

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ASSOCIAÇÃO DA HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICA À ALBUMINA BOVINA (BSA)

Tatiana Jorge Fernandes^{a*}, Fábio Marques de Oliveira^b, Elena Mavropoulos Oliveira Tude^b, Marcelo Henrique Prado da Silva^a

^aSeção de Engenharia de Defesa – Instituto Militar de Engenharia; Praça General Tibúrcio, 80, 22290-270, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

^bDepartamento de Física Aplicada, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF – Rua Dr. Xavier Sigaud, 150, 22290-180, Urca – Rio de Janeiro / RJ

*tatiana-jf@ig.com.br

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA), with and without the presence of polyvinylpyrrolidone (PVP), was synthesized using calcium hydroxide, orthophosphoric acid and lactic acid as starting materials, in different aging times (24, 40 and 88 hours). The pH of the solution was adjusted to 12 using potassium hydroxide (KOH). The precipitates were filtered, adding repeatedly Milli-Q® water to remove KOH and reach pH 7. The powders were sintered at 1100°C. Nanometric HA was obtained in the presence of 3wt% PVP. Bovine serum albumin (BSA) solution (1mg/ml) was associated to sintered and non sintered HA. The results showed hydroxyapatite at all samples without the presence of PVP, according to X-ray diffraction analysis. HA + PVP sintered sample showed other calcium phosphate phases, confirmed by Rietveld refinement analysis and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Scanning electron microscopy with field emission gun (SEM-FEG) showed submicrometric and nanometric particles and agglomerates. Ultraviolet spectroscopy results obtained for non sintered hydroxyapatites showed that HA PVP 24 adsorbed 100% of total BSA concentration, followed by HA 24 (50,05%), HA 88 (27,54%) and HA 40 (13,84%). Adsorbed BSA was not released from HA after desorption experiment under the action of Milli-Q® water.

Keywords: similarity, PVP, hydroxyapatite, albumin, protein adsorption.

RESUMO

Hidroxiapatita (HA), com e sem a presença de polivinilpirrolidona (PVP), foi sintetizada a partir de hidróxido de cálcio, ácido ortofosfórico e ácido láctico, com diferentes tempos de envelhecimento (24, 40 e 8 horas). O pH da solução foi ajustado para 12 utilizando hidróxido de potássio (KOH). Os precipitados foram filtrados, adicionando-se água ultra-pura Milli-Q® repetidamente, para remoção do KOH residual e obtenção de pH 7. Os pós foram sinterizados a 1100°C. Obteve-se

uma hidroxiapatita nanométrica em presença de 3%pp de PVP. Uma solução 1mg/mL de albumina de soro fetal bovino (BSA) foi associada aos pós sinterizados e não sinterizados. Os resultados de difração de raios X (DRX) com refinamento pelo método de Rietveld e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) revelaram a presença de hidroxiapatita nas amostras sintetizadas com e sem a presença de PVP. A análise por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) revelou a presença de partículas submicrométricas e nanométricas, formando aglomerados. Os resultados de espectroscopia na faixa do UV-visível obtidos para as amostras não sinterizadas mostraram que as HA PVP 24 adsorveram 100% da concentração total de BSA, seguidas das amostras HA 24 (50,05%), HA 88 (27,54%) e HA 40 (13,84%). A BSA adsorvida não foi liberada da HA após os experimentos de dessorção em água Milli-Q®.

Palavras-chave: similaridade, PVP, hidroxiapatita, adsorção de proteína.

INTRODUÇÃO

Novos biomateriais têm sido pesquisados para que se encontrem soluções terapêuticas para diversas aplicações clínicas, principalmente, para as doenças crônicas e degenerativas e, especificamente, nos traumas e patologias que levam à perda óssea.

Os biomateriais abrangem todos os elementos implantados no organismo humano com fins terapêuticos e que não apresentem reações adversas no meio fisiológico. Diferenciam-se pela escala de produção e pelos processos de síntese ou rotas de processamento. Em uma escala nanométrica, o desenvolvimento de biomateriais envolve entender os mecanismos de adesão, migração e interação celular nos vários níveis (nano, micro e macro) de reconstrução ou reparação das estruturas tridimensionais da matriz extracelular (Borojevic, 2005).

Devido a sua similaridade com a fase inorgânica do tecido ósseo e sua propriedade osteocondutora, a hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tem sido usada como a mais importante biocerâmica bioativa para implantes ósseos.

A presença de íons carbonatos na estrutura da hidroxiapatita tem grande efeito na cristalinidade da estrutura e tamanho de cristal. A formação de cristais menores contribui para um aumento da área superficial e da taxa de dissolução, como também provoca um alargamento dos picos de difração (LeGeros, 1991; Hench e Wilson, 1993).

Comparada com as cerâmicas convencionais, as características da HA contendo componentes nanoestruturados, permitem o controle de algumas propriedades tais como tamanho de partículas (área superficial), distribuições da nanoporosidade e da tensão superficial (molhabilidade), que podem promover a interação das partículas da HA com proteínas ou biomacromoléculas, melhorando a adesão de células ósseas (e.g. osteoblastos) e, portanto da funcionalidade do implante em longo prazo. Estas melhorias nas características físico-químicas da HA tem reflexo na fixação celular e, por conseguinte, nos níveis de fosfatase alcalina e deposição

mineral de cálcio (Ferraz *et al.*, 2004).

A preparação da HA com nanopartículas sem agregação é um problema tecnológico da indústria atualmente. Partículas pequenas tendem a se agregar, formando agregados, devido à redução da energia livre total do sistema. Com o objetivo de atenuar o problema da aglomeração das partículas de HA, alguns surfactantes têm sido utilizados como mediadores ou agentes de atividade superficial capazes de alterar as propriedades interfaciais das nanopartículas.

De acordo com estudos recentes, o polímero polivinilpirrolidona (PVP) é um destes surfactantes que podem desempenhar um importante papel na síntese da HA como estabilizador para retardar o crescimento do cristal ou prevenir aglomeração (Mendes *et al.*, 2010, Du *et al.*, 2009, Qiu *et al.*, 2008).

A interação de proteínas com superfícies sólidas inorgânicas é a chave para implementar aplicações clínicas importantes. Quando um biomaterial é implantado, as proteínas presentes no fluido fisiológico aderem nele rapidamente, resultando em uma camada interfacial entre o biomaterial e o meio fisiológico.

A Albumina Bovina Sérica (BSA) tem grande afinidade pela hidroxiapatita, o que pode ser explicado pela presença de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (cátions e ânions) que se unem aos sítios de cálcio e fosfato na superfície da HA (MAVROPOULOS *et al.*, 2011). Neste estudo, focou-se a avaliação da capacidade de adsorção da BSA sobre partículas coloidais da HA sintetizada com e sem a presença de PVP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Partículas de hidroxiapatita na forma de colóides foram sintetizadas com diferentes tempos de envelhecimento dos precipitados pelo método de co-precipitação no Laboratório de Cerâmica do Instituto Militar de Engenharia - IME. A solução utilizada para obtenção das nanopartículas teve a seguinte composição: 0,5 M de hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, 0,3 M de ácido fosfórico $[\text{H}_3\text{PO}_4]$ e 1 M de ácido láctico $[\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3]$. A suspensão obtida, denominada transparente, apresentou pH 3,7 (a temperatura ambiente). Para atingir o pH 12, necessário para a precipitação da HA, adicionou-se KOH à solução transparente. Nesta condição houve o envelhecimento dos precipitados em diferentes tempos para as três sínteses preparadas (24 horas (padrão), 40 horas e 88 horas). Após a formação dos precipitados, foi realizada filtração através de uma bomba à vácuo (Edwards, Neuberger) e a solução foi re-suspendida em água Milli-Q® (Millipore Corporate). O sólido obtido foi seco em um liofilizador (Freezone 1 – Labconco) por 24 horas. Parte do sólido sofreu tratamento térmico por 8 horas a 1.100°C. Uma nova síntese com tempo padrão de 24 horas de envelhecimento dos precipitados foi obtida, sendo adicionado o polímero polivinilpirrolidona (PVP) a 3% com o intuito de dispersar os aglomerados. Com o objetivo de estimar a quantidade de albumina bovina (BSA) adsorvida sobre as amostras de HA na forma verde e também após o tratamento térmico (CTT) a 1100°C, foi realizada imersão das amostras de HA em solução de BSA (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 1 mg/ml. Os experimentos foram realizados em triplicata. Adicionaram-se 0,200 g de cada amostra de HA aos 15 ml de solução de

BSA e, como controle, utilizou-se água Milli-Q®. Os tubos foram deixados sob agitação constante por 24 horas. Após esse tempo, houve a centrifugação (CT-6000R Cientec) durante 3 minutos com o objetivo de separar a HA da BSA.

Foi retirada uma alíquota de 10 ml do sobrenadante e reservado. O teor sorvido foi quantificado por diferença através de espectrofotometria de UV-VIS (UV-2450 Shimadzu). Após a sorção, o pó foi lavado com água Milli-Q® e submetido à agitação por mais 1 hora. Após esse período, o material foi centrifugado novamente, o sobrenadante foi descartado e o material particulado foi seco para posterior caracterização em um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Com o objetivo de analisar a fração de BSA fracamente adsorvida na HA, foi realizado o ensaio de dessorção, que seguiu as mesmas condições do experimento de sorção, porém as amostras sintetizadas de HA sorvidas com BSA ficaram sob agitação em tubos com água Milli-Q®. Após 24 horas de agitação, o material foi centrifugado, uma alíquota de 10 ml do sobrenadante foi retirada e reservada para posterior quantificação.

A morfologia das partículas de HA verde e após tratamento térmico (CTT) foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG - e-Line – Raith). A caracterização estrutural foi realizada através da difração de raios X (DRX - X'Pert Pro Panalytical) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR - FT-IR Prestige – 21/ Shimadzu). As análises quantitativas das amostras CTT de HA foram realizadas através do refinamento pelo método de Rietveld com o programa TOPAS, versão acadêmica, que utiliza nos cálculos a metodologia de parâmetros fundamentais (PF). Os experimentos de adsorção da BSA foram realizados através da espectroscopia de UV-Visível (UV-VIS - UV-2450 – Shimadzu).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A análise em difração de raios X das amostras verdes apresentou picos largos, com padrão característico de uma hidroxiapatita com baixo grau de cristalinidade, de acordo com a ficha n° 09-0432 do JCPDS (Figura. 1).

Os padrões de difração de raios X nas amostras tratadas termicamente, sem a presença do PVP, indicaram a fase hidroxiapatita com elevada cristalinidade nas amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT e HA 24 CTT, de acordo com a ficha JCPDS n° 09-0432 da HA (Figura. 2)

Observaram-se, na amostra HA PVP 24 CTT, a presença de picos da hidroxiapatita e traços da decomposição da HA em beta fosfato tricálcico (β -TCP), alfa fosfato tricálcico alfa (α -TCP) e beta fosfato tricálcio - Whitlockite (β -TCPW), de acordo com as fichas 09-0432 (HA), 09-0691 (β -TCP), 09-0348 (α -TCP) e 700681 (β -TCPW), segundo JCPDS (Figura 3).

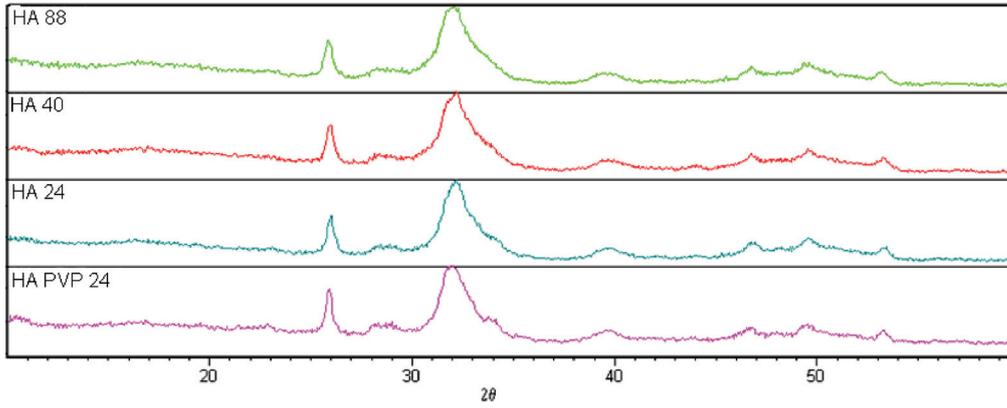


Figura 1 – Comparação dos difratogramas das amostras verdes de HA das sínteses preparadas no estudo.

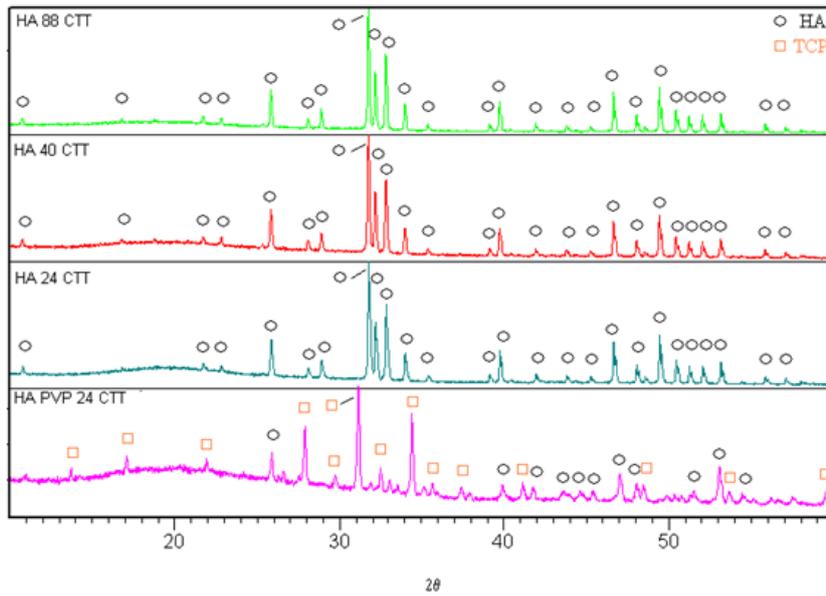


Figura 2– Comparação dos difratogramas das amostras CTT de HA das sínteses preparadas no estudo..

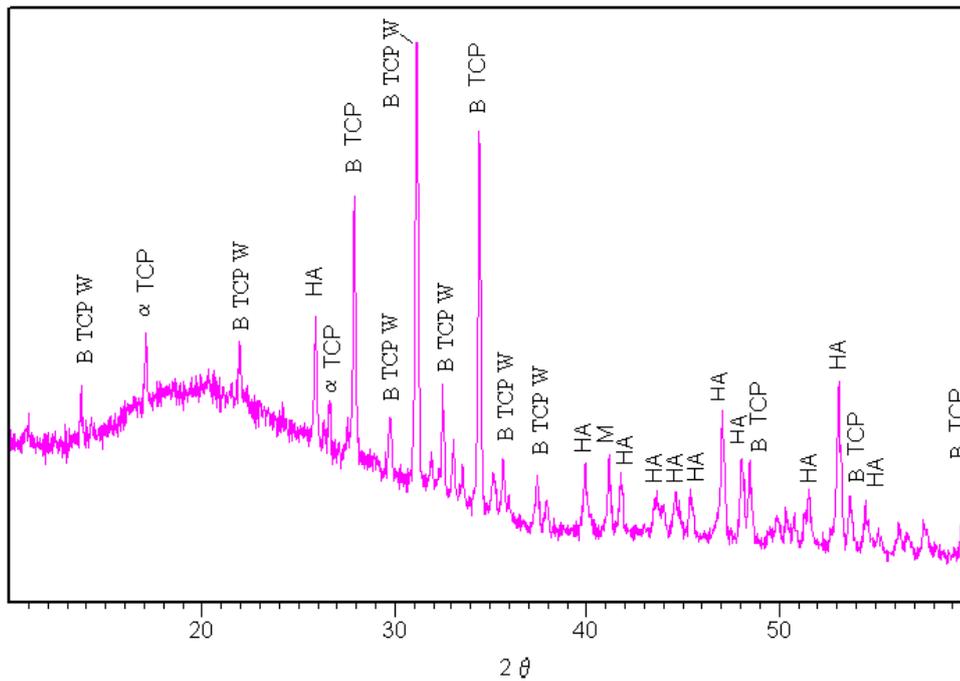


Figura 3 – Difratograma da amostra HA PVP CTT.

Para a análise quantitativa, foi realizado o refinamento pelo método de Rietveld dos dados de difração de raios X, onde foi revelada a percentagem das fases presentes e o tamanho médio dos cristalitos (Tabela1). As fichas ICSD (International Crystal Structure Database) utilizadas foram a 26204 (HA), 200202 (β -TCP), 92300 (α -TCP), 67432 (β -TCPW).

O resultado de quantificação de fases revelou que as amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT e HA 24 CTT são constituídas por 100% de HA (concentração em peso). A análise quantitativa da amostra HA PVP 24 CTT mostrou a presença majoritária de β -TCPW, seguida das fases β -TCP, HA e α -TCP. A fase β -TCPW tem maior empacotamento e velocidade de degradação menor do que as fases β -TCP e α -TCP, respectivamente, e maior do que a fase HA. Este resultado mostrou-se relevante, já que uma fase intermediária de velocidade de degradação é desejada nos materiais cerâmicos utilizados para enxertia óssea.

De acordo com o resultado do tamanho médio dos cristalitos, aumentando o tempo, aumentou-se o tamanho médio dos cristalitos. Este comportamento é esperado, já que o envelhecimento é um processo termicamente ativado e então dependente de temperatura e tempo.

TABELA.1 Resultados do refinamento pelo método de Rietveld das amostras CTT.

Amostra	Quantificação de fases	Tamanho médio dos cristalitos
HA 88 CTT	HA (100%)	291,46 nm
HA 40 CTT	HA (100%)	195,53 nm
HA 24 CTT	HA (100%)	192 nm
HA PVP 24 CTT	β -TCPW (70,36%)	129,25 nm
	β -TCP (12,67%)	113,93 nm
	HA (9,96%)	39,36 nm
	α -TCP (7,01%)	45,27 nm

A presença das fases β -TCP, α -TCP e β -TCPW na amostra HA PVP 24 CTT pode ser atribuída à alteração de pH observada após adição de PVP. A solução, antes com pH em torno de 3,5, alcançou pH em torno de 5. Nessa faixa de pH, a brushita é a fase mais estável, à temperatura ambiente. Este resultado foi confirmado pela análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) que indicou a presença de uma banda em 2308 cm^{-1} na amostra HA PVP 24 CTT. Sendo o valor de referência da monetita (DCPA) de 2300 cm^{-1} e da brushita (DCPD) de 2365 cm^{-1} , é mais provável que a banda observada seja característica da brushita, já que a monetita ocorre em temperaturas da ordem de 80°C .

Nas figuras 4, 5, 6 e 7 são apresentados os espectros das amostras HA 88 CTT, HA 40 CTT, HA 24 CTT e HA PVP 24 CTT, respectivamente. Na figura 8 é apresentado o espectro da amostra verde HA PVP 24 para verificar os modos vibracionais característicos do PVP.

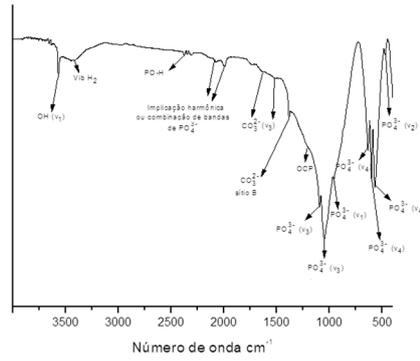


Figura 4 – Espectro da amostra HA 88 CTT, obtido por FTIR

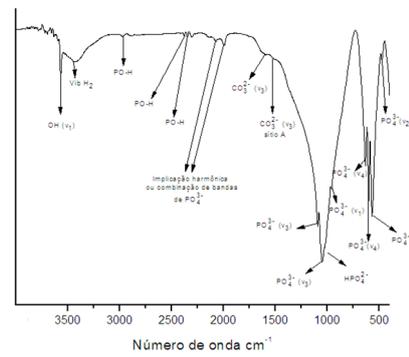


Figura 5 – Espectro da amostra HA 40 CTT, obtido por FTIR.

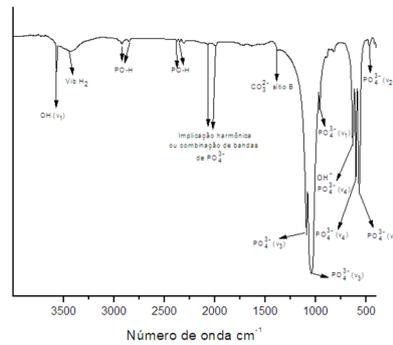


Figura 6 – Espectro da amostra HA 24 CTT, obtido por FTIR.

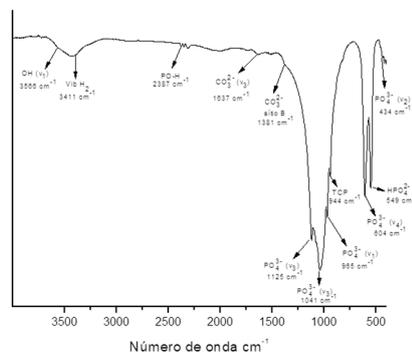


Figura 7 – Espectro da amostra HA PVP 24 CTT, obtido por FTIR.

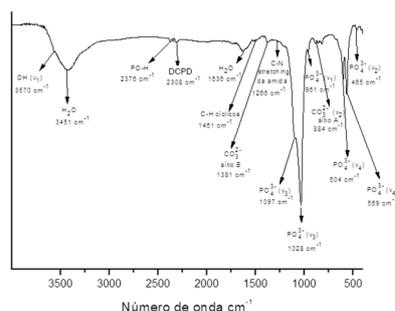


Figura 8 – Espectro da amostra HA PVP 24, obtido por FTIR.

Os espectros FTIR de todas as amostras de HA tratadas termicamente mostraram a presença de bandas que correspondem aos grupamentos funcionais fosfato (PO_4^{3-}), hidroxila (OH^-), carbonato (CO_3^{2-}), ligação PO-H e vibração dos átomos de hidrogênio pertencentes ao grupo hidrogenofosfato (Vib H).

As bandas presentes em $2073/2000 \text{ cm}^{-1}$ na HA 88 CTT, $2075/1991 \text{ cm}^{-1}$ na HA 40 CTT e $2076/2003 \text{ cm}^{-1}$ na HA 24 CTT podem ser atribuídas a uma implicação harmônica ou combinação de bandas de fosfato (PO_4^{3-}). A banda 1183 cm^{-1} presente na HA 88 CTT é referente ao fosfato octacálcio (OCP), precursor da HA. As bandas 1020 e 549 cm^{-1} presentes na HA 40 CTT e na HA PVP 24 CTT, respectivamente, são referentes ao hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) presente na hidroxiapatita deficiente em cálcio, de acordo com os estudos de RIGO *et al.*, 2007.

A amostra de HA PVP 24 CTT apresentou ainda a banda 944 cm^{-1} , referente à fase do fosfato tricálcico (TCP), verificada no resultado de difração de raios X e nos estudos de FRANCO *et al.*, 2010, FONSECA, 2007.

O espectro de FTIR da amostra verde HA PVP 24 mostrou a presença de bandas que correspondem aos grupamentos funcionais fosfato (PO_4^{3-}), hidroxila (OH^-), ligação PO-H, água (H_2O) e carbonato do tipo B (CO_3^{2-} B). Foi encontrada ainda a banda referente ao carbonato do tipo A (CO_3^{2-} A) em 884 cm^{-1} e a banda referente possivelmente à brushita (DCPD) em 2308 cm^{-1} . Foram também encontradas as bandas características do PVP, como 1461 e 1261 cm^{-1} correspondentes aos grupos funcionais CH deformação de CH_2 dos grupos cíclicos e C-N *stretching* da amida, em consonância com os resultados encontrados por FRANCO *et al.*, 2010, QIU *et al.*, 2008.

A análise morfológica (MEV) revelou partículas submicrométricas e nanométricas, formando diversos aglomerados (Figurass. 9 e 10). Nas amostras obtidas após a sinterização a 1100°C , observou-se a coalescência dos cristalitos da HA.

A FIG. 9 D apresenta morfologia típica (tamanho nanométrico) das partículas de HA com a adição do PVP, sugerindo que o polímero dificultou o crescimento do tamanho dos aglomerados (ou *clusters* de partículas), estando de acordo com os relatos de QIU *et al.*, 2008.

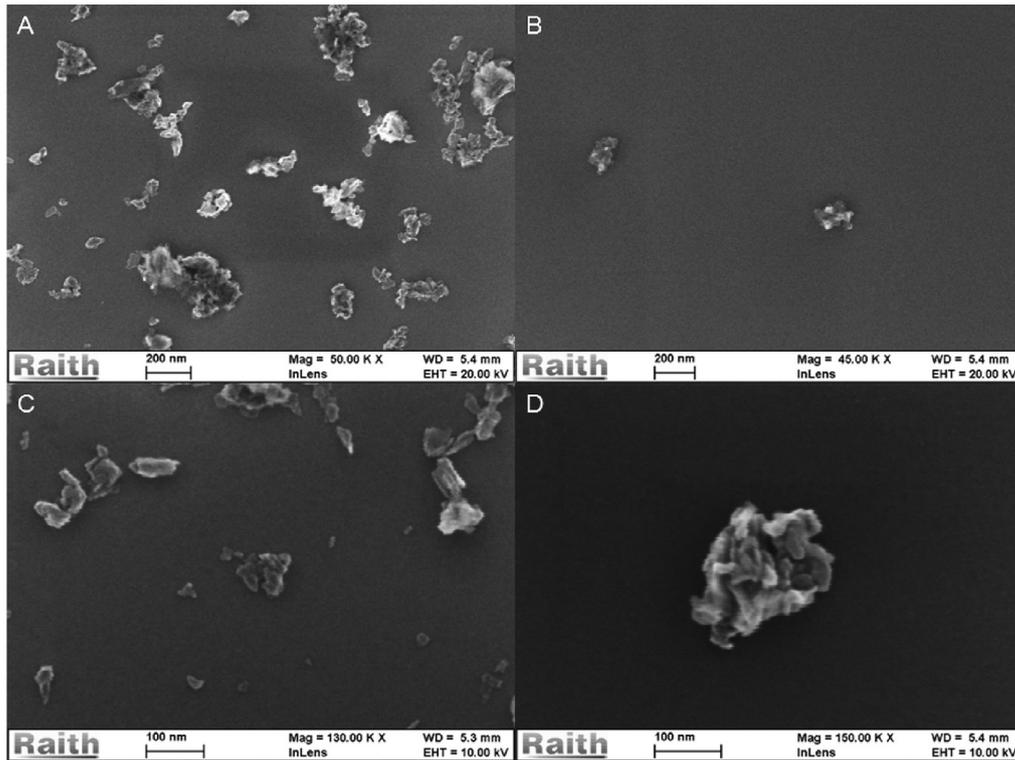


Figura 9 – Micrografias (MEV-FEG) das amostras: HA 88 (A), HA 40 (B), HA 24 (C) e HA PVP 24 (D).

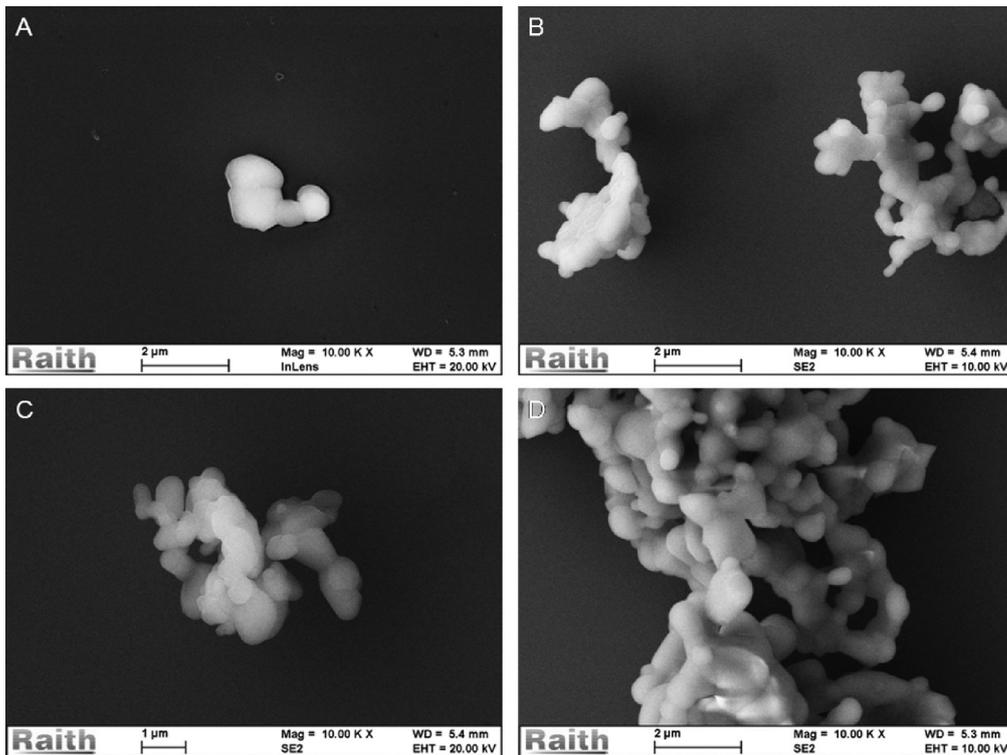


Figura 10 – Micrografias (MEV-FEG) das amostras: HA 88 CTT (A), HA 40 CTT (B), HA 24 CTT (C) e HA PVP 24 CTT (D).

Os resultados da sorção e dessorção de BSA, quantificados por espectrofotometria de UV-Visível, demonstraram que a sorção da BSA nas amostras tratadas termicamente apresentou valores significativamente menores, quando comparados com as amostras verdes, estando em consonância com os resultados de VILLARREAL *et al.*, 1998 e MAVROPOULOS *et al.*, 2008.

Os resultados de sorção da BSA das amostras verdes demonstraram que a HA PVP 24 sorveu 100% da BSA, seguida da HA 24 (50,05%). Já as amostras HA 88 e HA 40 sorveram valores menores de BSA, 27,54% e 13,84%, respectivamente. Após a quantificação da dessorção da BSA, foi observado que os valores correspondentes a absorvância eram negativos, ou muito próximos de zero, demonstrando que a BSA sorvida não dessorveu sob ação da água Milli-Q®, estando de acordo com MAVROPOULOS *et al.*, 2011.

CONCLUSÕES

A amostra sintetizada com adição de PVP (HA PVP 24 CTT) apresentou a presença de outros compostos da família das apatitas após a sinterização. Esse resultado pode ser atribuído à decomposição da brushita e/ou à formação da hidroxiapatita deficiente de cálcio. A mudança de pH ocorrida na solução precursora favoreceu a presença de brushita, confirmada pelos resultados das análises de FTIR.

Foi possível sintetizar partículas de dimensões médias submicrométricas, formando aglomerados diversos ou não em função do uso do surfactante (PVP). Um menor tempo de envelhecimento dos precipitados (24 horas) propiciou a formação de uma distribuição de tamanhos menores de partículas de HA. Foi verificada uma associação entre os cristais de HA e o PVP, criando um ambiente com capacidade de alterar as propriedades superficiais (confinando os cristalitos), o que possivelmente dificultou o crescimento das partículas.

Os resultados da sorção da BSA nas amostras de HA tratadas termicamente foram menores do que os valores encontrados nas amostras verdes. A BSA sorvida não dessorveu sob ação da água Milli-Q®. A maior capacidade de ligação da BSA à amostra HA PVP 24 sugere que a estrutura morfológica da macromolécula pode influenciar na interação do biomaterial com a proteína no meio fisiológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borojevic, R. *Medicina Regenerativa: terapias celulares, bioengenharia e biométrica. Seminários temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C,T&I. Parcerias Estratégicas*, **2005**, 20, 1639-1647.
- Du, X.; Chy, Y.; Xing, S.; Dong, L. *Hydrothermal synthesis of calcium hydroxyapatite nanorods in the presence of PVP. J Mater Sci*, **2009**, 44, 6273-6279.
- Ferraz, M. P.; Monteiro, F. J.; Manuel, C. M. *Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. J. Applied Biomaterials & Biomechanics.*, **2004**, 2, 74-80.
- Fonseca, F. M. *Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting; Dissertação de Mestrado em Ciência dos Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Brasil, 2007.*
- Franco, P. Q.; Silva, J. C.; Borges, J. P. *Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação. Ciência & Tecnologia dos Materiais*, **2010**, 22, 57-64.
- Hench, L. L., Wilson, J. *An Introduction to Bioceramics. World Scientific*, **1993**, 1, 139-80.
- LeGeros, R. Z. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science*, 15, Basel: Karger, 1991.
- Mavropoulos, E.; Rocha, N. C.; Rocha-Leão, M. H.; Santos, S. R.; Rossi, A. M. *BSA adsorption on hydroxyapatite after thermal treatment. Key Engineering Materials*, **2008**, 361-363, 127-130.
- Mavropoulos, E.; Costa, A. M.; Costa, L. T.; Achete, C. A.; Mello, A.; Granjeiro, J. M.; Rossi, A. M. *Adsorption and bioactivity studies of albumin onto hydroxyapatite surface. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, 83, 1-9.
- Mendes, L. L.; Rodrigues, R. C.; Silva, E. P. *Thermal, structural and morphological assessment of PVP/HA composites. J Therm Anal Calorim (2010)*, doi 10.1007/s10973-010-0835-4.
- Qiu, C. F.; Xiao, X. F.; Liu, R. F.; She, H. D. *Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite with polyvinylpyrrolidone as template. Materials Science and Technology*, **2008**, 24, 612-617.
- Rigo, E. C. S.; Gehrke, S. A.; Carbonari, M. *Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. Rev Dental Press Periodontia Implantol*, **2007**, 1, 39-50.
- Villarreal, D. R.; Sogal, A.; Ong, J. L. *Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces. Journal of Oral Implantology*, **1998**, 24, 67-73.