

SINTEZA NANOSTRUKTURNIH PRAHOVA KALCIJUM-HIDROKSIAPATITA KATALITIČKOM RAZGRADNOM UREE UREAZOM

Bojan JOKIĆ, Dobrica STOJANOVIĆ¹, Đorđe VELJOVIĆ, Saša DRMANIĆ,
Rada PETROVIĆ, Đorđe JANAČKOVIĆ

Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, 11000 Beograd
e-mail: nht@elab.tmf.bg.ac.yu
¹Dom Zdravlja Vračar, Beograd

(Primljen 2. juna 2004., prihvaćen 23. juna 2004.)

Sadržaj – U ovom radu je prikazana sinteza nanostrukturnih čestica kalcijum-hidroksiapatita metodom katalitičke razgradnje uree ureazom. Kao polazna jedinjenja korišćene su različite količine CaCl_2 , NaH_2PO_4 , urea i ureaze. Katalitička razgradnja uree ureazom dovodi do povećanja pH vrednosti rastvora što za posledicu ima homogenu precipitaciju kalcijum-hidroksiapatita. Tokom razgradnje uree takođe dolazi do oslobađanja CO_3^{2-} i njihove ugranje u kristalnu strukturu, sličnu onoj koja se javlja u apatitima prisutnim u kostima. U radu je takođe ispitan uticaj parametara sinteze: temperature i odnosa koncentracije rastvora prema koncentraciji ureaze na morfologiju i veličinu nastalih čestica. Utvrđeno je da u temperaturnom intervalu od 30 do 40°C dolazi do formiranja karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita. Smanjenjem odnosa koncentracija rastvora prema koncentraciji ureaze dolazi do smanjenja veličine čestica do ispod 100 nm i promene morfologije čestica od sunderaste lisnate ka sfernim.

Cljučne reči: nanostrukturni hidroksiapatit, urea, ureaza, mikrostruktura praha.

The Synthesis of Nanosized Calcium-Hydroxyapatite Particles by the Catalytic Decomposition of Urea with Urease

Abstract – In this paper, the synthesis of nanosized calcium-hydroxyapatite particles by the catalytic decomposition of urea with urease is presented. As reagents for the Ca-hydroxyapatite synthesis, the various amounts of CaCl_2 , NaH_2PO_4 , urea and urease were used. The urease catalyzed decomposition of urea leads to more homogenic precipitation of hydroxyapatite, due to pH changes because of urea hydrolysis. During urea hydrolysis, the CO_3^{2-} ion is released and can be incorporated in the crystal structure of hydroxyapatite, as it appears in human bones. The influence of synthesis parameters: temperature, concentrations of solution to urease concentration ratio on the particle size and morphology of nanostructured Ca-hydroxyapatite, were investigated. It was found that at temperature range from 30 to 40°C, the low crystallized carbonate hydroxyapatite formed in all case. It was also concluded that decreasing the solution to urease concentration ratio lead to decreasing in the particle size below 100 nm and morphology changes from sponge like to spherical.

Key words: nanosized hydroxyapatite, urea, urease, microstructure particles.

1. Uvod

Kost predstavlja prirodni nanokompozitni materijal, koji se sastoji od oko 58% karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), 12% vode i oko 25% organske supstance - uglavnom kolagena.

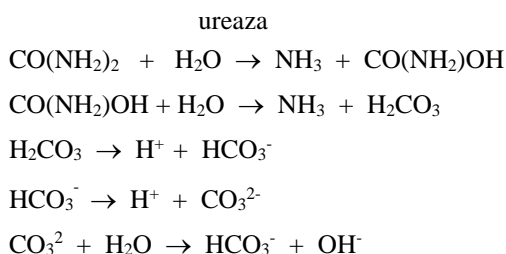
Prirodni apatit u kostima se nalazi u obliku štapićastih nanokristalita, širine od 1,5 do 20 nm i dužine od 20 do 60 nm. U strukturi takvog apatita dolazi do izostrukturalne zamene fosfatnih ili hi-

droksilnih an-jona sa karbonatnim ili fluoridnim jonima koji daju

specifične fizičko-hemijske, kristalne i morfološke karakteristike prirodnim apatitima [1, 2]. Brojna istraživanja su posvećena sintezi keramičkih bioaktivnih i biokompatibilnih materijala na bazi hidroksiapatita, koji se mogu koristiti za reparaciju i rekonstrukciju obolelih ili oštećenih delova skeletnog sistema [3, 4]. Kao metode sinteze ovih materijala koriste se reakcije u čvrstoj fazi [5], sol-gel postupak

[6], hidrotermalni postupak [7, 8], precipitacija [9], itd.

Precipitacija, kao jedan od metoda sinteze se sastoji u taloženju kalcijum-hidroksiapatita iz rastvora soli promenom pH vrednosti, pri čemu se za promenu pH vrednosti koristi NaOH, NH₃ ili (NH₄)₂CO₃. U cilju homogene precipitacije takođe se koristi taloženje apatita hidrotermalnom razgradnjom uree [10, 11]. Reakcija hidrolize uree se može odvijati i katalitičkom razgradnjom uree koristeći enzim ureazu. Prednost ove metode je u tome što se ove reakcije odvijaju na niskim temperaturama. Pri tome dolazi do reakcije hidrolize uree po sledećem mehanizmu:



Zbog toga što se hidroksilni joni homogeno oslobađaju po celoj zapremini rastvora dolazi do homogene precipitacije apatita po celoj zapremini. U ovoj reakciji se oslobađaju i karbonatni joni koji se ugrađuju u kristalnu strukturu hidroksiapatita pri čemu nastaje karbonatni tip hidroksiapatita, sličan po strukturi onom koji se javlja u kostima.

U ovom radu je prikazana sinteza nanostrukturnog karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita metodom precipitacije, pri čemu se hidroliza uree odvija katalitičkom razgradnjom pomoću enzima ureaze. Cilj ovog rada je da se ispita uticaj parametara sinteze: temperature, koncentracije rastvora i odnosa urea/ ureaza na veličinu i morfologiju čestica karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita.

2. Eksperimentalna procedura

Sinteza karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita je izvedena rastvaranjem različitih količina CaCl₂, NaH₂PO₄ i uree (svi reagensi su p.a. kvaliteta) u 100 ml destilovane vode, nakon čega su rastvori zagrevani do temperatura od 30, 35 ili 40°C. U rastvor je zatim dodata određena količina ureaze, prethodno rastvorena u 20 ml vode. U tabeli 1 prikazani su eksperimentalni uslovi sinteze za pojedine uzorke.

U cilju identifikacije faznog sastava, uzorci su analizirani metodom rendgenske difrakcije na uređaju Philips PW 1710 difraktometar sa CuK α zračenjem i grafitnim monohromatorom, u opsegu uglova od 2 θ = 5 – 50 sa širinom koraka 0,02. Takođe, za faznu analizu korišćena je infracrvena spektroskopska analiza koja je izvedena na uređaju MB Bomen Hartmann u opsegu talasnih brojeva od 400 do 4000 cm⁻¹, pri čemu su uzorci pripremani pri odnosu uzorak : KBr = 1:100.

Određivanje veličine i morfologije čestica je izvedeno analizom mikrografija dobijenih na skeniranjem elektronskom mikroskopu JEOL T-20 pri naponu od 19kV, uz prethodnu ultrazvučnu deaglomeraciju pra-hova i pripremu uzoraka za snimanje naparavanjem prahova legurom Pt/Pd.

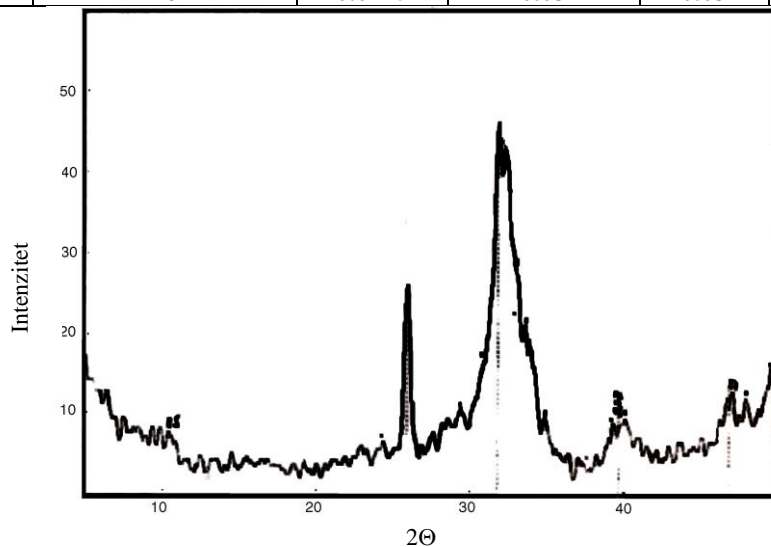
3. Rezultati i diskusija

Na slici 1 prikazana je rendgenska difrakciona analiza praha HAP-1. Mogu se uočiti pikovi niskog intenziteta, koji prema ASTM kartici 04-0697 pripadaju karbonatnom kalcijum-hidroksiapatitu. Širina pikova ukazuje na malu kristaliničnost, odnosno malu veličinu kristalita sintetizovanog HAP-a, sličnu onom kao u apatitu prisutnom u kostima.

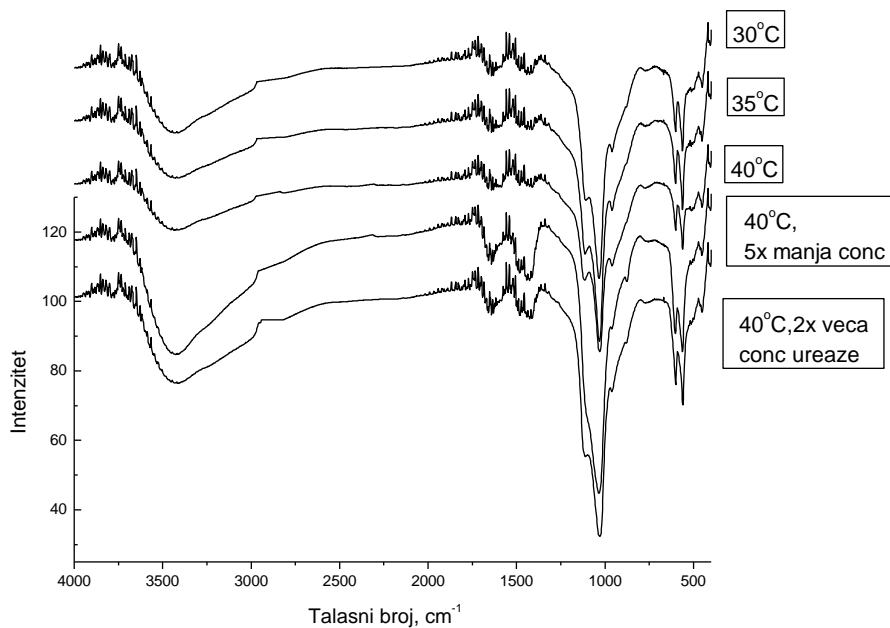
Tabela 1. Eksperimentalni uslovi sinteze karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita.

Uzorak	Temperatura, °C	CaCl ₂ , g	NaH ₂ PO ₄ , g	Urea, g	Ureaza, g
HAP-1	30	0.55	0.6	0.6	0.06
HAP-2	35	0.55	0.6	0.6	0.06
HAP-3	40	0.55	0.6	0.6	0.06
HAP-4	40	0.55	0.6	0.6	0.12
HAP-5	40	0.11	0.12	0.12	0.06

HAP-6	40	0.055	0.06	0.06	0.06
HAP-7	40	0.0275	0.03	0.03	0.06



Slika 1. Difraktogram uzorka HAP-1.



Slika 2. FTIR spektri uzorka HAP-a.

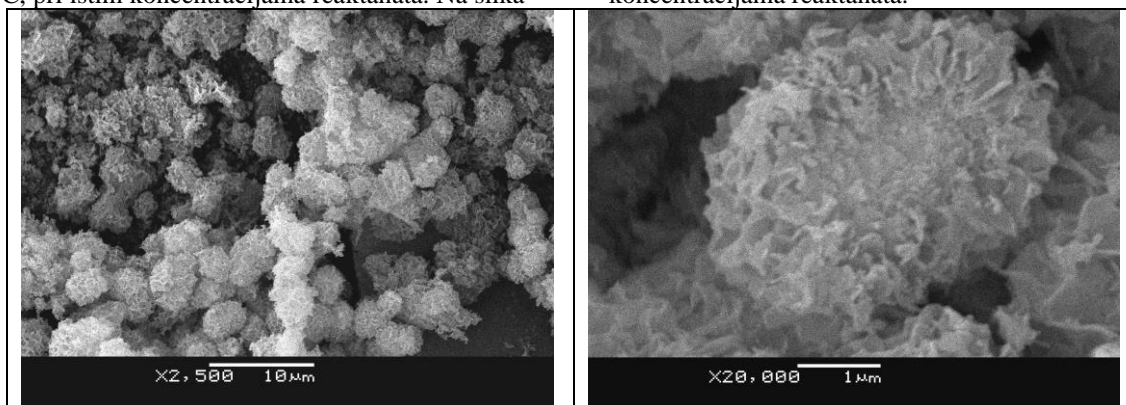
Na slici 2 prikazane su FTIR analize uzorka HAP-a. Uočavaju se trake na 437, 566, 611, 966, 1021, 1120 cm^{-1} koje pripadaju PO_4^{3-} grupama. Takođe se uočavaju trake na 1420-1480 kao i pik na 870 cm^{-1} kao posledica prisustva CO_3^{2-} grupe prisut-

ne u strukturi apatita. Vidi se da sa promenama temperature i koncentracije ne dolazi do pomeranja traka niti značajne promene njihovih intenziteta, što

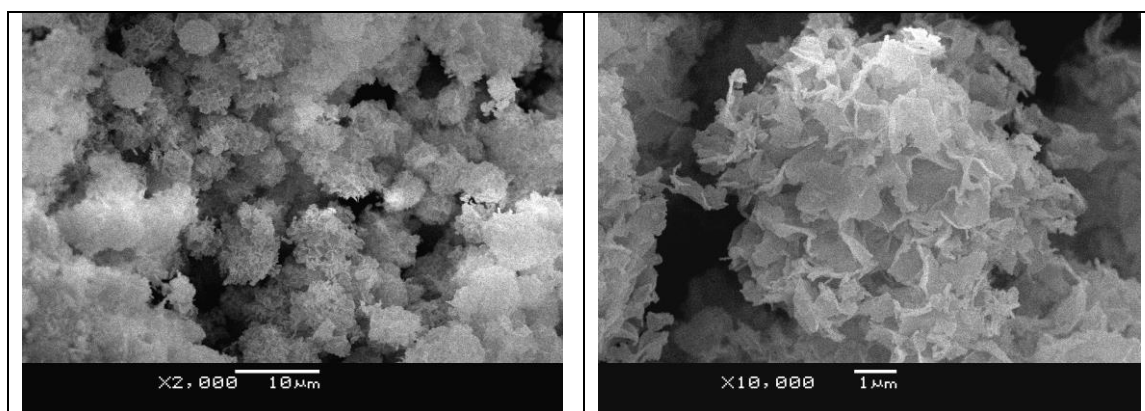
ukazuje da ne dolazi do promene strukture nastalog karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita.

Na slikama 3, 4 i 5 prikazane su SEM mikrografije čestica hidroksiapatita sintetizovanih na 30, 35 i 40°C, pri istim koncentracijama reaktanata. Na slika-

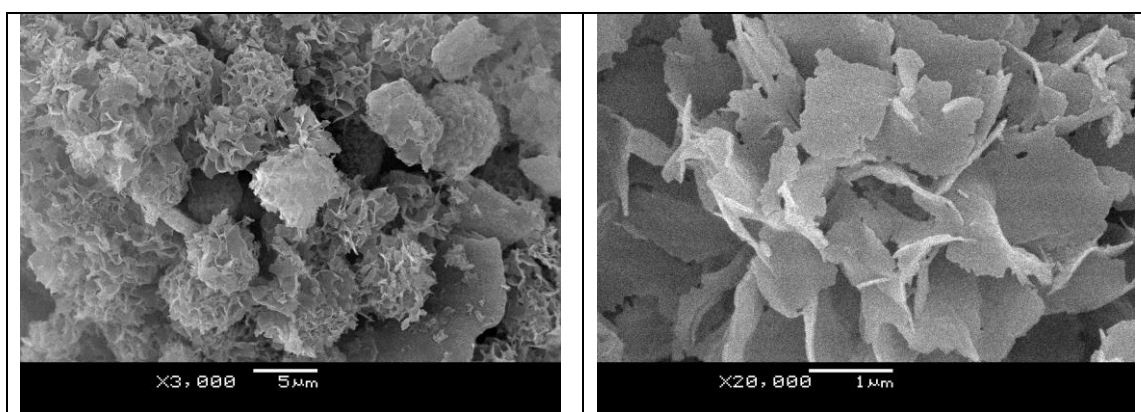
ma 6, 7 i 8 prikazane su SEM mikrografije prahova sintetizovanih na 40°C pri 5x, 10x i 20 puta manjim koncentracijama reaktanata.



Slika 3. SEM mikrografija uzorka HAP-1 sintetizovanog na 30°C.



Slika 4. SEM mikrografija uzorka HAP-2 sintetizovanog na 35°C.



Slika 5. SEM mikrografija uzorka HAP-3 sintetizovanog na 40°C.

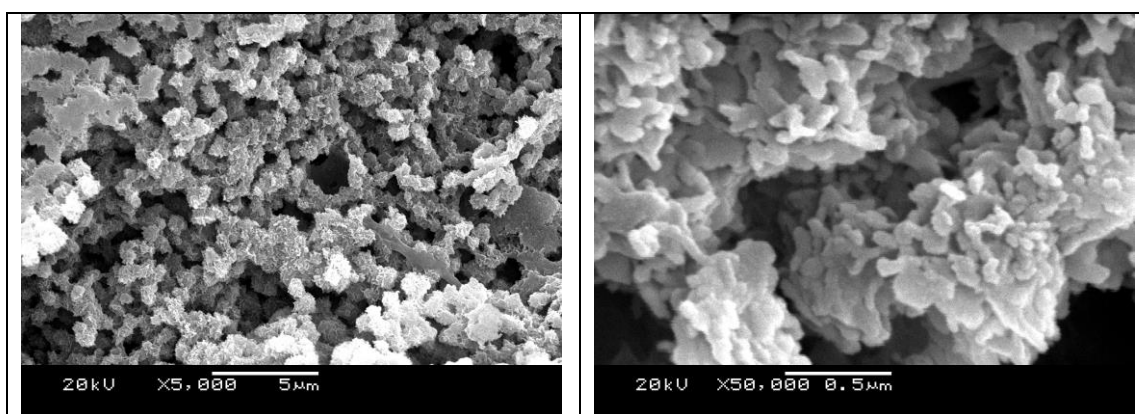
Sa slika 3, 4 i 5 se može uočiti da se sa promenom temperature sinteze pri istoj koncentraciji reak-

tanata bitnije ne menja veličina i morfologija čestica. Veličina čestica se kreće od 2 do 7 μm . Čestice su

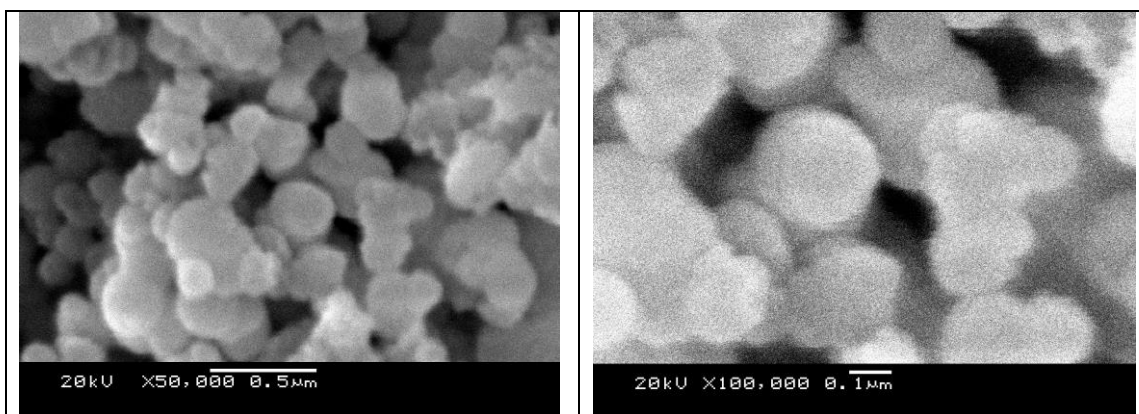
sunderaste strukture, veoma porozne i sastoje se od velikog broja kristalita lisnate strukture debljine ispod 100 nm. Kod uzoraka dobijenih pri manjim koncentracijama reaktanata a istoj koncentraciji ureaze, uočava se da dolazi do značajne promene veličine i morfologije čestica.

Kod uzorka sa 5x manjom koncentracijom, prikazanom na slici 6, uočavaju se neaglomerisane čes-

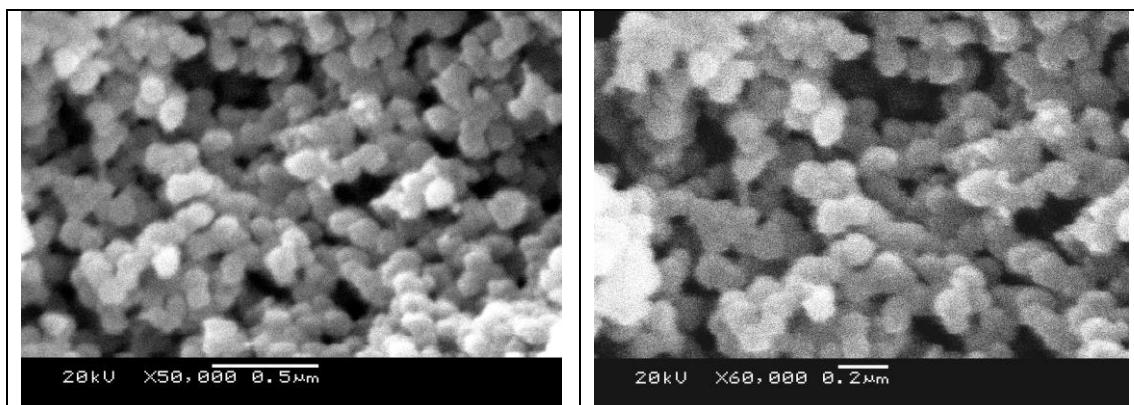
tice prilično velike sferičnosti i veličine od oko 700 nm. Takođe se uočava da se te čestice sastoje od velikog broja primarnih sfernih i štapićastih čestica – kristalita veličine ispod 100 nm.



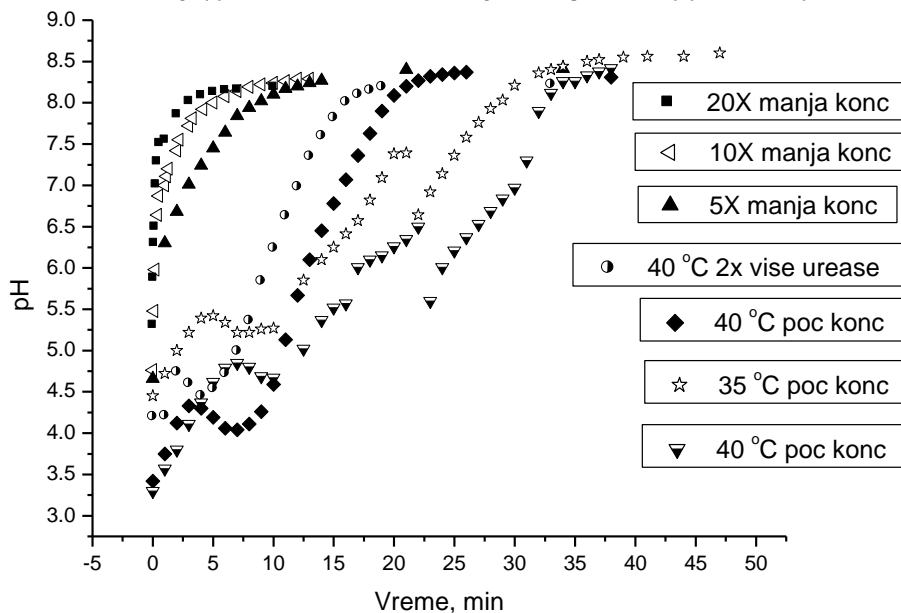
Slika 6. SEM mikrografija uzorka HAP-5 sintetizovanog na 40°C pri 5x manjoj koncentraciji reaktanata.



Slika 7. SEM mikrografija uzorka HAP-6 sintetizovanog na 40°C pri 10x manjoj koncentraciji reaktanata.



Slika 8. SEM mikrografija uzorka HAP-7 sintetizovanog na 40°C pri 20x manjoj koncentraciji reaktanata.



Slika 9. Zavisnost promene pH vrednosti rastvora od temperature i odnosa koncentracija ureaze prema koncentraciji rastvora.

Kod uzorka dobijenog pri 10 puta manjoj koncentraciji a pri istoj koncentraciji ureaze, slika 7, uočavaju se sferne neaglomerisane čestice veličine od 150 do 300 nm. Sa daljim smanjenjem koncentracije reaktanata od 20 puta u odnosu na polaznu koncentraciju, dolazi do daljeg smanjivanja veličine čestica, koja se kreće u intervalu od 80 do 140 nm. Čestice ostaju i dalje neaglomerisane i zadržavaju veliku sferičnost.

Na osnovu anize mikrografija može se zaključiti da odnos koncentracija reaktanata prema koncentraciji ureaze igraju veliku ulogu u formiranju čestica,

odnosno u procesu nukleacije i rasta nastalih kristalita. Prilikom katalitičke razgradnje uree ureazom, dolazi do homogenog oslobađanja hidroksilnih jona po celoj zapremini rastvora, koji sa jedne strane ulaze u reakciju nastajanja hidroksiapatita, dok neproreagovani OH⁻ joni povećavaju pH rastvora. Promena pH rastvora ima za posledicu homogenu nukleaciju i stvaranje velikog broja nukleusa hidroksiapatita. U slučaju veće koncentracije reaktanata, pored formiranja nukleusa dolazi i do trošenja na-stalih OH-jona u reakciji nastajanja hidroksiapatita pa samim tim i do značajnog rasta nastalih čestica. Pri tome dolazi do njihovog srastanja, rasta aglome-

rata i formiranja sunderaste strukture. U slučaju male koncentracije rastvora a velike koncentracije ureaze,

dolazi do bržeg oslobađanja hidroksilnih jona što dovodi do formiranja velikog broja nukleusa hidroksiapatita, ali usled male koncentracije reaktanata ne dolazi do njihovog značajnog rasta. To se može potvrditi praćenjem promene pH vrednosti rastvora u zavisnosti od temperature i odnosa koncentracije rastvora prema koncentraciji ureaze, što je prikazano na slici 9.

Sa slike se vidi logična zavisnost, da se sa povećanjem temperature skraćuje vreme kao posledica povećanja aktivnosti ureaze sa povećanjem temperature. Takođe se vidi da povećanje koncentracije ureaze za 2 puta kod iste koncentracije rastvora vodi bržem povećavanju pH. Takođe se vidi da još veći odnos koncentracija ureaze prema koncentraciji rastvora vodi još bržem povećanju pH vrednosti, odnosno bržem oslobađanju hidroksilnih jona. Povećanje brzine oslobađanja hidroksilnih jona, odnosno povećanje njihove koncentracije u kraćem vremenu vodi stvaranju većeg broja nukleusa hidroksiapatita, što za posledicu ima smanjenje veličine čestica na-stalog kalcijum-hidroksiapatita.

4. Zaključak

U ovom radu je prikazana sinteza nanostrukturnih čestica kalcijum-hidroksiapatita metodom katalitičke razgradnje uree ureazom. Katalitička razgradnja uree ureazom dovodi do povećanja pH vrednosti rastvora što za posledicu ima homogenu precipitaciju kalcijum-hidroksiapatita. Tokom razgradnje uree takođe dolazi do oslobađanja CO_3^{2-} i njihove ugranje u kristalnu strukturu. Utvrđeno je da u temperaturnom intervalu od 30 do 40°C dolazi do formiranja karbonatnog kalcijum-hidroksiapatita.

Na osnovu izloženog se može zaključiti da odnos koncentracija reaktanata prema ureazi igra veliku ulogu u formiranju čestica, odnosno u procesu nukleacije i rasta nastalih kristalita. Smanjenjem odnosa koncentracija rastvora prema koncentraciji ureaze dolazi do bržeg oslobađanja hidroksilnih jona. Povećanje brzine oslobađanja hidroksilnih jona, odnosno povećanje njihove koncentracije u kraćem vremenu vodi stvaranju većeg broja nukleusa hidroksiapatita, što za posledicu ima sman-

jenje veličine čestica na-stalog kalcijum-hidroksiapatita do ispod 100 nm i promene morfologije čestica od sunderasto-lisnate ka sfernim.

Literatura:

- [1] J.L. Katz, R.A. Harper; *Calcium Phosphates and Apatites*; Enciclopedia of Mat. Sci. and Eng., E.D.I. M.B. Bever, Dergamin Press, 1986.
- [2] J.B. Park; *Biomaterials*; An Introduction, Plenum Press, New York, 1997.
- [3] L.L. Hench; *Bioceramics*; *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 81, 785, 1998.

- [4] L.L. Hench, J. Wilson; *An Introduction to Bioceramics*; edited by L.L. Hench and J. Wilson, World Acientific, Singapore, pp.1-24, 1998.
- [5] R.Z. LeGeros, J.P. LeGeros; *Dense Hydroxyapatite*; An Introduction to Bioceramics, ed. by L.L. Hench and J. Wilson, World Scientific, Singapore, pp. 139-180, 1998.
- [6] A. Jilavenkatesa, R.A. Condrate; Sol-gel procesing of Hydroxyapatite; *J. Mater. Sci.*, Vol. 33, pp. 4111-4119, 1998.
- [7] Y. Fujishiro, T. Sato, A. Okuwaki; Coating of Hydroxyapatite on Titanium Plates by the Hydrothermal Reaction of $\text{Ca}(\text{edta})^{2-}$ in Phosphate Solution; *Proc. Pac. Rim. 2*, Cairns, Australia, pp. 18, 1996.
- [8] J.L. Xiaoyue Ye, H. Wang, M. Zhu, B. Wang, H. Yan; The Influence of pH and Temperature on the Morphology of Hydroxyapatite Synthesized by Hydrothermal Method; *Ceram. Int.*, Vol. 29, pp. 629-633, 2003.
- [9] H. Zhang, Y. Wang, Y. Yan, S. Li; Precipitation of biocompatible hydroxyapatite whiskers from moderately acid solution; *Ceram. Int.*, Vol. 29, pp. 413-418, 2003.
- [10] Đ. Janackovic, I. Petrovic-Prelevic, Lj. Kostic-Gvozdencovic, R. Petrovic, V. Jokanovic, D.Uskokovic; Influence of Synthesis Parameters on the Particle Sizes of Nanostructured Calcium-Hydroxyapatite; *Key Engin. Mater.*, Vol. 192-195, pp. 203-206, 2001.
- [11] Đ. Janackovic, I. Jankovic, R. Petrovic, Lj. Kostic-Gvozdencovic, S. Milonjic, D. Uskokovic; Surface Properties of HAP Particles obtained by Hydrothermal Decomposition of Urea and Calcium-EDTA Chelates; *Key Engin. Mater.*, Vol. 240-242, pp. 437-440, 2003.