

ESTUDO DA SÍNTESE PARA OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITA EM MEIO DE COLÁGENO

L. Z. Oliveira *, T. E. Watanabe *, D. Santos Gouveia**, A. H. A. Bressiani**, C. Ribeiro*

*Universidade Federal do ABC, Centro de Engenharia Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas-CECS, São Bernardo do Campo, SP, Brasil

**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CCTM, São Paulo, SP, Brasil
e-mail: lucas.zuccarello@aluno.ufabc.edu.br

Resumo: A obtenção da hidroxiapatita - HA nanoestruturada pode exigir modificações nas técnicas convencionais de síntese a fim de mimetizar estruturalmente as bioapatitas. A técnica de neutralização já vem sendo explorada em função de sua simplicidade e versatilidade, mas sua reprodutibilidade nem sempre é garantida, sugerindo a formação de fases intermediárias precursoras da HA, e algumas vezes outras fases, como o óxido de cálcio, além do alto estado de aglomeração de suas partículas. Com intuito de obter pós nanométricos de natureza dispersa e garantir a estabilidade da HA foi adicionado colágeno hidrolisado (4% em massa) ao meio de precipitação, variável ainda pouco explorada em processos de síntese. Os pós obtidos foram caracterizados por DRX, sendo observada a presença da fase pura e aumento da cristalinidade após calcinação a 800°C/3h, ainda verificou-se maior perda de massa para esta HA quando comparada a técnica clássica de precipitação (sem colágeno). Os resultados obtidos indicaram a viabilidade da metodologia para obtenção da HA, confirmando a natureza nanométrica dos pós e estabilidade da fase, logo após a síntese, e também após calcinação. A HA sintetizada apresentou cerca de 95% de densificação, microestrutura que pôde ser comprovada por MEV, além de manter sua estrutura cristalina, sem a formação de fase secundária, conforme observado por DRX, após sinterização a 1100°C/1h. A metodologia de síntese, em meio de colágeno, proporcionou a obtenção de pós de HA nanométrica de adequada sinterabilidade e estabilidade, podendo gerar microestruturas densas, mantendo fase única.

Palavras-chave: síntese, hidroxiapatita, colágeno.

Abstract: The obtention of nanostructured hydroxyapatite - HA can be made by changes of the convectional synthesis techniques in order to mimic structurally bioapatites. The neutralization technique has been assessed due to its simplicity and versatility. However, its reproducibility is not always assured, suggesting the formation of secondary phases, such as calcium oxide, in addition to the high state agglomeration of the particles. To obtain nanopowders dispersion nature and ensure stability of the HA was collagen hydrolysate (4% weigh) to the precipitation medium. The addition of the collagen is still a little explored variable in the sythesis process. The obtained powders were characterized by

DRX, being detected the presence of the pure phase and the crystallinity gain after the calcination at 800°C/3h. The HA synthesized with collagen showed greater weight loss when compared to the classic technique of precipitation. The results showed viability of the methodology to obtain nanometric HA and stable crystal structure, after synthesis and calcination. The sintered HA presented densification of the about 95%, as noted by the SEM. Furthermore, the HA remained stable without the formation of secondary phase, after sinterization at 1100°C/1h as observed by DRX. The synthesis with collagen provided nanometric HA powder with suitable sinterability and stability, also an ability to generate dense microstructures, maintaining its pure phase.

Keywords: synthesis, hydroxyapatite, collagen.

Introdução

Derivados de fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - HA), tem sido empregados na área clínica, em função de uma série de propriedades, como biocompatibilidade, osteocondução e bioatividade, além de estimular o crescimento de novo tecido, permitindo a proliferação de células osteoprogenitoras. Tais características permitem o uso da HA para reposição ou suporte em partes do fêmur, dentes, tendões, reconstrução maxilofacial, aumento da estabilização do maxilar, neurocirurgia do crânio, preenchimento de cavidades ósseas após cirurgia de tumores [1,2].

Devido a sua alta complexidade e diversificação na razão Ca/P as cerâmicas de fosfatos de cálcio podem sofrer modificações em função do método de síntese utilizado. Uma alternativa de síntese que pode mimetizar estruturalmente as bioapatitas considera a inclusão da fase orgânica, o colágeno, em meio reacional, explorando a alta afinidade entre estas fases naturalmente diferentes, como ocorre durante o processo de biomineralização óssea [3,4]. O colágeno já revela, em condições biológicas, uma ótima sinergia com a fase mineral do osso, além disso, pode garantir a dispersão do pó nanométrico, em meio reacional e assegurar a reprodutibilidade e estabilidade na obtenção da fase de hidroxiapatita pura [5,6].

A proposta deste estudo foi sintetizar a hidroxiapatita nanoestruturada pelo método de

precipitação induzida na presença de colágeno em solução aquosa, envolvendo reação de neutralização, entre hidróxido de cálcio e ácido fosfórico para obtenção da fase pura de HÁ para fins de preparação óssea e odontológica.

Materiais e Métodos

A síntese da hidroxiapatita (HA) foi realizada a partir da preparação prévia de uma solução aquosa (0,3M) de ácido fosfórico - Synth® e uma suspensão (0,5M) de hidróxido de cálcio - Synth®, contendo a dispersão de 4% em massa de colágeno hidrolisado (JBS® – origem bovina), com relação à massa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. As quantidades de ácido e base foram calculadas de forma a manter a razão estequiométrica da HA, ou seja, Ca/P igual a 1,67.

O processo de síntese envolveu a precipitação da fase cerâmica de HA-C (hidroxiapatita em meio de colágeno), a partir da adição da solução de ácido fosfórico, mantendo uma vazão de 8 mL/min, sob a suspensão de hidróxido de cálcio que continha a fase dispersa de colágeno, mantendo agitação constante e temperatura ambiente. Para uma análise comparativa outra síntese foi realizada mantendo as mesmas condições, porém na ausência do colágeno.

Durante toda a síntese, o pH foi monitorado (pHmetro Digimed DM-20), após a adição de diferentes volumes de ácido e após a precipitação completa. O precipitado foi mantido em digestão, por 24h, sendo verificado também o pH. Após período de digestão, os pós foram filtrados e secos em estufa (Quimis Q-316 B24) a 60°C/24h e finalmente calcinados a 800°C/3h em forno mufla (QUELME)

Os pós obtidos foram caracterizados por FTIR após etapa de secagem e após calcinação, e as fases cristalinas presentes foram determinadas por difração de raios X. A área de superfície específica foi medida pela técnica de adsorção gasosa, em equipamento (Micromeritics modelo ASAP 2010), utilizando gás N_2 como adsorvedor, e a morfologia e a dimensão das partículas por microscopia eletrônica de transmissão (JEOL JEM 200C). Os pós de HA-C sintetizados foram caracterizados quanto a morfologia e a dimensão das partículas por microscopia eletrônica de transmissão-MET (JEOLJEM200C).

O material obtido foi prensado uniaxialmente (20 MPa) no formato de pastilhas, seguido de prensagem isostática a frio (200 MPa) e sinterizados a 1100°C por 1 hora em forno Lindberg em atmosfera oxidante. As cerâmicas sinterizadas foram caracterizadas quanto a densidade pelo método de Arquimedes, a partir da equação (1):

$$\rho = [m_s / (m_u - m_t)] \cdot \rho_{H_2O} \quad (1)$$

Sendo m_s = massa da amostra seca; m_t = massa da amostra imersa; m_u = massa da amostra úmida; e ρ_{H_2O} = densidade da água na temperatura do ensaio.

Após sinterização os corpos de prova foram caracterizados por DRX e a microestrutura por microscopia eletrônica de varredura, após etapa de recobrimento com ouro (2 minutos), utilizando “sputter coater” (Baltec SCD 050).

Resultados

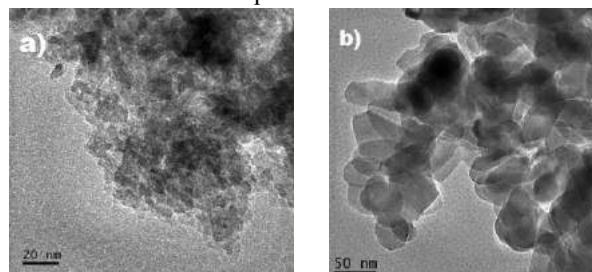
Na Tabela 1 estão apresentados os dados de pH (inicial: pH_i; após adição 70% (vol.ácido): pH₇₀; final: pH_F e após 24h: pH₂₄), durante a síntese na presença e ausência de colágeno para fins comparativos..

Tabela 1: Valores de pH monitorados durante as sínteses e após período de digestão por 24h (1): na presença e (2) ausência, de colágeno.

síntese	pH _i	pH ₇₀	pH _F	pH ₂₄
1	12,2	11,63	10,9	8,7
2	12,4	12,2	10	10,6

Notou-se uma redução nos valores de pH durante a precipitação da HA-C na presença do colágeno, quando comparada a evolução do pH durante a síntese sem o colágeno. Somente o pH_F (10,9) da síntese 1 mostrou-se mais alcalino que o pH_F (10) da síntese 2. A adição do colágeno, induziu uma queda mais expressiva do pH, após 24 horas de digestão, quando comparada a técnica clássica (sem o colágeno).

A Figura 1 apresenta as micrografias da HA-C sintetizada na presença de colágeno, obtida a partir da técnica da microscopia eletrônica de transmissão



(MET). Figura 1(a) - após etapa de secagem e Figura 1(b) após calcinação

Figura 1: Micrografias dos pós-obtidos por MET; (a) após secagem e (b) após calcinação a 800°C por 3 horas.

A análise de adsorção gasosa revelou uma área de superfície específica equivalente a 24,6 m²/g, valor adequado para uma boa sinterabilidade dos pós [3].

A Figura 2 apresenta o espectro gerado por FTIR da HA obtida após o processo de calcinação, revelando os grupamentos típicos da HA, destacando a presença da espécie carbonato, que a torna mais próxima das características da apatita biológica.

Na Figura 3, estão apresentados os perfis de difração de raios X normalizados da hidroxiapatita sintetizada na presença de colágeno e após sua calcinação.

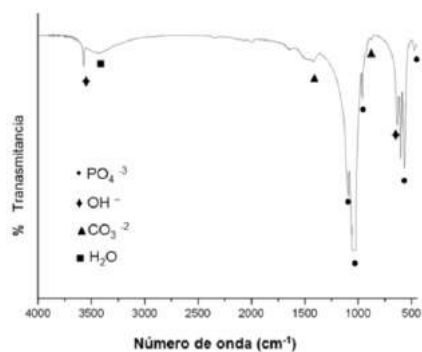


Figura 2: Espectro obtido por FTIR da HA calcinada a 800°C por 3 horas com a identificação das bandas referentes a cada grupamento químico.

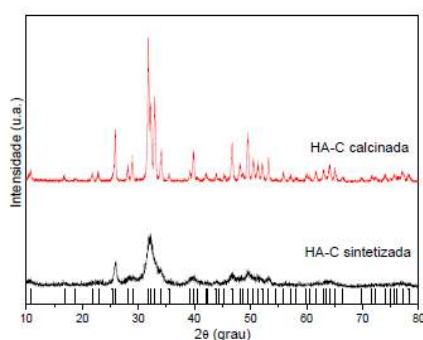


Figura 3: Difratomogramas de raios X dos pós de HA sintetizada com colágeno (HA-C) antes e após calcinação e posição dos picos típicos da HA-ficha JCPDS9-342.

Na Tabela 2, estão apresentados os dados de densidade a verde - D_v e densidade hidrostática após sinterização - D_F , determinada pelo método de Arquimedes, considerando densidade teórica da HA de $3,157\text{g/cm}^3$, e a perda de massa - PM da HA-C.

Tabela 2: Dados de densidades, utilizando triplicatas: D_v (geométrica); D_F (após sinterização) e PM.

	D_v	D_F	PM
HA	$54,8\% \pm 0,8$	$94,5\% \pm 0,6$	$4,6\% \pm 0,4$

A Figura 4 apresenta as micrografias obtidas por MEV de diferentes superfícies da fratura das amostras de HA após sinterização a 1100°C/1h.

O perfil de difração do material após sinterização está apresentado na Figura 5. Observa-se que a fase de HA foi mantida, sendo observado um aumento da cristalinidade do material pela maior definição dos picos quando comparada ao difratograma da Figura 3.

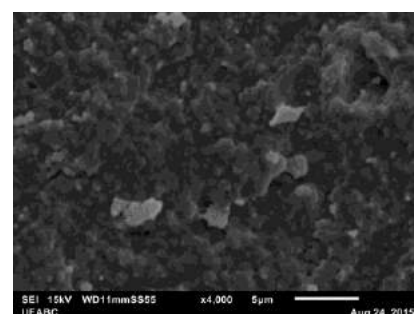
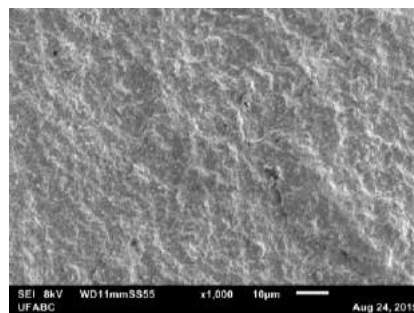


Figura 4: Micrografias obtidas por MEV de diferentes regiões da fratura dos corpos de prova de HA após sinterização a 1100°C/1h, em diferentes aumentos.

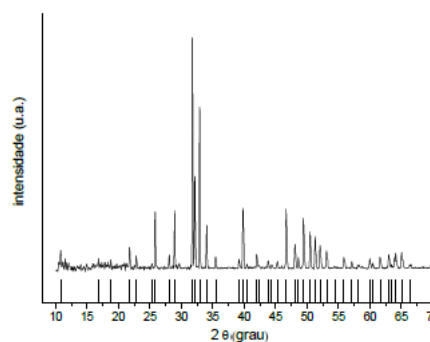


Figura 5: Difrátograma da amostra de HA-C após sinterização a 1110°C/1h e posição dos picos típicos da HA-ficha JCPDS9-342

Discussão

Neste estudo ficou evidente a influência do colágeno na síntese da hidroxiapatita. Notou-se, durante a síntese, uma queda significativa do pH durante a precipitação da HA-C (Tabela 1). Este comportamento pode estar associado a presença de grupamentos ácidos como COO^- e C=O presentes na estrutura do colágeno [6]. A natureza amorfa e hidrolisada do colágeno contribuiu também para a fácil solubilidade e melhor interação entre as fases dispersas (orgânica e inorgânica), além de facilitar sua degradação térmica, em função da quebra das ligações cruzadas em sua estrutura, quando comparada ao colágeno nativo [4, 6]. A presença do colágeno influenciou a natureza da HA sintetizada, gerando uma composição mais próxima das características biológicas, decorrente da presença da espécie carbonato (aprox. 875cm^{-1} e 1400cm^{-1}),

grupamento comumente encontrado em apatitas biológicas, conforme revelado pelo espectro de FTIR (Figura 2), quando comparado a dados da literatura [1, 2, 7].

Comprovou-se o comportamento disperso dos pós pela facilidade de desaglomeração após etapa de secagem, podendo estar associada ao impedimento estérico causado pelas moléculas de colágeno, mecanismo que auxilia no comportamento de dispersão de partículas, o que não ocorre quando se adota a metodologia tradicional (sem colágeno). Além disso, valores alcalinos de pH, como observados durante a síntese, associada também a espécies carregadas em sua estrutura, tendem a reorientar sua conformação de maneira a dificultar a interação entre as partículas do pó, minimizando as forças atrativas entre elas. Nesse caso, estão atuando mecanismos de interação eletroestérica, considerados os mais eficientes para garantir sistemas estáveis de dispersão [4,5].

Não foi observada modificação quanto a morfologia entre os pós antes e após a calcinação. Os pós mantiveram morfologia acicular, similar a da apatita biológica, sendo observado um crescimento das partículas após a calcinação, provavelmente resultante do coalescimento das partículas na temperatura utilizada (800°C). Dados da literatura não revalam mudança significativa quanto ao tamanho e forma das partículas, após mesma condição de calcinação [8]. As imagens (Figura 1) também revelaram a presença de uma distribuição estreita de tamanho de suas partículas, como resultado de uma metodologia capaz de originar pós de maior homogeneidade e uniformidade. O colágeno no meio reacional pode influenciar na velocidade de nucleação, incitando a formação de cristais ultrafinos, causada pela presença da proteína colágena, com tendência a esferoidização das partículas [5]. Materiais com essas características podem revelar estrutura com potencial para a mineralização biomimética de hidroxiapatita em sua superfície [6].

O pó antes da calcinação (Figura 3) apresenta um perfil de difração de raios X composto de bandas largas que pode estar associado a diferentes características, como a presença de cristais de dimensões nanométricas, baixa cristalinidade e presença de defeitos na estrutura, porém preservando a presença da fase única de HA. Após calcinação pode-se constatar a permanência da fase HA e aumento na cristalinidade.

As partículas obtidas são típicas de pós de alta reatividade adequados para obtenção materiais de alta densidade, característica associada à área de superfície específica dos pós. Esta propriedade facilita a sinterização, assegurando microestruturas refinadas e de alta densidade, como mostra a Figura 4, garantindo uma melhor biofuncionalidade quando utilizada para compensar uma disfunção óssea [1, 4, 8]. Estas características estão de acordo com as microestruturas comprovada pelo valor expresso na Tabela 2 e pela presença de porosidade fechada mínima (~5%), característica comum em materiais que atingiram último estágio de sinterização. Após a sinterização não foram

detectadas formação de novas fases, apenas aumento da cristalinidade (Figura 5), revelando alta estabilidade térmica à HA sintetizada preservando sua fase única.

Os resultados obtidos permitem concluir a presença do colágeno durante a síntese da HA teve influência no seu mecanismo de formação, sendo detectada uma variação do pH quando comparada à síntese convencional de neutralização. A rota de síntese obteve pós de fácil desaglomeração, alta estabilidade e presença exclusiva da fase HA, similar a biológica e de baixa cristalinidade. A análise por MET revelou uma tendência a esferoidização das partículas, sendo que a presença do colágeno pode ter favorecido a formação de cristais nanométricos. As características dos pós sintetizados permitiram a obtenção de HA capaz de atingir altas densidades e cristalinidade, após sinterização, preservando a fase desejada.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Central Experimental Multiusuário da UFABC, ao Laboratório de Microscopia do IPEN, ao CNPq pela bolsa de IC concedida e a JBS® pelo colágeno fornecido.

Referências

- [1] Dorozhkin SV. Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics. *Biomatter*. 2011; (1): 1-51.
- [2] Dorozhkin SV. Nanodimensional and Nanocrystalline Calcium Orthophosphates. *American Journal of Biomedical Engineering*. 2012; 2(3): 48-97.
- [3] Costa ACFM, Lima MG, Cordeiro V V, Viana KMS, Souza CV, Lira HL. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 2009; 4(3): 29-38.
- [4] Stenport VF, et al. Precipitation of calcium phosphates in the presence of collagen type I on four different bioactive titanium surfaces: an in vitro study. *Journal of Oral & Maxillofacial Research* [internet]. 2015 Oct-Dez 6(4):e1. Available from: <http://www.ejomr.org/JOMR/archives/2015/4/e1/v6n4e1.pdf>
- [5] Rodrigues V. Análises dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos [dissertação]. São Paulo: Interunidade em Biotecnologia - Universidade de São Paulo; 2009.
- [6] Prestes RC, Golunski SM, Kempka AP, Luccio MD. Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2013; 15(4): 375-382.
- [7] Elliott JC. *Structure and Chemistry of Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. London: Elsevier; 1994. P.191-304.
- [8] Gouveia DS. Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultrassom [tese]. São Paulo: IPEN - USP; 2008.