

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS ÍONS K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} E CO_3^{2-} NA CRISTALIZAÇÃO BIOMIMÉTICA DE FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP) E CONVERSÃO A FOSFATO OCTACÁLCICO (OCP)

Anahí Herrera Aparecida*, Marcus Vinícius Lia Fook, Márcio Luis dos Santos e Antonio Carlos Guastaldi

Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, R. Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara – SP, Brasil

Recebido em 15/5/06; aceito em 29/9/06; publicado na web em 28/5/07

STUDY OF THE INFLUENCE OF K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} AND CO_3^{2-} IONS IN THE BIOMIMETIC CRYSTALLIZATION OF AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE (ACP) AND CONVERSION INTO OCTACALCIUM PHOSPHATE (OCP). The crystallization of hydroxyapatite (HA) in aqueous solution can be described by the mechanism $ACP \rightarrow OCP \rightarrow HA$. In this work, it was studied the influence of K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} and CO_3^{2-} ions in the formation of ACP and in its conversion to OCP, using biomimetic coatings on metallic substrates of commercially pure titanium (Ti c.p.). The results showed that Mg^{2+} and CO_3^{2-} ions favored both the formation of ACP and its conversion to OCP. Differently, K^+ and SO_4^{2-} ions did not influence the formation of ACP and, consequently, interfered in the conversion to OCP.

Keywords: biomimetic coating; amorphous calcium phosphate; octacalcium phosphate.

INTRODUÇÃO

Durantes as décadas passadas, as biocerâmicas de fosfato de cálcio têm sido amplamente utilizadas em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, como recobrimentos ou materiais densos para a reposição e reparação do tecido ósseo, devido à similaridade química e estrutural com a apatita biológica, que propicia a interação direta com o tecido ósseo¹⁻⁴. Uma forma conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo - Ca/P, a qual varia de 0,5 a 2,0 conforme mostra a Tabela 1. Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , sob condições alcalinas ou ácidas.

A hidroxiapatita – HA, por constituir o principal componente mineral dos ossos, é o fosfato de cálcio mais utilizado como biocerâmica, seja como recobrimento ou material denso¹. Contudo, além da HA, vários outros fosfatos de cálcio também ocorrem em calcificações normais e patológicas, o que vem despertando

interesse significativo nas possibilidades de utilização destes materiais como biocerâmicas⁵. A Tabela 2 relaciona diversos fosfatos de cálcio e suas ocorrências em sistemas biológicos.

A utilização de HA em recobrimentos tornou-se popular em implantes dentários e ortopédicos devido às seguintes vantagens: rápida adaptação óssea, não formação de tecido fibroso, íntima adesão implante/tecido, tempo de cicatrização reduzido e maior tolerância a imprecisões cirúrgicas. A estas vantagens podem estar associadas outras características, como um sistema de manutenção do osso ao redor da área recoberta que aumenta a tolerância às mudanças ósseas naturais inevitáveis⁶. Apesar de todas estas vantagens, o uso clínico da HA é limitado devido à sua lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a HA começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implantação. A reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação⁵.

Tabela 1. Relação Ca/P das fases de apatita

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$Ca_4O(PO_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$	1,5
Fosfato tricálcico (α , α' , β , γ) (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio diidratado (DCPD)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$CaHPO_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$Ca_2P_2O_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio diidratado (CPPD)	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,0
Fosfato Heptacálcico (HCP)	$Ca_7(P_5O_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$Ca_4H_2P_6O_{20}$	0,67
Fosfato Monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,5
Metafosfato de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$Ca(PO_3)_2$	0,5

*e-mail: aherrera@posgrad.iq.unesp.br

Tabela 2. Ocorrências de fosfatos de cálcio em sistemas biológicos

Fosfato de Cálcio	Ocorrências
Hidroxiapatita (HA)	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário e urinário, pedras, calcificação de tecido mole
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	Cálculo dentário e urinário
Fosfato octacálcico (OCP)	Cálculo dentário e urinário
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	Cálculo dentário, ossos decompostos
Fosfato tricálcico (TCP)	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação de tecido mole
Pirofosfato de cálcio diidratado (CPPD)	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos

Fosfato de Cálcio Amorfo – ACP

Quando fosfatos de cálcio são precipitados a partir de soluções aquosas supersaturadas, com pH neutro ou alcalino, uma fase amorfa metaestável forma-se rapidamente nos estágios iniciais da reação^{7,8}. Esta fase é denominada fosfato de cálcio amorfo – ACP, cuja fórmula é $Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$, com $n = 3$ a $4,5$, e que corresponde à hidroxiapatita deficiente em cálcio – HA_D com composição $Ca_9H_2(PO_4)_6 \cdot n'H_2O$.

Alguns autores descrevem que ACP se converte diretamente a HA, contudo, a formação de fosfato octacálcico – OCP – como fase intermediária pode ocorrer e é descrita por outros autores^{8,9}.

Embora não pareça existir em quantidade detectável nos tecidos duros dos vertebrados, o ACP tem sido encontrado em muitos sistemas biológicos e como parte da composição de recobrimentos obtidos por aspersão térmica (“plasma-spray”). Esta fase de apatita tem sido relatada como responsável pela otimização das propriedades mecânicas destes recobrimentos, especialmente a adesão a superfícies metálicas, e das propriedades biológicas. O aumento da quantidade de ACP em recobrimentos melhora a osteocondutividade, contudo pode ocasionar a degradação do material, danificando sua integração biológica com o tecido vivo¹⁰.

Fosfato Octacálcico – OCP

O fosfato octacálcico (OCP) - $Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$ - apresenta importância biológica tanto quanto o ACP e a HA, pois é um importante precursor na formação de ossos e dentes. O OCP tem estrutura similar à HA e, freqüentemente, aparece como um intermediário em sua formação. Em solução aquosa, esta fase pode ser considerada como uma fase de transição, pois é formada como intermediária na conversão do ACP a HA, segundo o mecanismo $ACP \rightarrow OCP \rightarrow HA$, que pode ser influenciado por diferentes fatores, tais como temperatura, pH e composição da solução^{9,11,12}.

Entre as técnicas de recobrimento o método biomimético vem se destacando entre os demais, pois possibilita a mimetização do processo biológico de formação de tecidos rígidos. Inicialmente proposto por Kokubo *et al.*¹³, este método utiliza uma solução aquosa denominada “Simulated Body Fluid - SBF” de composição e pH similares ao fluido corpóreo. Dentre as diversas vantagens apresentadas por este método, pode-se destacar a possibilidade de controle de espessura da camada, tamanho de grãos e diversidade de forma cristalina.

Tanto no meio biológico quanto em solução aquosa como a SBF, a formação de apatitas ocorre em meio contendo, além de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , íons-traços essenciais tais como: Mg^{2+} , HCO_3^- , K^+ e Na^+ . Alguns destes íons apresentam propriedades específicas frente à formação de HA e de outras fases de apatita^{9,14,15}. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na formação da fase precursora ACP e na sua conversão a OCP. Utilizaram-se neste trabalho soluções biomiméticas com composições variadas e substratos metálicos de titânio comercialmente puro - Ti c.p.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras de Ti c.p., depois de cortadas nas dimensões de $0,5 \times 1,0 \times 0,3$ cm, foram lixadas com lixas d'água de granulometria 180 mesh, limpas em ultra-som por 15 min em mistura de acetona e álcool etílico e 15 min em água desmineralizada. Logo após, foram colocadas em solução de NaOH 5M por 24 h em estufa a $60^\circ C$ e, então, secas por 3 h, também em estufa a $60^\circ C$. Para analisar o efeito da composição da solução SBF na obtenção das fases ACP e OCP, seis diferentes soluções foram preparadas, com reagentes de grau analítico e água desmineralizada, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações iônicas das soluções SBF utilizadas (mmol dm^{-3})

	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}	CO_3^{2-}
SBF 0	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2
SBF 1	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	-
SBF 2	140,4	-	1,0	3,1	142,9	1,86	-	-
SBF 3	140,4	1,0	-	3,1	142,9	1,86	-	-
SBF 4	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	1,0	-
SBF 5	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	3,0
SBF 6	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	5,0

Na Tabela 3, a solução denominada SBF 0 é a solução padrão utilizada pelo método biomimético, com a presença de todos os íons em sua composição. Com a utilização da solução modificada SBF 1, avaliou-se o efeito da ausência dos íons-traços essenciais na formação das fases de apatita em estudo. Nas soluções denominadas SBF 2, 3 e 4, os íons em estudo foram Mg^{2+} , K^+ e SO_4^{2-} , respectivamente, todos na concentração de 1mM. O comportamento do íon CO_3^{2-} foi avaliado em duas concentrações, 3 e 5 mM, utilizando-se as soluções SBF 5 e 6, respectivamente.

As amostras foram mantidas em cada SBF a $37^\circ C$ por 7 dias, efetuando-se a troca da solução a cada 48 h.

Os recobrimentos obtidos foram analisados utilizando-se as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), usando microscópio JEOL-JSM, modelo T-330 A acoplado a espectrômetro de energia dispersiva de raios X - EDX e à câmera fotográfica; difratometria de raios X - DRX, utilizando um difratômetro de raios X Siemens D5000 com varredura angular entre 10 e 70° com passo de $0,02$ (2θ), sendo que o tempo de passo foi de 1,0 s para cada amostra; espectroscopia no infravermelho médio - IV (com número de ondas de 4000 a 400 cm^{-1}), realizada com espectrômetro Perkin Elmer, FT-IR Spectrometer-Spectrum 2000 de reflectância difusa Drift Collector.

RESULTADOS E DISCUSSÃO**Recobrimento por SBF 0**

Por imersão em SBF 0, obteve-se sobre a superfície do Ti c.p. um recobrimento compacto e de grãos esféricos com trincas de

aproximadamente 10 μm . Por EDX, notou-se que o recobrimento é composto somente pelos elementos Ca e P, em uma razão Ca/P de 1,45. A caracterização por DRX mostrou que este recobrimento é composto por uma mistura de fases correspondentes ao fosfato octacálcico (OCP) e à hidroxiapatita deficiente em cálcio (HA_D) – $\text{Ca}_{9,04}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$. Figura 1. O espectro de IV mostrou bandas características de grupos PO_4 em 387, 646, 984 e 1144 cm^{-1} , P-OH em 515 cm^{-1} e apatita carbonatada do tipo B em 1464 e 876 cm^{-1} , que pode ser atribuída também ao grupo P-OH.

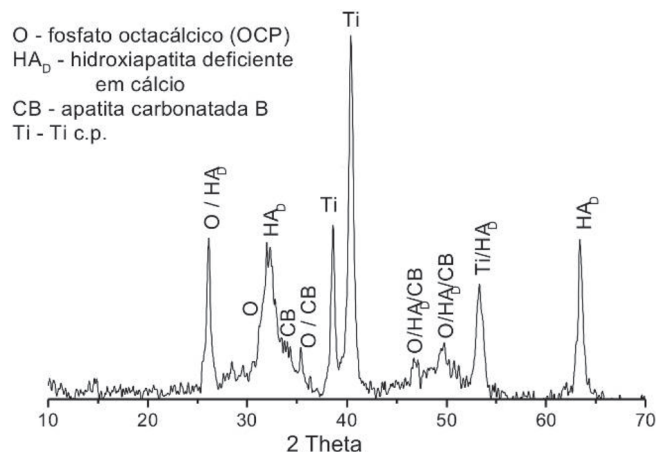
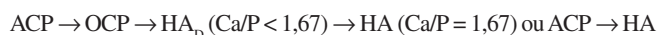


Figura 1. DRX do recobrimento de apatita obtido por imersão em SBF 0

A formação de ACP a partir de uma solução aquosa envolve um período de indução (t_{ACP}), o qual pode ser alterado mediante as condições de temperatura, pH e composição da solução. A presença de íons Mg^{2+} , CO_3^{2-} , F^- , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ e poliacrilatos reduz significativamente este período. Diferentemente, a presença de íons como Na^+ e K^+ não altera este período de indução⁹.

Após sua cristalização, o ACP sofre hidrólise originando OCP ou HA, segundo o mecanismo⁹:



O estudo do comportamento hidrolítico do ACP mostra que o mecanismo da conversão é governado por um processo de dissolução-precipitação, devido à alta solubilidade da fase amorfa comparada à fase cristalina. Em pH fisiológico (7,4), a hidrólise do ACP é descrita por um processo em duas etapas. Na primeira, ocorre a diminuição da razão Ca/P da fase sólida (inferior a 1,5) associada ao aumento do pH e ao aumento da razão Ca/P da solução (maior que 1,5). Na segunda etapa, um aumento na razão Ca/P do sólido é observado devido ao consumo de íon OH^- da solução e uma diminuição da razão Ca/P da solução. Esta etapa é caracterizada como hidrólise do OCP a hidroxiapatita¹⁰.

A partir dos dados obtidos, pode-se notar que a composição da solução SBF 0 possibilitou a cristalização completa do ACP, devido à redução do t_{ACP} ocasionada pela presença dos íons Mg^{2+} e CO_3^{2-} e sua total conversão a OCP. Esta última fase converteu-se parcialmente a HA deficiente em cálcio, conforme o mecanismo mostrado.

Recobrimento por SBF 1

O recobrimento obtido por imersão em SBF 1 apresentou morfologia característica de fase amorfa de fosfato de cálcio, composta por grãos esféricos⁹. A presença dos elementos Ca e P deu-se em uma razão de 1,4. Por DRX, Figura 2, observou-se que somente a fase ACP estava presente no recobrimento. O espectro

de IV, Figura 2cS, confirmou os resultados obtidos por DRX, pois apresentou bandas características dos grupos PO_4 (em 662 e 1301 cm^{-1}) e P-OH (em 1045 cm^{-1}) e da fase amorfa de fosfato de cálcio (em 573 cm^{-1}). Além destas bandas, o recobrimento apresentou bandas referentes ao grupo CO_3^{2-} da apatita carbonatada tanto do tipo A (em 1557 cm^{-1}) quanto do tipo B (em 1409 e 1468 cm^{-1}), caracterizando uma apatita carbonatada do tipo AB. Mesmo a solução SBF 1 não contendo o íon CO_3^{2-} em sua composição, a presença de apatita carbonatada no recobrimento é possível pela reação entre os íons OH^- da apatita com CO_2 do ar, durante o período de imersão, segundo a reação⁹:

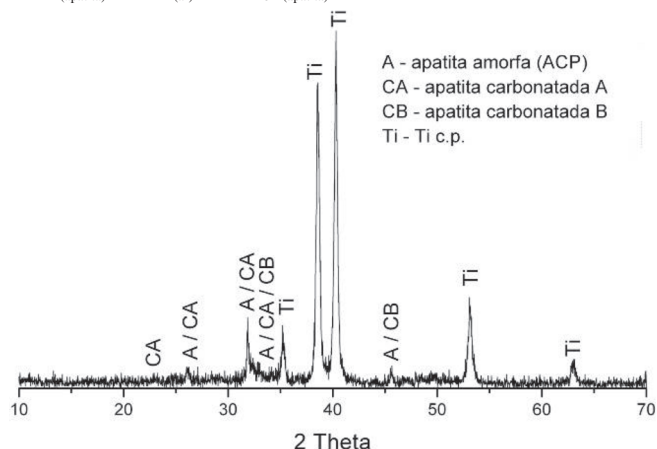
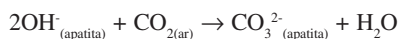


Figura 2. DRX do recobrimento de apatita obtido por imersão em SBF 1

O fato da solução SBF 1 conter, além dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , somente os íons Na^+ e Cl^- contribuiu para a obtenção majoritária de ACP no recobrimento, pois estes íons não alteram t_{ACP} , não favorecendo sua conversão a OCP.

Recobrimento por SBF 2

Por imersão em SBF 2, obteve-se um recobrimento com morfologia característica das fases amorfa de fosfato de cálcio e OCP, este último caracterizado por cristais orientados perpendicularmente semelhante a agulhas (acuniformes)^{11,12,15}. Por DRX, observou-se somente a presença destas fases, Figura 3. A razão Ca/P foi de 1,35. O espectro de IV apresentou bandas características dos grupos P-OH no intervalo de 1000-1104 cm^{-1} e PO_4 em 573 cm^{-1} , que pode ser também atribuída à fase amorfa de fosfato de cálcio, confirmando os resultados obtidos por DRX. Bandas de apatita carbonatada do tipo A apareceram em 1457 e 1528 cm^{-1} .

A presença do íon Mg^{2+} na solução possibilitou a obtenção de OCP, pois favoreceu a cristalização completa do ACP, por diminuição do t_{ACP} , e, conseqüentemente, sua transformação parcial a OCP.

Recobrimento por SBF 3

O recobrimento obtido por imersão em SBF 3 apresentou morfologia predominante de fosfato de cálcio amorfo, resultado confirmado por DRX, Figura 4. A razão Ca/P foi de 1,42. O espectro de IV apresentou bandas características dos grupos P-OH em 944-1119 cm^{-1} , PO_4 em 573 cm^{-1} , que pode ser atribuída também à fase amorfa de fosfato de cálcio, e apatita carbonatada do tipo A em 1457 e 1528 cm^{-1} . O comportamento desta solução assemelhou-se à solução SBF 1, indicando a não interferência do íon K^+ em t_{ACP} .

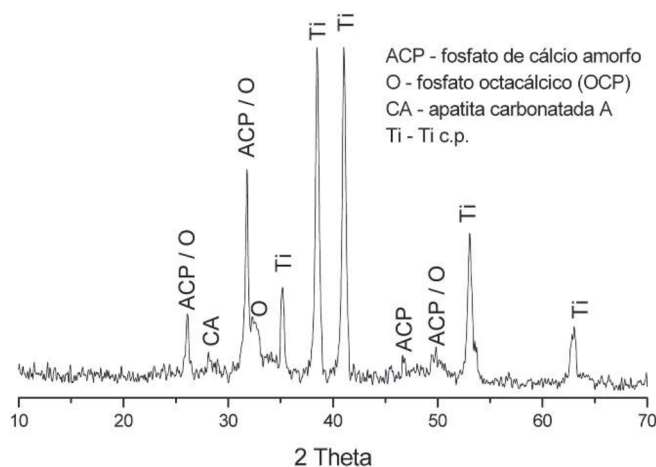


Figura 3. DRX do recobrimento de apatita obtido por imersão em SBF 2

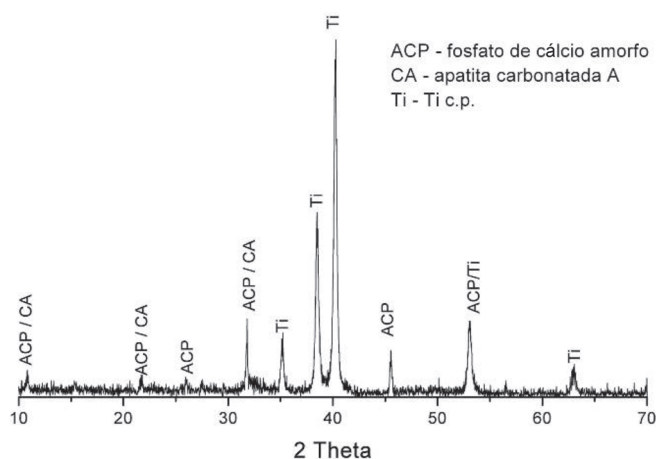


Figura 4. DRX do recobrimento de apatita obtido por imersão em SBF 3

Recobrimento por SBF 4

Por imersão em SBF 4 obteve-se um recobrimento composto por grãos esféricos característicos de fosfato de cálcio amorfo. A razão Ca/P foi de 1,5. Os resultados do DRX confirmaram a presença majoritária ACP, Figura 5. O fenômeno de formação desta fase é semelhante ao ocorrido pela imersão das amostras em SBF 1 e 3, ou seja, a composição da solução não possibilitou a redução de t_{ACP} , interferindo desta forma na sua conversão a outras fases de apatita. O espectro de IV exibiu bandas características dos grupos PO_4 (em 564 cm^{-1}), P-OH (em $944-1119\text{ cm}^{-1}$) e apatita carbonatada do tipo A e B (em 1536 e 1468 cm^{-1} , respectivamente).

Recobrimento por SBF 5

O recobrimento obtido pela imersão em SBF 5 apresentou morfologia característica das fases ACP e OCP, ou seja, composto por grãos esféricos e cristais em forma de agulhas. Estas observações foram confirmadas pela análise do DRX, o qual apresentou picos característicos destas fases, Figura 6. A presença dos elementos Ca e P deu-se em uma razão de 1,46. O espectro de IV apresentou bandas dos grupos PO_4 em 465 e 593 cm^{-1} , P-OH em $944-1119\text{ cm}^{-1}$, apatita carbonatada do tipo A em 880 e 1457 cm^{-1} e apatita carbonatada do tipo B em 870 cm^{-1} , que pode também ser atribuída ao grupo PO_4 .

Pode-se notar que o íon CO_3^{2-} na concentração de 3 mM possi-

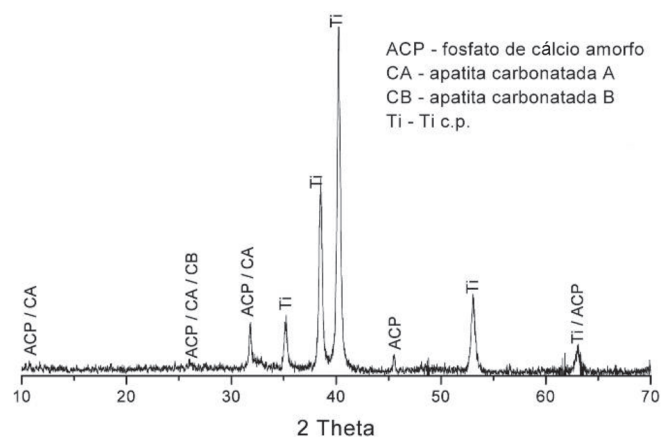


Figura 5. DRX do recobrimento de apatita obtido por imersão em SBF 4

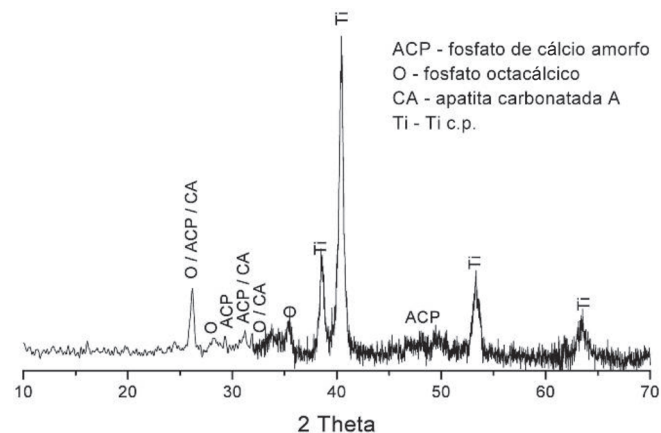


Figura 6. DRX do recobrimento de apatita obtido por imersão em SBF 5

bilitou a cristalização completa do ACP, favorecendo, dessa forma, sua conversão parcial a OCP.

Recobrimento por SBF 6

O recobrimento obtido por imersão nesta solução apresentou em sua morfologia aglomerados entre partículas esféricas maiores que aquelas características da fase ACP e agulhas características do OCP. A presença dos elementos Ca e P deu-se em uma razão de 1,53. Os resultados de DRX confirmaram as observações anteriores, pois apresentaram picos característicos somente da fase OCP e de apatita carbonatada AB, Figura 7. Dessa forma, nota-se que nesta concentração (5 mM) os íons CO_3^{2-} apresentam maior eficiência na diminuição do período de indução da cristalização do ACP. As bandas exibidas por espectroscopia de IV foram características dos grupos PO_4 (em 454 , 544 e 595 cm^{-1}), P-OH (em 879 e $944-1095\text{ cm}^{-1}$) e apatita carbonatada dos tipos A e B (em, respectivamente, 1547 e 1311 , 1468 cm^{-1}).

A elevada concentração do íon CO_3^{2-} nesta solução possibilitou, além da cristalização completa do ACP, sua conversão total a OCP.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a influência da composição da solução biomimética na obtenção de diferentes fases de apatita. A cristalização de ACP foi possível com a utilização de todas as soluções em estudo, sendo que a composição de tais soluções determinou a presença desta fase como majoritária ou como

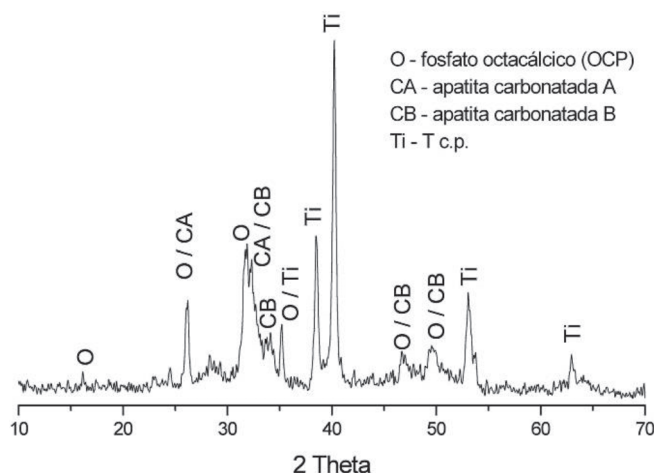


Figura 7. DRX do recobrimento de apatita obtido por imersão em SBF 6

mistura juntamente com OCP ou ainda na sua conversão direta a OCP. A presença majoritária de ACP no recobrimento só foi observada quando se utilizou soluções contendo os íons K^+ e SO_4^{2-} , tendo em vista que estes íons não alteraram t_{ACP} . A conversão desta fase a OCP somente foi possível com a presença dos íons Mg^{2+} e CO_3^{2-} . O comportamento do íon CO_3^{2-} tornou-se acentuado na concentração de 5 mM, onde foi observada a conversão direta de ACP a OCP.

MATERIAL SUPLEMENTAR

No material suplementar, disponível gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br> na forma de arquivo PDF, estão contidas as Figuras referentes a MEV, EDX e IV dos recobrimentos obtidos, Figuras 1S a 7S.

REFERÊNCIAS

1. Campbell, A. A.; *Mater. Today* **2003**, 26.
2. Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Wang, H.; Kim, T. N.; Kim, J. O.; *J. Cryst. Growth* **2000**, 210, 735.
3. Hench, L. L. Em *An Introduction to Bioceramics*; Hench, L. L.; Wilson, J., eds.; World Scientific: Londres, 1993, caps. 1-4.
4. Hanawa, T. Em *The Bone-Biomaterial Interface*; Hanawa, T., ed.; University of Toronto Press: Toronto, 1991, cap. 5.
5. Kawachi, E. Y.; Bertran, C. A.; Reis, R. R.; Alves, O. L.; *Quim. Nova* **2000**, 23, 518.
6. Kay, J. F.; *Dental Clin. North Am.* **1992**, 36, 1.
7. Kim, S.; Ryu, H. S.; Shin, H.; Jung, H. S.; Hong, K. S.; *Mater. Chem. Phys.* **2005**, 91, 500.
8. Abbona, F.; Baronnet, A.; *J. Cryst. Growth* **1996**, 165, 98.
9. Kanazawa, T. Em *Inorganic Phosphate Materials*; Kanazawa, T., ed.; Elsevier: Tóquio, 1989, caps. 1-6.
10. Somrani, S.; Banu, M.; Jemal, M.; Rey, C.; *J. Solid State Chem.* **2005**, 178, 337.
11. Graham, S.; Brown, P. W.; *J. Cryst. Growth* **1996**, 165, 106.
12. Barrere, F.; Layrolle, P.; Blitterswijk, C. A. V.; Groot, K.; *Bone* **1999**, 25, 107S.
13. Kokubo, T.; *Acta Mater.* **1998**, 7, 2519.
14. Barrere, F.; Blitterswijk, C. A. V.; Groot, K.; Layrolle, P.; *Biomaterials* **2002**, 23, 1921.
15. Dekker, R. J.; Bruijn, J. D.; Stigter, M.; Barrere, F.; Layrolle, P.; Blitterswijk, C. A. V.; *Biomaterials* **2005**, 26, 5231.