

Deposição da Hidroxiapatita sintetizada a partir da casca de ovos sobre a superfície de ligas de titânio

Karina Feliciano Santos¹; Juliana K. M. B. Daguano¹; Davinson Mariano da Silva²

¹Universidade Federal do ABC, ²Faculdade de Tecnologia de São Paulo

e-mail: karinafs30@hotmail.com

Resumo: Neste trabalho investigamos a obtenção da hidroxiapatita (Hap) através das cascas de ovos de galinha (COG). Após o processo reação entre a suspensão preparada a partir da COG misturado com o ácido fosfórico e com parâmetros bem controlados. O produto resultante foi analisado por difração de raios X, espectroscopia Infravermelho por Transformada e Fourier e Raman. Os resultados indicaram a presença de Hap, após o tratamento térmico o material obteve maior cristalinidade. Nos espectros indicaram que Hap obtida, apresenta características hidroxiapatitas carbonatadas. Posteriormente a caracterização, Hap foi preparada numa mistura do material com álcool etílico, para deposição eletroforética. Os filmes obtidos, foram caracterizados por microscopia eletrônica por varredura (MEV) que indicaram, que os revestimentos obtidos não apresentavam uniformidade sobre o substrato. Portanto, sendo necessário rever as condições de deposição para que obtenha filmes de Hap/liga de titânio com melhor distribuição do material e aderência sobre o substrato.

Palavras chaves: Biomaterial, Casca de ovos, Eletroforese, Hidroxiapatita, Liga de Titânio.

1. INTRODUÇÃO

As biocerâmicas à base de fosfato de cálcio tem merecido lugar de destaque entre os biomateriais. Dentre eles o material mais estudado é a hidroxiapatita (Hap). Pertencente ao grupo das apatitas, a Hap de fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ se destaca por ser um material altamente bioativo, biocompatível e osteocondutor, além de ser considerado um dos principais constituintes dos ossos e dentes (Javidi et al. 2008; Wu, 2015).

A aplicação da Hap tem ocorrido nas mais diversas áreas, com destaque para as áreas médica e odontológica (SZCZEŚ et al., 2017). Já foram reportadas aplicações para a Hap em oftalmologia, otorrinolaringologia, como catalizador, adsorção de fármacos, tratamento ósseo, substituição parcial ou completa do tecido ósseo, reconstrução de tecidos ósseo e dentário parcial ou completa, entre outros (Fihri et al, 2017).

Existe um interesse particular, principalmente na área ortopédica, pois a Hap pode ser utilizada como revestimento de ligas metálicas como as de titânio e alguns aços (Trommer, 2006). Por exemplo a aplicação de Hap em implantes porosos de baixa carga estimula o crescimento dos tecidos ósseos circundante sobre o implante, estabelecendo contato entre a Hap sintética bioativa com a Hap biológica da matriz óssea circundante (Javidi et al. 2008).

Outro benefício da Hap como revestimento de implantes metálicos é a combinação de propriedades, já que o material final pode se beneficiar com a resistência e a tenacidade do substrato metálico. Uma outra vantagem é que a presença do revestimento pode inibir a corrosão do implante metálico quando em contato com fluidos corpóreos e pode contribuir para aumentar a fixação de próteses devido a formação dessas interações químicas entre os tecidos adjacentes (Javid et al. 2008).

Conforme o tipo de aplicação da Hap, existem diversas formas de obtenção do material. Mas basicamente a síntese do biomaterial pode ocorrer de duas formas: em baixas temperaturas com a formação de Hap de baixa cristalinidade e em temperaturas elevadas, que possibilita a obtenção de um material de maior cristalinidade com características mais semelhantes ao tecido ósseo (Melo, et al. 2009; Leite, et al 2017).

A síntese da Hap pode ser realizada de diversas formas, como, por sol-gel, síntese hidrotermal, por combustão, precipitação química, entre outros (Kalamalathan et al.,2014; SZCZESŹ et, al.,2017). O método empregado e as condições de síntese permitem o controle da porosidade, morfologia e da estequiometria da Hap (Kalamalathan et al.,2014). Neste trabalho, a síntese de Hap ocorreu pela técnica de precipitação química que envolve reações de via úmida entre os reagentes de cálcio e fósforo devido ao seu baixo custo e fácil manipulação.

A Hap derivada de fontes naturais como conchas, ossos de animais, cascas de ovos também apresentam elementos característicos semelhantes aos tecidos ósseos, devido a incorporação de íons na sua estrutura, tais como Fe^{+2} , Mg^{+2} , Sr^{+2} , F^- , entre outros. Por isso, o uso destes materiais no desenvolvimento da Hap é de suma importância (Kalamalathan et al.,2014).

Levando em consideração a busca por novas fontes precursoras, as cascas de ovos de galinhas (COG) apresentam-se como uma boa alternativa de síntese da Hap, já demonstrado em estudos anteriores (Kalamalathan et al.,2014; Wu, et al., 2015; Rivera et al., 1999). As cascas ricas em carbonato de cálcio ($CaCO_3$), são convertidas em óxido de cálcio (CaO). Posteriormente é preparada uma suspensão para obter os íons de cálcio (Ca^{+2}) utilizada na síntese dos biomaterial (Luna, 2018). Além disso, há presença também de traços dos íons de Na^+ , Sr^{+2} e Mg^{+2} , que tornam ainda mais a COG atrativa como fonte precursora.

Desta forma, neste presente estudo o objetivo é investigar o uso da COG como fonte precursora na síntese da Hap, empregando o método por via úmida, a fim de obter um produto de alta pureza com características semelhantes a Hap biológica, além de apresentar uma forma viável, de baixo custo e fácil obtenção. Em seguida realizar a deposição do material, em um substrato de titânio por meio da técnica por deposição eletroforética como forma de aplicação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Tratamento inicial das cascas de ovos de galinha (COG)

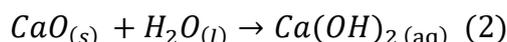
Para obtenção das amostras de Hap, as COG foram moídas e beneficiadas termicamente. Nesta etapa, no processo de calcinação da COG, ocorre a decomposição do $CaCO_3$ resultando em CaO e dióxido de carbono (CO_2). A temperatura utilizada foi de

1000°C durante período de 3 horas. A decomposição do carbonato de cálcio é representada pela Eq. (1).



Obtenção de Hidroxiapatita (Hap) por método de precipitação por via úmida

A síntese de Hap, foi produzida a partir da suspensão de hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$, partir de 5,6 g do CaO proveniente das COG. A suspensão do CaO foi adicionada lentamente em béquer com 150 ml de água deionizada até a obtenção de uma mistura homogênea. A preparação da suspensão pode ser vista na Eq. (2)



No método de precipitação por via úmida, a obtenção da Hap pode ser vista na Eq. (3):



Para obter a razão molar da Hap de Ca/P 1,67, os reagentes utilizados foram o ácido fosfórico comercial na concentração de 2,0 mol/L e o a suspensão do hidróxido de cálcio obtida partir da CaO.

Para a preparação da solução de H_3PO_4 (2M) foram utilizados uma pipeta volumétrica para obter 1,8ml de ácido que foi diluído em água deionizada para obter 30mL de solução. A solução ácida foi colocada em uma bureta que foi posicionada acima do balão volumétrico com suspensão de $Ca(OH)_2$ com auxílio de garras em suporte universal com haste metálica. Para melhor controle de vazão do ácido, a válvula da bureta foi ajustada 1mL/min. A suspensão foi adicionada em um balão volumétrico, conforme processo reacional o material foi submetido à agitação e a temperatura do sistema foi mantida em torno de 40°C com apoio de um agitador magnético com aquecimento e banho de glicerina por 24 horas. Em todo o processo, a suspensão teve seu pH controlado durante a reação. Caso o pH da suspensão ficasse abaixo de 10, era realizada a adição de uma pequena quantidade de solução aquosa de hidróxido de amônio (NH_4OH) na concentração 1:1 v/v utilizada para correção do pH quando necessário.

Após o período reacional de envelhecimento, foi obtido um precipitado de coloração de branca que foi filtrado e submetido a secagem em uma estufa a 100°C por 24 horas. Ao término da secagem o material foi desaglomerado e em seguida submetido a calcinação em 1000°C por 3 horas numa taxa de 10°C/min.

A Hap obtida foi caracterizada inicialmente por difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Raman, com intuito de identificar fases presentes, identificação química dos principais grupos do material.

Deposição eletroforética

Para realizar a deposição de Hap sobre as ligas de titânio, inicialmente foi preparada uma suspensão coloidal com 0,5 g de Hap em 0,80 mL de álcool etílico

(C₂H₆O) misturado e agitado em temperatura ambiente. Na suspensão foi adicionado 3 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) a 0,1 mol/L. Em seguida a solução resultante foi misturada e deixada em repouso durante 1 hora para sedimentação de partícula aglomeradas.

As ligas de titânio (Ti-4Al-7V) em forma retangular de área de aproximadamente (1 cm²), tiveram suas superfícies previamente lixadas com lixas d'água de granulometria 180, 200, 300, 400, 600 e 800. Logo em seguida, as placas foram limpas com água deionizada, álcool metílico e acetona para remoção de possíveis gorduras na superfície.

Para a deposição eletroforética, as placas de titânio foram utilizadas como eletrodo de trabalho, sendo aplicado potencial negativo. Foi utilizado um contra-eletrodo de platina. A distância entre os eletrodos foi de aproximadamente de 40 mm, e a tensão aplicada foi de 12V por 3 minutos.

Finalmente, as placas revestidas com a Hap foram submetidas a tratamento térmico em 800°C por período de 3 horas para melhorar a aderência dos filmes sobre a liga de titânio. As placas foram caracterizadas na microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observar a homogeneidade dos filmes sobre o substrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Difração de raios X

A figura 1 mostra o difratograma das amostras sintetizadas de Hap obtidas pela COG com e sem tratamento térmico. Os resultados mostraram que no processo de síntese houve a formação da Hap de baixa cristalinidade antes do tratamento térmico. Após a calcinação, houve estreitamento dos picos e uma melhor definição dos picos como apresentado no difratograma. Isso indica que o tratamento térmico favoreceu o crescimento dos grãos, obtendo um material de características cristalinas.

Ainda, na figura 1, é possível ver um pico do composto CaO derivada da COG. Segundo Wu et al, conforme ocorre o aumento de temperatura os precursores residuais vão sendo gradualmente reduzidos na reação, até o seu total desaparecimento em torno de 1200°C. Entretanto, na presença excessiva de cálcio e alta razão mássica (Ca/P), o tratamento térmico promove a desidroxilação dos compostos Ca(OH)₂ favorecendo a decomposição e a formação de CaO (Azevedo et al.,2014).

Os picos de Ca(OH)₂ não são observados facilmente devido a sua baixa concentração na amostra (Azevedo et al.,2014). Salienta-se que o tempo de duração do tratamento térmico na formação da Hap cristalina é de suma importante na formação dos fosfatos de cálcio (Wu, et al, 2015).

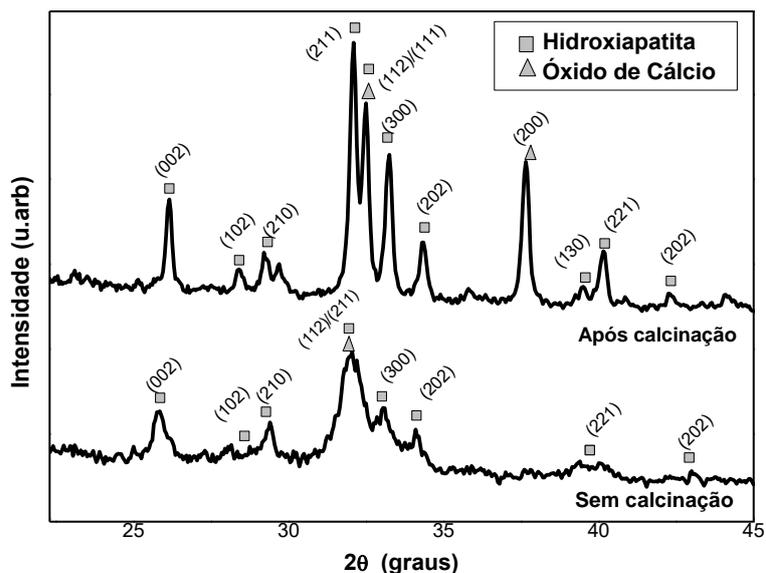


Figura 1-Difratograma das amostras obtidas de hidroxiapatita antes e após calcinação na temperatura de 1000°C.

3.2. Espectroscopia no Infravermelho e Raman

Após os resultados de DRX indicarem a formação de Hap a partir da COG, foram realizadas análises de Espectroscopia por Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman para identificação dos grupos funcionais presentes na Hap. Os principais modos vibracionais observados na Hap estão mostrados na tabela 1, como referência para identificação dos picos.

Tabela 1 - Tabela de referência adaptada para identificação dos grupos principais da Hap por FTIR e Raman

Número de onda/ Deslocamento Raman – FTIR (cm ⁻¹)	Identificação
3570	ν_5 Estiramento OH de hidroxila
3400 – 3100	ν_5 Estiramento OH de H ₂ O
1645	Deformação H-O-H de H ₂ O
1470- 1420	ν_1 Estiramento simétrico CO ₃ (CHAp- tipo B)
1104	ν_1 Estiramento simétrico CO ₃ (CHAp - tipo A)
1128,875, 880	ν_6 Estiramento PO ₃ em HPO ₄
1100, 1093, 1047	ν_3 Estiramento assimétrico de PO ₄ ou ν_6 estiramento PO ₃ em HPO ₄
965	ν_1 Estiramento simétrico PO ₄
918	ν_2 Estiramento antissimétrico de CO ₃
884	ν_2 Estiramentos de CO ₃ (CHAp- tipo B)
650	Vibrações da hidroxila
616, 581	ν_4 Deformação O-P-O em PO ₄ ou ν_4 deformação P-O em HPO ₄

535	ν_7 Estiramento P-OH em HPO_4
431, 446, 460	ν_2 Estiramento simétrico do PO_4

Fonte adaptada (Ramakrishnaiah, et al.2015; Lima, 2015; Lafon et al, 2008; Barinov et al., 2006)

As bandas de absorção relacionadas ao ν_2 e ν_3 estão situadas entre 1000 e 1200 cm^{-1} , e podem ser atribuídas ao estiramento assimétrico do PO_4^{3-} . Já o modo vibracional ν_1 está localizado próximo às regiões 950-960 cm^{-1} . As bandas de absorção situadas nas regiões entre 560-570 cm^{-1} correspondem a bandas ν_4 .

A figura 2 mostra o espectro de FTIR obtido das amostras antes do tratamento térmico. É possível observar as bandas de absorção dos grupos HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} no espectro apresentado. As bandas de absorção localizadas entre 1400 e 1600 cm^{-1} correspondem a presença dos íons carbonatos (CO_3^{2-}). Na região de aproximadamente 3400 cm^{-1} que está possivelmente associada a água absorvida e ao estiramento de OH^- da água.

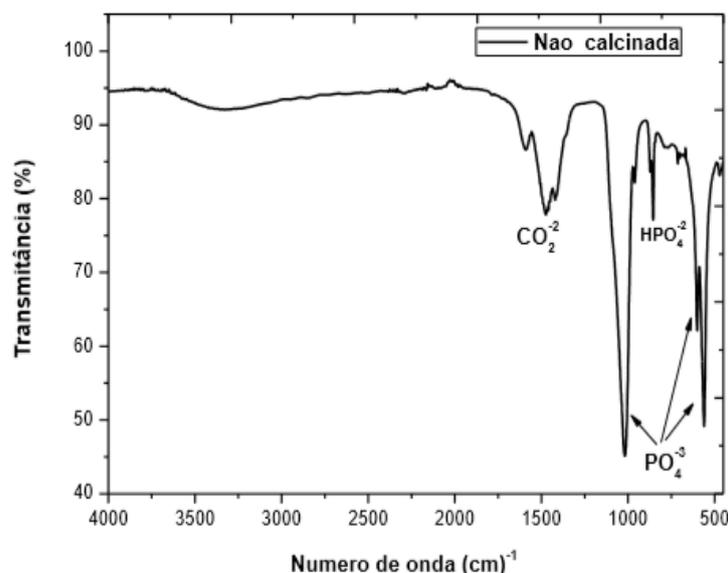


Figura 2- Espectro FTIR das amostras não calcinadas de Hap.

O espectro de FTIR da amostra de Hap após o processo de calcinação é exibido na figura 3. Foram identificados os grupos HPO_4^{2-} , e PO_4^{3-} . De forma análoga ao espectro anterior, foram observadas bandas de absorção correspondente aos íons carbonatos CO_3^{2-} e água absorvida e o grupo OH^- em menor intensidade quando confrontada com espectro anterior. Esse tipo decréscimo, geralmente está associado a substituições iônicas na estrutura, tais como substituição dos íons de hidroxila por íons carbonatos, influenciando na intensidade dos picos.

As regiões de absorção próximas a 875, 1424, 1445 e 1461 cm^{-1} podem ser atribuídas a substituições de hidroxiapatita carbonatada do Tipo- B (CHAp-Tipo B). Isso indica que a substituição de grupos CO_3^{2-} por OH^- , sendo possível identificar esses picos nas figuras 2 e 3.

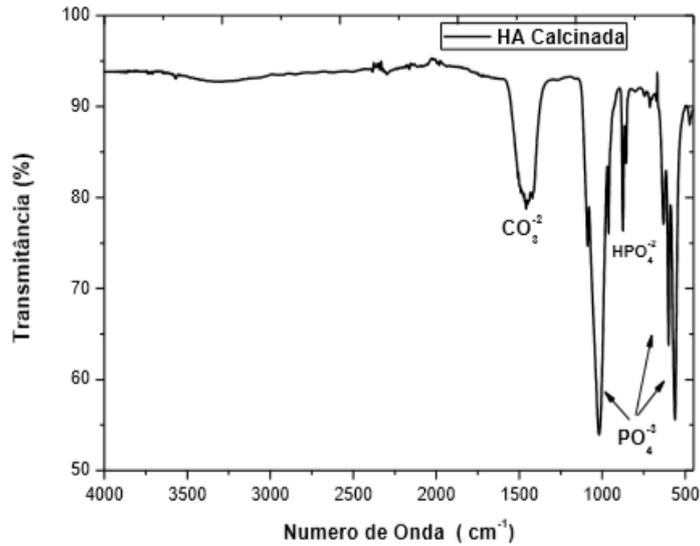


Figura 3- Espectro FTIR das amostras calcinadas.

Na figura 4 são mostrados os espectros Raman das amostras de Hap antes e após o processo de calcinação. As amostras após a calcinação tiveram o pico em aproximadamente 1070 cm⁻¹ intensificados. Este pico refere-se à presença de íons CO₃²⁻.

A presença deste pico nesta região indica a presença da apatita do tipo B, o que mostra possivelmente a ocorrência de substituição de grupos fosfatos pelo íons carbonatos. A CHAp-tipo B são espécies predominante em apatitas de origem biológica, que se formam através das substituições energeticamente preferidas dos íons PO₄³⁻ do que pelos íons OH¹⁻ como as CHAp-tipo A (Bazin et al, 2009; Barinov et al., 2006)

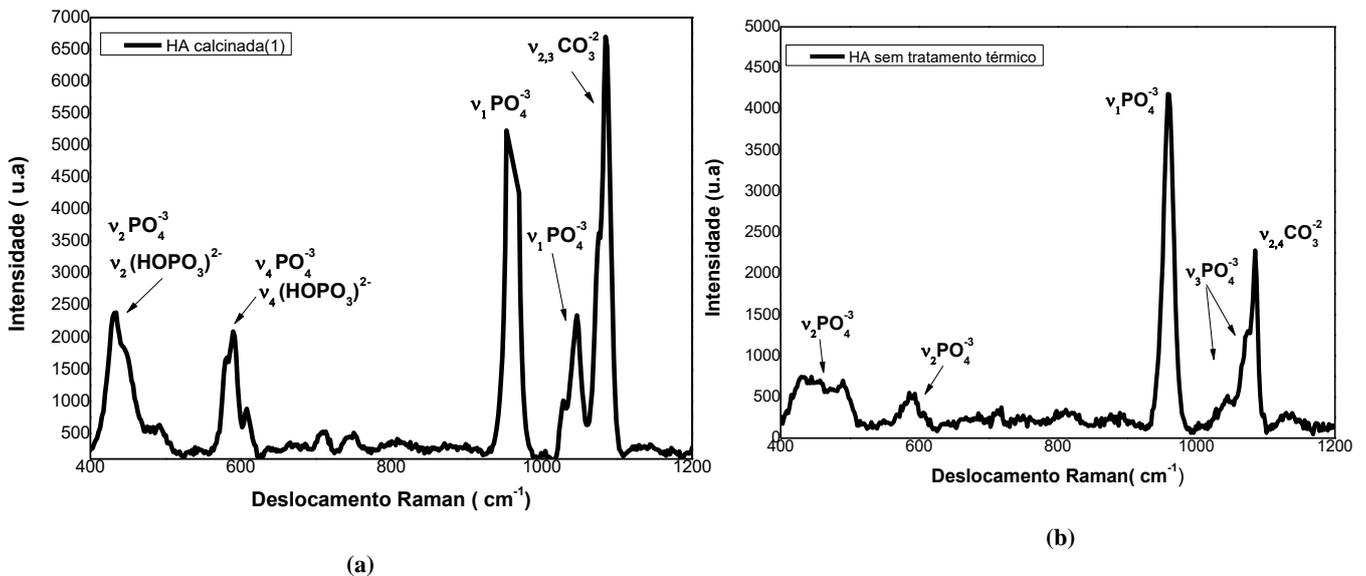


Figura 4- Espectros obtidos por FTIR das amostras de Hap antes e após calcinação. A amostra (a) é a calcinada e a amostra (b) sem calcinação.

3.3. Amostras produzidas por eletroforese

Após o processo de caracterização da Hap, foram realizados testes de obtenção de filmes de Hap por eletroforese, obtidas nas condições de uma tensão de 12V em 3 minutos.

Na figura 5, foi possível observar a formação de um filme de Hap sobre a liga de titânio, apresentando uma boa aderência após o tratamento térmico. Entretanto, observa-se que apesar da boa aderência, o filme formado não apresentou aspecto homogêneo sobre a superfície da liga. Isso pode ser consequência da grande área de superfície do substrato, que acarretou em menor densidade de corrente durante o processo, limitando a deposição.

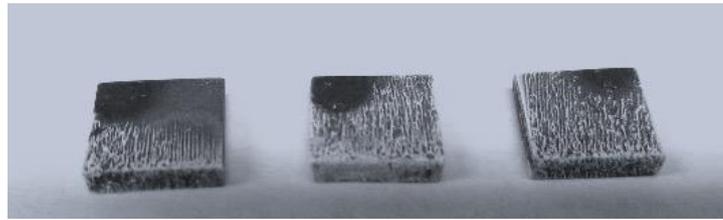


Figura 5- Ligas de Ti revestidas com HA por eletroforese. A tensão aplicada em todas as amostras foi de 12 V e foram submetidas a tratamento térmico em 800°C durante 3h por 3 minutos

Na micrografia 6 mostra a formação de uma película sobre todo substrato de Hap. Entretanto, a presença possivelmente de aglomerados na suspensão pode contribuir para que a camada formada não seja homogênea. Todas as amostras testadas apresentaram fissuras em sua cobertura cerâmica. Um possível problema da deposição da Hap sobre o substrato de titânio, pode ser presumida devido ao stress térmico, pela diferença entres os coeficientes de expansão térmico entre os dois materiais, assim influenciando diretamente no filme depositado (Ribeiro,2007).

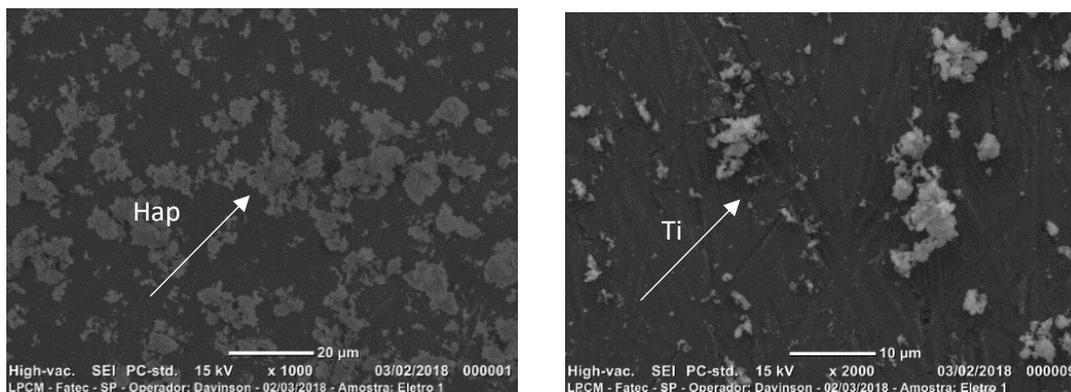


Figura 6- Micrografias da amostra produzida a partir da deposição por eletroforese. As setas indicam o filme de Hap e substrato da liga de titânio (Ti)

4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível verificar a viabilidade de obtenção da Hap, através do método de precipitação química. As cascas de ovos de galinha para síntese do biomaterial representa uma fonte precursora renovável. Além disso, as COGs fornecem os íons de cálcio necessários para a obtenção de uma Hap semelhante a Hap biológica.

As análises de DRX, demonstraram que o material após sofrer o tratamento térmico, tem a sua cristalinidade elevada. Através das análises FTIR e Raman foram possíveis identificar grupos funcionais fosfatos e carbonatos, característicos da hidroxiapatita carbonatada com predominância do Tipo B.

Por fim, neste trabalho foi possível obter filmes de Hap pela técnica de deposição por eletroforese como visto pelas análises por MEV. Isso demonstra, a possibilidade da aplicação da Hap como revestimento de próteses. Entretanto, os filmes obtidos não tiveram aparência uniforme demandando maiores estudos que visem melhorar o processo de deposição.

É importante ressaltar que a utilização das cascas de ovos de galinha para síntese deste biomaterial representa uma nova fonte de destinação deste material que é comumente descartado. A aplicação dessa matéria-prima, pode, portanto, representar economia considerável, se o processo de síntese puder ser realizado em maior escala.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro. Também reconhecemos a Universidade Federal do ABC (UFABC) pela parceria e pelos futuros testes de bioatividades. Aos laboratórios da Faculdade Tecnologia de São Paulo (Fatec SP) que permitiram a realização deste trabalho, em especial aos Laboratório de Síntese de Materiais (LSM) e ao laboratório de Processamento e Caracterização de Materiais (LPCM).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA Filho, E. et al, (2007) “*Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-CP modificada por aspersão térmica*”, *Quim.Nova.*, 30, 5, 1229.
- ARABHOSSEINI, Akbar. (2018) “*Application of eggshell wastes as valuable and utilizable products: A review*”. *Research in Agricultural Engineering*, 64, 2, 104-114.
- AZEVEDO, Adriano Galvão S.; STRECKER, Kurt. (2014), “*Avaliação da influência da razão Ca/P nos valores de cristalinidade e crescimento de cristalitos durante a sinterização de pós de hidroxiapatita*”. *Eclética Química Journal*, 39, 1, 141-150.
- BARINOV, S. M. et al. (2006), “*Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range*”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*.17, 7,597-604.

- BAZIN, Dominique et al. (2009), “*Diffraction Techniques and Vibrational Spectroscopy Opportunities to Characterise Bones*”. *Osteoporosis international*, 20, 6, 1065-1075.
- IBGE, IBGE Indicadores. Estatística da produção pecuária (2017). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=298009>
Acessado em setembro de 2019.
- JAVIDI, M. et al. (2008), “*Electrophoretic Deposition of Natural Hydroxyapatite on Medical grade 316L Stainless steel*”. *Materials Science and Engineering: C.*, 28, 8, 1509-1515.
- KAMALANATHAN, P. et al. (2014), “*Synthesis and Sintering of Hydroxyapatite Derived From Eggshells as a Calcium Precursor*”. *Ceramics International*, 40,10, 16349-16359.
- LAFON, J. et al.(2003),” *Termal decomposition of carbonated calcium phosphate apatites.*” *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 72, 3, 1127-1134.
- LIMA, Cleibson Oliveira de et al. (2015), “*Hidroxiapatitas modificadas com prata aplicadas como agentes antimicrobianos*”. Dissertação de Mestrado UFPB/ João Pessoa, Paraíba.
- LUNA, M. dos Santos Fernanda (2018), “ *Valorização dos Resíduos de Casca de Ovo na obtenção de aluminato de cálcio via ativação mecânica*”. Tese de doutorado UENF/ Rio de Janeiro.
- Melo Costa, A. C. F. et al. (2009), "*Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações*", *Revista eletrônica de Materiais e Processos*, 4, 29-38
- RAMAKRISHNAIAH, Ravikumar et al.(2015) “*Applications of Raman Spectroscopy in Dentistry: Analysis of Tooth Structure*” *Applied Spectroscopy Reviews*.50, 4,332-350.
- RIBEIRO, Alexandre Antunes et al. (2007), “*Biomateriais: Estudo da Deposição de Hidroxiapatita por Via Polimérica sobre Superfícies de Ti cp modificado por feixe de laser*”. Tese de Doutorado.FEQ/Unicamp
- RIVERA, Eric M. et al. (1999), *Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. Materials Letters*,41, 3, 128-134.
- SZCZEŚ, Aleksandra et. al. (2017). “*Synthesis of Hydroxyapatite for Biomedical Applications*”. *Advances in colloid and interface science*. 249, 321-330.
- TROMMER, Rafael Mello (2006). “*Obtenção e caracterização de revestimentos de hidroxiapatita sobre substratos de aço inoxidável 316L utilizando a técnica de deposição química de vapor assistida por chama*”. Tese de Doutorado. UFRS/Rio grande do Sul.
- WU, Shih-Ching et al. (2015) “*Effects of heat treatment on the synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders*”. *Ceramics International*. 41, 9, 10718-1072.