

ANÁLISE DOS COMPONENTES INORGÂNICOS DE FÊMURES DE CAMUNDONGOS POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

Rodrigo de Oliveira¹, Claudia Maria de Oliveira Monteiro da Silva¹, Airton Abrahão Martin², Ana Maria do Espírito Santo²

¹UNIVAP/Faculdade de Ciências da Saúde - FCS, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, SP.

²UNIVAP/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D/LEVB, Av. Shishima Hifumi, 2911, 12244-000, São José dos Campos, SP.

oliverardg@ig.com.br, lesouares@univap.br, claudia@univap.br, amartin@univap.br, amesanto@univap.br

Resumo - O objetivo do presente estudo é avaliar o teor de cálcio (Ca) e fósforo (P) na estrutura óssea de camundongos machos saudáveis. Para tal, foram analisados os fêmures esquerdo e direito de dois animais imediatamente após o sacrifício e após a conservação das amostras em soro fisiológico e formol, decorridos 60 horas, 120 horas e 30 dias. A técnica de micro-análise utilizada é a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (ED-XRF). Os parâmetros experimentais foram estabelecidos comparando-se a estrutura óssea com a hidroxiapatita sintética estequiométrica, para uma aproximação quantitativa da técnica analítica. Foi determinado os teores dos componentes de Ca e P das amostras, assim como a relação entre estes componentes que fornece uma estimativa do grau de mineralização das mesmas. Os resultados obtidos indicaram o surgimento de picos do elemento enxofre (S) que passou a ser detectável decorrente da decomposição da medula por necrólise

Palavras-chave: Ossos, fluorescência de raios-x, hidroxiapatita, tecidos duros, mineralização

Área do Conhecimento: IV - Ciências da Saúde

Introdução

O osso é o elemento estrutural primário do corpo humano. Serve para proteger órgãos vitais e dar suporte aos músculos que permitem os movimentos do esqueleto. O osso difere de outros materiais estruturais da engenharia, pois ele é auto-reparador e suas propriedades químicas e morfológicas podem ser alteradas em resposta a mudanças fisiológicas (KAPLAN, 1994).

É de consenso geral que o osso é um órgão individual do sistema esquelético, mas o termo osso tem pelo menos três significados. O primeiro é a matriz óssea mineralizada excluindo o osteóide; este se adapta rigorosamente à definição de osso como tecido duro. O osteóide é a matriz orgânica que será mineralizada, e às vezes é chamada de pré-osso. O segundo significado de "osso", e por nós adotado, é matriz óssea mineralizada ou não, isto é, incluindo ambos osso mineralizado e osteóide. O terceiro significado de "osso" é um tecido incluindo medula óssea e outros tecidos moles, bem como definido previamente. Referimos-nos à combinação de osso e tecido mole associamos a medula como "tecido ósseo". Tecido é definido como "uma agregação de células similarmente especializadas unidas na execução de uma função específica" (PARFITT et al., 1987). O osso tem, basicamente, como componentes inorgânicas majoritárias, os elementos Ca, P e K e, como componentes minoritárias, os elementos Fe e S. (GARTNER; HIATT, 1999)

As propriedades mecânicas dos ossos estão relacionadas com sua formação orgânica e inorgânica. Segundo Currey (1998), os componentes inorgânicos, predominantemente hidroxiapatita, constitui em torno de 60-70% do osso adulto. As componentes inorgânicas são responsáveis pela rigidez da estrutura óssea. Os componentes orgânicos, que formam o restante do osso, são predominantemente compostos por colágeno tipo I (90%) e o restante consistindo de outras substâncias, tais como: glicoproteínas, proteoglicanos e água. As componentes orgânicas são responsáveis pela elasticidade (STEVENSON; LINDSAY, 1998)

A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Após a remoção da parte mineral, os ossos mantêm sua forma intacta, porém tornam-se tão flexíveis quanto os tendões. A destruição da parte orgânica, que é principalmente colágeno tipo I, pode ser realizada por incineração, e também deixa o osso com sua forma intacta, porém tão quebradiço que dificilmente pode ser manipulado sem se partir (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Após a morte, os corpos sofrem putrefação, que é a destruição dos tecidos do corpo por ação de bactérias e enzimas, resultando na dissolução gradual dos tecidos em gases, líquidos e sais. A primeira ação desencadeada é a total ou parcial decomposição dos tecidos moles. A decomposição total do corpo pode durar alguns meses e até

vários anos, dependendo da ação ambiental. Um dos materiais que menos sofre com a decomposição são os ossos, entretanto, a medula é um tecido mole que faz parte da estrutura óssea. Entre os produtos da decomposição temos o sulfeto de hidrogênio (H₂S), responsável pela produção de mercaptana quando ligado ao carbono saturado (POUNDER, 1995 apud Macedo 2003).

A análise por fluorescência de raios-X é um método semi-quantitativo baseado na medida da intensidade (número de fótons coletados por unidade de tempo) dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra quando devidamente excitada. A intensidade da energia característica emitida pelos componentes da amostra está relacionada com a concentração de cada elemento presente na amostra (LIEBHAFSKY, 1966). Deste modo, uma avaliação quantitativa por comparação pode ser conduzida para determinação dos teores inorgânicos presentes na estrutura óssea. Esta técnica foi muito utilizada para estudo de materiais inorgânicos, como cerâmicas e ligas metálicas, e, nos últimos 10 anos, tem sido utilizada para o estudo de tecidos biológicos (MACEDO, 2004). Entre as principais vantagens desta técnica analítica, destaca-se o fato de que não há qualquer necessidade de preparação prévia da amostra, as mesmas são técnicas não-destrutivas e o resultado pode ser obtido em tempo real.

Materiais e Métodos

Amostras: Este estudo foi realizado pelo aproveitamento do material descartado dentro do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (A030/2006/CEP). Neste estudo-piloto, foram utilizados dois fêmures, direito e esquerdo, de dois camundongos machos adultos saudáveis (animal A e animal B). A Figura 1 mostra o aspecto do fêmur esquerdo, próximo à região da bacia, imediatamente após o sacrifício. A Figura 2 mostra o aspecto dos fêmures esquerdo, armazenado em soro fisiológico, e direito, armazenado em formol, após 60 horas, 120 h e 30 dias, respectivamente, à temperatura ambiente (entre 15 e 23 °C). Os procedimentos de anestesia, sacrifício e osteotomia foram realizados em sala cirúrgica com cuidadosa desinfecção do local. A cirurgia foi realizada de acordo com as normas para prática didático-científica da vivisseção de animais (lei 6638/08 de maio de 1979) e com os princípios éticos de experimentação animal (COBEA, 1991) sob condições padrão de assepsia. O sacrifício do animal foi feito administrando-se uma injeção intramuscular (seringa e agulha descartável) de Zoletil 0,8 ml/Kg e, após 10 minutos, foi aplicado Tio Pental (Barbitúrio – CRYSTALIA) 0,5 ml/Kg. A

região femoral foi dissecada, sendo o tecido mole eliminado.



Figura 1: Fotografia do fêmur esquerdo do animal A imediatamente após o sacrifício e osteostomia.

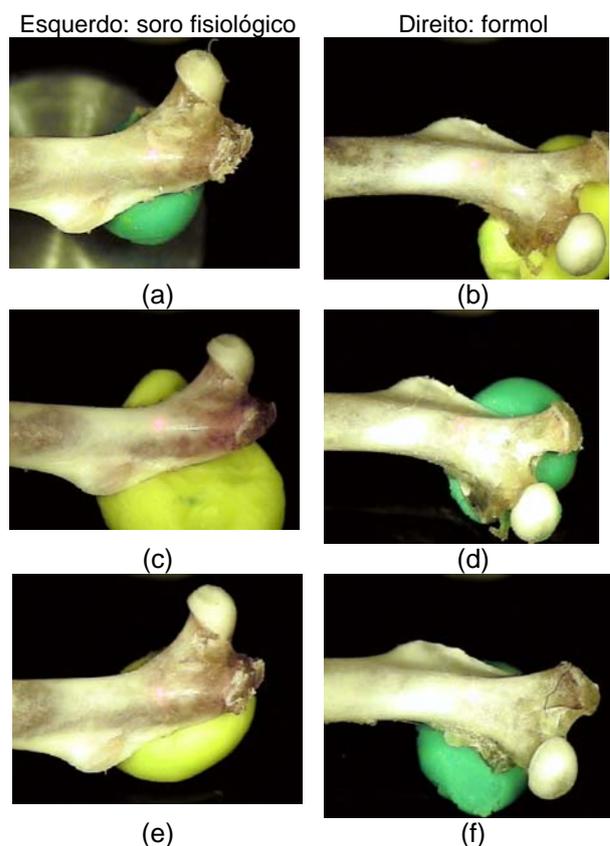


Figura 2: Fotografia do aspecto dos fêmures do animal A após armazenamento à temperatura ambiente:

- (a) fêmur esquerdo após 60 horas da remoção e armazenado em soro fisiológico.
- (b) fêmur direito após 60 horas da remoção e armazenado em formol.
- (c) fêmur esquerdo após 120 horas da remoção e armazenado em soro fisiológico.
- (d) fêmur direito após 120 horas da remoção e armazenado em formol.
- (e) fêmur esquerdo após 30 dias da remoção e armazenado em soro fisiológico.
- (f) fêmur direito após 30 dias da remoção e armazenado em formol.

Técnica analítica: A análise química por ED-XRF foi realizada em um espectrofotômetro de Fluorescência de Raios-X marca Shimadzu modelo μ EDX-1300. A superfície da amostra foi analisada longitudinalmente por dispersão de energia da radiação proveniente de um tubo de Rh acoplado a um sistema computadorizado. A varredura foi feita em 5 pontos distintos. O tempo de leitura foi estipulado em 100 s por ponto. A contagem da radiação foi feita por um detector semiconductor de Si (Li) refrigerado por nitrogênio líquido. A tensão e a corrente do tubo foram ajustados em 15 kV com ajuste automático da corrente. A amostra foi colocada na câmara e a superfície externa foi irradiada com Raios X.

A Figura 3 mostra o equipamento analítico por ED-XRF. Foi utilizado, como referência, o reagente de hidroxiapatita estequiométrica sintética, marca Sigma-Aldrich, grau de pureza 99.99% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Os parâmetros fundamentais para cálculo do balanço da fórmula química foram estabelecidos para os pesos relativos de Ca, P e O.



Figura 3: Fotografia do espectrofotômetro de Fluorescência de Raios-X por energia dispersiva, marca Shimadzu modelo μ EDX-1300. Detalhe: compartimento do porta-amostras.

Resultados

A Figura 4 mostra os espectros ED-XRF dos minerais cálcio (Ca) antes e após armazenamento em soro fisiológico (fig. 4a) e formol (fig. 4b); fósforo (P) antes e após armazenamento em soro fisiológico (fig. 4c) e formol (fig. 4d); e enxofre (S) antes e após armazenamento em soro fisiológico (fig. 4e) e formol (fig. 4f)

Em todos os espectros, observa-se que os picos de Ca, P e S estão centrados em, aproximadamente, 3,68 keV, 2,01 keV e 2,31 keV, respectivamente. Estes valores correspondem exatamente à energia de transição da camada $K\alpha$ do elemento Ca (3,691 keV), do elemento P (2,013 keV) e do elemento S (2,308 keV).

Observa-se que há variabilidade das intensidades relativas dos picos entre as amostras. A intensidade dos picos está relacionada aos

teores dos elementos minerais presentes. Entretanto, os valores da proporção Ca/P é um fator indicativo da mineralização da hidroxiapatita óssea.

Nota-se o surgimento do pico de energia de fluorescência de raios-X referente à transição eletrônica da camada $K\alpha$ do elemento enxofre (S) nas amostras antes e após conservação. Com o decorrer do tempo, dá-se início à decomposição da medula. Entre os produtos da decomposição está o sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é volátil e evapora à temperatura ambiente. Por isto observa-se maior quantidade deste elemento em tempos mais curtos após o sacrifício do animal, pois os frascos foram mantidos abertos durante o experimento.

Supõe-se que a decomposição pode ocorrer mesmo para a amostra conservada em formol, pois acreditamos que não houve tempo hábil para que o reagente formol pudesse atingir a região da medula antes do início do processo de decomposição da mesma, pois o osso é íntegro. Como o feixe de raios-X incidente atinge uma grande parte da espessura da amostra, há a detecção de todos os elementos presentes no volume de excitação da amostra.

Ainda, o elemento enxofre está presente nas enzimas musculares e tecidos que revestem o osso. Para conclusões futuras, deve-se proceder o estudo com ossos seccionados transversalmente para facilitar a penetração dos reagentes na medula ou fazer um mapeamento transversal dos elementos.

Os valores do teor de enxofre e da proporção Ca/P da hidroxiapatita óssea das amostras analisadas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Relação Ca/P e teor do mineral S presentes na superfície das estruturas ósseas analisadas.

Amostra	Teor Ca/P - (% peso)				Teor S - (% peso)			
	animal A		animal B		animal A		animal B	
	Sor	For	Sor	For	Sor	For	Sor	For
Fêmur após remoção	1,66	1,66	1,78	1,78	0,26	0,26	0,15	0,15
Fêmur após 60 horas	1,74	1,99	1,75	2,03	0,28	0,37	0,29	0,41
Fêmur após 120 horas	1,72	1,75	1,66	1,72	0,24	0,28	0,18	0,39
Fêmur após 30 dias	1,75	2,02	1,72	1,97	0,23	0,33	0,32	0,40

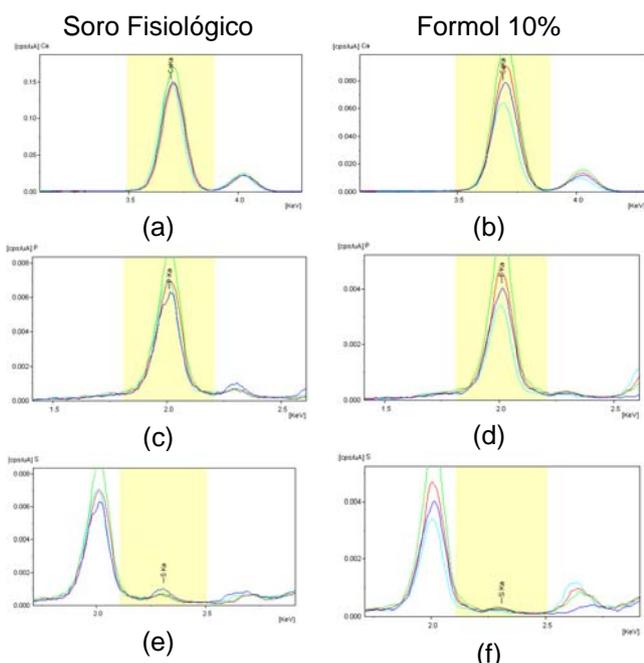


Figura 4: Espectro ED-XRF das amostras analisadas para os componentes cálcio (Ca), fósforo (P) e enxofre(S) logo após remoção (azul), após 60h (verde), após 120h (vermelho) e após de 30 dias (azul escuro).

Discussão

A hidroxiapatita estequiométrica apresenta fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A taxa de minerais da hidroxiapatita é determinada pela razão de Ca e P. A relação Ca/P calculada (teórica) para a hidroxiapatita estequiométrica é 1,67 que é o mesmo valor obtido experimentalmente com as condições estabelecidas neste trabalho. Entretanto, a hidroxiapatita presente nos tecidos biológicos duros apresenta uma variação deste valor dada pelo grau de mineralização do mesmo.

A proporção de Ca/P dos tecidos duros, como apresentado nos resultados do presente estudo, apresentaram uma grande variabilidade. Isto indica que existem diferentes graus de mineralização das amostras. Este resultado é esperado devido às diferenças fisiológicas (intrínsecas e extrínsecas) de cada animal, inclusive entre os ossos direito e esquerdo de um mesmo animal. Isto ocorre por causa de fatores cronológicos, hábitos alimentares e articulação.

Observou-se que as amostras mantidas em soro fisiológico apresentaram maior desmineralização comparativamente àquelas que foram mantidas em formol 10%.

Conclusão

Foi estabelecido um procedimento para medidas analíticas quantitativas das componentes minerais do osso de camundongos pela técnica ED-XRF. A proporção Ca/P da hidroxiapatita aumenta com a desmineralização do tecido, de modo que a inferir que o teor do componente fósforo (fosfato) reduz mais rapidamente que o componente cálcio. O estudo forneceu balizamento para proceder a continuidade do projeto para avaliar o processo de desmineralização na conservação e influência do tempo de morte em ossos.

Agradecimentos

Este trabalho é desenvolvido com o suporte financeiro da FAPESP (50811-9/05 e 4384-8/01). R. OLIVEIRA agradece a Fundação Valeparaibana de Ensino (FVE/Univap) pela bolsa de estudos fornecida.

Referências

- GARTNER, P.G.; HIATT, L.H. Tecido Ósseo. In: Tratado de Histologia. 1a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999, p. 104-123.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: Histologia Básica. Koogan. P. (ed.), 9ª ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999, p. 111-28.
- KAPLAN, F.S. et al. Form and Function of Bone. In: SIMON, S.R. Orthopaedic Basic Science. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.
- LIEBHAFSKY, H. A. et al. X-Ray Absorption and Emission in Analytical Chemistry. In: Spectrochemical Analysis with X-rays. 2ª ed, New York, John Wiley e Sons, Inc., 1966, 357p.
- MACÊDO, J. A. B. Métodos Laboratoriais de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas – 2ª. Edição. Belo Horizonte: CRQ-M.G. 450p., 2004.
- PARFIT, A. M et al. Bone Histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Journal of Bone and Mineral Research, v. 2, n. 6, p. 595-610,1987.