

Síntese e caracterização de Hidroxiapatita dopada com Európio: Influência do comprimento de onda de excitação na luminescência do Eu^{3+} na HA

Flávia R. O. Silva^a, Nelson B. de Lima^a, Deiby S. Gouveia^a, Nildemar A. M. Ferreira^a,
Valter Ussui^a, Lilia C. Courrol^b, Ana Helena A. Bressiani^a

^aInstituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) – Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais

^bUniversidade Federal de São Paulo – Departamento de Ciência Exatas e da Terra

RESUMO:

A Hidroxiapatita (HA) dopada com o európio (HAEu), oferece a vantagem de tornar a HA um biomaterial fluorescente permitindo o imageamento da mesma através da sua emissão in vitro e in vivo. Vários autores baseiam seus estudos de sítio de ocupação do európio na hidroxiapatita através da luminescência do íon lantanídeo, verificando que a mesma é influenciada pelo método de síntese e concentração do íon dopante. Neste trabalho nanopartículas de HA dopadas com 1,4% de Európio trivalente foram sintetizadas pelo método de co-precipitação e calcinadas a diferentes temperaturas (600°C e 1200°C). Foi realizada uma avaliação criteriosa da influência do comprimento de onda de excitação na luminescência do Európio na HA, sendo verificado que tanto as transições características do európio, no sítio Ca_I e Ca_{II} , quanto a intensidade luminescente são dependentes do comprimento de onda de excitação. A não observância desse fato pode levar a conclusões errôneas quanto ao sítio de ocupação do európio na apatita.

Palavras-chaves: Hidroxiapatita, Európio, Fluorescência, Difração de Raios x

INTRODUÇÃO

A Hidroxiapatita (HA) é o constituinte inorgânico mais importante dos tecidos ósseos. Sua fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e devido a sua constituição mineral similar a dos ossos e dos dentes⁽¹⁾, a HA sintética vem sendo extensivamente usada para próteses, como substituto ósseo, em revestimentos de implantes metálicos e/ou no preenchimento de cavidades ósseas⁽²⁾, entre outros.

As estruturas das apatitas permitem substituições catiônicas e aniônicas, que têm como propósito alterar as características do material aproveitando as melhorias

individuais ou concomitantemente (nos casos de co-dopagem) que cada íon promove no biomaterial. Nos sítios catiônicos não equivalentes da HA: Ca_I e Ca_{II} , os cátions do sítio I apresentam simetria trigonal (C_3) formada por nove átomos de oxigênio que coordenam o sítio catiônico, enquanto que os cálcios do sítio II estão coordenados a 6 átomos de oxigênio e ao íon OH^- , apresentando simetria local (C_6)⁽³⁾.

A dopagem com íons lantanídeos, como o európio, oferece a vantagem de tornar a HA luminescente, ou seja, um biomaterial com propriedades fluorescentes que permitem o acompanhamento do mesmo através da sua emissão, através do imageamento da HA luminescente *in vitro* e *in vivo*, monitoramento da liberação de drogas controladas, a adsorção/dessorção de metais pesados em água e solo e etc.

O Eu^{3+} apresenta a configuração $4f^6$ em vários ligantes levando a uma intensa emissão no vermelho (590-625nm) devido às várias transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$, $J = 0-4$ (especialmente $J=1$ e 2), Figura 1. Outra característica interessante da luminescência do Eu^{3+} é que sua estrutura de níveis energéticos é relativamente simples, especialmente a 7F_j , permitindo a determinação da simetria microscópica em torno do sítio³. Além disto, as linhas de emissão não-degeneradas $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ são importantes nesse contexto por revelarem a presença de sítios não equivalentes na matriz hospedeira (hidroxiapatita)³.

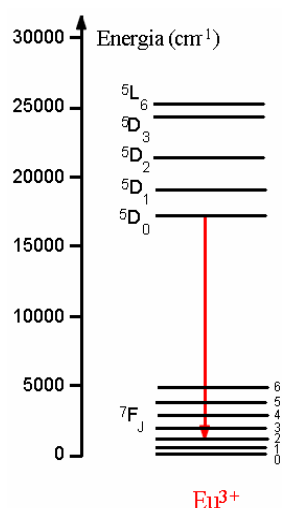


Figura 1 – Diagrama dos níveis de energia do Európio

Têm sido reportado que o método de preparação, a morfologia, mudanças na estrutura do cristal, dos parâmetros de rede e a concentração do dopante afetam o

sítio de ocupação do európio na apatita, o que influencia diretamente no espectro de emissão e de excitação e na intensidade de fluorescência do íon lantanídeo ^(4,5,6).

Em estudos já realizados pôde-se constatar que não há um consenso na escolha da excitação do material para os estudos de luminescência. Por exemplo, Martin et al⁽⁷⁾, estudaram a implantação iônica de 2,5% de Európio em apatitas naturais, mostrando que a emissão do íon implantado e após um aquecimento de 1h a 400°C, no espectro de emissão, quando excitadas a 337nm, apresentaram as transições específicas do Eu³⁺ no sítio Cal correspondentes às linhas em 621,5nm; 595nm e 579nm. Para tempos mais longos de calcinação, novas bandas apareceram: em 630nm, 626nm e 573,5nm. Essas intensidades aumentaram com o tempo (2-3h) enquanto que as linhas de emissão anteriores decresceram progressivamente. O primeiro conjunto de banda de emissões com o máximo em 621nm corresponde às transições $^5D_0 \rightarrow ^5F_j$ do Eu³⁺ na posição Cal de alta simetria C₃, enquanto que o segundo conjunto com a emissão principal em 573nm corresponde às mesmas transições do Eu³⁺, mas na posição Call de baixa simetria C_s.

Yang P. et al⁽⁸⁾ obtiveram a hidroxiapatita com 5% de Európio pelo método de precipitação e calcinaram as amostras por 6h a 550°C. As amostras, quando excitadas em 250nm apresentaram emissão com bandas estreitas, centradas em 590nm, 612nm, 650nm e 659nm atribuídas às transições $^5D_0 \rightarrow ^5F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^5F_2$, $^5D_0 \rightarrow ^5F_3$, $^5D_0 \rightarrow ^5F_4$, respectivamente, o que significa que o Európio ocupava apenas o sítio Cal.

Graeve O.A. et al⁽⁹⁾ produziram HA dopada com 2% de európio através da síntese por combustão e obtiveram pós cristalinos com e sem tratamento térmico. As amostras foram excitadas com comprimentos de onda em 254nm, 305nm, 337nm e 359nm, sendo os três últimos os melhores em promover a fluorescência do európio(III), em comprimento de ondas mais longos, 575nm, correspondente as transições: $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$, 575nm; $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, 605nm; $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, 625nm e 631nm e, $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$, 661nm. Em seus experimentos com Eu³⁺ e Eu²⁺, eles mostraram que os pós apresentavam luminescência fraca após a combustão a 500°C, e intensa luminescência após o tratamento térmico a 600°C, 800°C e 1000°C, obtendo picos mais finos e o movimento do európio entre os sítios catiônicos. Com essa temperatura acima de 600°C eles começaram a observar a formação da fase β -TCP.

Han et al⁽¹⁰⁾ sintetizaram HA dopada com 2% Eu^{3+} pelo método de precipitação utilizando ultrassom e calcinadas a 600°C. Eles observaram apenas picos em 594nm e 618nm, quando excitadas em 394nm (mais uma vez, európio ocupando apenas o Cal).

Jagannathan et al⁽³⁾ sintetizaram hidroxiapatita dopada com 5% európio pelo método de precipitação. Excitando essas amostras a 395nm eles observaram duas bandas de emissão mais intensas, e largas, em 590nm e 613nm e duas bandas muito fracas entre 575nm e 580nm, correspondente a transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$, indicando a presença de dois sítios de ocupação do Eu^{3+} no sistema. Porém, mesmo calcinadas 950°C por 2h as bandas continuavam largas como para as amostras sem calcinação, indicando provável baixa cristalinidade das mesmas. Eles verificaram também diferença nos espectros para as diferentes apatitas: hidroxiapatita, fluoroapatita, bromoapatita e cloroapatita.

Com o objetivo de estudar a influência da excitação dos materiais no que diz respeito a ocupação dos sítios Cal e Call pelo Európio na HA, foram sintetizadas nanopartículas de HA dopadas com 1,4% de Európio trivalente pelo método de co-precipitação e calcinadas em diferentes temperaturas (600°C e 1200°C). Foi realizada uma avaliação criteriosa da luminescência do Európio na HA, para as diferentes excitações, para verificar a influencia das mesmas nos espectros de emissão das amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes, cloreto de európio hexahidratado 99,99% (Sigma Aldrich), hidróxido de cálcio PA (Synth), ácido ortofosfórico PA (Dinâmica), hidróxido de amônio PA (Synth) e ácido nítrico (Synth) foram usados sem purificação.

Para a obtenção de EuNO_3 partiu-se do $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ da Sigma. 0,251g de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada foi adicionado, sob forte agitação, a uma solução aquosa de hidróxido de amônio para a obtenção de pH próximo a 10. Por filtração, o precipitado foi separado do sobrenadante e em seguida lavado com água deionizada para a retirada dos íons cloreto. Ao filtrado foi adicionado HNO_3 , obtendo-se assim o EuNO_3 , o qual foi posteriormente usado na síntese da HAEu.

A síntese da hidroxiapatita pura (HAp) foi realizada pelo método de precipitação, onde o ácido ortofosfórico é adicionado gota a gota (8 mL/min) em uma

suspensão de hidróxido de cálcio, sob agitação constante formando água como subproduto: $10 \text{Ca(OH)}_2 + 6 \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 18\text{H}_2\text{O}$

A síntese da HAEu, por co-precipitação, é baseada na fórmula $\text{Ca}_{(8,6)}\text{Eu}_{1,4}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e seguiu-se o mesmo procedimento para a obtenção de HAp. Durante a síntese, o pH foi monitorado e adicionou-se hidróxido de amônia para ajustar o pH = 10.

Após a síntese, os precipitados ficaram 24h sem agitação e em seguida eles foram filtrados e lavados com água deionizada. Em seguida os filtrados passaram pelo processo de secagem em estufa, a 60°C por 24h.

Feito isso, os pós sintetizados foram calcinados a 600°C por 1 hora e 1200°C por 3 horas. **Erro! Indicador não definido..**

Para a caracterização dos biomateriais, foram realizadas as seguintes análises:

- Difração de Raio X (DRX) foi realizada em um difratômetro da marca Rigaku, modelo Multiflex, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0,1542\text{nm}$). Para avaliação do tamanho médio do cristalito foi utilizado a equação de Scherrer e o plano cristalino foi o (002):

$$D = \frac{k\lambda}{B \cos(\theta)}$$

D é o tamanho médio do cristalito, $k=0,94$ a constante Scherrer, λ o comprimento de onda da raios x, θ é o ângulo de difração correspondente à linha (hkl) considerada, B é a largura da linha de difração da amostra.

- Microscopia eletrônica de Varredura: as amostras foram recobertas com carbono e analisadas no FEG JSM 6701F – JEOL;

- Microscopia eletrônica de Transmissão: as amostras foram dispersas em álcool isopropílico e depositadas sobre grade de cobre para análise no JEM 2100 – JEOL;

- Espectroscopia de Fluorescência: foi utilizado o Fluorímetro Fluorolog 3 da Jovin Yvon para as análises dos materiais através de fibra óptica. Nessa etapa, foi feita uma avaliação criteriosa da influência do comprimento de onda de excitação na luminescência do Európio na HA, afim de verificar a influência da escolha do comprimento de onda de excitação na determinação do sítio de ocupação do európio na HA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os difratogramas de raios x mostrados na Figura 2 mostram picos de difração bem alargados após a síntese da HAEu, indicando que o tamanho médio de cristalito é pequeno (22nm) e não apresentando grande variação até tratamento de calcinação a 600^oC (23nm). O cristalito aumenta de forma significativa para o tratamento a 1200^oC (181nm). O tamanho médio de cristalito para a HAP após a síntese é de 27nm e após tratamento a 1200^oC atinge o valor de 163nm. Apesar do baixo tamanho de cristalito após a síntese, tanto a HA quanto a HAEu apresentam fase cristalina bem definida. Isto pode ser verificado nas micrografias de HRTEM apresentadas na Figura 3.

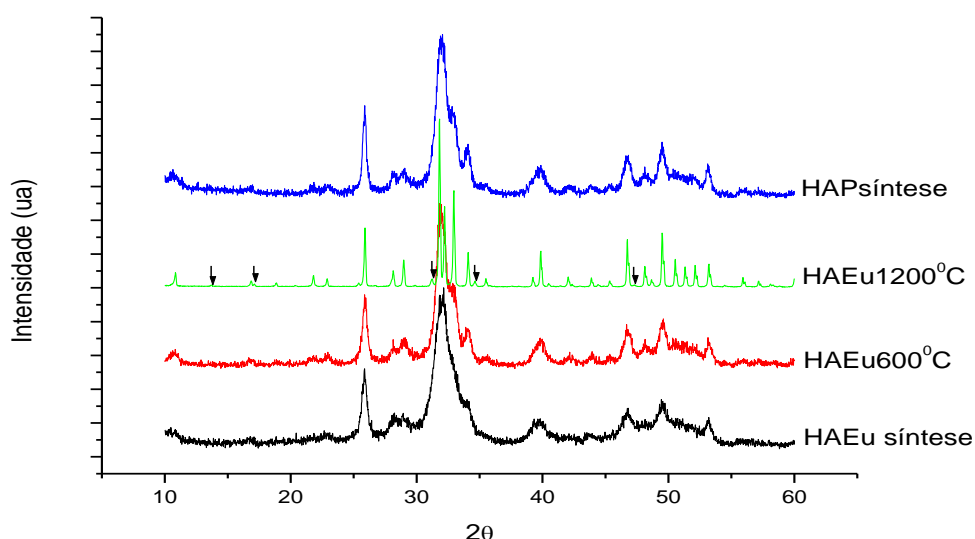


Figura 2 - Difratogramas de raios x apresentando o padrão de difração da HA. As setas indicam a presença da fase minoritária $\text{Ca}_{2,81}\text{Mg}_{0,19}(\text{PO}_4)_2$. O alargamento das raios é inversamente proporcional à temperatura.

A hidroxiapatita dopada com európio apresenta morfologia diferente do material puro. As partículas são mais arredondas com a presença de európio e mais retangular na HAP e também ocorre pequena diminuição no TMC das partículas com európio quando comparadas à HAP. Quando calcinadas a 1200^oC o tamanho de partícula da HAEU é maior do que o da HAP.

Nas amostras de HAEu é possível observar no difratograma apresentado na Figura 2 a presença de uma segunda fase identificada como $\text{Ca}_{2,81}\text{Mg}_{0,19}(\text{PO}_4)_2$ conforme cartão ICDD-PDF 70-682.

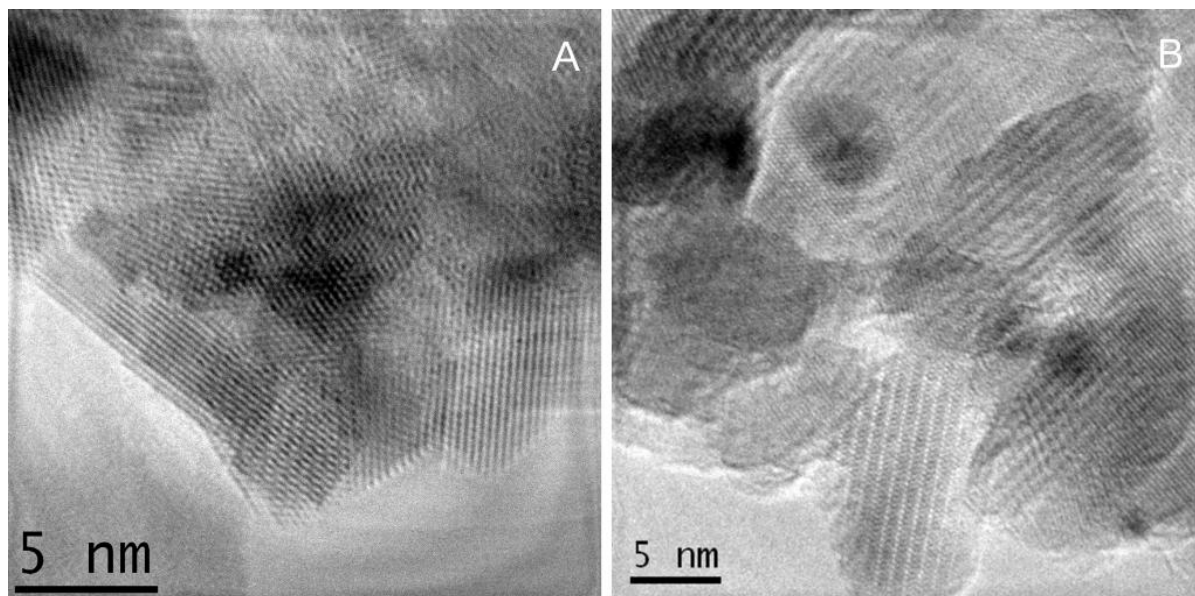


Figura 3 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução das amostras A) HAp sintetizada e B) síntese de HAEu

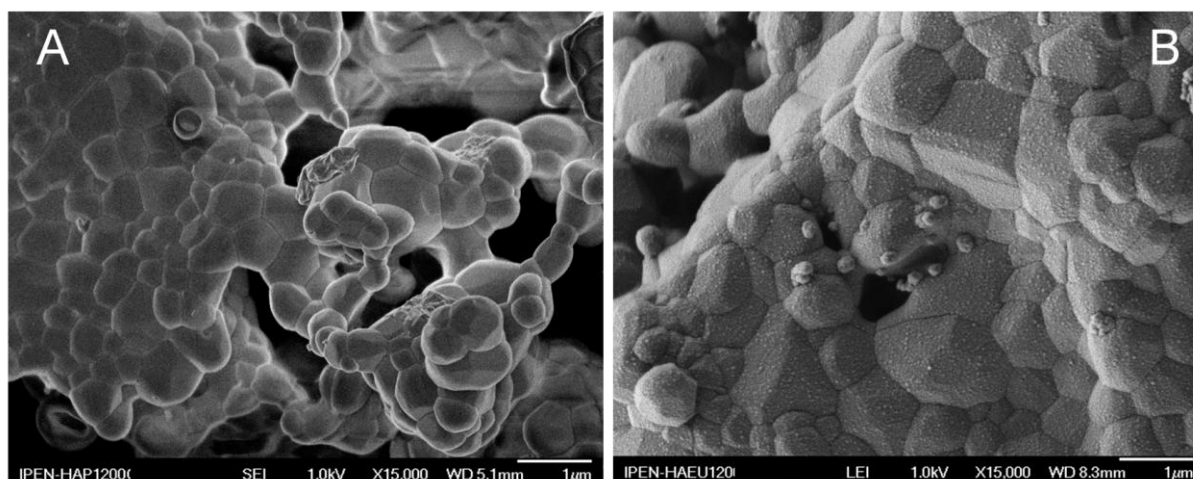


Figura 4 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras A) HAp calcinada a 1200°C e B) HAEu calcinada a 1200°C.

Quanto à luminescência, as amostras de hidroxiapatitas puras apresentaram uma fraca emissão em torno de 400nm quando excitadas a 250nm, e não houve alterações significativas após o tratamento térmico, apenas um afinamento da banda (figura não mostrada). Já para as amostras de HAEu, foi verificado que o processo de calcinação altera a emissão do lantanídeo na hidroxiapatita devido a migração do európio do sítio Cal para o sítio Call. Segundo Martin et al⁽⁷⁾, a 600°C ocorre a difusão do Eu da posição Cal para Call, sendo que o európio em cada um dos sítios

apresenta características espectroscópicas particulares. Quando o európio encontra-se no sítio Cal são observadas as emissões correspondentes as transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ em 590nm e ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ em 618nm. Quando o európio está localizado no Call, as emissões mais intensas foram em 575nm, 623nm e 629nm. Essa característica peculiar do európio vem permitindo o estudo de dopagens e co-dopagens de íons nas hidroxiapatitas para entender a substituição do cálcio no biomaterial. Porém, nesse estudo, foi confirmado que além do método de síntese, do tratamento térmico, da concentração do dopante e etc, outro fator que pode influenciar a emissão do európio, correspondente ao sítio Cal e/ou sítio Call, é a escolha do comprimento de onda da luz de excitação, ou seja, dependendo do comprimento de onda usado para a excitação, o resultado, conforme será discutido abaixo, pode levar a conclusão de que a ocupação do európio ocorre em um ou outro sítio ou ainda nos dois, além de estar diretamente ligado a intensidade de emissão do íon.

A Figura 5 mostra que para a mesma amostra, dependendo do comprimento de onda escolhido é possível excitar preferencialmente o európio no sítio Cal ou Call o que pode levar a conclusões equivocadas quanto ao sítio de ocupação do íon na hidroxiapatita. A excitação em 250nm, 397nm e 468nm favorece a excitação do európio no sítio Cal observada pelas emissões mais intensas em 590nm e 618nm, enquanto a excitação nos comprimentos de onda de 337nm, 350nm, 455nm, 460nm, 527nm, 529nm, 570nm e 572nm favorecem a emissão do európio ocupando o sítio Call, com emissões em 575nm, 623nm e 629nm. Quando excitada em 359nm, 381nm, 392nm, 464nm e 576nm é possível confirmar as emissões correspondente às transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ (575nm), ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ (590nm), ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (618-629nm), indicando a presença do európio em ambos os sítios. Logo, é de suma importância a escolha do comprimento de onda/fonte de excitação de modo a obter a melhor luminescência do íon lantanídeo no biomaterial, lembrando que dependendo da aplicação e do meio onde o biomaterial se encontra, pode ser interessante favorecer a luminescência em um ou em outro sítio, afim de distingui-la da autofluorescência do meio em que o material se encontra.

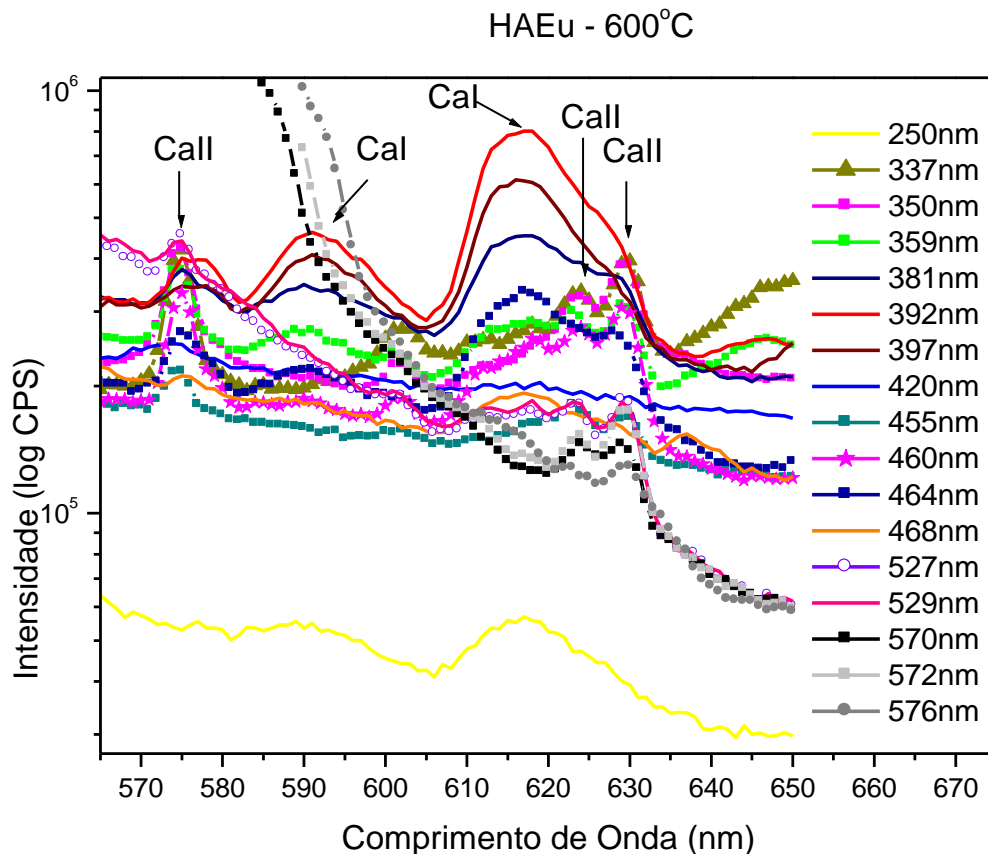


Figura 5 - Espectros de emissão da HAEu calcinada a 600°C por 1h e excitada com diferentes comprimentos de onda

Na Figura 6.A é mostrado que para a amostra sintetizada, utilizando três comprimentos de onda de excitação distintos, 250nm, 460nm e 392nm, para excitar, respectivamente, o sítio Cal, Call e ambos, é observado somente a emissão correspondente ao európio no sítio Cal, uma vez que todo o európio encontra-se nesse sítio, porém os espectros mostram que há uma relação direta também com a intensidade de emissão da HAEu que é muito mais intensa para a amostra excitada em 392 nm e muito fraca para 250nm. Isso porque a absorção das amostras é bastante intensa em aproximadamente 392nm, como mostra a Figura 6.B **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, onde foi fixada a emissão em 618nm e verificado que a banda em 392nm é a de maior absorção dessas amostras.

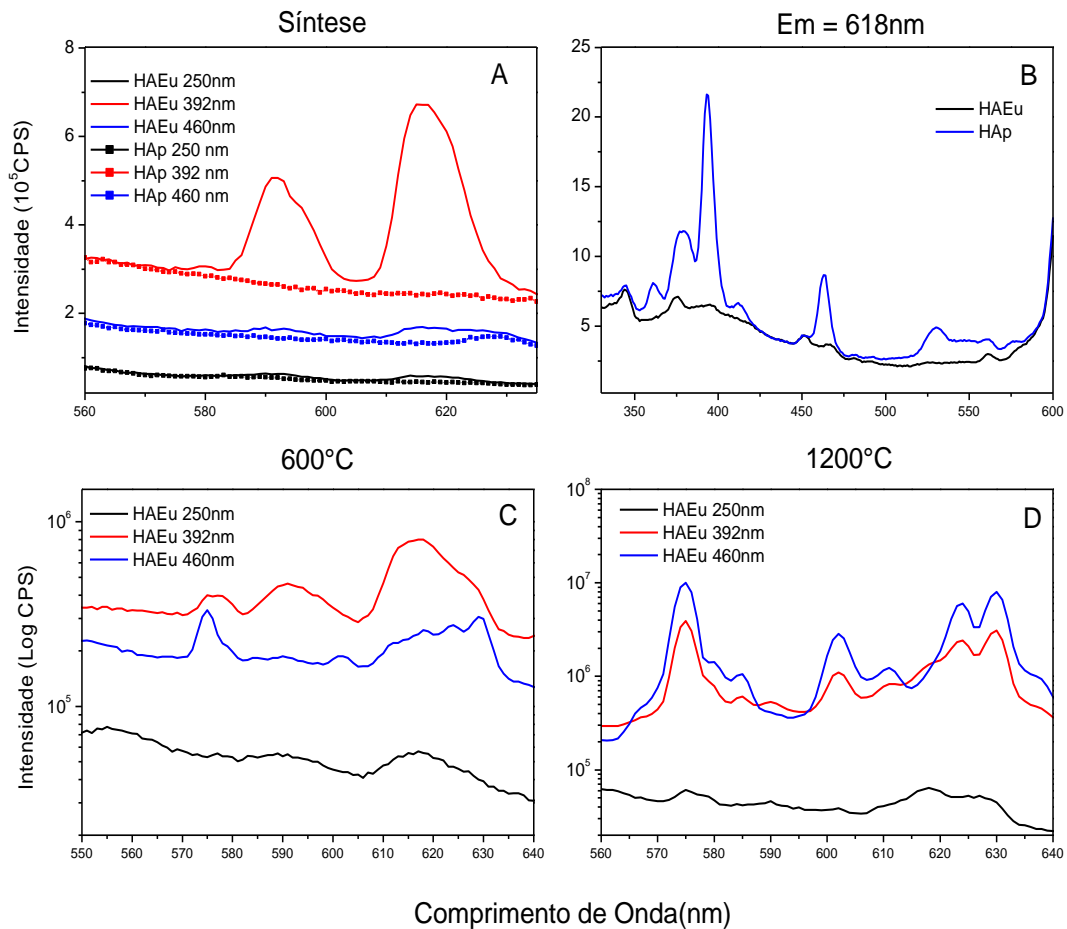


Figura 6 – Espectros de emissão e excitação das amostras de hidroxiapatitas pura e dopadas com európio. A) HAp e HAEu como sintetizadas, excitadas em 250nm, 392nm e 460nm. B) HAp e HAEu calcinadas a 600°C com emissão fixada em 618nm. C) HAp e HAEu calcinadas a 600°C e D) HAp e HAEu calcinadas a 1200°C também em 250nm, 392nm e 460nm.

Avaliando as emissões das amostras calcinadas a 600°C, Figura 6.C, quando excitadas em 250nm observam-se as bandas referentes às transições $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ e $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$, em aproximadamente 590nm e 618nm respectivamente, levando a conclusão de que o európio está ocupando apenas o sítio Cal. Quando excitada em 460nm aparecem as emissões em 575nm, 611nm, 618nm, 623nm e 629nm resultado este que pode ser interpretado como a maioria, senão todo, o európio ocupando o sítio Call. E quando excitado em 392nm, há a emissão de todas essas bandas correspondentes ao sítio Cal e Call. Logo, a escolha da excitação é um fator determinante no resultado espectroscópico.

E por último, a Figura 6.D realça a relação entre energia de excitação e intensidade de emissão, pois mesmo os espectros sendo similares, quando $\lambda_{exc} = 460\text{nm}$ a emissão é mais intensa que para $\lambda_{exc} = 392\text{nm}$, pois no primeiro caso toda a energia de excitação é absorvida pelo európio no sítio Call, enquanto que no segundo, essa energia é absorvida também pelo európio no Cal, o que reflete uma emissão mais fraca, porém em um espectro com as transições de ambos os sítios.

CONCLUSÕES

Nesse estudo foi verificado que tanto as transições características do európio, nos sítios Cal e Call, quanto a intensidade luminescente do íon são dependentes do comprimento de onda de excitação. A não observância desse fato pode levar a conclusões errôneas quanto ao sítio de ocupação do európio na apatita.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ¹ YANG P., QUAN Z., LI C., et al. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier, *Biomaterials* v.29, p.4341–4347, 2008.
- ² COSTA A. C. F. M., et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações, *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* ISSN 1809-8797 , v.4.3, p. 29-38, 2009.
- ³ JAGANNATHAN R., KOTTAISAMY M. Eu^{3+} luminescence: a spectral probe in $\text{M}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ apatites (M = Ca or Sr; X = F^- , Cl^- , Br^- or OH^-), *J. Phys.: Condens. Mater.*, v.7, p. 8453-8346, 1995.
- ⁴ TERNANE R., TRABELSI-AYEDI M., KBIR-ARIGUIB N., PIRIOU B. Luminescent properties of Eu^{3+} in calcium hydroxyapatite. *J. Lumin.* v.81, p. 165-170, 1999.
- ⁵ SILVA C. C., FILHO F. P., SOMBRA et al. Study of Structural and Photoluminescent Properties of $\text{Ca}_8\text{Eu}_2(\text{PO}_4)_6\text{O}_2$, *J Fluoresc* (2008) 18:253–259
- ⁶ KOTTAISAMY M., JAGANNATHAN R., JEYAGOPAL P. et al. Eu^{3+} luminescence in $\text{M}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ apatites, where M is Ca^{2+} , Sr^{2+} or Ba^{2+} , and X is F^- , Cl^- , Br^- and OH^- . *J. Phys. D: Appl. Phys.* V. 27, p. 2210-7215, 1994.

⁷ Martin P., Carlot G., Chevarier A., et al. Mechanisms involved in thermal diffusion of rare earth elements in apatites. *J Nucl Mater.*, v. 275, p. 268–76, 1999.

⁸ YANG P., QUAN Z., LI C., et al. Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug Carrier *Biomaterials* 29, 4341–4347, 2008.

⁹ GRAEVE A. O. , KANAKALA R., MADADI A., et al. Luminescence variations in hydroxyapatites doped with Eu^{2+} and Eu^{3+} ions. *Biomaterials*, 31, 4259–4267, 2010.

¹⁰ HAN Y, WANG X, DAI H, LI S. Synthesis and luminescence of Eu^{3+} doped hydroxyapatite nanocrystallines: Effects of calcinations and Eu^{3+} content. *J. Lumin.*, v. 135, p. 281-287, 2013.

Synthesis and characterization of Eu-doped HA: Influence of excitation wavelength on the Eu^{3+} luminescence in the HA

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA) doped with europium (HAEu) offers the advantage of making the hydroxyapatite a fluorescent biomarker, allowing their imaging through *in vivo* and *in vitro* emission. Several authors had been based their studies about europium site occupation (CaI and CaII) on hydroxyapatite by the lanthanide ion luminescence, verifying the influence of the method of synthesis and concentration of the dopant ion. In this study HA nanoparticles doped with 1.4% of trivalent europium were synthesized by co-precipitation method and calcined at different temperatures (600°C and 1200°C). A careful evaluation of the influence of the excitation wavelength of europium luminescence in the HAEu was performed and it has been verified that both the characteristics transitions of europium, at CaI and CaII site, and the luminescent intensity are dependent on the excitation wavelength. The non-observance of this fact can lead to erroneous conclusions about the site occupation of europium in apatites.

Key-words: hydroxyapatite, europium, fluorescence, x ray diffraction