



## OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APATITAS NANOMÉTRICAS SINTETIZADAS PELO MÉTODO CITRATO

*M.A. Napolitano<sup>1,2</sup>, E.R. Camargo<sup>2</sup>, C. Ribeiro<sup>3</sup>*

(1) DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, Rua Sebastião de Morais 831, 13562-030, São Carlos, SP, [quimical@dmcgroup.com.br](mailto:quimical@dmcgroup.com.br)

(2) Universidade Federal de São Carlos, DQ/UFSCar, Rodovia Washington Luís SP-310, km 235, 13565-905, São Carlos, SP, [camargo@ufscar.br](mailto:camargo@ufscar.br)

(3) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970. São Carlos, SP, [caue.ribeiro@embrapa.br](mailto:caue.ribeiro@embrapa.br)

**Resumo:** Apatitas pertencem a uma classe de materiais que podem ser utilizados para várias aplicações na medicina, odontologia e veterinária como implante ósseo devido a suas propriedades de biocompatibilidade e osseointegração. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar qual tipo de apatita pode-se obter da síntese baseada nos precursores poliméricos. As apatitas nanométricas obtidas foram caracterizadas por DRX, BET, Raman, IV e MEV. Observamos pelos resultados dos experimentos, que os pós obtidos apresentam duas fases, caracterizando a presença de hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP com tamanho médio de partícula em 200 nm e área superficial de 20,297 m<sup>2</sup>/g. Concluímos que o método citrato para obtenção de apatitas é eficiente e que estas podem ser utilizadas em engenharia de tecidos devido a suas características compatíveis com as encontradas no mercado.

**Palavras-chave:** hidroxiapatita, tricalcio fosfato, osseointegração, precursores poliméricos.

### **ACHIEVEMENT AND CHARACTERIZATION OF NANOMETRICS APATITES SYNTHESIZED BY CITRATE METHOD**

**Abstract:** Apatites belong to a class of materials that can be used for various applications in medicine, dentistry and veterinary as a bone implants due to its properties of biocompatibility and osseointegration. The aim of this study was to achieve and characterize types of apatite through the polymeric precursors method. The obtained nanometric apatites were characterized by XRD, BET, Raman, IR and SEM. The results demonstrate that the powders two phases, characterized by the presence of hydroxyapatite and  $\beta$ -TCP with a median particle size of 200 nm and surface area of 20.297 m<sup>2</sup> / g. We conclude the citrate method used for apatite achievement as an efficient route. Such apatite-based powders could be used for tissue engineering purposes due to its compatible characteristics to the current ones in the market.

**Keywords:** hydroxyapatite, tricalcium phosphate, osseointegration, polymeric precursors.

### **1. Introdução**

A hidroxiapatita (HAP) está presente nos dentes e ossos dos seres humanos e animais vertebrados, como fase mineral, com uma concentração em torno de 95%, estando em equilíbrio com formadores de ossos “osteoblastos” e outras células ósseas (J. SALEH et al., 2004; A. ALMIRALL et al., 2007; E. C. CARLO et al., 2009). O tricalcio fosfato na fase  $\beta$  ( $\beta$ -TCP) faz parte da síntese óssea, visto que este é um intermediário da produção feita pelos osteoblastos. (M. B. CONZ et al., 2005; S. P. NUKAVARAPU et al., 2009). Essas apatitas foram testadas e bem difundidas pela literatura para osseointegração e biocompatibilidade com diversos tecidos do corpo humano e animais (C.C. VITAL et al., 2006; T.S. DUARTE et al., 2006).

Na saúde humana, uma das áreas que utilizam mais as apatitas para osseointegração é a odontologia, onde se emprega desde o enchimento de ossos quanto na aplicação de pinos para implantes (W. ZHU et al., 2009; A. KASAJ et al., 2008).

Há uma necessidade explícita de conseguir uma melhor biocompatibilidade e osseointegração de apatitas em tecidos humanos e animais, e com isto, tem-se desenvolvido trabalhos com quitosana, ácido polilácidoglicólico, carboximetilcelulose, 4-estireno sulfonato de sódio, entre outros, pois se pode construir “scaffolds” ou “plataformas” de crescimento de tecidos ósseos ou não com estes tipos de materiais junto com células viáveis com os osteoblastos.

Existem diversas maneiras de obtenção destas apatitas, desde as mais simples como reação ácido-base, passando pelas de sol-gel e chegando às mais recentes de precursores poliméricos, pois estas últimas apresentam a vantagem de controle de tamanho das partículas, a possibilidade de altos rendimentos e utilização de materiais

mais simples para produção (M. L. SANTOS et al., 2005; J. C. DE ARAÚJO et al., 2007; E. C. S. RIGO et al., 2010; H.K. VARMA et al., 2005)

Dentre as sínteses citadas uma característica em especial vem sendo trabalhada, as apatitas com morfologia nanométrica chamadas apatitas nanotecnológicas, pois o tamanho nano ( $10^{-9}$  m) pode ser mais rapidamente osteointegrado pelos osteoblastos e com menor inflamação, gerando resultados mais rápidos, criando uma satisfação do paciente o quanto antes, visto que cirurgias para reconstrução óssea são doloridas e em quase todas, o paciente perde vários dias de trabalho/estudo.

As sínteses mais conhecidas apresentam análises similares e com boas formas de detecção de apatitas. No presente trabalho, é desenvolvida a técnica de obtenção de apatitas nanométricas via precursores poliméricos (citrato) e as caracterizações foram feitas baseadas nas diversas existentes na literatura, destacando difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho (IV), espectroscopia Raman (ER), análise de área superficial (BET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## 2. Materiais e Métodos

**Materiais:** ácido cítrico (AC) (99% Synth), carbonato de cálcio (CC) (99% Synth), ácido fosfórico (AF) (85% Carloerba), etilenoglicol (EG) (99% Synth) e água deionizada.

**Métodos:** As apatitas foram sintetizadas pelo método dos precursores poliméricos. A uma solução aquosa 0,3 mol/L de ácido cítrico, aquecida a 60 °C e mantida em agitação, foi adicionado carbonato de cálcio em uma razão molar inicial Ca/P=1,67. Esta razão molar foi obtida da literatura específica, onde se verificou que com esta proporção molar apresentaram maior eficiência, pois é esta da HAP.

Após a solubilização completa, adicionou-se ácido fosfórico, formando uma solução, que foi polimerizada pela adição de etilenoglicol, na razão molar AC:AF:EG: igual a 2:1:1 (211), e deixado por 24 horas sob a mesma temperatura para evaporação da fase solvente água. Também foram feitos mais dois experimentos, onde um se utilizava 0,15 mol/L de AC (111) e o outro também onde esta concentração de AC permaneceu e não foi utilizado o EG para polimerização (110).

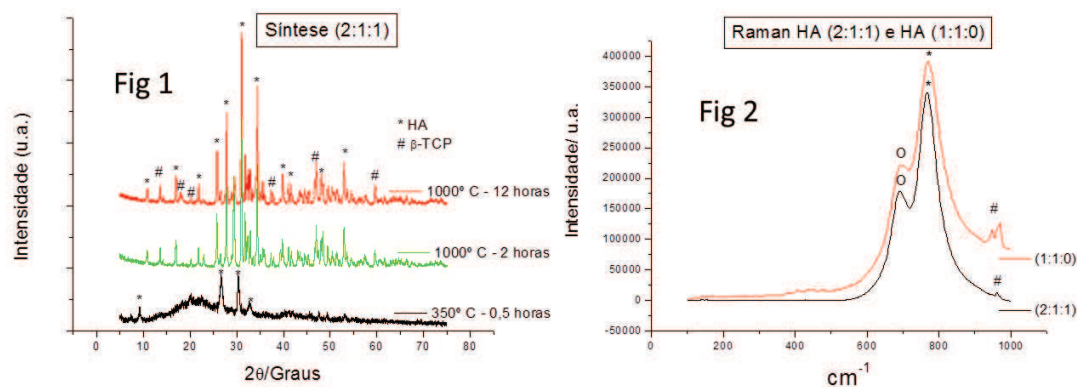
Após a polimerização, o material foi pré-calcinado para eliminação de parte da fração orgânica e formação de um precursor, de coloração cinza escuro, em forno elétrico a 350 °C por 30 minutos, a uma razão de aquecimento de 10 °C/minuto. Este precursor obtido foi macerado em almofariz e pistilo e passado em peneira granulométrica de 90  $\mu$ m.

Em seguida, foram calcinados em forno elétrico, em temperaturas de 750, 900 e 1000 °C, e em tempos de 1/2, 2 e 12 horas. Os pós obtidos possuem coloração branca, e estes foram deixados sob vácuo em dessecador por 24 horas para depois serem enviados para análises DRX, IV, ER, BET e MEV.

## 3. Resultados e Discussão

A temperatura escolhida para realização de todas as análises propostas foi a de 1000 °C, pois em pré-análise de DRX, esta apresentou melhor cristalinidade frente às outras, possuindo no espectro picos mais característicos e conformados.

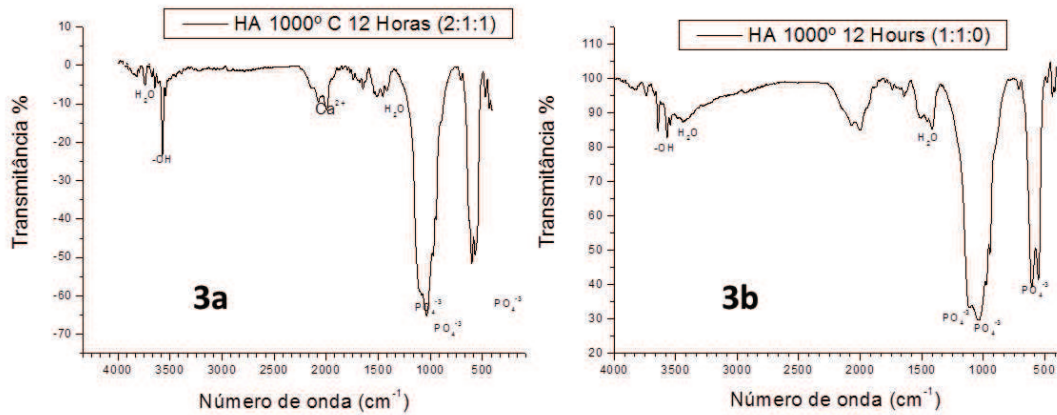
**Resultados DRX:** Podemos ver as análises de DRX do precursor inicial e de dois tempos de queima, 2 e 12 horas a 1000 °C na Figura 1. Verifica-se a presença de dois picos característicos de apatitas em 28 e 30 graus na fase precursora e picos característicos de hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP na temperatura de 1000 °C.



Figuras 1 e 2. DRX Precursor e 2 tipos de queima da síntese (211). \* indica os picos da HAP. Os picos não marcados são do  $\beta$ -TCP e Raman de 2 tipos de síntese (211) e (110). \* indica os picos da HAP, ° picos do  $\beta$ -TCP e # picos do CaO.

**Resultados Raman:** A Figura 2 ilustra duas análises de espectroscopia Raman, uma com o EG (211) e outro sem o EG (110). Podem-se observar picos característicos da hidroxiapatita em 790 cm<sup>-1</sup>, de β-TCP em 690 cm<sup>-1</sup> e um pouco de óxido de cálcio (CaO) em 930 e 950 cm<sup>-1</sup>.

**Resultados IV:** As Figuras 3a e 3b ilustram a espectroscopia no Infra Vermelho de duas rotas, com e sem EG respectivamente. Podem-se perceber picos característicos de ions fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>) pertencentes à HAP e β-TCP, (OH) pertencente à HAP e H<sub>2</sub>O.



Figuras 3a e 3b. Espectro da síntese com etilenoglicol (211) a 1000 °C - 12 horas e Espectro da síntese sem etilenoglicol (110) a 1000 °C - 12 horas, respectivamente.

**Resultados BET:** Na Tabela 1 estão datados os dados das três sínteses para comparação de área superficial. Verifica-se que o melhor resultado, neste caso, foi o da síntese (111), com área superficial de 20,297 m<sup>2</sup>/g, indicando que teoricamente, este tipo de apatita teria maior área de contato para ser absorvida em implantes ósseos.

Tabela 1. Resultados da análise de BET. \* indica melhor resultado.

	AC inicial	Metade de AC	Metade de AC e sem EG
Ácido Cítrico	2	1	1
Carbonato de Cálcio/Ácido Fosfórico	1	1	1
Etilenoglicol	1	1	0
Área Superficial (m <sup>2</sup> /g)	16.061	20.297*	15.676

**Resultados MEV:** As Figuras 4a, 4b, 4c e 4d ilustram as MEV do precursor, síntese (211) com duas fases, síntese (211) focada nas partículas mais “esféricas” e (211) focada nas partículas com formas de “escamas” respectivamente. Isto nos demonstra que temos duas fases presentes na síntese final, sendo a figura 4c a HAP e a Figura 4d o β-TCP.

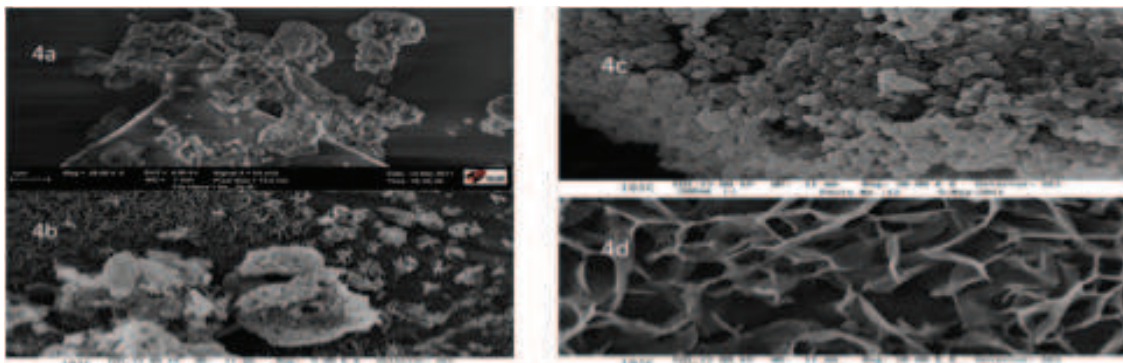


Figura 4. Precursor 350° C – 30 min. (4a); Síntese (211) 1000 °C–12 h (4b); Síntese (211) 1000 °C – 12h, foco partículas “esféricas” (4c), Síntese (211) 1000 °C – 12 h , foco partículas “escamas” (4d)

#### 4. Conclusões

Dada a metodologia de obtenção de materiais nanométricos via citrato, concluímos com este trabalho que apatitas, destacando-se a hidroxiapatita e o  $\beta$ -TCP, podem ser sintetizadas.

Os resultados das análises realizadas indicam uma mistura de fases destas apatitas, que se pode ver claramente na análise morfológica através de microscopia eletrônica.

Como a absorção e osseointegração são conseguidas por ambas as fases citadas, classificamos os produtos finais como viáveis, visto que na síntese óssea pelos osteoblastos ambas são utilizadas, mas há uma necessidade de trabalhos para comprovar sua biocompatibilidade e aplicação “in vivo”.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a DMC Importação e Exportação de Equipamentos por fornecer equipamentos e reagentes para as sínteses e apoio financeiro; A UFSCar pelas análises de IV e Raman; a Embrapa Instrumentação pelas análises de DRX e MEV.

#### Referências

- ALMIRALL, A.; DELGADO, J. A.; ALFONSO, A. “Fosfatos de cálcio porosos: Métodos de Preparación”, VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, Habana 2007, artículo T062.
- CARLO, E. C.; BORGES, A. P. B.; POMPERMEYER, L. G.; MARTINEZ, M.M.M.; ELEOTÉRIO, R.B.; NEHME, R.C.; MORATO, G.O. “Compósito para fabricação de implantes reabsorvíveis para osteossíntese: avaliação da biocompatibilidade em coelhos”, *Ciência Rural*, v.39, n.1, jan-fev, 2009.
- CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. A. “Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft”, *J. Appl Oral Sci*, 2005; 13(2): 136-40.
- DE ARAÚJO, J. C.; SENA, L.; BASTOS, I. N.; SOARES, G.D.A. “Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-X”, *Quím. Nova*, Vol. 30, nº 8, 1853-1859, 2007.
- DUARTE, T. S.; BORGES, A. P. B.; LAVOR, M. S. L.; FILGUEIRAS, R.; TSIOMIS, A.C.; OLIVEIRA, F.L.; PONTES, K.C.S. “Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos”, *Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.*, v.58, n.5, p.849-853, 2006.
- KASAJ, A.; WILLERSHAUSEN, B.; REICHERT, C.; ROHRIG, B.; SMEETS, R.; SCHMIDT, M. “Ability of nanocrystalline hydroxyapatite paste to promote human periodontal ligament cell proliferation”, *Journal of Oral Science*, Vol. 50, Nº. 3, 279-285, 2008.
- NUKAVARAPU, S. P.; KUMBAR, S. G.; BROWN, J. L.; KROGMAN, N.R.; WEIKEL, A.L.; HINDENLANG, M.D.; NAIR, L.S.; ALLCOCK, H.R.; LAURENCIN, C.T. “Polyphosphazene/Nano-Hydroxyapatite Composite Microsphere Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Biomacromolecules*, 2008 July 9(7): 1818–1825.
- RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. “Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação”, *Ver. Dental Press Periodontia Implantol.*, Maringá, v.1, n. 3, p. 39-50, jul./ago./set. 2007.
- SALEH, J.; WILLKE, L. W.; BASSANI, I. A.; KRAETHER, L.; MOLZ, R. F.; SANTOS, L. A. “Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo”, XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Engenharia de Materiais, Porto Alegre – RS 28 de novembro a 02 de dezembro de 2004.
- SANTOS, M. L.; FIORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J.; APARECIDA, A. H.; LIA FOOK, M. V.; GUASTALDI, A. C. “Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico”, *Ecl. Quím.*, São Paulo, 30(3): 29-35, 2005.
- VARMA, H. K.; BABU, S. S. “Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method”, *Ceramics International*, 31 (2005) 109–114.
- VITAL, C. C.; BORGES, A. P. B.; C.C. FONSECA, C. C.; TSIOMIS, A.C.; CARVALHO, TB.; FONTES, E.B.; SENA, M.P.; FÓFANO, G. “Biocompatibilidade e comportamento de hidroxiapatita em falha óssea na urina de coelhos”, *Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.*, v.58, n.2, p.175-183, 2006.
- ZHU, W.; XIAO, J.; WANG, D.; LIU, J.; XIONG, J.; LIU, L.; ZHANG, X.; ZENG, Y. “Experimental study of nano-HA artificial bone with different pore sizes for repairing the radial defect”, *International Orthopaedics (SICOT)* (2009) 33:567–571.