

OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITA SUBMICROMÉTRICA DE ORIGEM BOVINA POR MOAGEM VIBRATÓRIA VISANDO PROTOTIPAGEM RÁPIDA

C. R. Meira⁽¹⁾; F. J. C. Braga⁽²⁾; B. M. Purquerio⁽¹⁾; C. A. Fortulan⁽¹⁾

⁽¹⁾ Escola de Engenharia de São Carlos - USP

⁽²⁾ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

Av. Trabalhador São-carlense, 400 – 13566-590 – São Carlos – SP

Escola de Engenharia de São Carlos – USP

camilameira@sc.usp.br

RESUMO

Hidroxiapatita de origem bovina submicrométrica foi obtida visando prototipagem rápida. A hidroxiapatita advinda de estrutura óssea mineral bovina possui grande importância dentre os biomateriais devido a sua biocompatibilidade e grande similaridade com a estrutura óssea humana. Este trabalho objetiva a obtenção de pós para manufatura de scaffolds por prototipagem rápida que requer pós altamente reativos para compensação da ausência de pressão de conformação. A hidroxiapatita processada foi moída em moinho de bolas e moinho vibratório, e seus pós caracterizados quanto ao diâmetro esférico equivalente e área específica. Corpos de prova cilíndricos foram conformados por prensagem isostática a 100 MPa, usinados à verde e ensaiados por flexão e densificação. Na moagem em moinho de bolas foi obtido partículas de diâmetro médio equivalente de 0,74µm e em moinho vibratório de 0,46µm. Resistência de 100 MPa e 99,8% da densidade teórica foi obtida nas peças sinterizadas a 1300°C-2h, sinalizando potencial para aplicação em prototipagem.

Palavras-chave: hidroxiapatita, prototipagem rápida, biomaterial.

INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que é o componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes humanos, garantindo assim sua plena biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade⁽¹⁻³⁾, e com estas propriedades permite a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, as quais não a distinguem da superfície do tecido vivo ósseo, o que indica a grande similaridade química superficial. A superfície da HA permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo que moléculas de água, proteínas e

moléculas de colágeno sejam adsorvidas na superfície, induzindo a uma neoformação tecidual, o que a classifica também como osteoindutora.

O modo de ação e interação da hidroxiapatita junto ao organismo se dá pelas reações de formação de neo-tecido e a formação de uma ligação química entre o enxerto e os tecidos originais atuando como fonte de cálcio e fósforo e servindo como base na formação do neo-tecido no processo de remodelamento ósseo pela Unidade Básica Multicelular (UBM)⁽⁴⁻⁶⁾.

A impressão tridimensional é de grande interesse na área de biomateriais onde a presença de poros é desejável, bem como a morfologia, distribuição e interconexão dos poros⁽⁷⁾.

A tecnologia da prototipagem rápida permite a manufatura direta de peças a partir de modelos 3D e vem ganhando espaço na área médica por permitir que sejam fabricados implantes e próteses a partir de uma tomografia computadorizada do defeito ósseo do paciente.

O objetivo deste trabalho é obter pós de hidroxiapatita bovina submicrométrico visando à manufatura de *scaffolds* por prototipagem rápida, para aplicação em restaurações ósseas e implantes craniomaxilofaciais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de processamento da hidroxiapatita de origem bovina para manufatura por prototipagem rápida. Os métodos de prototipagem idealizados são a impressão tridimensional (3D Print), usinagem à verde e *Laywise Slurry Deposition* (LSD). Excetuando a usinagem à verde que também é considerada por alguns pesquisadores como uma forma de prototipagem rápida (processo subtrativo de materiais) as demais técnicas propostas são de baixa pressão de conformação, o que, exigirá alta reatividade do pó. Esta alta reatividade é obtida pela diminuição do tamanho de partículas em processo de moagem e a usinagem à verde ficou estabelecida como padrão referencial para exploração deste trabalho.

Obtenção da Hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi obtida de tecido ósseo de origem bovina (fêmur) e para evitar que o material estivesse contaminado pelo agente patogênico causador da

encefalopatia espongiforme bovina (EEB), conhecida como doença da vaca louca, que é transmissível ao homem causando a nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob, o tecido ósseo utilizado foi proveniente de gado rastreado de rebanho brasileiro, adquirido de frigorífico com autorização de funcionamento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. De acordo com o enquadramento de risco geográfico emitido pelo Código Zoosanitário Internacional e pelo Scientific Steering Comitee da Comunidade Européia (SSCEC agosto de 2005) o Brasil é livre de Encefalopatia Espongiforme Bovina e o país também se declara livre da Encefalopatia Enpongiforme Bovina através da portaria 516/97.

Os tecidos ósseos utilizados na produção da hidroxiapatita eram provenientes de animais cadastrados no sistema brasileiro de rastreabilidade bovina e bubalina – SISBOV. No processamento o material passou por processos termo-químicos para retirada da matéria orgânica, foi granulado em moinho de facas tipo *willye*, com tamanho de grãos abaixo de 750 μ m e calcinado a 950°C, seguiu as especificações da ASTM F1185-88, que determina o limite de metais pesados na composição química como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantidade máxima permitida de metais pesados.

Metal	ppm, max
Chumbo	30
Mercúrio	5
Arsênio	3
Cádmio	5

Medida de densidade

Foi medida a densidade real da hidroxiapatita obtida através do picnômetro de hélio da Micromeritics, AccuPyc 1330.

Moagem

Para moagem da hidroxiapatita utilizou-se um jarro de polietileno com altura de 85mm e volume de 300 cm³ carregado com 40vol% (500g) de elementos de moagem, no caso, esferas de zircônia 3Y \varnothing 10mm, perfazendo um volume útil de 100mL. O jarro foi carregado numa concentração de 30vol% de sólidos e colocado

em moinho de bolas com velocidade de 104 rpm por 24, 48, 72 e 96 horas e em moinho vibratório por 24 e 48 horas.

Primeiramente realizou-se a moagem em meio aquoso, o jarro foi carregado com 30vol% de hidroxiapatita e 0,5vol% de etileno glicol, 0,5vol% de poliacrilato de amônia e 69vol% de água destilada. Após as 96 horas de moagem em moinho de bolas e 48h em moinho vibratório adicionou-se 1,5% em peso (da hidroxiapatita) de álcool polivinílico (PVAI) e o jarro foi colocado por 2 horas no moinho de bolas para homogeneização, em seguida o jarro foi descarregado, e a barbotina foi seca em banho-maria.

Uma nova moagem foi realizada em meio alcoólico por 48 horas em moinho de bolas, após esse período adicionou-se 1,2% em peso de PVB (poli vinil butiral) sobre o peso de HA, que foi misturado e homogeneizado por 2 horas. O jarro foi descarregado e a barbotina seca com soprador de ar quente a aproximadamente 80°C.

Outra moagem em meio alcoólico por 48 horas em moinho de bolas e 48 horas em moinho vibratório foi realizada adicionando-se 1,2% em peso de PVB sobre o peso da HA. Os pós foram granulados e classificados em malhas (peneiras) de aço inoxidável de #200 mesh $\leq 74\mu\text{m}$.

Medida de tamanho de partículas

Realizaram-se ensaios de medida de tamanho de partículas antes da adição do ligante no equipamento Sedigraph 5000ET da Micromeritics.

Sinterização

A sinterização do material foi realizada em forno tipo câmara Lindberg Blue/M em atmosfera de ar, da temperatura ambiente até 160°C com taxa de aquecimento de 2,7°C/min, depois até 600°C a 4°C/min, em seguida até 1100°C a 5°C/min e, finalmente até a temperatura máxima (1200°C, 1250°C, 1300°C, 1350°C ou 1400°C) a 6°C/min, com patamar de 120 minutos seguido de resfriamento do forno (até temperatura ambiente). A hidroxiapatita sinterizada em atmosfera ambiente entre 1200-1300°C tem essencialmente como produto cristalográfico a apatita. Em temperaturas próximas a 1400° a hidroxiapatita perde sua água estrutural e se converte em α -TCP e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$. Neste trabalho procurou-se manter a fase apatita e, portanto foi conceituado temperaturas próximas a 1300°C.

Resistência Mecânica

Cinco amostras cilíndricas foram analisadas para determinar a resistência à ruptura por flexão a 3 pontos (ASTM C1684-08) utilizando a Máquina Universal de Ensaio da EMIC com velocidade do travessão de 0,5mm/min com célula de carga de 2kN.

Densidade Aparente

Os valores de densidade e porosidade aparente das peças foram obtidos pelo método de imersão, baseado no princípio de Arquimedes, utilizando água como fluido, conforme a norma ASTM C373-88 (1999). O experimento foi realizado com 5 amostras em uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW 220D com precisão de 0,1mg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados difratogramas de raio X de amostras recém extraídas do osso (original) e calcinadas à temperaturas de 700, 900 e 1100°C, apresentadas na Figura 1. A temperatura de calcinação de 900°C foi escolhida devido à manutenção dos picos característicos da hidroxiapatita com menor tamanho de cristalito com menores aglomerados e maior área específica. Na temperatura de 700°C foi constatada a presença de cinzas residuais.

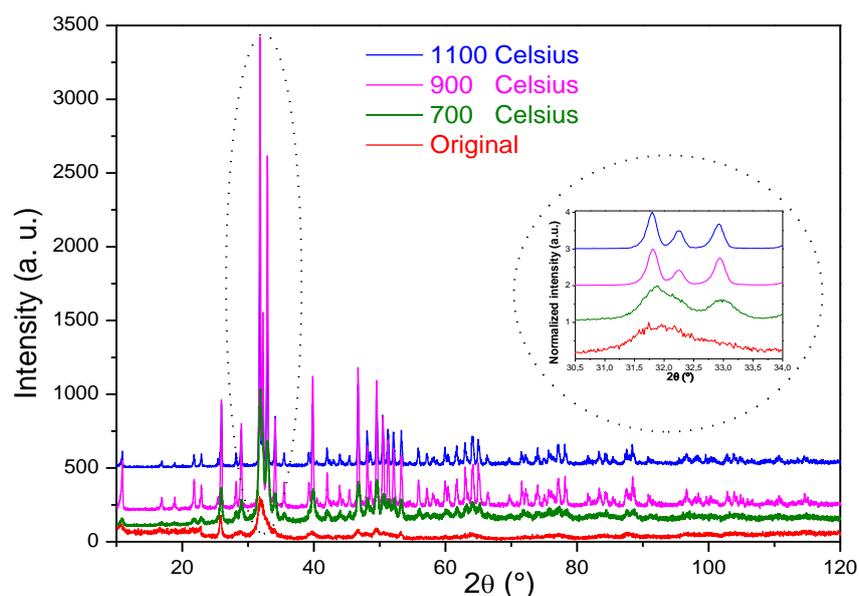


Figura 1- Difratogramas de raio X para amostras in natura, e calcinadas nas temperaturas de 700, 900 e 1100°C.

A densidade real da hidroxiapatita obtida através do ensaio de picnometria foi de $3,1122 \pm 0,0103 \text{ g/cm}^3$, o que revela uma boa densificação, sendo o valor obtido bem próximo ao da densidade teórica da hidroxiapatita que é $3,156 \text{ g/cm}^3$, indicando que na calcinação foi possível obter o mesmo empacotamento atômico.

O material calcinado se aglomerou apresentando dimensões de $\sim 750\mu\text{m}$ que foi macerado em almofariz/pistilo até passar em malha #200 mesh ($75 \mu\text{m}$) seguida de transferência para jarro em moinhos de bolas e vibratório por ciclos de tempo. A Figura 2 mostra as curvas de distribuição granulométrica de cada ciclo de moagem. O moinho de bolas reduziu para $1,8\mu\text{m}$ o diâmetro médio equivalente (ϕ_{ee}) após 24 horas e para $0,74\mu\text{m}$ após 96 horas de moagem. Após moagem no moinho de bolas o jarro foi transferido para o moinho vibratório e obteve-se redução para $0,46\mu\text{m}$ após mais 48 horas neste moinho. Foram feitas moagens em solução aquosa e posterior adição de PVAI e solução em álcool isopropílico para adição posterior de PVB. Na moagem em meio aquoso foi adicionado poliácrlato de amônio durante a moagem para garantir a viscosidade líquida da barbotina ($\eta \leq 300 \text{ mPa.s}$), porém após ϕ_{ee} atingir $\sim 0,46\mu\text{m}$ a suspensão adquiriu consistência de pasta e não conseguiu-se mais manutenção da baixa viscosidade. A Figura 3 mostra a adição de poliácrlato de amônio para manutenção de baixa viscosidade.

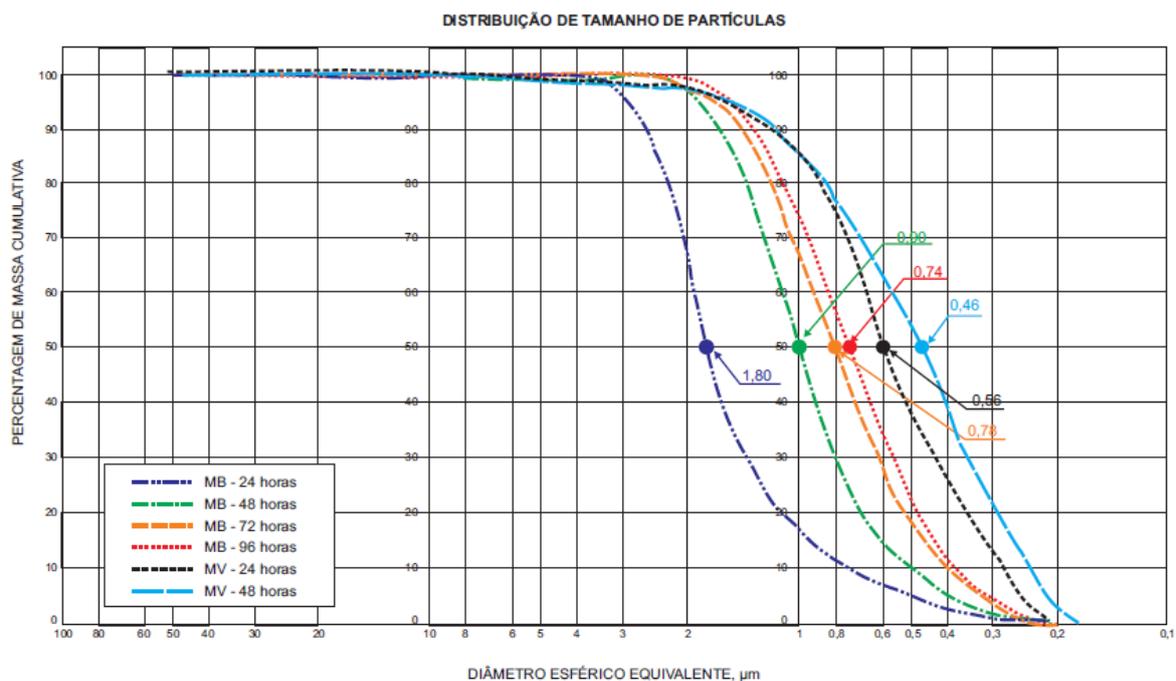


Figura 2- Desempenho da moagem em barbotina aquosa.

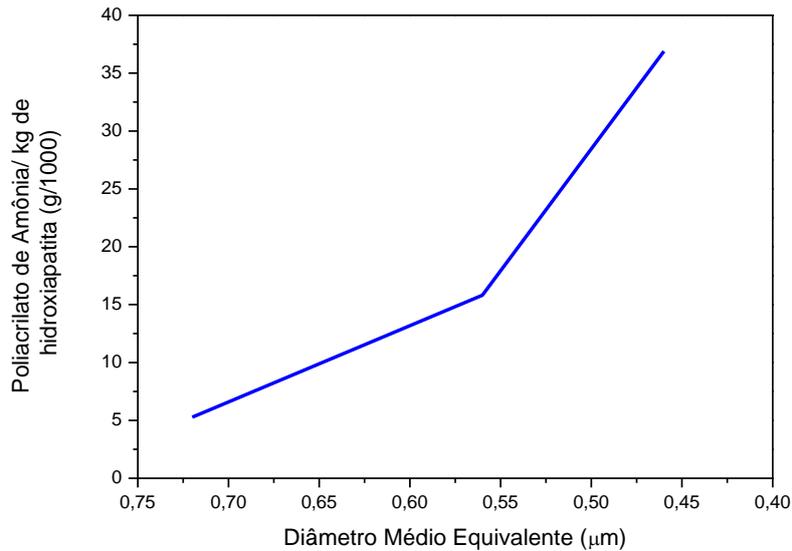


Figura 3- Adição de poliacrilato de amônia ao longo da moagem em meio aquoso.

A Figura 4 mostra a retração de sinterização das amostras processadas, é observada grande diferença entre o desempenho das peças em meio aquoso (PVAI) e meio alcoólico (PVB). As amostras sinterizadas a partir de 1300° moídas em moinho de bolas e vibratório em meio alcoólico tiveram maiores retrações e tornaram-se translúcidas. É possível que a presença de grupos hidroxilas da hidroxiapatita favoreça a formação de camadas superficiais hidratadas que inibe o contato físico das partículas diminuindo a densificação no sistema aquoso com PVAI. Este fenômeno é responsável pela aparência mais opaca de suas amostras.

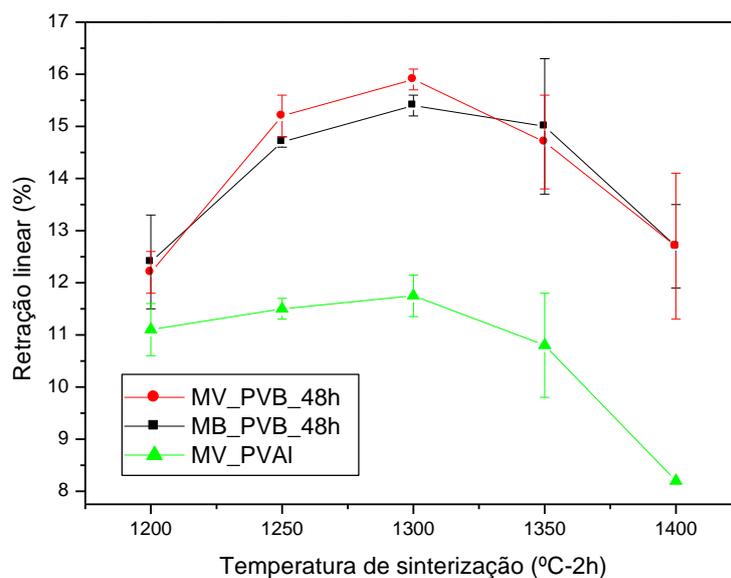


Figura 4 - Variação da retração de queima das amostras de HA em função da temperatura e barbotina

A Tabela 2 apresenta as densidades aparente e porosidade aparente e total para todas as peças.

Tabela 2 – Propriedades das peças sinterizadas.

	°C	D_{ap} (g/cm ³)	D_{ap}/D_{th} (%)	P_{ap} (%)	P_{total} (%)
	1200	2,7723±0,1087	89,0793±3,4935	10,5817±0,3548	10,9207±3,4935
	1250	3,0310±0,0324	97,3900±1,0409	0,1634±0,0274±	2,6100±1,0409
MB_PVB	1300	3,0908±0,0138	99,3128±0,4430	0,1531±0,1249	0,6872±0,4430
	1350	3,1030±0,0102	99,7035±0,3269	0,1062±0,0747	0,2965±0,3269
	1400	3,1118±0,047	99,9873±0,1521	0,0215±0,0091	0,0127±0,1521
	1200	2,7544±0,0249	88,5019±0,8000	12,3415±0,2681	11,4981±0,8000
	1250	3,0568±0,0239	98,2212±0,7666	0,2025±0,1080	1,7788±0,7666
MV_PVB	1300	3,1068±0,0226	99,8250±0,7268	0,2012±0,1176	0,1750±0,7268
	1350	3,0976±0,0183	99,3100±0,5873	0,1105±0,0666	0,6900±0,5873
	1400	3,1091±0,0023	99,9010±0,0745	0,1253±0,0604	0,0990±0,0745
	1200	2,9097±0,0210	93,4925±0,6744	5,0502±0,0491	6,5075±0,6744
	1250	3,0064±0,0053	96,6006±0,1688	1,6638±0,8225	3,3994±0,1688
MV_PVAI	1300	3,0440±0,0431	97,8086±1,3854	1,2434±0,9932	2,1914±1,3854
	1350	3,0141±0,0300	96,8491±0,9628	0,7824±0,8268	3,1509±0,9628
	1400	3,0421	97,7468	0,6490	2,2532

Após a sinterização a 1300°C a taxa de retração diminuiu significativamente e as densidades teóricas alcançaram valores muito próximos a 100%. Para as temperaturas de 1350 e 1400°C no sistema PVAI houve diminuição da densidade e no sistemas com PVB-MV aumento da porosidade aparente e diminuição dos poros fechados decorrente da instabilidade estrutural da apatita nessa faixa de temperatura. Considerando a estabilização da sinterização e um limite da integridade estrutural da apatita foi confirmada a temperatura de 1300°C como a temperatura a ser estudada para as propriedades mecânicas.

A Figura 5 mostra as amostras processadas após moagem em moinho de bolas por 48 horas com adição de 1,2% em peso de PVB e sinterizadas a temperaturas de 1200, 1250 e 1300°C. Os cilindros foram utilizados na realização do ensaio de flexão 3 pontos e os discos para determinação da retração de sinterização, densidade aparente e porosidade.

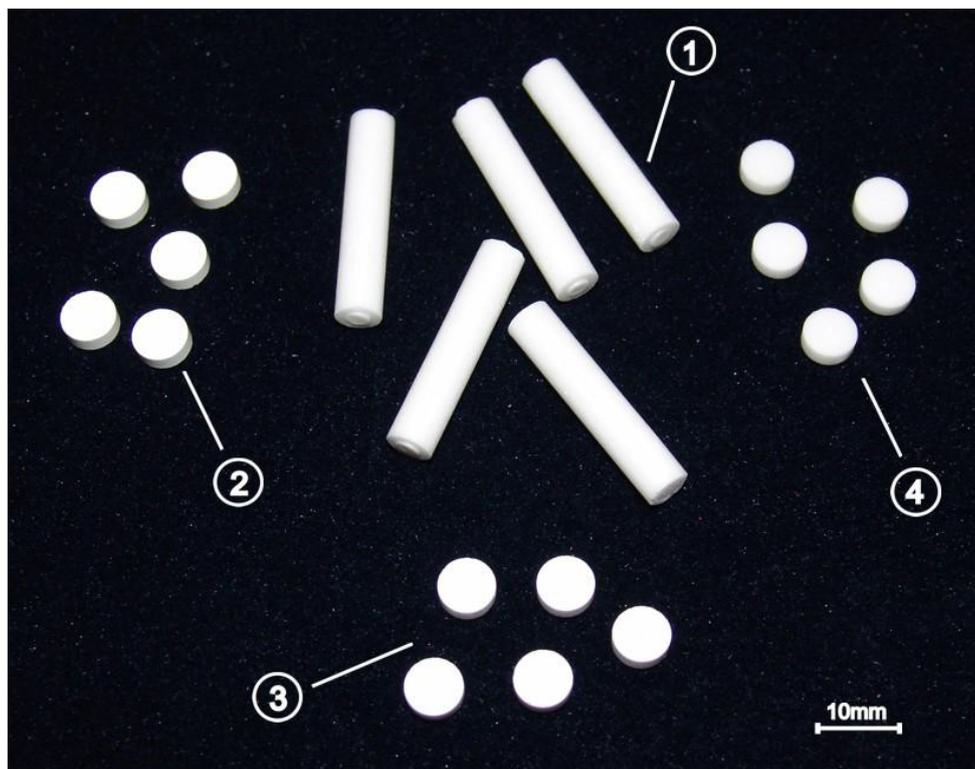


Figura 5 - Imagem das amostras de MB_PVB em 1- cilindros (1300°C-2h) e em 2,3,4 amostras sinterizadas à 1200-2h, 1250-2h e 1300-2h, respectivamente.

Resistência Mecânica à Flexão

As medidas de resistência mecânica à flexão em 3 pontos são apresentadas na Tabela 3, observa-se que coerente com a maior retração de sinterização as amostras obtidas de pós moídos no moinho vibratório e em sistema alcoólico (PVB) apresentaram os melhores valores nas propriedades mecânicas e principalmente com menor dispersão. Motisuke (2010) relata que a bibliografia apresenta valores de 25 a 250 MPa para a hidroxiapatita, é destacado que nesses experimentos foram analisadas peças sem acabamento superficial pós queima, o que limita as propriedades mecânicas das peças testadas, avalia-se também que ainda é possível melhorar a resistência com a diminuição do diâmetro equivalente das partículas.

Tabela 3 – Valores de resistência mecânica à flexão

	σ_{RT} (MPa)	σ_n (MPa)
MV PVAI	61,9	$\pm 29,4$
MB – PVB – 48h -	99,5	$\pm 18,9$
MV – PVB – 48h	100,4	$\pm 2,8$

CONCLUSÕES

A obtenção de hidroxiapatita a partir do osso bovino teve êxito nas propriedades químicas e mecânicas de peças obtidas por usinagem à verde, padrão de referência para peças prototipadas. Obteve-se resistência à flexão de 100MPa com relativa baixa dispersão, nestas amostras a aparência translúcida sinaliza para bom desempenho no processamento efetuado.

O processo de moagem se mostrou bastante adequado para obtenção de pós submicrométricos, podendo ser obtida melhor eficiência de moagem com a utilização de um defloculante para meio alcoólico.

Foi obtido desempenho muito superior na peças obtidas a partir de pós moídos em meio alcoólico. É provável que a adsorção de água pelos grupos hidroxílicos da hidroxiapatita gerou interface entre as partículas que inibiu a reação de sinterização do estado sólido. A rota de processamento com meio alcoólico evitou este efeito, porém o não uso de defloculante limitou a eficiência de moagem, sendo que melhorias podem ainda ser obtidas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pela concessão do projeto Pró Engenharias nº PE 0652008 481500/2007-3 pelo financiamento de insumos e dotação de bolsa de doutorado.

A empresa Critéria Indústria e Comércio de Produtos Medicinais e Odontológicos Ltda. pelo apoio e material gentilmente cedido.

REFERÊNCIAS

- (1) RODRIGUESA, C.V.M., SERRICELLAB, P., LINHARESC, A.B.R., GUERDESD, R.M., BOROJEVIC, R., ROSSIE, M.A., DUARTEC, M.E.L., FARINA, M. Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, p. 4987-4997, 2003.
- (2) EANES, E.D. Crystal growth of mineral phases in skeletal tissues. *Prog. Crystal Growth Charact.*, v.3, p.3-15, 1980.
- (3) KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, p. 518-522, 2000.
- (4) HERNANDEZ, C. J., HAZELWOOD, S. J., MARTIN, R. B., The Relationship Between Basic Multicellular Unit Activation and Origination in Cancellous Bone, *Bone*, v. 25, n. 25, p. 585-587, 1999.
- (5) <http://courses.washington.edu/bonephys/physremod.html>, acessado em 24 de abril de 2011.
- (6) JILKA, L. R., Biology of the Basic Multicellular Unit and the Pathophysiology of Osteoporosis, *Med. Pediatr Oncol*, v. 41, p. 182-185, 2003.
- (7) WILSON, C.E.; BRUIJN, J.D. de; BLITTERSWIJK, C.A. van; VERBOUT A.J.; DHERT, W.J.A. Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. In *HA scaffolds for bone-tissue research*. p.123-132, 2003.
- (8) MOTISUKE, M.. Síntese de cimento ósseo a base de (alfa)-TCP e estudo da influência do Mg e Si nas suas propriedades finais. Tese de Doutorado, UNICAMP. 2010

OBTENTION OF HYDROXYAPATITE SUBMICROMETRIC OF BOVINE ORIGIN BY VIBRATORY GRINDING FOR RAPID PROTOTYPING

ABSTRACT

Submicron bovine hydroxyapatite was obtained for rapid prototyping. Hydroxyapatite structure originated from bovine mineral bone has great importance among the biomaterials and biocompatibility due to its great similarity with the human bone structure. This study aims to obtain powder for manufacture by rapid prototyping of scaffolds. This technique manufacture requires highly reactive powders to compensate for the absence of pressure forming. Hydroxyapatite was milled in a ball mill and vibratory mill, and analyzed for their average equivalent spherical diameter and surface area. Test specimens were isostatically pressed at 100 MPa and machined into cylindrical test specimens. These specimens were sintered at several temperatures to determine the optimal sintering temperature based on densification and chemistry stability. In grinding ball mill was obtained particles of equivalent diameter of 0.74 micron in vibratory mill of 0.46 micrometers. An average flexural strength of 100 MPa and 99,8% of real density was attained for the sample sintered at 1300°C/2h, signaling potential for use in rapid prototyping.

Key Words: hydroxyapatite, rapid prototype, biomaterial.