais, infiltrado inflamatório morfonuclear foram significativas, ou seja, as diferenças de proporções de alterações no fígado foram significativas.
- 3) Nos grupos Protos 2 (GP 2) e Controle (GC), nenhuma variável foi estatisticamente significativa no nível de 0,05 de significância, ou seja, a proporção de alterações no fígado não difere entre esses dois grupos.

Como o estrôncio é utilizado no tratamento de osteoporose (ranelato de estrôncio), já foram realizados vários estudos *in vivo* sobre a toxicidade desse elemento. Em muitos deles, mudanças na cristalinidade dos ossos e problemas renais, porém não se relatam casos de morte por altas taxas de estrôncio no organismo, não podendo, dessa forma, o estrôncio ser considerado um elemento tóxico. No entanto, é possível afirmar que, apesar disso, em grandes quantidades

ele pode alterar funções metabólicas das células e, com isso, prejudicar a mineralização óssea.²⁹ Achados similares aos resultados parciais obtidos na presente pesquisa em que aconteceram alterações celulares, são relatados por Nielsen.²⁹

Embora sintomas tóxicos decorrentes de superdosagem de Sr não tenham sido relatados em humanos, a administração intravenosa de altas doses induz hipocalcemia, devido ao aumento da excreção renal de Ca.⁴

Os achados deste trabalho mostram que a utilização de Sr nos grupos testados provocou alterações em alguns órgãos como fígado e rim, o que não foi observado em pele e cérebro.

As lesões mais evidentes no fígado foram microesteatose e necrose celular, e, no rim, acúmulo de morfonucleares e infiltrado inflamatório glomerular, sugerindo possível glomerulonefrite, associada a lesão glomerular grave, que resulta em perda da função renal em poucos dias ou semanas. Futuros estudos deverão dar continuidade a esta pesquisa para maiores esclarecimentos.

4.6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a administração sistêmica de Sr proporcionou alterações histológicas em fígado provocando peliose, microesteatose hepática, necrose, infiltrado morfonuclear e nefrite e infiltrado morfonuclear na cortical do rim.

5 ARTIGO 2

Quantificação por GFASS da deposição de estrôncio em órgãos de rato, após administração enteral de fármacos.

(Guillermo Alberto López¹, Rita Weste Nano², Wagna Piler Carvalho dos Santos², Alexandre Malta Rossi³, Aryon de Almeida Barbosa Junior⁴, Iorrana Indira dos Santos⁵, Fabiana Paim Rosa⁶)

- 1- Mestre em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia-UFBA, Professor do Departamento de Tecnologia em Saúde e Biologia DTSBio- Instituto Federal da Bahia- IFBA,
- 2- -Doutora em Química, Professora do Departamento de Química do Instituto Federal da Bahia- IFBA,
- 3- Doutor em Física da Matéria Condensada, Coordenador dos Laboratórios de Biomateriais e de Cultura Celular e Nanotoxicidade, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas- CBPF
- 4- Doutor em Medicina, Médico Patologista do Instituto de Patologia Geral e Cutânea- IPAC
- 5- Mestre em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, UFBA, Bolsista do Doutorado LBTB-ICS, UFBA
- 6- Doutora em Odontologia, Coordenadora do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais-LBTB, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Universidade Federal da Bahia- UFBA,

Resumo:

Introdução: O GFAAS é uma técnica apropriada para a determinação de elementos como o estrôncio (Sr) em baixos níveis de concentração uma vez que apresenta alta sensibilidade, permitindo a determinação direta, com mínimo consumo de amostra e simplicidade na preparação. **Objetivo:** foi utilizar a técnica de espectrofotometria na determinação de metais e obter a quantificação do depósito de estrôncio, com absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), em fígado de ratos após administração enteral de fármacos. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados sessenta ratos Wistar, com peso aprox. entre 350 e 480 gramas, distribuídos em grupos (Protos) GP1 e GP 2, grupo (Fármaco teste) GF, e grupo controle (GC) com seus pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias. **Resultados:** Os valores encontrados de concentração de Sr foram significativos para os tempos 15 e 60 dias. **Conclusão:** Conclui-se que na quantificação, as concentrações de Sr foram compatíveis com o tempo de administração, demonstrando deposição no fígado e corroborando toxicidade.

Palavras chaves: Estrôncio, Concentração, Absorção Atômica, Análises.

Abstract

Introduction: The GFAAS is an appropriate technique for the determination of elements such as strontium (Sr) in low levels of concentration since it presents high sensitivity, allowing direct determination with minimal sample consumption and simplicity in preparation. **Aim:** to use the spectrophotometry technique in the determination of metals and to obtain the quantification of the strontium deposit, with

atomic absorption with graphite furnace (GFAAS), in rat liver after enteral administration of drugs. **Materials and Methods:** Sixty Wistar rats weighing approx. between 350 and 480 grams, distributed in groups (Protos) GP1 and GP 2, group (Test drug) GF, and control group (GC) with their biological points of 15, 30 and 60 days. **Results:** The values found for Sr concentrations were significant for the 15 and 60 days times. **Conclusion:** It was concluded that in the quantification, Sr concentrations were compatible with the time of administration, demonstrating liver deposition and corroborating toxicity.

Keywords: Strontium, Concentration, Atomic Absorption, Analysis

5.1 Introdução

Para avaliar a absorção de Estrôncio (Sr) a nível sistêmico deve-se ter um teste que possa discriminar baixos, médios e altos níveis de concentração. Para isto é necessário a utilização de equipamentos com precisão dentre eles a espectrometria de absorção atômica de forno de grafite (GFAAS) ^{1 2} .

O GFAAS é uma técnica apropriada para a determinação de elementos como o estrôncio (Sr) em baixos níveis de concentração uma vez que apresenta alta

sensibilidade, permitindo a determinação direta, com mínimo consumo de amostra e simplicidade na preparação. Além disso, atualmente a técnica de GFAAS pode ser aplicada à determinação simultânea de elementos, reduzindo o tempo e o custo de análise.³

Do ponto de vista analítico, os métodos mais adequados para a determinação destes metais são os métodos espectrofotométricos, sendo os métodos de espectrofotometria atômica os mais usuais para a determinação de metais em amostras.⁴

O Sr é usado para tratamento e prevenção da osteoporose⁵, como osseointegrador e inibidor osteoblástico⁶. O ranelato de estrôncio possui dois átomos de estrôncio e um ligante denominado ácido ranélico, Esta substância foi escolhida, em estudos clínicos e farmacológicos, entre diversos sais de estrôncio por apresentar melhores características físico-químicas (solubilidade e estabilidade) e farmacocinéticas (biodisponibilidade), além de apresentar ação específica sobre as células ósseas⁷. O ácido ranélico não é metabolizado, tem baixa ligação às proteínas plasmáticas, não se acumula no organismo humano e é rapidamente eliminado por via renal, deixando os dois átomos de estrôncio livres, responsáveis pelo mecanismo de ação do fármaco.⁷

O desenvolvimento de análises analíticas rápidas e precisas e os métodos para a determinação de concentrações de metais em tecidos orgânicos ainda é um desafio em termos de controle de qualidade e análise, devido à baixos níveis de concentração de alguns elementos e as dificuldades que surgem devido às características da matriz. A maioria das técnicas espectrométricas requer alguma forma de pré-tratamento da amostra. Procedimentos, incluindo extração, pré-concentração e digestão ácida, têm sido utilizada para reduzir a influência da matriz orgânica.¹

A primeira etapa de uma análise química consiste em submeter a amostra a um tratamento adequado, visando a sua preparação para progredir nas etapas que formam uma análise química.⁸

Idealmente, um procedimento de digestão de uma amostra deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenos volumes de ácidos, permitir a dissolução de grande número de amostras e, finalmente, produzir resultados precisos e exatos. Mesmo amostras líquidas podem necessitar de um preparo prévio para a análise.

Assim, a maneira de se decompor uma amostra para a análise depende da sua natureza, do analito que se quer determinar, bem como da sua concentração, do método de análise e, por fim, da precisão e exatidão desejadas.⁶

O objetivo deste trabalho foi utilizar a técnica de espectrofotometria na determinação de metais e obter a quantificação do depósito de estrôncio, com absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), em fígado de ratos após administração enteral de fármacos.

5.2 Materiais e Métodos

Este estudo foi autorizado pelo Comissão de Ética no uso de Animais (CEUAs) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) sob o Número 063/2014. Foram utilizados sessenta ratos Wistar, com peso aprox. entre 350 e 480 gramas do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), conveniada ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do ICS- UFBA. Os ratos foram distribuídos em grupos (Protos) GP1 e GP 2, grupo (Fármaco) GF, e grupo controle (GC) com seus pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias (Quadro 1). No grupo (GP1), tem sido ofertado o medicamento Protos® durante 15 dias nos subgrupos de 15, 30 e 60 dias. No Grupo (GP2) foi ofertado o medicamento Protos® todos os dias em cada um dos três subgrupos e no Grupo F (GF) foram ofertadas microesferas de hidroxiapatita (HA) dopadas com Sr e alginato(Alg) [HASr-Alg] durante 15 dias nos subgrupos de 15, 30 e 60 dias; e grupo controle (GC), tendo sido unicamente ofertada ração.

Quadro 1 Grupos GP, GF e GC com seus respectivos pontos biológicos

Pontos Biológicos	15	30	60	TOTAL
Grupo Protos 1 (GP1)	05	05	05	15
Grupo Protos 2(GP2)	05	05	05	15
Grupo Fármaco (GF)	05	05	05	15

Grupo Controle (GC)	05	05	05	15
TOTAL	20	20	20	60

Fonte: Dados da pesquisa

5.2.1 Fármaco:

Inicialmente, para síntese do compósito HASr-Alg, foi sintetizado o fosfato de cálcio em pós nanométricos com cristais de dimensões inferiores a 10 nm, por meio de rotas de precipitação em via úmida, ácida e alcalina, com controle dos parâmetros de preparação: concentração dos reagentes, temperatura de precipitação e digestão, pH, velocidade de adição dos reagentes, velocidade de agitação do meio reacional, tempo de digestão. O pó de nanoHA obtido foi submetido a um processo de desaglomeração mediante tratamento com ultrassom de alta potência e material desaglomerante com condições controladas de pH. Para a formação das esferas de nanoHA e alginato, essa mistura foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio, com a formação de esferas com diâmetros entre 1.000 e 2.000 μm , que foram lavadas em água destilada e secas. Posteriormente, adicionou-se nitrato de estrôncio $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, na concentração de 50%. A síntese e as caracterizações desse compósito foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas no Rio de Janeiro (CBPF/RJ).

O fármaco, ranelato de estrôncio, foi incorporado à dieta com ração pastosa, na proporção de 900 mg/Kg/dia/rato, conforme protocolo modificado a partir do descrito por Ammann et al.² Como os animais apresentavam peso médio de 375 g, calculou-se uma dose média de 337,5 mg de ranelato de estrôncio anidro, que correspondeu à dose diária de 675 mg de pó do Protos® fracionada em tubos plásticos. A administração do fármaco por via oral na dieta iniciou-se no segundo dia do pós-operatório, estendendo-se até o período dos respectivos pontos biológicos. Uma porção da ração sólida (aproximadamente 8 g) foi triturada e misturada com 5 mL de água filtrada para formar dieta pastosa, à qual se acrescentou a dose diária do ranelato de estrôncio.

5.2.2 Preparo das amostras

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em caixas plásticas identificadas conforme o grupo e o ponto biológico, autoclavadas, forradas com

maravalha de pinus autoclavada e trocada diariamente. Na ficha de identificação, ainda constavam a massa corporal do animal, a data da cirurgia e do sacrifício e o nome do pesquisador.

Os animais foram alimentados com ração sólida e água ad libitum (*latim*: a vontade), mantidos em condições ambientais adequadas de temperatura e luminosidade. Após os pontos biológicos de 15, 30 e 60 dias, os animais foram anestesiados por meio de injeção intramuscular com cloridrato de quetamina na proporção de 0,12mL/100g de peso, e cloridrato de xilazina, na proporção de 0,06mL/100g de massa corpórea, e logo foram sacrificados com uma dose letal. Os órgãos, fígado e rim direito foram removidos e separados da seguinte forma: O fígado foi seccionado em corte axial, em sentido látero-medial para separar a parte superior e a inferior. O fragmento superior foi colocado em frasco estéril em formol tamponado a 4%, durante 48 horas, e o fragmento inferior foi inserido em frasco estéril congelado a -35° C, e colocados no freezer da marca Indrel Scientific do LBTB-ICS, UFBA

O rim direito foi seccionado em corte axial, em sentido látero-medial, para separar a parte superior e a inferior. O fragmento superior foi colocado em frasco estéril em formol tamponado a 4%, durante 48 horas, e o fragmento inferior foi inserido em frasco estéril congelado a -35° C.

Os órgãos congelados foram liofilizados com a finalidade de retirar a água, possibilitando que a água previamente congelada (estado sólido) passe diretamente ao estado gasoso (sem passar pelo estado líquido), ou seja, a mudança de estado físico ocorre por sublimação.⁹ Foi utilizado um liofilizador da marca LIOTOP modelo L101 número de série 15111, do Laboratório de Análises Químicas da Universidade Estadual da Bahia (UNEB). (Figura 1)

Figura 1: Liofilizador LIOTOP L101



Fonte: Autoria própria

Após a liofilização, no laboratório do Departamento de Química do Instituto Federal da Bahia (IFBA), os órgãos passaram por moagem com almofariz e pistilo (Figura 2), para proteger as amostras, colocaram-se em sacos plásticos de amostragem estéreis da marca Labplas®, Quebec, Canada, para minimizar a contaminação, logo feita a moagem, com a finalidade de homogeneizar as amostras após a moagem as amostras foram armazenadas em dessecador para evitar a absorção de água do meio ambiente.

Figura 2: Moagem dos órgãos fígados e rins



Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Digestão

Foi realizada a digestão com Ácido Nítrico (HNO_3) 65% SUPRAPUR e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 30% da marca Merck Milipor0065®, Darmstadt, Germany e Ácido Clorídrico (HCl) 37% da marca Êxodo Científica®, Sumaré, S.P. , Brasil, em forno

com aquecimento por micro-ondas da marca Milestone S.R.L. Modelo Ethos One, Sorisole, Bergamo, Italia. (Figura 3)

Figura 3: Forno Micro-ondas com amostras



Fonte: Autoria própria

A digestão do material liofilizado foi realizada utilizando 1 ml (HNO_3), 1 ml (HCl), 3 ml (H_2O_2) e 5ml de água ultrapura. No micro-ondas se colocaram 8 ensaios por cada rodada, sendo 6 amostras de fígado, sendo uma delas triplicata, 1 material de referência para Agricultura, Pecuária e Toxicologia, Fígado Bovino, Código RM-Agro E3001^a, da Embrapa, Brasil, (Tabela 1) e um ensaio em branco. Após a digestão as soluções foram transferidas para tubos Falcon® de 15 ml, é o volume completado para 14 ml.

Para a determinação de Sr foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GFASS) da marca Perkin Elmer®, modelo AAnalyst 600, Massachusetts, U.S.A. (Figura 4). As condições operacionais do espectro correspondem a programação do forno (tabela 2).

Tabela 1: Valores informativos para a fração massa (na base seca) atribuídos aos elementos determinados no RM-Agro E3001a.

Elementos	Média± U_{MR}
As ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	15,22 ± 8,97
Br (mg kg^{-1})	4,78 ± 0,07
Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	96,03 ± 60,28
Co (mg kg^{-1})	0,35 ± 0,07
Cs (mg kg^{-1})	0,328 ± 0,006
Cu (mg kg^{-1})	246,26 ± 34,10
Mn (mg kg^{-1})	8,11 ± 1,17
Mo (mg kg^{-1})	3,79 ± 0,37
Pb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	77,32 ± 22,94
Rb (mg kg^{-1})	47,2 ± 0,29
Se (mg kg^{-1})	0,91 ± 0,34
Sr (mg kg^{-1})	0,25 ± 0,11
V (mg kg^{-1})	0,033 ± 0,008

Fonte: Embrapa, 2017

Tabela 2: Programação do GFAAS para detecção de Sr

Passo	Temperatura (C°)	Tempo de rampa	Tempo de espera	Fluxo interno	Tipo de gás
1	110	1	30	250	Normal
2	130	15	30	250	Normal
3	1300	10	20	250	Normal
4	2400	0	5	0	Normal
5	2500	1	3	250	Normal

Fonte: Autoria própria

Figura 4: GFASS



Fonte: Autoria própria

5.2.4 Análise estatística

Foram calculadas as medidas descritivas (média, mediana, desvio padrão, valores máximo e mínimo) da concentração (ug/g) no fígado dos grupos controle (15, 30 e 60 dias), fármaco (15 e 60 dias), Protus1 (15, 30 e 60 dias) e Protus 2 (30 e 60 dias). Em seguida foi feito o teste para verificar se os dados foram provenientes de uma distribuição normal, como a suposição de normalidade não foi satisfeita para algumas amostras utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparar a média de concentração entre os grupos. Em seguida foi feito o teste de

comparações múltiplas, quando necessário, no caso de a hipótese nula ser rejeitada no teste de Kruskal Wallis.

Foram comparados os grupos: GC, GF e GP1 para fígados dos grupos de 15 dias; GC, GP1, GP2 para os grupos de 30 dias e GC, GF, GP1 e GP2 para os grupos de 60 dias. O nível de significância adotado no teste foi de 0,05 e para a análise dos dados foi utilizado o pacote estatístico R versão 3.5.1.

5.3 Resultados e Discussão

A Figura 1 representa a comparação dos valores da concentração presente no fígado de acordo com os grupos em relação aos dias. Conforme a representação do boxplot, percebe-se que o grupo fármaco observado durante 15 dias, apresentou a maior quantidade de concentração em comparação com os outros grupos estudados.

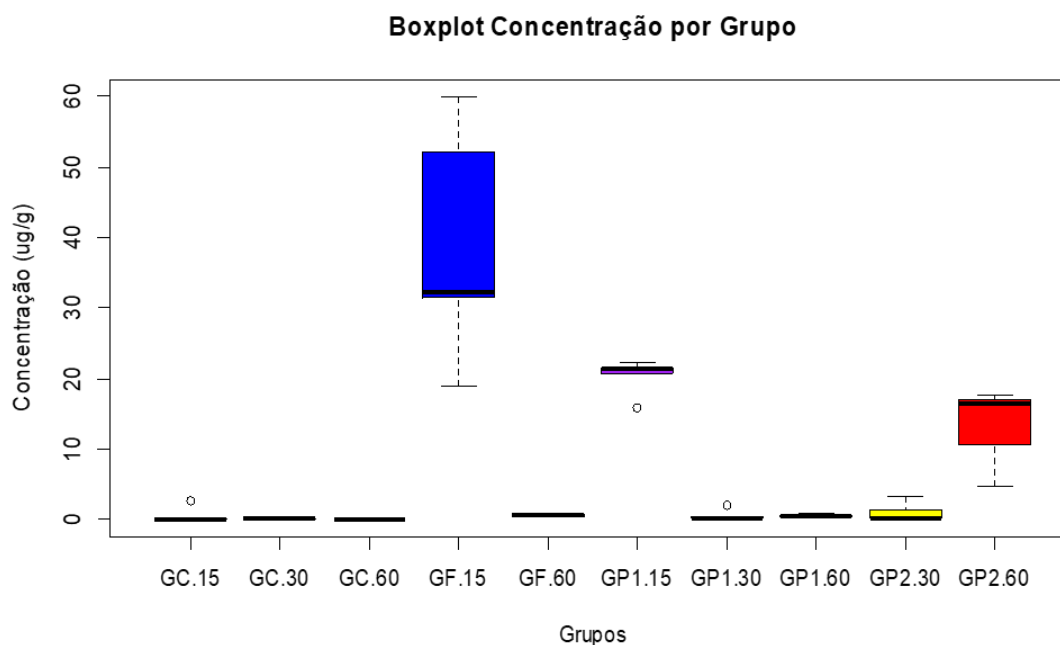


Figura 5: comparação da concentração entre os grupos analisados no período de 15, 30 e 60 dias.

Fonte: Elaboração do autor

Tabela 3. Média e coeficiente de variação da quantidade de concentração encontrada no fígado com p-valor do teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

Fonte: Elaboração do autor

Tabela da desvio valor e da	Grupos	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	4: Valor média, padrão o mínimo máximo
	CONTROLE (GC)						
	15 dias	0.69	0.16	1.17	0.11	2.78	
	30 dias	0.20	0.20	0.07	0.15	0.25	
	60 dias	0.12	0.12	0.02	0.11	0.14	
FÁRMACO (GF)							
	15 dias	38.94	32.32	16.67	18.89	59.84	
	60 dias	0.65	0.61	0.18	0.49	0.87	
PROTUS 1(GP1)							
	15 dias	20.40	21.43	2.60	15.85	22.39	
	30 dias	0.60	0.36	0.69	0.11	2.14	
	60 dias	0.53	0.52	0.22	0.25	0.81	
PROTUS 2(GP2)							
	30 dias	0.96	0.37	1.20	0.15	3.37	
	60 dias	13.00	0.65	7.17	4.75	17.74	

concentração (ug/g).

	Média	Coefficiente de variação (%)	P-valor *
15 dias			
GC	0,69	170	0,004
GF	38,94 ^a	42,8	
GP1	20,40 ^a	12,74	
30 dias			
GC	0,20	35,0	0,36
GP1	0,60	115,0	
GP2	0,96	115,2	
60 dias			
GC	0,12 ^a	16,7	0,01
GF	0,65 ^{a,b}	27,70	
GP1	0,53 ^{a,b,c}	41,5	
GP2	13,00 ^{b,c}	55,15	

Fonte: Elaboração do autor.

Notas: * Com 5% de significância. a=a; b=b; c=c; b≠a ≠c.

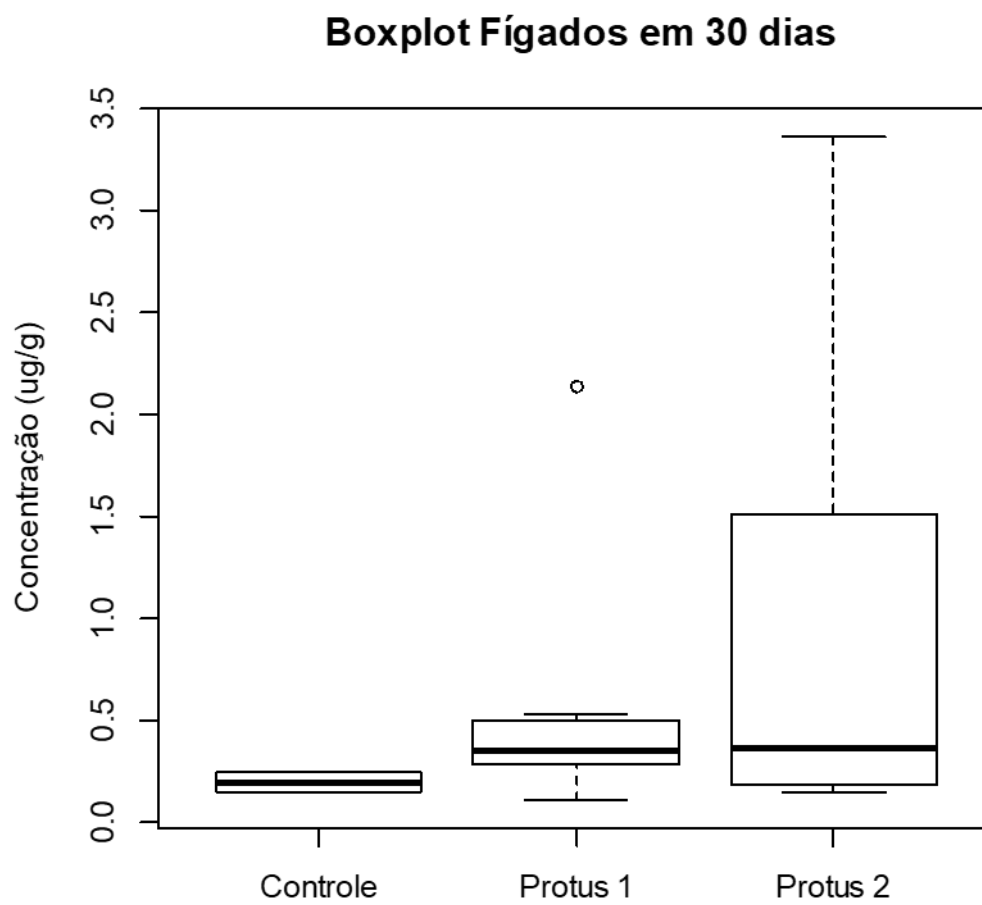


Figura 6: Comparação da concentração no fígado entre os grupos analisados no período de 30 dias.

Fonte: Elaboração do autor

Boxplot Fígados em 60 dias

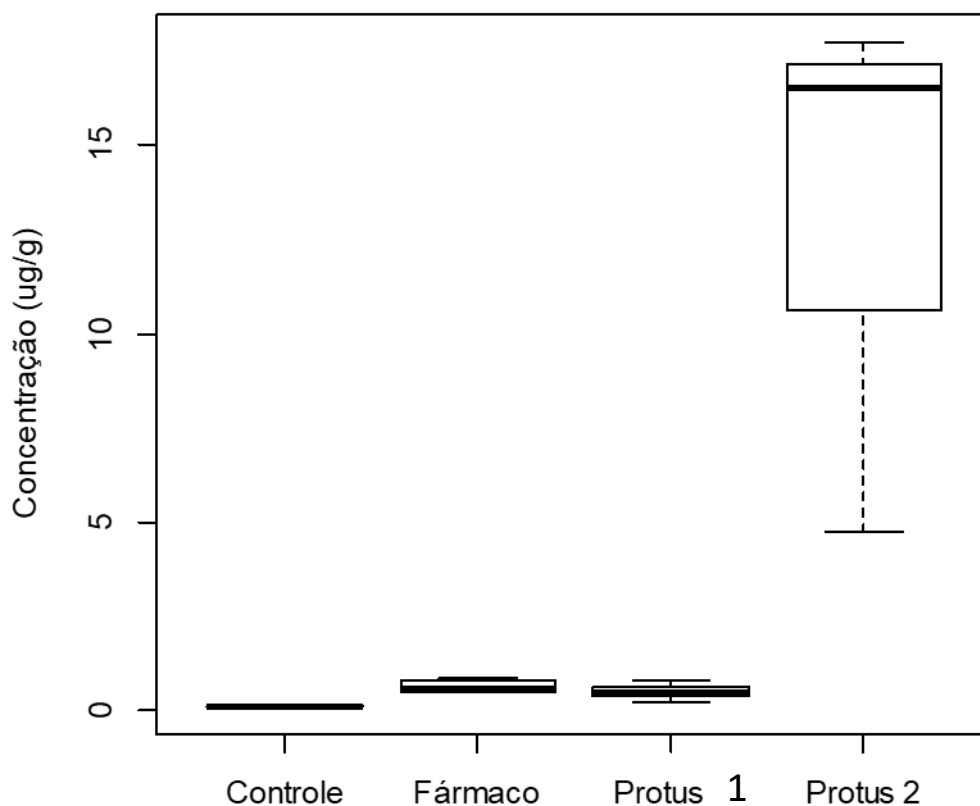


Figura 7: Comparação da concentração no fígado entre os grupos analisados no período de 60 dias.

Fonte: Elaboração do autor

Os valores encontrados do p-valor foram estatisticamente significativos para os tempos 15 e 60 dias. Conforme mostra a Tabela 2, não houve diferença estatística significativa na média da concentração no fígado durante 30 dias de tratamento entre os grupos, GC, GF, GP1 e GP2 ($p=0.36$). Os resultados mostram que o grupo GP2 apresentou a maior média de concentração no fígado em comparação com outros grupos analisados para 30 dias. Comparando as médias das concentrações nos 15, 30 e 60 dias verifica-se que houve diferença estatisticamente significativa no grupo de 15 dias ($p=0.001$) e 60 dias ($p=0,01$), sendo que o grupo GF apresentou a maior quantidade de concentração nas duas situações.

Quando analisada a concentração de Sr nos grupos de 15 dias, observa-se que coincide com relatos na literatura, alcançando o platô de concentração nesse período. Também observou-se que no grupo GF existe uma concentração alta comparada aos outros grupos. Acredita-se que a liberação de Sr nos intestinos dos ratos é oferecida de forma lenta o que leva esse pico comparada com o outro fármaco dos grupos GP1 e 2, onde a liberação seria mais rápida, estes resultados demonstraram ser significativos.

Acredita-se que, pela mesma razão que alcançou o platô nesse período de quinze dias, as concentrações foram altas .

A concentração plasmática de Sr nos grupo de 15 dias é mais alta comparada com o GC, e a do Ca é menor, correspondendo ao esperado.¹⁰

Observando os resultados após os 15 dias as concentrações diminuem levando a hipótese de que foi metabolizado o Sr.

Segundo o estudo de Komarnicki, a concentração de metais pesados se deposita principalmente no fígado e nos rins, como observado neste estudo.¹¹

Nos grupos de 30 dias os resultados desde o ponto de vista estatístico não foram significativos, isso não significa que não tenha sido importante os resultados, porém o GP2 foi o que mais concentração de Sr demonstrou na quantificação no fígado. Comparando os Grupos Protos (GP1 e GP2) o GP2 foi o que demonstrou uma média maior, levando a hipótese de que a oferta do fármaco durante todo o tempo obteve como resultado uma maior concentração.

Analisando os valores vemos que comparados com os grupos de 15 dias houve uma diminuição na concentração, sugerindo que, os fígados, nessa face conseguiram metabolizar o Sr, pois os danos ainda não eram suficientes para afetar o metabolismo. Acredita-se que este pode ter sido um dos motivos que provocou o resultado desses grupos.

Nos grupos de 60 dias, o GP 2 foi o que demonstrou maior quantidade de depósito de Sr, comparado com os outros grupos.

No estudo de Ribeiro, I, I, et. Al.,¹⁰ que analisa as concentrações plasmáticas de Sr e Ca, as concentrações de Sr aos 60 dias diminui comparado com os pontos de 15 e 30 o que corresponde ao esperado, e levando a confirmação do depósito em fígado.

Sabemos pela literatura que não existem casos reportados por toxicidade de Sr, em seres humanos¹², sendo a concentração de 320 mgs, num adulto de 70 kg.⁶, desde este ponto de vista, este estudo indica o contrario demonstrando que, com maior tempo de oferta dos fármacos nos ratos, provoca toxicidade.

Respeito ao Ca ele aumenta muito pouco comparado aos grupos de 15 e 30, levando a confirmação de diminuição do Sr e aumento do Ca, sendo o esperado com respeito aos órgãos.

Apesar de não ter sido avaliado o osso, a literatura indica que quando existe perda da função hepática, esta, afeta a densidade óssea.¹³

A concentração de Sr no fígado e a competição do mesmo com o Ca pode ter aumentado a concentração de Ca livre em plasma e pode provocar problemas cardiovasculares.¹⁴

O depósito de Sr no fígado pode ter afetado a homeostasia iônica dos hepatócitos provocando alterações nos níveis de Ca, e pode afetar a membrana citoplasmática dos hepatócitos e causar danos hepáticos.

As alterações celulares no fígado foram provocadas pelo deposito de Sr que não foram metabolizados.

Estudo de Kostial, K,¹⁵ demonstra que a alimentação contendo metais, tem mais absorção em ratos jovens comparados com ratos adultos. Existindo compatibilidade com nosso trabalho.

Mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar estes resultados.

5.4 Conclusão

Conclui-se que na quantificação, as concentrações de Sr foram compatíveis com o tempo de administração, demonstrando deposição no fígado e corroborando toxicidade.

6 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A avaliação histológica evidenciou alterações celulares no fígado e no rim, sendo compatíveis com o aumento da concentração de Sr.
- O grau de concentração de Sr, foi significativo para 15 e 60 dias, devido a alta deposição no fígado atestando toxicidade.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO

1. Susana Catarina Silva Rezende. **Aplicações dos Biomateriais em Ortopedia**. Porto, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, 2014. P. 17.
2. United nations. **World Population ageing**. New York, 2015. [acesso em 2018 Jan. 17]. Disponível em: http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf.
3. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. **Biomateriais: tipos, aplicações e mercado**. Quim Nova, 2015; 38(7):957-71.
4. Brown, Lemay, Bursten. **Química a ciência central, características dos biomateriais**. Ed. Pearson, 2005. Cap. 12. P. 9.
5. Almeida MM, Nani EP, Teixeira LN, Peruzzo DC, Joly JC, Napimoga MH et al. **Strontium ranelate increased osteoblast activity**. Tissue cell. 2016:1-6.
6. Almeida JC, Wacha A, Gomes PS, Alves LC, Fernandes MH, Salvador IM et al. **A biocompatible hybrid material with simultaneous calcium and strontium release capability for bone tissue repair**. Mater Sci Eng. 2016; 62:429-38.
7. World Health Organization. **Concise International Chemical Assessment Document 77 strontium and strontium compounds**. Geneva: Switzerland; 2010.
8. Ozgur S, Sumner H, Kocoglu, G. **Rickets and soil strontium**. Arch Dis Child. 1996; 75:524-6.
9. D'Haese PC. **Measurement of strontium in serum, urine, bone, and soft tissues by Zeeman atomic absorption spectrometry**. Clin chem. 1999; 43(1):121-8.
10. Johnson AR, Armstrong WD, Singer L. **The incorporation and removal of large amounts of strontium by physiologic mechanisms in mineralized tissues**. Calcif Tissue Res. 1968;2(3):242-52.
11. Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD et al. **The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis**. New Engl J Med. 2004; 350(5):459-68.
12. Ammann, P, Marie PJ, Boivin G, Rey C. **Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone**. Calcif Tissue Int. 2001; 69:121-9.

13. Grynblas MD, Hamilton E, Cheung R, Tsouderos Y, Deloffre P, Hott M et al. **Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect.** Bone. 1996;8(3):253-9.
14. Mendes Filho AA, **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada.** Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), 2006. P. 204.
15. Fu YF, Chen DM. **Influence of Sr²⁺ on Strontium substituted Hydroxyapatite's (Sr-HA) Cytotoxicity.** Journal of Tissue Engineering. 2005;2(2):76-80.
16. Ratner BD, Bryan SJ. **Biomaterials: Where we have been and where we are going.** Rev Biomed Eng. 2004; 6:41-75.
17. Comar CL, Bronner F. **Miner Metab.** New York: Academic press; 1969. V. III.
18. Marcus CS, Lengemann FW. **Absorption of Ca⁴⁵ and Sr⁸⁵ from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat.** J Nutr. 1962; 77:55-160.
19. Morohashi T, Sano T, Yamada S. **Effects of strontium on calcium metabolism in rats: i. a distinction between pharmacologic and toxic doses.** Jpn J Pharmacol. 1994; 64:155-62.
20. Ammann P. **Strontium ranelate: A physiological approach for an improved bone quality.** Bone. 2006; 38:15-8.

REFERÊNCIAS REFERENCIAL TEÓRICO

- 1) Ratner, B.D.; Bryant, S.J. **Biomaterials: Where we have been and where we are going**, Rev. Biomed. Eng. V. 6 P. 41–75, 2004.
- 2) Laing, P.G. In: Corrosion and degradation of implant materials. ASTM STP 684 B.C. Syrete A. Acharya, EDS., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1979.
- 3) Rius, D.R.; **Obtención de capas de nítrido de titanio mediante tratamiento termoquímico em titanio y Ti6Al4V y caracterización de sus propiedades para aplicaciones biomédicas**. Tese de Doutorado em Engenharia de materiais, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, 1999.
- 4) Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F, J.; Lemons, J. E. **Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine**. Chapter Biomaterials Science: An Evolving Multidisciplinary Endeavor. Ed, Elsevier Oxford, 2013.
- 5) Holzapfel, M.B. et. Al.: **How smart do Biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view**. Advance d Drug Delivery Reviews V.65 P. 581-603, 2012
- 6) Hubbell, J. A.; **Bioactive biomaterials**, Biotechnol. V. 10, P. 123-129 1999.
- 7) **The World Population Prospects: 2015 Revision**. Acessado em 28/02/2018. <http://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-2015-revision.html>
- 8) Pires, A.L.R. Bierhalz, A.C.K., Moraes, A.M. **Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado**. Quim. Nova, Vol. 38, No. 7, P. 957-971, 2015.
- 9) D’Haese P.C., **Measurement of strontium in serum, urine, bone, and soft tissues by Zeeman atomic absorption spectrometry**, Clinical chemistry, V. 43:1, P. 121–128, 1999.
- 10) Nielsen, S.P., **The biological role of strontium**, Bone V.35, P. 583– 588, 2004.
- 11) Curzon, M.E., **The relation between caries prevalence and strontium concentrations in drinking water, plaque, and surface enamel**. J Dent Res; V. 64-12, P 1386– 1388, 1985.
- 12) Bonnevier, J., Malmquist, U., Sonntag, D., et al., **Cell Physiol**, Am J Physiol. V. 282: P.845–855, 2002.
- 13) Doberenz, A. R., Weber, C.W., Reid, B.L. **The effect of high dietary strontium levels on bone and egg shell calcium and strontium**. Calcif. Tissue Res. V.4 180-4, 1969.

- 14) Comar, C.L., Bronner, F. In: **Miner Metab**, vol. III. New York: Academic Press; 1969.
- 15) Marcus C.S., Lengemann F.W. **Absorption of Ca⁴⁵ and Sr⁸⁵ from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat.** J Nutr;77 P.155– 160. 1962.
- 16) Wasserman, E.M., Kallfelz, F.A., Comar, C.L. **Active transport of calcium by the rat duodenum in vivo.** Science; V. 133, P. 883–884. 1961
- 17) Ammann, P. **Strontium ranelate: A physiological approach for an improved bone quality.** Bone, V. 38, P. 15-18, 2006.
- 18) Mathias, M. Comar, C.L., Bronner, F. **Mineral metabolism. An advanced treatise: Renal excretion of alkaline earths, editors.** Academic Press. New York, Chapter4. P 235-320, 1969.
- 19) Mathias, R.S., Brown, E.M. **Divalent cations modulate PTH-dependent 3V, 5V- cyclid adenosine monophosphate production in renal proximal tubular cells.** Endocrinology, V. 128. P. 3005-3012, 1991.
- 20) Jeronymo, S. Moraes Barros, S. B., Sesso, R. **Determination of some trace elements in water, dialysis liquid and serum of patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis, applying the mass spectrometry technique (quadrupolar type), associated with a source of inductive coupling plasma (ICP-MS).** J. Bras. Nefrol. V. 27 (3). P. 138-145, 2005.
- 21) Meunier, P.J. et. Al. **The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis.** The New England Journal of Medicine V. 350 (5), P. 459-468, 2004.
- 22) Escanero, J.F., Cordova, A. **Effects of glucagon on serum calcium, magnesium and strontium levels in rats.** Miner Electrolyte Metab, V. 17, P.190–193. 1991.Amman, M. P.J., P, Rey, B. G. C., **Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone.** Calcif Tissue Int; 69:121-9. 2001.
- 23) Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology, **Toxicological Profile for Strontium.** U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, Georgia 30333, 2004.
- 24) Vaughan, J., **The physiology of bone.** third ed. Oxford: Clarendon Press; 1981.
- 25) Ozgur, S., Sumner, H., Kocoglu, G. **Rickets and soil strontium.** Arch Dis Child, V 75, P. 524-526. 1996.
- 26) Johnson, A.R., Armstrong, W.D., Singer, L.**The incorporation and removal of large amounts of strontium by physiologic mechanisms in mineralized tissues.** Calcif Tissue Res V. 2(3), P. 242-252. 1968.
- 27) Marie, P.J., Hott, M. **Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse.** Metabolism. V. 35(6), P. 547-551. 1986.

- 28) Morohashi, T., Sano, T., Yamada, S. **Effects of strontium on calcium metabolism in rats: I. A distinction between the pharmacological and toxic doses.** Jpn J Pharmacol., V. 64, P.155-162. 1994.
- 29) Neufeld, E.B., Boskey, A.L. **Strontium alters the complexed acidic phospholipid content of mineralizing tissues.** Bone, V. 15(4), P. 425-430. 1994.
- 30) Storey, E. **Intermittent bone changes and multiple cartilage defects in chronic strontium rickets in rats.** J Bone Jt Surg Am V. 44B (1)., P.194-208. 1962.
- 31) Armbrecht, H.J., Boltz, M.A., Christakos, S., et al. **Capacity of 1,25-dihydroxyvitamin D to stimulate expression of calbindin D changes with age in the rat.** Arch Biochem Biophys V. 352(2). P.159-164. 1998.
- 32) Grynopas, M.D., Hamilton, E., Cheung, R., et al. **Strontium increases vertebral bone volume in rats at a low dose that does not induce detectable mineralization defect.** Bone V. 18(3), P. 253-259. 1996.
- 33) Kroes, R., den Tonkelaar, E.M., Minderhoud, A., et al. **Short-term toxicity of strontium chloride in rats.** Toxicology. V. 7(1), P.11-21. 1977.
- 34) Ghosh, S., Talukder, G., Sharma, A. **Clastogenic activity of strontium chloride on bone marrow cells in vivo.** Biol Trace Elem Res. V. 25, P.51-56. 1990.
- 35) Llobet, J.M., Colomina, M.T., Domingo, J.L., et al. **Effect of chelating agents on tissue distribution and excretion of strontium following semichronic strontium ingestion.** Res Commun Chem Pathol Pharmacol. V. 71(2), P 243-246. 1991.
- 36) Kshirsagar, S.G. **Effect of stable strontium on the tissue alkaline and acid phosphatase activities of rat: Feeding studies.** J Nutr V. 106(10), P. 1475-1483. 1976.
- 37) Amman, M. P.J., P, Rey, B. G. C., **Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone.** Calcif Tissue Int; 69:121-9. 2001.
- 38) Fu, Y.F. Chen, D.M., **Influence of Sr²⁺ on Strontium substituted Hydroxyapatite's (Sr-HA) Cytotoxicity.** Journal of Tissue Engineered, 2 (2) p. 76-80, 2005.
- 39) Thorwarth, M. et al. **Bone Regeneration in Osseous Defects Using a Resorbable Nanoparticulate Hydroxyapatite.** J Oral Maxillofac Surg, v.63, p.1626-1633, 2005.
- 40) Dourado, Erico Rodrigues. **Preparação e Caracterização de Hidroxiapatita Nanoestruturada Dopada com Estrôncio.** 2006.128p. Dissertação (Mestrado em Física). Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro (RJ), 2006.

- 41) Turhani, D. et al. **Exogenous Recombinant Human BMP-2 Has Little Initial Effects on Human Osteoblastic Cells Cultured on Collagen Type I Coated/Noncoated Hydroxyapatite Ceramic Granules**. *J Oral Maxillofac Surg*, v.65, p.485-93, 2007.
- 42) Prado da Silva, M.H. **Apostila de Biomateriais**, CERAMED 2007. Disponível em: <http://www.mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriais.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2007.
- 43) Chen, Y.W. et al. **In vitro study on the influence of strontium-doped calcium polyphosphate on the angiogenesis-related behaviors of HUVECs**. *J Mater Sci Mater Med*, v.19, n.7, p.2655–62, 2008.
- 44) Fiona Louis. **Régulation de l'ostéogénèse par le Strontium pour des applications spatiales: implication des RhoGTPases**. Biologie moléculaire. Université Jean Monnet - SaintEtienne, 2014. Français. **Régulation de l'ostéogénèse par le Strontium pour des applications spatiales: implication des RhoGTPases. Biologie moléculaire**. Tese de Doutorado, Université Jean Monnet - SaintEtienne, 2014.
- 45) Takahashi, Sasaki, Tsouderos, et Suda. **S 12911-2 Inhibits Osteoclastic Bone Resorption in vitro**. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* V. 18 (6), P. 1082-1087. 2003.
- 46) Bonnelye, Chabadel, Saltel, et Jurdic. **Dual Effect of Strontium Ranelate: Stimulation of Osteoblast Differentiation and Inhibition of Osteoclast Formation and Resorption in vitro**. *Bone* V. 42 (1), P.129-138. 2008.
- 47) Caudrillier, Hurtel-Lemaire, Wattel, Cournarie, Godin, Petit, Petit, et al. **Strontium Ranelate Decreases Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand-Induced Osteoclastic Differentiation in vitro: Involvement of the Calcium-Sensing Receptor**. *Molecular Pharmacology* V. 78 (4), P. 569-576. 2010.
- 48) Hurtel-Lemaire, Mentaverri, Caudrillier, Cournarie, Wattel, Kamel, Terwilliger, Brown, et Brazier. **The Calcium-Sensing Receptor Is Involved in Strontium Ranelate-Induced Osteoclast Apoptosis. New Insights into the Associated Signaling Pathways**. *The Journal of Biological Chemistry*, V.284 (1), P. 575-584. 2009.
- 49) Dahl, Allain, Marie, Mauras, Boivin, Ammann, Tsouderos, Delmas, et Christiansen. **Incorporation and distribution of strontium in bone**. *Bone*, V. 28 (4), P. 446-453. 2001.
- 50) Sila-Asna, Bunyaratvej, Maeda, Kitaguchi, et Bunyaratavej. **Osteoblast Differentiation and Bone Formation Gene Expression in Strontium-Inducing Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell**. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, V. 53 (1-2), P. 25-35. 2007.
- 51) Fernandez, M. M., et al. **Effect of preventive Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate and zoledronic acid**

- on bone quality in ovariectomized rats.** American Journal of Clinical and Experimental Medicine. 4(6): 191-200, 2016.
- 52) Fournier, Perrier, Thomas, Laroche, Dumas, Rattner, Vico, et Guignandon. **Reduction by Strontium of the Bone Marrow Adiposity in Mice and Repression of the Adipogenic Commitment of Multipotent C3H10T1/2 Cells.** Bone V.50 (2), P. 499-509. 2012.
- 53) Vidal, Gunaratnam, Tong, et Duque. **Biochemical changes induced by strontium ranelate in differentiating adipocytes.** Biochimie. V. 95, P. 793-798. 2012.
- 54) Saidak, Haÿ, Marty, Barbara, et Marie. **Strontium Ranelate Rebalances Bone Marrow Adipogenesis and Osteoblastogenesis in Senescent Osteopenic Mice through NFATc/Maf and Wnt Signaling.** Aging Cell V. 11 (3), P. 467-474. 2012.
- 55) Kim, S. S. et al. **Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds** for bone tissue engineering. Biomaterials, Guildford, v. 27, n. 8, p. 1399-1409, 2006.
- 56) Andrade, A. D. et al. **Biologia óssea: uma revisão da literatura.** Revista Implant News, São Paulo, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007
- 57) Bellido, T. **Osteocyte-Driven Bone Remodeling.** Calcif Tissue Int., New York, v. 94, n. 1, p. 25–34, 2014.
- 58) Turhani, D. et al. **Exogenous Recombinant Human BMP-2 Has Little Initial Effects on Human Osteoblastic Cells Cultured on Collagen Type I Coated/Noncoated Hydroxyapatite Ceramic Granules.** J Oral Maxillofac Surg, Philadelphia, v. 65, p. 485-93, 2007.
- 59) Andia, D. C., Cerri, P. S, Spolidorio, L. C. **Bone tissue: morphological and histophysiological aspects.** Rev Odontol UNESP, Araraquara, v. 35, n.2, p. 191-98, 2006.
- 60) Ross, M.H.; Pawlina, W. **Histologia: texto e atlas.** 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- 61) Terra, J, et. al. **The structure of Strontium -doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study.** Phys Chem Chem Phys, V.11, p. 574, 2009.
- 62) Rho, J. Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. **Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone,** Medical Engineering; Physics, London, v. 20, p. 92-102, 1998.

1. Dee KC, Puleo DA, Bizios R. **An Introduction to tissue-biomaterial interactions**. Hoboken: John Wiley & Sons; 2002. 248 p.
2. Ammann P, Marie PJ, Boivin G, Rey C. **Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone**. *Calcif Tissue Int*. 2001; 69:121-9.
3. D'Haese PC. **Measurement of strontium in serum, urine, bone, and soft tissues by zeeman atomic absorption spectrometry**. *Clin chem*. 1999; 43(1):121-8.
4. Morohashi T, Sano T, Yamada, S. **Effects of strontium on calcium metabolism in rats: i. a distinction between the pharmacological and toxic doses**. *Jpn J Pharmacol*. 1994; 64:155-62.
5. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Division of Toxicology Toxicological Profile for Strontium**. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia: Public Health Service; 2004.
6. Ambrecht HJ, Boltz MA, Christakos S, Bruns ME. **Capacity of 1,25-dihydroxyvitamin D to stimulate expression of calbindin D changes with age in the rat**. *Arch Biochem Biophys*. 1998;352(2):159-64.
7. Laning LL. **Toxicological pathology assessment**. In: Jacobson-Kram D, Keller KA. (eds.) *Toxicology testing Handbook*. New York: Marcel Dekker; 2001. P. 315-43.
8. Redling K. **Rare earths elements in agriculture with emphasis on animal husbandry** [dissertação]. München: University Ludwig Maximilian of Munich; 2006.
9. Palasz A, Czekaj P. **Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action**. Silesian Medical Academy. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(4):1107-14.
10. Leite, A. **Aplicação de um caso prático de doenças profissionais: relevâncias médico-legal** [dissertação]. Portugal: Universidade do Porto; 2014.
11. Domingues, J.A, Toledo, M.T, Moraes, S.G. **Maternal and fetal liver histomorphological analysis of malnourished pregnant rats submitted to exposure to ethanol**. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba*. 2009;11(3):9-17.
12. Kemper J, Jung G, Poll LW, Jonkmanns C, Lüthen R, Moedder U. **CT and MRI findings of multifocal hepatic steatosis mimicking malignancy**. *Abdom Imaging*. 2002; 27:708-10.
13. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2013.

14. Serafim TD, Malafaia G, Silva ME, Pedrosa ML, Rezende SA. **Immune response to Leishmania (Leishmania) chagasi infection is reduced in malnourished BALB/c mice.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;05(6):811-7.
15. Law K, Brunt EM. **Nonalcoholic Fatty Liver Disease.** Clin Liver Dis. 2010;14: 591-604.
16. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt EM, Denk, H. **Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis.** J Hepatol. 2008; 48:821-8.
17. Pereira, FAL. **Degenerações- morte celular.** In: Brasileiro Filho G, Bogliolo Alterações do interstício: patologia geral. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. P.43-82
18. Kierszenbaum AL. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia.** Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
19. Alves VAF, Mello ES. **Fígado e sais biliares** In: Brasileiro Filho G. Bogliolo, patologia geral. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. P. 731-91.
20. Guzman G. **Overview of liver pathology.** Dis Mon. 2008; 54:419-31.
21. McCuskey R. **The hepatic microvascular system in health and its response to toxicants.** Anat Rec. 2008; 291:661-71.
22. Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda, S. **Liver architecture, cell function, and disease.** Semin Immunopathol. 2009. 31:399-409.
23. Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman AL. **Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver.** Hepatology. 2000; 32(1):3-10.
24. Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT. **Leukocyte adhesion molecules.** Crit Rev Oral Biol Med. 1997;8(4):380-8.
25. Furness RW, Camphuysen CJ. **Seabirds as monitors of the marine environment.** Ices Journal of Marine Science [Internet]. 1997 [acesso em 2018 jan 23];54(4):726-37. Disponível em: <http://icesjms.oxfordjournals.org/cgi/reprint/54/4/726>
26. Diamond AW, Devlin CM. **Seabirds as indicators of changes in marine ecosystems: ecological monitoring on Machias Seal Island.** Environmental Monitoring and Assessment [Internet]. 2003 [acesso em 2018 jan 25]; 88: 153-75. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025560805788>.
27. Gadd GM. **Interactions of fungi with toxic metals.** New Phytologist [Internet]. 1993 [acesso em 2018 jan 26]; 124:25-60. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x>.

28. Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone, FAD. **Toxicidade aguda: a contribuição dos novos métodos de ensaio.** ILSI Brasil Notícias. 2007; 3:4-6.
29. Nielsen SP. **The biological role of strontium.** Bone. 2004; 35:583-8.

REFERENCIAS ARTIGO 2

1. Leggli, C.V.S., Bohrer, D, Nascimento, P.C.D., Carvalho, L.M.D. **Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable oils, margarine and butter after sample emulsification.** Food Addit Contam Part A. 1º de maio de 2011;28(5):640–8.
2. Barto R, Sips AJ, van der Vijgh WJ, Netelenbos JC. **Sensitive method for analysis of strontium in human and animal plasma by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry.** Clin Chem. agosto de 1995;41(8 Pt 1):1159–63.
3. Carvalho M de FH, Maio FD de, Duran MC, Kira CS, Okada IA. **Determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.** Rev Inst Adolfo Lutz Impresso. 2005;64(1):44–9.
4. Baker SA, Miller-Ihli NJ, Fodor P, Woller Á. **Atomic Spectroscopy in Food Analysis Update based on the original article by Scott A. Baker and Nancy J. Miller-Ihli,** Encyclopedia of Analytical Chemistry, © 2000, John Wiley & Sons, Ltd. In: Encyclopedia of Analytical
5. Zhang D, Wang X, Liu M, Zhang L, Deng M, Liu H. **Quantification of strontium in human serum by ICP-MS using alternate analyte-free matrix and its application to a pilot bioequivalence study of two strontium ranelate oral formulations in healthy Chinese subjects.** J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS. 2015; 29:69–74.
6. Picón-Borregales D, Carrero PE, Gutiérrez-Peña LV, Vielma JR. **Relación del estroncio con el metabolismo mineral óseo y la osteoporosis. Una revisión de la literatura.** Av En Biomed. 2017;6(2):133–43.
7. Neuprez A, Hiligsmann M, Scholtissen S, Bruyere O, Reginster J-Y. **Strontium ranelate: The first agent of a new therapeutic class in osteoporosis.** Adv Ther. 2008;25(12):1235–56.
8. Arruda MAZ, Santelli RE. **Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte.** Quím Nova [Internet]. dezembro de 1997
9. Terroni, H.C. et. al. **LIOFILIZAÇÃO.** 2011.Revista Científica Unilago. P 271-284.
- 10- Ribeiro, I, I, et. al. **Utilização do fármaco composto por hidroxiapatita nanoestruturada e alginato como carreador de estrôncio para a regeneração óssea.** 2018.
- 11- Komarnicki, G. J.K. **Tissue, sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (Talpa europaea L.) in a central urban area.** 2.000; Chemosphere, V 41, p 1593-1602.
- 12 - Nielsen SP. **The biological role of strontium.** Bone. 2004;35(3):583–8.

13- Vieira SMG, Amaral B. **Osteodistrofia hepática: revisão da literatura e relato de experiência pessoal em um grupo de crianças e adolescentes com colestase crônica.** :1998; HCPA, (3) 18, 311-321.

14- Courties, A, et. al. **Coronary heart disease is associated with a worse clinical outcome of hand osteoarthritis: a cross-sectional and longitudinal study.** 2017. Rheumatic and Muculoskeletal Diseases. (3), 1-8.

15- Kostial, B, Kargacin, M. **Influence of dietary ingredients on the body retention of strontium, cadmium and mercury in suckling rats** -1984. Toxicology Letters, V.23 (2) 163-168.

APÊNDICES



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **063/2014**, intitulado **“Desenvolvimento de nanobiomateriais compósitos e de um novo fármaco para a terapêutica aplicada ao reparo ósseo”**, sob a responsabilidade do Professora Doutora Fabiana Paim Rosa, lotada no setor de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **12 de setembro de 2014**.

Salvador, 12 de setembro de 2014.

Prof^ª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS

Profa. Tânia Tavares Rodrigues
Coordenadora da CEUA-ICS
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CRM - AGRO
Materiais de Referência para a
Agricultura, Pecuária e Toxicologia

Certificado de Análises

MATERIAL DE REFERÊNCIA

Fígado Bovino

Código: RM-Agro E3001a

Data de emissão: Abril de 2017

Valores de referência para a fração massa (na base seca) atribuídos aos elementos determinados no *RM-Agro E3001a* e incerteza expandida (U_{MR})* em porcentagem

Elementos	Média \pm U_{MR}	U_{MR} (%)
Ca (mg kg^{-1})	186,07 \pm 61,26	32,92
Fe (mg kg^{-1})	206,96 \pm 49,37	23,85
K (g kg^{-1})	11,44 \pm 1,85	16,18
Mg (mg kg^{-1})	706,98 \pm 236,55	33,46
Na (g kg^{-1})	2,64 \pm 0,37	13,90
P (g kg^{-1})	14,37 \pm 6,67	46,43
Zn (mg kg^{-1})	164,44 \pm 29,21	17,76

*Intervalo a 95% de confiança.

Valores informativos são fornecidos para auxiliar os usuários nas análises de elementos de interesse em desenvolvimento de métodos e outras aplicações. Os valores informativos são baseados em resultados que não passaram por avaliação de todas as fontes de incerteza.



CRAM - AGRO
Materiais de Referência para a
Agricultura, Pecuária e Toxicologia

Valores informativos para a fração massa (na base seca) atribuídos aos elementos
determinados no RM-Agro E3001a.

Elementos	Média ± $U_{95\%}$
As ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	15,22 ± 8,97
Br (mg kg^{-1})	4,78 ± 0,07
Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	96,03 ± 60,28
Co (mg kg^{-1})	0,35 ± 0,07
Cs (mg kg^{-1})	0,328 ± 0,006
Cu (mg kg^{-1})	246,26 ± 34,10
Mn (mg kg^{-1})	8,11 ± 1,17
Mo (mg kg^{-1})	3,79 ± 0,37
Pb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	77,32 ± 22,94
Rb (mg kg^{-1})	47,2 ± 0,29
Se (mg kg^{-1})	0,91 ± 0,34
Sr (mg kg^{-1})	0,25 ± 0,11
V (mg kg^{-1})	0,033 ± 0,008

Ensaio colaborativo

Os resultados foram obtidos através do ensaio de proficiência com a participação efetiva de empresas da iniciativa privada, instituições de pesquisa estatais e de ensino superior, num total de 7 participantes.

Obtenção do material

Para o preparo do material candidato a material de referência de fígado bovino, foram utilizados fígados de 27 bovinos (animais cruzados) provenientes de experimento desenvolvido na Empresa Pecuária Sudeste (São Carlos - SP).

Uso pretendido

Esta amostra destina-se ao uso como um material de referência para a medição de elementos traço em amostras de tecido animal. O material também pode ser utilizado em controle de qualidade para a avaliação de um trabalho analítico, para a validação de métodos de análise e de controle de qualidade dentro do laboratório.

Preparação do material

Os fígados foram lavados com água desmineralizada, refrigerados e posteriormente moídos e congelados em bandejas de isopor, totalizando 160 kg de amostra *in natura*. Após liofilização da amostra (34 kg) o material foi moído em moinho ultracentrífugo (ZM 200, Retsch, Alemanha). Inicialmente foi realizada a moagem utilizando peneira de 500 μm , e após, para obtenção de menor tamanho de partícula foi utilizada a peneira de 250 μm . A seguir, a amostra foi separada em 3 baldes e homogeneizada utilizando um homogenizador em Y (modelo MA 201/5MO, Marconi, Piracicaba, Brasil). Aproximadamente 1 kg de amostra de cada balde era colocado dentro do homogeneizador (3 kg de amostra aproximadamente) e agitado por 15 min. Esse procedimento foi repetido 3 vezes para garantir a homogeneidade da amostra. Após a homogeneização, a amostra foi empacotada em frascos de vidro âmbar previamente desmineralizados. Foram produzidos 330 frascos



CRM - AGRO
Materiais de Referência para a
Agricultura, Pecuária e Toxicologia

contendo 100 g de material e receberam etiquetas adesivas para identificação. Em seguida, os frascos foram organizados em caixas e esterilizados com radiação gama (25-30 kGy) para aumento do tempo de prateleira. Todas as etapas de preparo seguiram as normas ISO GUIA 30, 31, 33, 34 e 35¹⁻⁵.

Instruções para uso

A massa mínima recomendada para a análise é de 250 mg. Deve-se realizar uma homogeneização manual prévia do frasco antes da análise e deve-se tomar as devidas precauções para evitar a contaminação do material restante no frasco.

Procedimentos de digestão em micro-ondas com cavidade (sistema fechado) são indicados para evitar perdas de elementos voláteis, utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Procedimento de digestão em bloco digestor (sistema aberto) utilizando ácido nítrico e ácido perclórico também pode ser realizado para a determinação de elementos menos voláteis.

Homogeneidade

O teste de homogeneidade interamostral tem por objetivo verificar se há variabilidade entre os frascos. Para este estudo, 10 frascos do material candidato foram aleatoriamente escolhidos e para cada frasco sorteado foram realizadas 3 réplicas de 250 mg, sendo que a seguir um frasco foi selecionado para a realização dos estudos de homogeneidade dentro do frasco (7 réplicas). Foi realizada a análise de variância ANOVA de fator único, sendo possível observar que o F_{obtido} foi maior que o F_{tabelado} para todos os elementos de interesse indicando que os resultados não diferiram de forma significativa a 95% de confiança e o material pode, portanto, ser considerado homogêneo (para uma massa de amostra de 250 mg).

Estabilidade

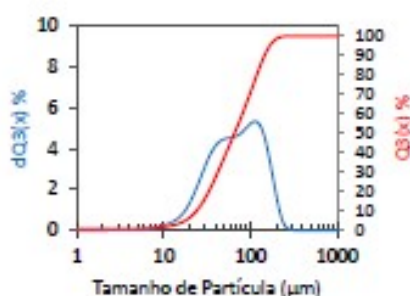
Foram avaliados dois tipos de testes de estabilidade a serem considerados em materiais de referência: a estabilidade a curto prazo e a estabilidade a longo prazo. Foram sorteados frascos aleatoriamente e colocados dentro de sistema fechado no qual a temperatura foi fixada em 38°C na estufa e a umidade em 100%, simulando épocas de chuva e calor. Este sistema fechado foi mantido durante 1 mês e feita a quantificação em triplicata dos analitos de interesse nos frascos sorteados. Para o teste de estabilidade a longo prazo foram sorteados aleatoriamente e a cada 3 meses foi feita uma quantificação dos analitos em estudo, em triplicata, durante o período de 9 meses a temperatura ambiente (cerca de 25 °C), sendo realizado a fim de acompanhar a estabilidade do material sob condições de armazenamento. Foram feitas as determinações por ICP-MS para As, V, Mn, Co, Cu, Se, Sr, Mo, Cd e Pb e as concentrações de Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn foram obtidas usando ICP OES. Análise de variância ANOVA de fator único apresentou F_{obtido} maior que o F_{tabelado} para todos os elementos de interesse indicando que os resultados não diferiram de forma significativa a 95% de confiança e o material foi considerado estável nos dois testes avaliados.



CRM - AGRO
Materiais de Referência para a
Agricultura, Pecuária e Toxicologia

Tamanho de partículas

Foram realizadas três leituras em cada um dos três frascos submetidos ao ensaio de distribuição de partícula usando o modo de dispersão seca. Aproximadamente 60% do material apresenta tamanhos de partículas de aproximadamente 145 nm, conforme pode ser observado no gráfico a seguir.



Incertezas

A abordagem das incertezas em conformidade com o preconizado na norma ABNT ISO Guia 35¹ pressupõe a declaração das incertezas de todas as etapas de preparação do material. Dessa forma, a estimativa da incerteza expandida associada aos valores de concentração (U_{MR}) foi obtida pela combinação das contribuições referentes à incerteza padrão da caracterização (u_{char}), da homogeneidade (u_{ho}) e da estabilidade a longo prazo (u_{st}), conforme equação abaixo:

$$U_{MR} = k \sqrt{u_{char}^2 + u_{ho}^2 + u_{st}^2}$$

Adotou-se para o fator de abrangência k igual a 2, com intervalo de confiança de 95%. Os cálculos das incertezas da homogeneidade, da estabilidade e da caracterização foram executados de acordo com o indicado na norma ABNT ISO Guia 35¹.

Armazenamento

O material deve ser mantido fechado no frasco original e armazenado no escuro em temperatura de aproximadamente 25 °C. Os frascos também podem ser armazenado em dessecador.

Determinação do peso seco

Todos os valores estão expressos na base seca. Portanto, o peso seco tem de ser determinado no momento da análise, utilizando-se sub-amostras separadas de pelo menos 1g até peso constante em estufa a temperatura de 105 °C em alíquota que não será utilizada para determinação dos elementos de interesse.

Prazo de validade

Estipulou-se que o tempo de prateleira poderia ser em torno de 5 anos para o candidato a material de referência de fígado. É possível que o material seja estável por tempo maior que o definido. Dessa forma, este material ficará como produto a ser monitorado semestralmente. Qualquer alteração será informada.



CRM - AGRO
Materiais de Referência para a
Agricultura, Pecuária e Toxicologia

Técnicas utilizadas para determinação de cada elemento

Elemento	Código da técnica	Elemento	Código da técnica
Arsênio (As)	ICP-MS, INAA	Magnésio (Mg)	ICP OES
Cálcio (Ca)	ICP OES, INAA	Sódio (Na)	ICP OES, INAA
Cádmio (Cd)	ICP-MS	Potássio (K)	ICP OES, INAA
Cobre (Cu)	ICP-MS, INAA	Fósforo (P)	ICP OES
Ferro (Fe)	ICP OES, INAA	Chumbo (Pb)	ICP-MS
Mangânês (Mn)	ICP OES, INAA	Zinco (Zn)	ICP OES, INAA
Cobalto (Co)	ICP OES, ICP-MS	Vanádio (V)	ICP OES ICP-MS
Estrôncio (Sr)	ICP OES, ICP-MS	Selênio (Se)	ICP OES, ICP-MS, INAA
Molibdênio (Mo)	ICP OES, ICP-MS INAA		

Técnicas:

ICP OES Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente
ICP-MS Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente
INAA Análise por ativação Neutrônica Instrumental

Participantes do ensaio colaborativo

Centro de Estudos Ambientais - Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Embrapa Solos
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)
Universidade Federal da Bahia (UFBA)*
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)
Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Química - Universidade de São Paulo (USP)
LANAGRO - Pernambuco
LANAGRO - Rio Grande do Sul
LANAGRO - São Paulo

Referências

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT ISSO GUIA 30. Materiais de referência - Termos e definições selecionados. ABNT 2016.
²ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT ISO GUIA 31. Materiais de referência - Conteúdo de certificados e rótulos. 2004.



CRM - AGRO
Materiais de Referência para a
Agricultura, Pecuária e Toxicologia

³ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT ISO Guia 33. Utilização de materiais de referência certificados. 2002.

⁴ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT ISSO GUIA 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. ABNT, 2012.

⁵ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT ISSO GUIA 35: Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. ABNT, 2012.

Ana Rita de Araujo Nogueira
Gilberto Batista de Souza
Silmara Rossana Bianchi
Mayumi Kawamoto

Comentários, informações e dúvidas podem ser direcionados a:

Embrapa Pecuária Sudeste
Email: cppse.mr@embrapa.br

Emitido e fornecido por

Embrapa Pecuária Sudeste
<http://www.cppse.embrapa.br/>
Rodovia Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos SP

