

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE ADIÇÃO DE ÁCIDO NA COMPOSIÇÃO E TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA (HA) OBTIDAS POR NEUTRALIZAÇÃO

Aparecida, A. H.^{1,2}; Silva, A. C.^{1,3}; Braga, F. J. C.^{1,3}

¹Consulmat Materiais de Referência, Soluções e Serviços.

²Instituto de Química de Araraquara – Unesp.

³Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Rua Juan Lopes, 159, São Carlos, SP, Brasil

e-mail: aherrera@iq.unesp.br

Resumo. Além de suas excelentes propriedades já bem estabelecidas, estudos revelam que Hidroxiapatita (HA) nanoestruturada apresenta melhor bioatividade quando comparada ao seu correspondente cristalino. Esta propriedade tem despertado o interesse na utilização de nanopartículas de HA em aplicações médicas, ortopédicas, odontológicas, cimentos ósseos, terapia gênica e liberação controlada de fármacos. Trabalhos recentes vêm mostrando que o método por via úmida por neutralização de soluções contendo cálcio e fósforo é o mais adequado para a obtenção da HA nanométrica, contudo todos os parâmetros de síntese devem ser efetivamente controlados, pois cristalinidade, morfologia e tamanho de partículas são afetadas por estes. Neste trabalho, os efeitos da velocidade de adição de ácido na composição e tamanho de nanopartículas de HA foram estudados. Pós de HA foram obtidos por via úmida à partir da reação de neutralização entre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 , adotando-se as velocidades de adição de ácido de rápida (20mL/min) e lenta (5mL/min). Os pós foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X – EDX, Difratomia de Raios X – DRX, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR e Distribuição granulométrica por difração à laser. Os resultados mostraram que a velocidade de adição de ácido interfere diretamente na composição de nanopartículas de HA quanto à presença de impurezas e resíduos de outras fases de apatita, contudo não apresenta relação com o tamanho das nanopartículas.

Palavras-chave: Biomateriais, Hidroxiapatita (HA), Nanopartículas.

1. INTRODUÇÃO

Além de suas excelentes propriedades já bem estabelecidas, estudos revelam que Hidroxiapatita (HA) nanoestruturada apresenta propriedades melhoradas quando comparadas ao material com partículas de tamanhos convencionais, principalmente melhor bioatividade que seu correspondente cristalino. Esta propriedade tem despertado o interesse na utilização de nanopartículas de HA em diferentes aplicações onde a distribuição de tamanho de

partículas e a morfologia podem apresentar aplicações específicas, tais como substituição e reparo do tecido ósseo em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, cimentos ósseos, terapia gênica e liberação controlada de fármacos [Salimi, 2012; Guastaldi, 2010; Dorozhkin, 2010; Rey, 2007].

Vários métodos têm sido propostos para a preparação de nanopartículas de HA, os quais são classificados como métodos por via seca ou por via úmida, tais como: precipitação química em soluções aquosas (método por via úmida), sol-gel, *freeze-drying*, síntese hidrotérmica, síntese mecano-química, hidrólise de outros fosfatos de cálcio, eletrocristalização, fragmentação de micropartículas induzida por laser, entre outros [Dorozhkin, 2010]. Os processos por via seca (*freeze-drying*, síntese mecano-química, fragmentação de micropartículas induzida por laser) resultam em pós muito finos e homogêneos, porém estes métodos geralmente não permitem a obtenção de materiais com composição estequiométrica bem definida, além do difícil controle das condições de síntese [Kawachi, 2000]. Trabalhos recentes vêm mostrando que o método por via úmida por neutralização de soluções contendo cálcio e fósforo é o mais adequado para a obtenção da HA nanométrica. Campos et. al. sintetizaram HA por 3 rotas diferentes: a) precipitação do acetato de cálcio e fosfato de amônia dibásico; b) neutralização do hidróxido de cálcio e ácido fosfórico e c) rota sol-gel de acetato de cálcio e ácido fosfórico em meio alcoólico. Os autores observaram que os pós obtidos por neutralização exibiram os melhores resultados em termos de cristalinidade e estabilidade térmica [Dorozhkin, 2010; Cai, 2008; Gouveia, 2008].

A metodologia utilizada para a obtenção de HA pelo método por via úmida por neutralização é baseada nos métodos de Rathje e Hayek, que consistem na adição em gotas do ácido ortofosfórico numa suspensão de hidróxido de cálcio formando água como subproduto, de acordo com a reação abaixo [Gouveia, 2008]:



Tendo em vista que o Ca(OH)_2 é pouco solúvel em água e a forma como os íons ortofosfato se dissociam é dependente do pH, para se obter HA monofásica pelo método de neutralização todos os parâmetros de síntese, tais como, natureza e composição do materiais de partida, pH, razão de adição do ácido e temperatura da solução preparada, devem ser efetivamente controlados, pois propriedades como cristalinidade, morfologia e tamanho de partículas são afetadas por estes [Gouveia, 2008; Pang, 2003].

Temperatura de síntese e de calcinação, pH, período de envelhecimento e velocidade de agitação são parâmetros estudados por diversos autores [Salimi, 2012; Gomes, 2008; Natarajan, 2008; Pang, 2003], os quais são relacionados com a sua influência no tamanho de partículas de nanopós de HA, contudo a influência da velocidade de adição do ácido fosfórico e do rígido controle do pH durante a síntese são parâmetros pouco estudados na literatura. Dessa forma, este é um dos primeiros trabalhos a estudar a influência da velocidade de adição de ácido na composição e no tamanho de partículas de nanopós de HA. Esses são parâmetros importantes, tendo em vista a utilização de nanopartículas de HA em grande número de aplicações onde a distribuição de tamanho de partículas e a composição podem afetar sua eficácia.

Neste trabalho, os efeitos da velocidade de adição de ácido na morfologia, composição e no tamanho de partículas de pós de HA obtidos por neutralização foram estudados. Os pós foram obtidos por via úmida à partir da reação de neutralização entre hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] e ácido fosfórico [H_3PO_4], adotando-se as velocidades de adição de ácido de rápida (20mL/min) e lenta (5mL/min). Morfologia, composição e tamanho das partículas foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X – EDX, Difractometria de Raios X – DRX,

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR e Distribuição Granulométrica por Difração à Laser.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação de pós de HA:

Pós de HA foram preparadas pelo método por via úmida à partir da reação de neutralização entre Hidróxido de Cálcio $[Ca(OH)_2]$ 0,5M e Ácido Fosfórico $[H_3PO_4]$ 0,3M. Com o objetivo de obter como principal fase a HA, as proporções dos reagentes foram ajustadas para o valor da razão Ca/P de 1,67. A suspensão de $Ca(OH)_2$ foi mantida sob aquecimento a 80°C por 30 minutos sob agitação constante e, em seguida, adicionou-se a solução de H_3PO_4 nas velocidades de 20mL/min (rápida) e 5mL/min (lenta). Durante o experimento o pH do meio reacional foi monitorado. Cessada a mistura dos reagentes, a suspensão obtida foi submetida a envelhecimento pelo período de 24 horas a temperatura ambiente. Os precipitados obtidos foram filtrados à vácuo e lavados com água deionizada. Após secagem em estufa a 40°C por 24 horas, os pós foram submetidos a tratamento térmico com patamares de temperatura de 300, 550 e 800°C por 3 horas cada, com taxa de aquecimento e resfriamento de 5°C/min.

2.2 Caracterização das partículas de HA:

A composição e o tamanho das partículas foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X – EDX, Difractometria de Raios X – DRX, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR e Distribuição Granulométrica por Difração à Laser. A identificação das fases de apatita foi realizada comparando-se os dados obtidos de DRX com as fichas padrões da base de dados mantida pelo JCPDS – Joint Committee for Powder Diffraction Studies. A fração de fase cristalina (X_c) nos pós foi calculada utilizando-se a equação 1 [Pang, 2003]:

$$X_c = 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \quad (1)$$

onde $V_{112/300}$ é a intensidade do alo entre os picos de difração (112) e (300) da HA e I_{300} é a intensidade do pico de difração (300) da HA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os espectros de DRX dos pós de HA obtidos adotando-se diferentes velocidades de adição de ácido são apresentados na figura 1. Observa-se que a velocidade de adição de ácido apresentou influência na composição e na cristalinidade dos pós obtidos. A adoção de velocidade rápida de adição originou pós compostos pela mistura de HA e β -fosfato tricálcico (β -TCP), além da presença de $Ca(OH)_2$ como impureza, sendo este indesejável devido ao caráter citotóxico que confere aos pós, em decorrência do elevado pH, Figura 1(a). A figura 1(b) mostra que a adoção de velocidade lenta de adição de ácido levou à formação de pós biocerâmicos compostos por HA como fase única. A presença de $CaCO_3$ pode ser observada na composição de todos os pós biocerâmicos. A presença de picos de difração mais estreitos nos difratogramas dos pós biocerâmicos obtidos por velocidade lenta de adição, Figuras 1(b), indica a maior cristalinidade destes quando comparados aos pós obtidos por velocidade rápida, o que corrobora com os valores da fração de fase cristalina (X_c), calculada utilizando-se a equação 1, dos pós biocerâmicos obtidos por velocidades de adição rápida e lenta: 0,61% e 0,69%, respectivamente.

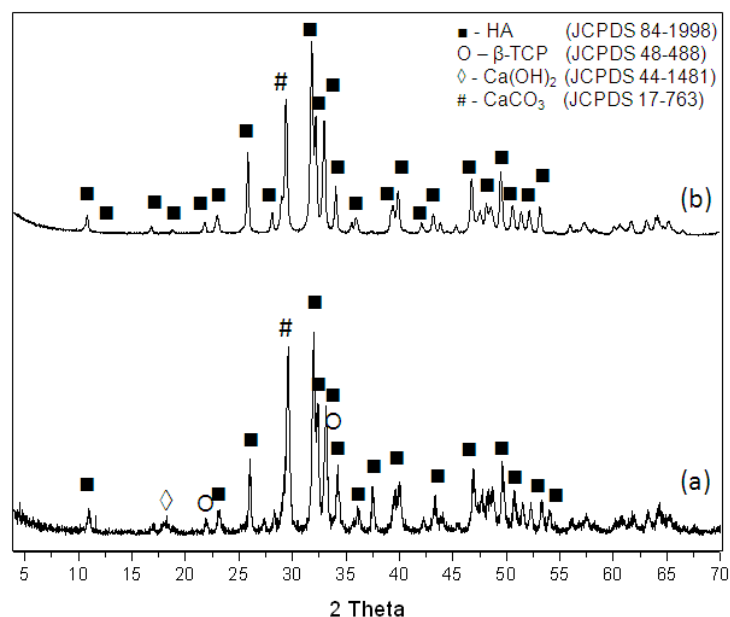


Figura 1: Espectro de DRX dos pós de HA obtidos adotando-se velocidades de adição de ácido rápida (a) e lenta (b).

Os espectros de FTIR dos pós de HA, Figura 2, confirmam os resultados obtidos por DRX. Bandas características dos grupos PO_4 (em 562 e 600 cm^{-1}), POH (em 870 e 1040 cm^{-1}) e do grupo OH referente a HA (em 3569 cm^{-1}) são observadas em ambos os espectros. A presença da banda característica do grupo OH do Ca(OH)_2 em 3642 cm^{-1} é observada somente para os pós obtidos por velocidade rápida (Figuras 2(a)), confirmando a presença de resíduos deste composto. As bandas em 1416 e 1469 cm^{-1} são devido à formação de grupos CO_3 decorrente do aprisionamento do CO_2 atmosférico durante o período de síntese e tratamento térmico. As bandas em 1640 e 3400 cm^{-1} são referentes a água, sendo que esta última, referente H_2O adsorvida, indica a presença de uma camada hidratada nos pós biocerâmicos obtidos, o que confirma que são formados por nanopartículas. Análises estruturais realizadas empregando-se Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) revelam que nanopartículas de apatita são compostas por uma camada hidratada na superfície em conjunto com a estrutura típica da apatita. A camada hidratada é composta por espécies iônicas que podem ser facilmente e rapidamente trocadas por íons ou macromoléculas presentes nos fluidos vizinhos. Essa camada hidratada é instável, transformando-se progressivamente na estrutura apatítica mais estável à partir do envelhecimento no meio aquoso [Dorozhkin, 2010].

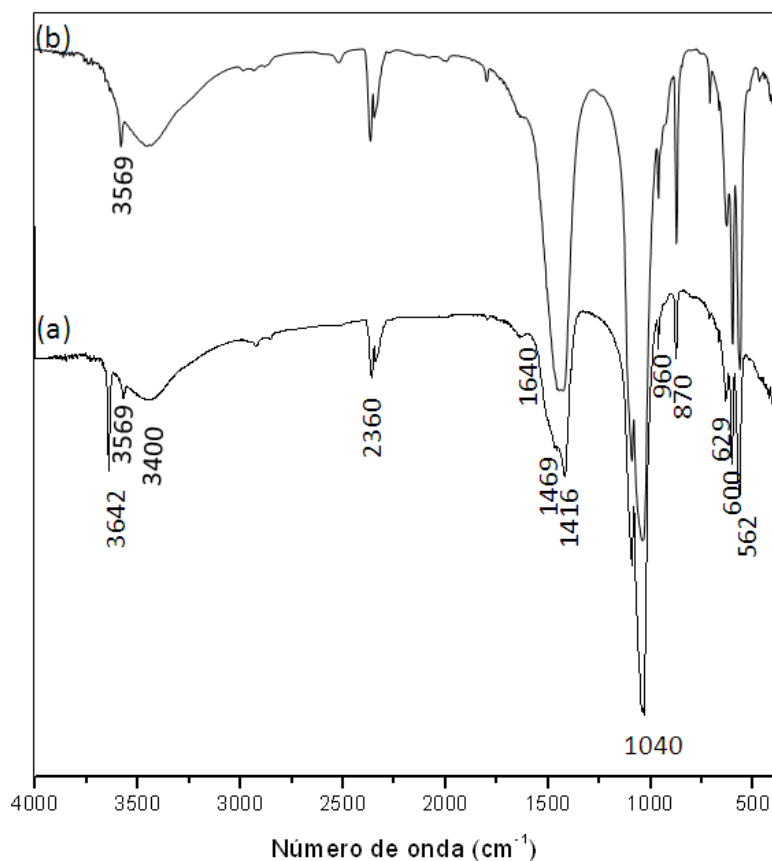


Figura 2: Espectro de FTIR dos pós biocerâmicos obtidos adotando-se velocidades de adição de ácido rápida (a) e lenta (b).

A morfologia dos pós biocerâmicos obtidos adotando-se velocidades de adição de ácido rápida e lenta é apresentada na Figura 3. Observa-se que a adoção de ambas as velocidades originou pós biocerâmicos com morfologias típicas de nanopartículas de HA após sinterização, ou seja, formados por aglomerados de pequenas partículas de tamanhos nanométricos, sendo que a morfologia destas partículas foi influenciada pela velocidade de adição de ácido adotada. As partículas presentes nos aglomerados dos pós obtidos pela rápida adição de ácido apresentaram morfologia flocular, com contornos irregulares e menos definidos (Figuras 3(a)). Por outro lado, a lenta adição de ácido originou aglomerados formados por pequenas partículas esféricas, com contornos mais regulares e definidos (Figuras 3(b)), decorrente da mais alta cristalinidade em comparação aos pós obtidos por velocidade rápida de adição de ácido [Pang, 2003].

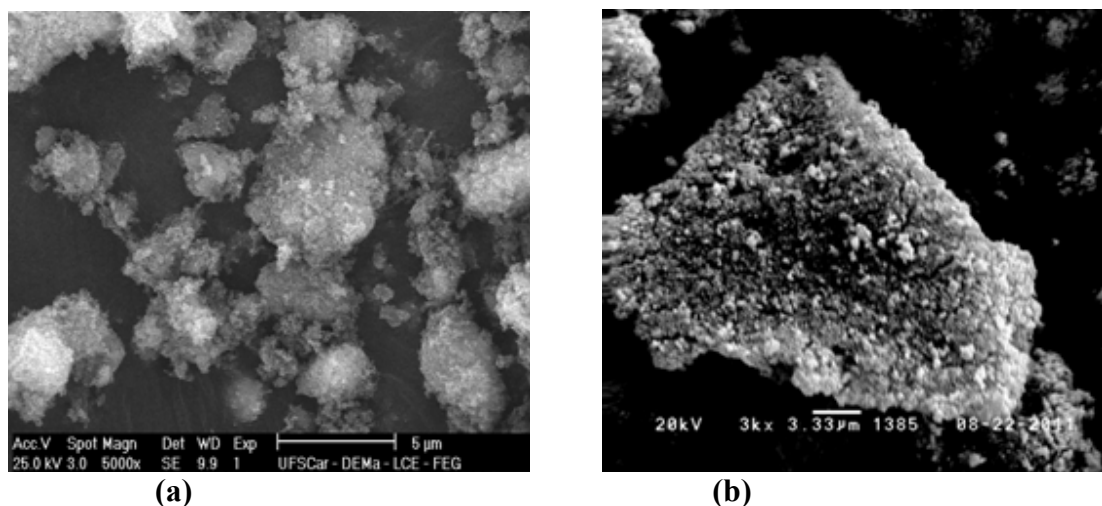


Figura 3: MEV dos pós biocerâmicos obtidos adotando-se velocidades de adição de ácido rápida (a e b) e lenta (c e d).

A morfologia dos pós, apresentada na Figura 3, indica que os aglomerados são formados por partículas que apresentam ampla distribuição de tamanho, o que pode ser confirmado pelas curvas representativas da distribuição granulométrica apresentadas na Figura 4. Pós biocerâmicos obtidos adotando-se rápida velocidade de adição de ácido apresentaram porcentagem inferior a 5% de sua massa composta por partículas e/ou aglomerados com diâmetro esférico menor que 1 μm , enquanto que cerca de 25% foi composta por aglomerados com diâmetro esférico na faixa de 1 a 10 μm e aproximadamente 80% com diâmetro esférico na faixa de 10 a 100 μm . Contudo, os pós biocerâmicos obtidos por velocidade de adição lenta apresentaram maior percentual de massa acumulada composta por partículas e/ou aglomerados com diâmetro esférico inferior a 1 μm e na faixa de 1 a 10 μm . A velocidade de adição de ácido não apresentou influência significativa no diâmetro dos aglomerados, pois em ambos os pós os aglomerados apresentaram diâmetros médios de 18 μm . Diversos estudos mostram que temperatura de síntese e período de envelhecimento são os parâmetros que afetam o tamanho das partículas e/ou dos aglomerados de pós biocerâmicos [Pang, 2003; Gomes, 2008].

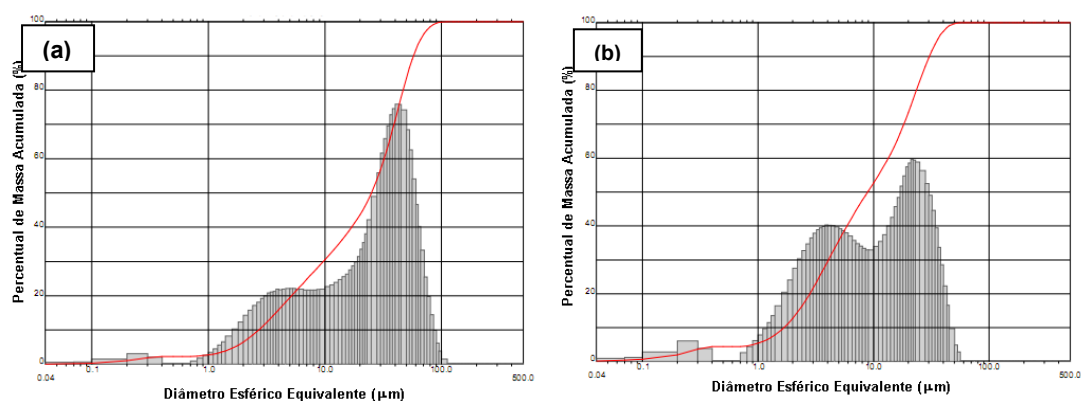
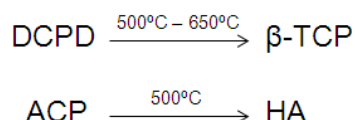


Figura 4: Curvas de distribuição de tamanho de partículas e/ou aglomerados dos pós biocerâmicos obtidos adotando-se velocidades de adição de ácido rápida (a) e lenta (b).

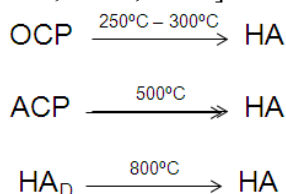
A formação de HA a partir soluções aquosas supersaturadas envolve a precipitação inicial de fosfato de cálcio amorfo (ACP), como previsto pela regra de estágios de Ostwald. Segundo esta regra, a primeira fase a se formar é a de maior solubilidade, a qual se transforma

por dissolução e recristalização em fases menos solúveis [Dorozhkin, 2010; Cai, 2008; Gouveia, 2008; Kanazawa, 1989; Aoki, 1991]. Por se tratar de uma fase metaestável, após sua cristalização o ACP passa por um ou mais passos intermediários de recristalização. Para valores de pH superiores a 7, ACP se converte a HA, conforme descrito [Abbona, 1996; Kanazawa, 1989]: $ACP \rightarrow OCP \rightarrow HA_D \rightarrow HA$. Contudo, para valores de pH entre 5 e 7, a formação de HA é interferida, pois ACP se converte diretamente a DCPD [Dorozhkin, 2010; Cai, 2008; Gouveia, 2008; Kanazawa, 1989; Aoki, 1991].

Durante os procedimentos experimentais observou-se que a adição de ácido de forma rápida fez com que o pH do meio reacional diminuísse rapidamente de 12 para 5,7 ao final da adição, o que favoreceu a transformação de ACP a DCPD, levando à formação, por tratamento térmico, da mistura de fases de HA e β -TCP, segundo as transformações abaixo [Kanazawa, 1989; Aoki, 1991]:



Diferentemente, adotando-se lenta adição de ácido o pH do meio reacional diminuiu de forma gradual, passando de 12 a 7 ao final da adição, favorecendo a recristalização de ACP a OCP e HA_D , como descrito acima, os quais se transformam a HA por tratamento térmico, conforme descrito abaixo [Kanazawa, 1989; Aoki, 1991]:



Como a adoção do método de precipitação para a obtenção de HA envolve a dissolução do $Ca(OH)_2$ e a dissociação dos íons ortofosfatos, a baixa solubilidade do $Ca(OH)_2$ em água associada ao curto período de reação decorrente da adição de ácido de forma rápida não favoreceram a ocorrência deste eventos e da interação entre os reagentes de forma adequada, o que fez com que quantidades remanescentes de $Ca(OH)_2$ permanecessem em solução e, conseqüentemente, na composição dos pós biocerâmicos obtidos por velocidade rápida de adição de ácido.

4. CONCLUSÕES

A velocidade de adição de ácido apresentou influência significativa na composição de nanopartículas de HA obtidas pelo método de neutralização, contudo não apresentou relação com o tamanho de partículas. A adoção de velocidade rápida originou pós compostos pela mistura de fases de HA e β -TCP e resíduos citotóxicos de $Ca(OH)_2$. Diferentemente, pela adoção de velocidade lenta obteve-se pós compostos somente por HA. A velocidade de adição de ácido afetou a composição das nanopartículas de HA devido à sua influência no pH do meio reacional. O tamanho de partículas foi semelhante para ambos os pós biocerâmicos obtidos.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a Capes e a Finep pelo apoio financeiro (Processo n. 2462095).

REFERÊNCIAS

- ABBONA, F. et al. A XRD and TEM study on the transformation of amorphous calcium phosphate in the presence of magnesium. **J. Cryst. Growth**, n. 165, p. 98-105, 1996.
- AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokio: JAAS, 1991. 230 p.
- CAI, Y. et al. Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. **Journal of Materials Chemistry**, n. 18, p. 3775–3787, 2008.
- DOROZHKIN, S. V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. **Acta Biomaterialia**, n. 6, p. 715-734, 2010.
- GOMES, J. F. et al. An investigation of the synthesis parameters of the reaction of hydroxyapatite precipitation in aqueous media. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 6, p. 1-15, 2008.
- GOUVEIA, D. S. **Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultra-som**. 2008. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de tecnologia nuclear – materiais) – IPEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- GUASTALDI, A. C. et al. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção e recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.
- KANAZAWA, T. **Inorganic phosphate materials**. Tokio: Elsevier, 1989. 289 p.
- KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 518-522, jul./ago. 2000.
- NATARAJAN, U. V. et al. Influence of calcium precursors on the morphology and crystallinity of sol-gel-derived hydroxyapatite nanoparticles. **J. Crystal Growth**, n. 310, p. 4601-4611, 2008.
- PANG, Y. X. et al. Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. **J. European Ceramic Society**, n. 23, p. 1697-1704, 2003.
- REY, C. et al. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: implications for biominerals and biomaterials. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, p. 198-205, Mar. 2007.
- SALIMI, M. N. et al. Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles. **Powder Technology**, n. 218, p. 109-118, 2012.

STUDY OF INFLUENCE OF THE RATE OF ADDITION OF ACID IN THE COMPOSITION AND SIZE OF NANOPARTICLES OF HYDROXYAPATITE (HA) OBTAINED BY NEUTRALIZATION

Aparecida, A. H.^{1,2}; Silva, A. C.^{1,3}; Braga, F. J. C.^{1,3}

¹Consulmat Materiais de Referência, Soluções e Serviços.

²Instituto de Química de Araraquara – Unesp.

³Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

e-mail: aherrera@iq.unesp.br

Abstract. In addition to its excellent properties are well established, studies show that nanostructured hydroxyapatite (HA) has a better bioactivity when compared to its crystalline corresponding. This property has stimulated interest in the use of nanoparticles of HA in medical, orthopedic, dental applications, bone cements, gene therapy and controlled drug release. Recent studies have shown that the wet method by neutralization of solutions containing calcium and phosphorus is the most suitable for obtaining the nano-HA, however all synthesis parameters should be effectively controlled, as crystallinity, morphology and particle size are affected by them. In this study, the effects of rate of addition of acid in the composition and size of nanoparticles of HA were studied. HA powder were obtained by the wet method from the neutralization reaction between $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and H_3PO_4 , adopting the speed of addition of acid fast (20mL/min) and slow (5mL/min). The powders were analyzed by Scanning Electron Microscopy - SEM, Energy Dispersive Spectroscopy X-ray - EDX, X-Ray Diffraction - XRD, Spectroscopy Fourier Transform Infrared - FTIR and size distribution by laser diffraction. The results showed that the rate of addition of acid directly interferes with nanoparticle composition of HA for the presence of other impurities and residues of apatite phases, however, is not related to the size of the nanoparticles.

Keywords: Biomaterials, Hydroxyapatite (HA), Nanoparticles.