CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA SUBSTITUÍDA COM SILÍCIO

H. M. da Silva^{1,2}; M. Mateescu²; M. Palard³; E. Champion³, K. Anselme²; G. A. Soares¹ ¹Lab. de Biomateriais para Engenharia Óssea, COPPE/UFRJ, CP 68505, Rio de Janeiro, 21941-972, Brazil ²Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M), UHA, Mulhouse, France

³ Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, Limoges, France e-mail: <u>helena@metalmat.ufrj.br</u>

A incorporação de íons na estrutura da hidroxiapatita (HA) influencia diretamente nas suas propriedades físicas, químicas, fisiológicas e conseqüentemente no processo de mineralização de tecidos cálcicos. Estudos mostram que a incorporação do íon silício na estrutura da HA melhora a bioatividade, acelerando o processo de biomineralização. O principal objetivo desse trabalho é caracterizar hidroxiapatitas pura e substituída com 1,13% em peso de Si, obtidas através de precipitação por via úmida. As técnicas de MEV/EDS, AFM, DRX e FTIR foram utilizadas para caracterizar as cerâmicas obtidas. Resultados de EDS e FTIR confirmaram a presença do Si. Os resultados obtidos por DRX não apresentaram diferenças entre ambas as cerâmicas. Além disso, não foram encontradas fases secundárias, sugerindo a efetiva substituição de grupos fosfato pelo silício.

Palavras - chave: hidroxiapatita, silício, biocerâmicas

INTRODUÇÃO

As cerâmicas à base de fosfato de cálcio são amplamente estudadas e utilizadas em diversos domínios médicos, assim como, odontologia, ortopedia, cirurgia facial, entre outros. Esse fato se deve às suas propriedades favoráveis para a substituição óssea, tais como composição química próxima a do osso humano, osteocondutividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (1).

Os fosfatos de cálcio mais utilizados são β -TCP (Ca₃(PO₄)₂ β), hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) ou uma mistura bifásica de β -TCP e HA em uma proporção variável de acordo com as propriedades desejadas (1-2).

A solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta à medida que a razão Ca/P diminui. Desta forma, a hidroxiapatita estequiométrica, razão molar Ca/P igual a 1,67, é pouco solúvel em meios biológicos

Mesmo que a composição química de alguns fosfatos de cálcio se aproxima das apatitas biológicas, a bioatividade desses materiais artificiais fica relativamente limitada (1). Uma maneira de melhorar suas propriedades biológicas seria ajustar sua composição química próxima à dos ossos, via substituição na estrutura da apatita (3).

Cada agrupamento iônico da apatita pode ser substituído por outro agrupamento iônico de mesma valência ou de valência diferente. Os sítios de hidróxido (OH) e fosfato (PO₄) da HA são notados, respectivamente, como sítios A e B. Os exemplos de substituições presentes na Tabela 1 são relacionados aos elementos presentes na estrutura da fase mineral do osso. A introdução desses íons pode influenciar a resposta biológica do material (4).

Substituições	Fórmulas químicas teóricas
Sítio Ca ⁺ 2	
Mg ⁺ 2	Ca _{10-x} Mg _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Zn ⁺ 2	Ca _{10-x} Zn _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Sr ⁺ 2	Ca _{10-x} Sr _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Ag ⁺	Ca _{10-x} Ag _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂
Sítio B (PO ₄ - ³)	
CO3 ⁻²	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x}
SiO4 ⁻⁴	Ca ₁₀ (PO ₄) _{6-x} (SiO ₄) _x (OH) _{2-x}
HPO ₄ ⁻²	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (HPO ₄) _x (OH) _{2-x}
Sítio A (OH ⁻)	
F	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} F _{2x}
Cl	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} Cl _{2x}
CO3 ⁻²	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} (CO ₃) _x

Tabela 1 – Exemplos de substituições na estrutura da apatita (4).

A introdução de novos grupamentos iônicos na estrutura da apatita leva a uma diminuição de cristalinidade e da estabilidade térmica e um aumento da solubilidade. As apatitas apresentadas na Tabela 1 atendem a essa regra, com exceção para os

íons flúor (F) que substituem os íons (OH), pois essa substituição tende a reduzir a solubilidade do material (5).

O estudo da substituição dos íons fosfato (PO₄) pelos íons silicato (SiO₄) na estrutura da hidroxiapatita é recente. Gibson et al. apresentaram o seguinte modelo de substituição (6):

$$Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x} \quad 0 \le x \le 2$$
 (A)

De acordo com esse modelo, o número teórico de silicato que pode ser introduzido na rede cristalina é igual a 2, correspondente a 5,82% em massa de silício.

Dados da literatura mostram que a incorporação de Si na estrutura da HA aumenta a bioatividade dos materiais. As cerâmicas à base de SiHA são capazes de desenvolver uma nova camada de fase apatita biológica na superfície em contato com fluidos fisiológicos mais rapidamente que a HA pura. (7; 8; 3). Estudos envolvendo cultura celular descrevem que a proliferação de células ósseas e sua diferenciação são mais importantes sobre a superfície de SiHA que sobre HA. Ademais, o Si induz o aumento da taxa de dissolução conduzindo à uma liberação dos íons Ca, P e Si no meio de cultura. Logo uma nova camada de apatita carbonatada se forma rapidamente, tornando-se um local ideal para adesão e crescimento ósseo. O Si liberado pode também se ligar ao oxigênio para formar uma matriz na superfície capaz de reter proteínas de uma maneira organizada, contribuindo para uma estrutura óssea conectada. (9, 3, 10). Testes *in vivo* colocam em evidência um excelente comportamento dos materiais contendo Si após implantação (11).

O principal objetivo desse trabalho é obter e caracterizar materiais monofásicos de hidroxiapatitas pura e substituída com 1,13% em peso de Si, obtidas através de precipitação por via úmida

Procedimento Experimental

Obtenção das pastilhas cerâmicas

Hidroxiapatitas estequiométrica (HA) e substituída com Si (SiHA) foram obtidas a partir de precipitação por via úmida, sendo a primeira obtida no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF segundo estudos realizados por Mavropoulos *et al.*

(2003) (12). E a contendo Si foi sintetizada no Sciences des Procédés Céramique et Traitements de Surface – SPCTS.

Para a síntese de SiHA, os números de moles, Tabela X, foram definidos em função da composição desejada, x = 0,4 (4), levando-se em consideração a razão molar Ca/(P+Si) igual a 1,67, e a fórmula química hipotética é descrita por (A), (Gibson *et al.* (1999).

Os produtos utilizados pra síntese da hidroxiapatita substituída por Si foram: nitrato de cálcio tetrahidratado Ca(NO₃)₂.4H₂O (Sigma Aldrich, 99%), hidrogênio fosfato diamônio (NH₄)₂HPO₄ (Sigma Aldrich, 99%) e tetraacetato de silício Si(CH₃COOH)₄ (Sigma Aldrich, 98%).

Foram adicionados 200 mL da suspensão de Si(CH₃COOH)₄ a 100 mL de $(NH_4)_2HPO_4$ e agitou-se por aproximadamente 10 minutos, em seguida aqueceu-se a 70°C, visando diminuir diferença de temperatura como o reator, ao qual essa solução foi adicionada com auxílio de uma bomba peristáltica (PD 5001, Heidolth).

A quantidade necessária de Ca(NO₃)₂.4H₂O foi adicionada a 500 mL de água destilada, no reator de 2 L, no qual a temperatura foi mantida a 90°C com o auxílio de uma sonda de temperatura (Horst). O gás carbônico atmosférico dissolvido na água foi eliminado por um fluxo de argônio que passa pelo reator por 30 minutos antes do início da reação, sendo que esse fluxo permaneceu constante durante toda a reação e o tempo de maturação. Ademais, acoplado ao reator, foi utilizado um condensador a fim de limitar perdas de liquido por evaporação. O pH do meio reacional foi ajustado a 9, e mantido durante o tempo da reação e da maturação, a partir de uma bomba dosadora (BL 7916 Hanna Instruments) conectada a um eletrodo de pH. O ajuste foi feito a partir da adição de uma solução de hidróxido de amônio NH₄OH (Prob., conc. 28%).

O precipitado formado foi deixado em maturação por 15 minutos, sendo a agitação, fluxo de argônio, regulações de pH e temperatura mantidos por esse período. Ao fim da maturação, o precipitado é recuperado por centrifugação, 2500 rpm por 5 min, lavado uma vez com água destilada, e então seco em uma estufa ventilada à 90°C durante uma noite.

Como a cinética de sinterização depende da área desenvolvida pelos grãos, foi feita a calcinação de ambas as cerâmicas visando a normalização da área de superfície, valor entre 30 e 40 m²/g, assim como descrito na literatura (4). Esse

processo foi realizado em um forno tipo mufla, a 650°C por 30 min para HA e 120 min para SiHA, a uma velocidade de aquecimento e resfriamento igual a 5°C/min.

Os pós calcinados nas condições especificadas anteriormente foram compactados individualmente em uma matriz de forma uniaxial utilizando-se uma pressão de aproximadamente 125 MPa. Após a prensagem, pastilhas de 10 mm de diâmetro e 2 mm de altura foram obtidas.

Visando alcançar uma máxima densificação, foi realizada a sinterização à 1200°C por 1 hora, condição esta que permite a obtenção de pastilhas com um grau de densificação superior a 95%.

Avaliação morfológica

Após sinterização à 1200°C/1h, as superfícies das pastilhas antes e após polimento, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio, visando verificar possíveis falhas, tais como, trincas ou poros.

A rugosidade média de superfície (Ra) das pastilhas foi obtida por microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*), no modo contato intermitente (*tapping*), a partir de imagens quadradas (1600 µm²) de diferentes regiões de uma mesma amostra. As analises foram realizadas usando-se um nanoscopio do tipo AFM Multimode Nanoscope IV (ICSI/CNRS, Mulhouse).

Composição das pastilhas

A composição das pastilhas após sinterização foi estimada por meio de EDS, FTIR - DRIFT, DRX. Os espectros de DRX foram obtidos variando 20 de 10 a 100°, com uma velocidade de 1/s e passo 0,05°. Os espectros por refletância difusa – DRIFT foram obtidos na faixa de 500 a 4000 cm ⁻¹ com uma resolução de 4 cm ⁻¹. As bandas foram normalizadas a partir de $v_4 PO_4^{-3}$ (602 cm ⁻¹) (13).

Resultados e Discussão

Após sinteriezação à 1200°C, os grãos da superfície de HA são maiores que os encontrados na superfície de SiHA, Fig. 1. Como esperado a rugosidade média (R_a)

na superfície de HA (88 \pm 7nm) apresenta um maior (p>0,05) valor em comparação ao valor equivalente para SiHA (49 \pm 12nm), como mostrado na Figura 2.



Figura 1 – Micrografia das superfícies de (a) HA e (b) SiHA após sinterização à 1200°C/1h.



Figura 2 – Perfis 3D típicos das superfícies (a) HA e (b) SiHA obtidos por AFM em modo de contato intermitente, escalas similares.

O padrão de difração dos pós de HA e SiHA, Fig.3, correspondem ao padrão de uma HA pura (PDF 9-432), em que os três picos mais intensos identificados pelos ângulos 20 de 31,8°, 32,2°, 32,9°, são correspondentes aos planos (211), (112) e (300), respectivamente. Não foi observada a presença de outros fosfatos de cálcio, além disso, a partir do teste colorimétrico de detecção de Ca(OH)₂ foi confirmada a ausência de CaO(14). Além disso, resultados de EDS confirmaram a presença do Si na estrutura da hidroxiapatita substituída, Fig. 4.



Figura 3 – Espectros de DRX dos pós de HA e SiHA sinterizados à 1200°C.

	- ()		-
1000 -	Ca (a)	1000 - Ca	(b)
800 -	P	800 - P	
600 -		600 -	
400 -		400 -	
200			
Ů) 2 4	2 4	

Figura 4 – EDS dos pós das hidroxiapatitas (a) pura e (b) substituída com Si.

No espectro de absorção no infravermelho, Fig.5, estão presentes as bandas que caracterizam a fase HA para ambos os materiais estudados; em 1089 (v_3), 1052 (v_3), 962 (v_1), 606 (v_4), 550 cm⁻¹ (v_4) tem-se os picos referentes ao grupamento PO₄³⁻, 632 e 3574cm⁻¹, referentes ao grupamento OH-. Assim como dados encontrados na literatura (6), a substituição do grupo fosfato pelo grupo silicato pode ser comprovada pelo balanço de cargas gerado para compensar a maior eletronegatividade do grupo silicato. Desta forma, para SiHA nota-se uma menor intensidade das bandas característicos de OH⁻ (3570 e 632 cm⁻¹) e PO₄⁻³. Além disso, bandas adicionais (948 – 838 cm⁻¹) aparecem devido à incorporação do Si na estrutura da apatita.



Figura 5 – Espectroscopia dos pós das hidroxiapatitas pura e substituída com Si.

CONCLUSÃO

A caracterização dos pós de hidroxiapatitas pura e substituída com Si mostrou que o pó produzido pelo método de precipitação via úmida apresenta uma única fase associada apenas à HA, não coexistindo outras fases. Resultados de EDS e FTIR confirmaram a presença do Si na hidroxiapatita. Ademais, a grande diferença morfológica entre as superfícies deve – se ao fato da SiHA apresentar menor tamanho de grão, conseqüentemente, uma menor rugosidade.

REFERÊNCIAS

- (1) Hench, L. L. Bioceramics: From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc*,v.74, p.487-1510, 1991.
- (2) LeGeros, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics *Clinical Materials*, v.1, p.65-88, 1993.
- (3) Vallet-Regi, M.; Arcos, D. Silicon substituted hydroxyapatite. A method to Upgrade calcium phosphate based implants. *J. Mat. Chemistry*, v.15, p.1509-1516, 2005.
- (4) Palard, M.; Champion, E; Foucaud, S. Synthesis of silicated hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)_{6-x}(SiO₄)_x(OH)_{2-x}. *J. Solid State Chemistry*, v.181, Issue 8,p. 1950-1960, 2008.
- (5) Yao, F.; LeGeros, J.P.; LeGeros, R. Z. Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties. *Acta Biomaterialia*, In Press, Corrected Proof, 2009
- (6) Gibson, I. R.; Best, S. M.; Bonfield, W. Chemical characterisation of siliconsubstituted hydroxyapatite. J *J. Biom. Mat. Res.*, v. 44, p. 422-428, 1999.
- (7) Botelho, C. M.; Lopes, M. A.; Gibson, I. R.; Best, S. M.; Santos, J. D. Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite : zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy. *J. Mat. Sc.: Materials in Medicine*, v.13, p.1123-1127, 2002.
- (8) Porter, A. E.; Botelho, C. M.; Lopes, M. A.; Santos, J. D.; Best, S. M.; Bonfield W. Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substitued hydroxyapatite in vitro and in vivo, *J. Biom. Mat. Res.*, v69A, p.670-679, 2004.
- (9) Gibson, I. R.; Huang, J.; Best, S. M.; Bonfield, W. Enhanced in vitro cell activity and surface apatite layer formation on novel silicon-substituted hydroxyapatites, *Bioceramics*, v.12, p.191-194, 1999.
- (10) Botelho, C. M.; Brooks, R. A.; Spence, G.; McFarlane, I.; Lopes, M. A.; Best, S. M.; Santos, J. D.; Rushton, N.; Bonfield, W. Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of Si-substituted hydroxyapatite. *J. Biom. Mat. Res.*, v.78A, p. 709-720, 2006.
- (11) Patel, N.; Best, S. M.; Bonfield, W.; Gibson, I. R.; Hing, K. A.; Damien, E; Revell, P. A. A comparative study on the in vivo behaviour of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules, *J. Mat. Sc.: Materials in Medicine*, v.13, p.1199-1206, 2002.
- (12) Mavropoulos, E.; Rossi,A. M da Rocha, N. C. C.; Soares,G. A.; Moreira,J. C.; Moure, G. T. Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions. *Materials Characterization*, v. 50, p. 203-207, 2003.
- (13) Raynaud, S; Champion, E.; Bernache-Assollant,D.; Laval. Determination of Calcium/Phosphorus Atomic Ratio of Calcium Phosphate Apatites Using X-ray Diffractometry. *J. Am. Ceram. Soc.*, v.84, p. 359–66, 2001.
- (14) Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T.; Dickson, I.R.; Glimcher, M.J. The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcif. Tissue Int.*, v.45, p.157–164, 1989.

CHARACTERIZATION OF HYDROXYAPATITE SUBSTITUTED WITH SILICON

Incorporation of silicon (Si) ions into hydroxyapatite structure (HA) influences on physical, chemical and physiological properties. Some studies reported the improved bioactivity Si substitution, and it also accelerates the biomineralization process. The main objective of this work is to characterize stoichiometric hydroxyapatite and hydroxyapatite substituted with 1.13% in weight of Si (SiHA) using a wet precipitation method followed by a heat treatment. SEM/EDS, AFM, DRX and FTIR analyses were used to characterize the samples. EDS and FTIR results confirmed the presence of Si. Silicon induces small changes on crystal structure of HA, not detected on X-ray diffraction patterns of sintered tablets of SiHA and HA. No secondary phases were observed, that indicates the Si had entered the HA lattice.

Key – words: Hydroxyapatite, Silicon, Biomaterials