



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS (*P²CEM*)**

TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ESTRUTURA CRISTALINA DA
HIDROXIAPATITA**

PAULO HENRIQUE OLIVEIRA JÚNIOR

**SÃO CRISTÓVÃO – SE
ABRIL DE 2021**

PAULO HENRIQUE OLIVEIRA JÚNIOR

**EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ESTRUTURA CRISTALINA DA
HIDROXIAPATITA**

Orientador: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Nilson dos Santos Ferreira

SÃO CRISTÓVÃO – SE

ABRIL DE 2021

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

J95e Júnior, Paulo Henrique Oliveira
Efeito do manganês sobre a estrutura cristalina da hidroxiapatita
/ Paulo Henrique Oliveira Júnior ; orientador Euler Araujo dos
Santos. - São Cristóvão, 2021.
105 f.: il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Ciência dos materiais. 2. Hidroxiapatita. 3. Óxidos de
manganês. 4. Nanopartículas magnéticas. I. Santos, Euler Araujo
dos orient. II. Título.

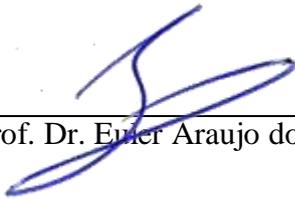
CDU 66.017

**EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ESTRUTURA CRISTALINA DA
HIDROXIAPATITA**

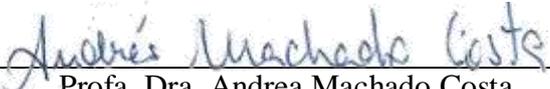
Paulo Henrique Oliveira Júnior

Tese submetida ao corpo docente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

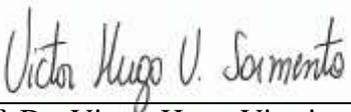
Aprovada por:



Prof. Dr. Emer Araujo dos Santos



Profa. Dra. Andrea Machado Costa



Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmento



Prof. Dr. Luis Eduardo Almeida

Profa. Dra. Rosane Maria Pessoa Betânio Oliveira

SÃO CRISTÓVÃO – SE

ABRIL DE 2021

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.” AYRTON SENNA

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmãos e amigos pelo incrível apoio, amor e dedicação na minha vida.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo. Sem a presença dele, nada seria possível na minha vida. Aos meus pais Paulo Henrique e Joana Francisca, por sempre confiarem nos meus sonhos e objetivos. Aos meus irmãos Leonardo Dante e Luís Neto, pela amizade, companheirismo e conselhos em todos os momentos. À toda a minha Família, pelo apoio.

Ao prof. Dr Euler Araujo, que se mostra sempre um excelente profissional com muita humildade, simplicidade, sabedoria e muita paciência sempre amando o que faz. Professor, obrigado por ser um dos responsáveis pela conquista dessa etapa.

Agradeço aos colegas de laboratório, que acompanharam toda a peleja e pela ajuda.

Agradeço e dedico imenso carinho aos amigos Lucas Santana e Mário Rodrigues pelo apoio, conversas e bons diálogos desenvolvidos que me ajudaram a crescer como pessoa e profissional na busca por conhecimentos.

Agradeço as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPITEC/SE pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

A todos os professores do departamento pelo conhecimento adquirido, pelo apoio e pelos momentos de descontração. A todos que acreditaram na concretização deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.).

EFEITO DO MANGANÊS SOBRE A ESTRUTURA CRISTALINA DA HIDROXIAPATITA

Paulo Henrique Oliveira Júnior

Abril/2021

Orientador: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Nilson dos Santos Ferreira

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Resumo

O manganês (Mn) pode desenvolver propriedades magnéticas em hidroxiapatitas (HA) substituídas, assim como o ferro, cobre, cobalto e samário, mas com a vantagem de também controlar diversas atividades celulares. O tipo e grau de ocupação dos sítios da HA e a possibilidade de segregação de óxidos desses elementos durante tratamentos térmicos definem as propriedades magnéticas resultantes. Por essa razão, o objetivo desse trabalho foi estudar de forma preliminar como ocorre a acomodação do Mn nos sítios de uma HA carbonatada, bem como seu mecanismo de segregação em temperaturas acima de 800°C com a formação de nanopartículas de Mn₃O₄. Para isso, HAs com cinco diferentes concentrações de Mn em relação ao cálcio foram sintetizadas pelo método de precipitação em meio aquoso: (Mn/(Mn+Ca)) = 0, 5, 10, 15 e 20 % at. Usando-se fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda, difração de raios X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de fotoelétrons de raios X, ficou demonstrando que o Mn foi inserido na estrutura da HA para todas as concentrações, perturbando consideravelmente a sua estrutura cristalina. As regiões dos canais hexagonais de hidroxila sofreram as maiores perturbações, com evidências de ocupação preferencial dos sítios de Ca₂, principalmente para as amostras verdes com alto teor de CO₃²⁻ em substituição ao PO₄³⁻. Quando o CO₃²⁻ é liberado em alta temperatura e a cristalinidade aumenta, os sítios de Ca₁ parecem mais suscetíveis à ocupação por Mn. Em temperaturas acima de 1000°C, o Mn tendeu a ser segregado da estrutura da HA na forma de nanopartículas de Mn₃O₄, via canais de hidroxila, ocupando preferencialmente sítios de Ca₂ no estágio final da segregação. A presença de Mn em diversos estados de oxidação também sugeriu que, além das substituições catiônicas, ocorreram também substituições aniônicas de MnO₄³⁻ nos sítios de PO₄³⁻. Na sua concentração mais baixa, o Mn não apresentou citotoxicidade frente a osteoblastos humanos. Esses resultados são essenciais na compreensão do comportamento do Mn na HA e sua segregação, sendo fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias para a produção de arcabouços magnéticos ativos baseados em hidroxiapatita no futuro.

Palavras-Chave: *Hidroxiapatita; óxido de manganês; nanopartículas magnéticas; estrutura cristalina.*

Abstract of Thesis presented to P²CEM/UFS as part of the requirements for obtaining the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.)

EFFECT OF MANGANESE ON THE CRYSTALLINE STRUCTURE OF HYDROXIAPATITE

Paulo Henrique Oliveira Júnior

April 2021

Advisor: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos
Co-supervisor: Prof. Dr. Nilson dos Santos Ferreira
Department: Materials Science and Engineering

Abstract

Manganese (Mn) can develop magnetic properties in substituted hydroxyapatites (HA), as well as iron, copper, cobalt and samarium, but with the advantage of controlling several cellular activities. The occupation of the HA sites by Mn and its segregation from HA structure during heat treatments can affect magnetic properties. For this reason, the objective of this work was to study the accommodation of Mn into a carbonated HA, and its segregation mechanism at temperatures above 800°C yielding Mn₃O₄ nanoparticles. HAs with five different concentrations of Mn in relation to calcium were synthesized by the aqueous precipitation method: (Mn/(Mn+Ca)) = 0, 5, 10, 15 and 20 at. %. Using wavelength dispersion X-ray fluorescence, X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, transmission electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy, it was possible to demonstrate that Mn was inserted into the HA structure in all concentrations, strongly compromising its crystalline structure. The regions around the hydroxyl channels were affected the most, with clear evidence of preferential Ca2 sites occupation, especially in the samples with a high content of CO₃²⁻ replacing PO₄³⁻. When carbonate was released at high temperature and the crystallinity increased, the Ca1 sites seemed more susceptible to occupation by Mn. At temperatures above 1000°C, Mn segregated from the HA structure in the form of Mn₃O₄ nanoparticles, via hydroxyl channels, preferentially occupying Ca2 sites at the final segregation stage. The presence of Mn in several oxidation states also suggested that, in addition to the cationic substitutions, there were also anionic substitutions such as MnO₄³⁻ at the PO₄³⁻ sites. No cytotoxicity was detected for the lower concentration of Mn regarding osteoblastic cells. These results contributed to clarify the Mn behavior into HA and its segregation, being fundamental to the development of new strategies to synthesize magnetic-active hydroxyapatite-based scaffolds in the future.

Keywords: *Hydroxyapatite; manganese oxide; magnetic nanoparticles; crystalline structure.*

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xv
Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	15
Capítulo 2 – OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
Capítulo 3 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Hidroxiapatita (HA)	21
3.2 Fosfato Tricálcico (TCP)	25
3.3 Precipitação Assistida por Síntese de Micro-ondas	28
3.4 Óxido de Manganês (Mn ₃ O ₄)	31
3.5 Método Rietveld e Mapas de Densidade Eletrônica	33
3.6 Substituição De Cálcio Por Metais Em Apatitas	38
Capítulo 4 – METODOLOGIA	42
4.1 SÍNTESES	43
4.1.1 Hidroxiapatita pura	43
4.1.2 Hidroxiapatita contendo Mn ²⁺	44
4.2 ESTABILIDADE TÉRMICA	44
4.2.1 Tratamento Térmico	44
4.2.2 Mecanismo de Segregação de Fase	45
4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	45
4.3.1 Composição Elementar	45
4.3.2 Difractometria de Raios X	45
4.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	46
4.2.4 XPS	47
4.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	48
4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA	48
4.3.1 Teste de Citotoxicidade	48
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

5.1 Composição Elementar	51
5.2 Composição de Fases e Segregação de Mn_3O_4	52
5.3 Estrutura Cristalina	63
5.4 Ocupação dos Sítios da HA	64
5.4.1 Evolução dos Grupos OH^- , PO_4^{3-} e CO_3^{2-}	64
5.4.2 Mapas de Fourier.....	69
5.4.3 Efeito da Temperatura na Acomodação do Mn	73
5.4.4 XPS.....	78
5.6 Morfologia das Partículas de Mn_3O_4	81
5.7 Testes de Citotoxicidade	83
Capítulo 6 – CONCLUSÃO	85
Capítulo 7 – PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	87
Capítulo 8 – REFERÊNCIAS	89
Capítulo 9 – ANEXOS E ARQUIVOS SUPLEMENTARES	99
9.1 FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)	100
9.2 Produção Científica.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura típica do osso em várias escalas. A microestrutura do osso cortical ou compacto consiste em sistemas haversianos (círculos em corte transversal e vista microscópica) com canais osteônicos e lamelas e, em escala nanométrica, a estrutura estrutural é composta por fibras de colágeno compostas por feixes de fibrilas de colágeno mineralizadas com apatitas biológicas (SADAT-SHOJAI <i>et al.</i> , 2013)	21
Figura 2. (a) Estrutura cristalina da HA (projetada perpendicular ao eixo <i>c</i>) e (b) projetada no plano $(0\ 0\ 1)$ (KANNAN <i>et al.</i> , 2008)	24
Figura 3. Estrutura cristalina da β -TCP, projetada perpendicular ao eixo <i>c</i> (Kannan <i>et al.</i> , 2008)	26
Figura 4. Sítios de Ca na estrutura do β -TCP (esferas cinza representam os átomos de cálcio e tetraedros rosa representam os grupos fosfato) (RENAUDIN, GOMES, & NEDELEc, 2017)	26
Figura 5. Síntese química de nanopartículas de HA por precipitação (SADAT-SHOJAI <i>et al.</i> , 2013)	28
Figura 6. Principais rotas das sínteses por micro-ondas para preparação de HA (SADAT-SHOJAI <i>et al.</i> , 2013)	30
Figura 7. Interação de MW com uma molécula dielétrica (por exemplo, molécula da água) (HASSAN <i>et al.</i> , 2016)	30
Figura 8. Diagrama de estabilidade de fases manganês – oxigênio em função da temperatura (DOUGLAS E MCDANIEL, 1994)	32
Figura 9. Estrutura do óxido de Mn_3O_4 (VÁZQUEZ-OLMOS <i>et al.</i> , 2005)	32
Figura 10. Pico difratado no raios X, mostrando a intensidade ($y_{i(obs)}$) e largura à meia altura (FWHM) (KINAST, 2000)	34
Figura 11. Interfaces dos programas. Fullprof e HighScore Plus.	35
Figura 12. Fluxograma das etapas empregadas no refinamento pelo MR no programa X’pert HighScore Plus (GOBBO, 2009).	36
Figura 13. Mapa de Fourier da diferença de densidade eletrônica obtido via refinamento Rietveld para a fase Na_3PSe_4 no plano <i>xy</i> em $z = 0$ mostrando as posições de átomos de P e Na (ZHANG <i>et al.</i> , 2015).	38
Figura 14. Esquema ilustrativo da interação entre o agente de contraste (Mn_3O_4 – lado esquerdo e Gd-DTPA – lado direito) e água (XIAO <i>et al.</i> , 2013)	40

Figura 15. Arranjo experimental da síntese de hidroxiapatita: solução de H_3PO_4 foi gotejada sobre $Ca(OH)_2$ sobre agitação, aquecimento e refluxo; o controle do pH do meio foi feito com adição de KOH, quando necessário	43
Figura 16. Fluxograma das etapas de síntese envolvida na preparação das hidroxiapatitas	44
Figura 17. Difrátogramas de raios X obtidos das amostras verdes para concentrações crescentes de Mn. As reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.	52
Figura 18. Tensões residuais e tamanhos de cristalitos calculados para a fase HA em função do aumento da concentração de Mn via refinamento de Rietveld.	53
Figura 19. Difrátogramas de raios X obtidos das amostras calcinadas a $1000^\circ C/2$ h para concentrações crescentes de Mn. As reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.	56
Figure 20. Composição de fases das amostras após calcinação a $1000^\circ C/2$ h para diferentes concentrações de Mn.	56
Figura 21. Diagrama de fases da hidroxiapatita com base na relação Ca/P (SILVA, 2019).	56
Figura 22. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 0,0% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.	57
Figura 23. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.	57
Figura 24. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 9,3% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo	58
Figura 25. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 13,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.	59

- Figura 26.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 16,7% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 59
- Figura 27.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 0,0% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 60
- Figura 28.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 61
- Figura 29.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 9,3% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 61
- Figura 30.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 13,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 62
- Figura 31.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 16,7% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 62
- Figura 32.** Parâmetros de rede (eixos a e c) e volume de unidade celular (V) calculados a partir da fase de hidroxiapatita verde e calcinada a 1000°C/2 h, através do refinamento de Rietveld para as amostras com aumento da concentração de Mn. 64
- Figura 33.** Espectros de FTIR das bandas de absorção de $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_{\text{L}}\text{OH}^-$, HPO_4^{2-} e $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ obtidas a partir de amostras contendo Mn verde e calcinada a 1000°C/2 h (abaixo). 67

- Figura 34.** Deconvoluções do espectro de FTIR das bandas do fosfato – $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (680 – 520 cm^{-1}) das amostras de HA com diferentes concentrações de Mn: verde e calcinada a 1000°C/2 h 68
- Figura 35.** Deconvoluções do espectro de FTIR das bandas do carbonato – $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ (900 – 840 cm^{-1}) das amostras verdes. 69
- Figura 36.** 3D Mapas de Fourier da diferença (Fobs - Fcal) obtidos a partir das fases de hidroxiapatita contendo 0,0 e 4,9% molar de Mn, amostras verdes. Os sítios Ca1, Ca2, P1 e H1 são mostrados na célula unitária hexagonal da hidroxiapatita 71
- Figura 37.** 3D Mapas de Fourier da diferença (Fobs - Fcal) obtidos a partir das fases de hidroxiapatita contendo 0,0 e 4,9% molar de Mn das amostras calcinadas a 1000 °C/2 h (taxa de aquecimento de 2°C/min) 72
- Figura 38.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinada a 400°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 74
- Figura 39.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinada a 600°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 74
- Figura 40.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinada a 800°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 75
- Figura 41.** Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinada a 1000°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo. 76
- Figura 42.** 3D Mapas de Fourier da diferença (Fobs - Fcal) obtidos a partir da fase hidroxiapatita contendo 4,9% mol de Mn após serem calcinados por 5 min a 400, 600, 800 e 1000°C, com taxa de aquecimento de 2°C/min. 77
- Figura 43.** Espectros de XPS Mn 2p obtidos a partir da amostra sintetizada contendo 4,9 mol% de Mn: (a) 20°C (como sintetizada), (b) 800°C/5 min e (c) 79

1000°C/2 h. (d) Curva linearizada de energias de ligação de Mn 2p_{3/2} conhecidas contra o estado de oxidação de Mn.

Figura 44. Deconvolução dos espectros de XPS em Mn 2p_{3/2} para as espécies Mn (II), Mn (III) e Mn (IV) da amostra sintetizada contendo 4,9 mol% Mn: (a) 20 ° C (como sintetizada), (b) após calcinação a 800°C/5 min, (c) 1000°C/2h e (d) área relativa sob as curvas associadas a Mn (II), Mn (III) e Mn (IV) para cada condição. 80

Figura 45. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) da amostra contendo 4,9% de Mn após tratamento térmico a 1000°C/2 h. Os mapas elementares da espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) mostram a localização dos nanocristais de Mn₃O₄ segregados da fase de hidroxiapatita contendo Mn após a calcinação (acima). Mapas detalhados de EDS (abaixo) adquiridos em regiões distantes dos nanocristais de Mn₃O₄ mostram a distribuição heterogênea de Mn ao longo dos cristais de hidroxiapatita 82

Figura 46. Teste de citotoxicidade das amostras. * Diferença significativa ($n = 10$; $p < 0,05$) do controle positivo em relação aos demais grupos, ** diferença significativa do controle negativo em relação às amostras de HA e MnHA 83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Composição comparativa e parâmetros estruturais de fases inorgânicas de tecidos calcificados humanos e HA sintética (KANNAN <i>et al.</i> , 2008).	22
Tabela 2.	Principais sais de fosfato de cálcio (SZCZE, HO E CHIBOWSKI, 2017)	23
Tabela 3.	Principais grupos químicos presentes em apatitas nanocristalinas e seus modos vibracionais correspondentes no infravermelho (IR) (BRANGULE E GROSS, 2015).	47
Tabela 4.	Quantidades relativas (% em mol) de Ca, P e Mn nas amostras medidas por WDXRF. As relações Ca/P, (Ca+Mn)/P e Mn/(Mn+Ca) são informadas para cada condição	51

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita é uma das biocerâmicas mais conhecidas e empregadas na produção de enxertos, recobrimentos de implantes e arcabouços para regeneração/reparo do tecido ósseo (ŠUPOVÁ, 2015). Sua alta biocompatibilidade e capacidade de incorporar diferentes íons em sua estrutura (KAYGILI *et al.*, 2014) possibilitam, por exemplo, a produção de implantes de hidroxiapatita e enxertos com propriedades magnéticas (MONDAL *et al.*, 2017). Ferro, cobalto, manganês, samário e cobre estão entre os elementos usados para desenvolver propriedades magnéticas na hidroxiapatita (MONDAL *et al.*, 2017; PETCHSANG *et al.*, 2009; PON-ON, MEEJOO E TANG, 2008; TAMPIERI *et al.*, 2012). Muitos desses elementos apresentam alta toxicidade e não são tolerados em aplicações biomédicas. No entanto, alguns desses elementos demonstraram ser capazes de induzir a diferenciação de células precursoras de osteoblastos por meio da ativação de cascatas de sinalização específicas, estimulando a regeneração do tecido ósseo. Por exemplo, o manganês é conhecido por melhorar a biocompatibilidade da hidroxiapatita. Seu íon bivalente (Mn^{2+}) vem sendo bastante estudado em associação aos fosfatos de cálcio (LALA *et al.*, 2017; ROBLES-ÁGUILA, REYES-AVENDAÑO E MENDOZA, 2017; SOPYAN E NATASHA, 2009; TORRES *et al.*, 2014), além de ser conhecido por estar diretamente envolvido na formação óssea. A deficiência desse elemento no corpo retarda a produção da fase orgânica da matriz extracelular, especialmente durante a ossificação endocondral (BOANINI, GAZZANO E BIGI, 2010). Esta propriedade está associada à ativação de cascatas de sinalização envolvidas na adesão de osteoblastos via integrinas (ŠUPOVÁ, 2015). O manganês também tem um efeito notável na diferenciação dos osteoblastos, expresso pela alta produção de osteocalcina quando o manganês está presente na hidroxiapatita (BRACCI *et al.*, 2009), além de estar associado a uma atividade antibacteriana moderada (YU *et al.*, 2014, 2017).

A estabilização dos íons Mn^{2+} na estrutura da hidroxiapatita é bastante difícil (PEREIRA *et al.*, 2016; RENAUDIN, GOMES E NEDELEC, 2017). Após tratamentos térmicos em alta temperatura, as hidroxiapatitas contendo Mn tendem a se transformar em outras fases. Os principais fatores que contribuem para essa instabilidade são os raios iônicos e eletronegatividades díspares entre o Ca^{2+} e o Mn^{2+} , e a susceptibilidade dos íons Mn^{2+} à oxidação durante a síntese ou tais tratamentos térmicos. Tipicamente, as fases provenientes da transformação da hidroxiapatita contendo manganês são α -fosfato tricálcico (α -TCP), β -fosfato tricálcico (β -TCP), pirofosfato de cálcio (CPP) e óxidos de manganês (MAYER *et al.*, 2003; PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2014). Muitas dessas fases exibem menor biocompatibilidade do que a hidroxiapatita. Porém,

um dos óxidos que pode ser gerado nesse processo é o Mn_3O_4 . Este óxido é insolúvel em condições fisiológicas (HEM, 1963) e, devido às suas propriedades magnéticas (NARAYANI *et al.*, 2019), pode ser considerado um material promissor para a produção de arcabouços compostos à base de hidroxiapatita magneticamente ativa. Uma vez que as propriedades magnéticas exibidas pela hidroxiapatita contendo metal de transição e seus óxidos são dependentes do tamanho, formato e arquitetura das partículas (KLUENKER *et al.*, 2018), incluindo a ocupação de sítios de hidroxiapatita (KYRIACOU *et al.*, 2013; ZILM *et al.*, 2018), é extremamente importante entender como o manganês se comporta quando inserido em uma fase de hidroxiapatita.

A alta biocompatibilidade da hidroxiapatita e a segregação das partículas de Mn_3O_4 de uma fase de hidroxiapatita contendo Mn pode ser ajustada para a produção controlada de nanopartículas com propriedades magnéticas. Para tanto, ainda é necessário avançar no entendimento sobre a acomodação do Mn^{2+} na estrutura da hidroxiapatita, e buscar respostas para questões abertas, tais como: (a) o limite máximo de concentração de manganês que pode ser incorporado à hidroxiapatita sem comprometer a sua estabilidade térmica, (b) as fases possíveis de serem encontradas após tratamentos térmicos, (c) os prováveis estados de oxidação do manganês quando em substituição aos sítios do Ca^{2+} , (d) o mecanismo de segregação da fase Mn_3O_4 , (e) e o efeito do óxido segregado sobre o potencial biológico da cerâmica obtida.

Capítulo 2 – OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é estudar como a acomodação do manganês na estrutura da hidroxiapatita afeta as suas propriedades físico-químicas e citotóxicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar HA contendo Mn via co-precipitação em meio aquoso;
- Estudar o efeito da acomodação do Mn na rede cristalina da hidroxiapatita em baixa temperatura (ambiente até 800°C) e alta temperatura (800 a 1000°C);
- Avaliar os mecanismos de segregação de fase em função da temperatura e tempo;
- Avaliar a citotoxicidade das amostras contendo Mn frente a células do tipo osteoblastos humanos da linhagem MG-63.

Capítulo 3 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Hidroxiapatita (HA)

Os sais de fosfatos de cálcio (CaP) são os principais componentes minerais dos tecidos mineralizados dos vertebrados (BOANINI, GAZZANO E BIGI, 2010; KANNAN *et al.*, 2008; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). Ossos e outros tecidos calcificados, como mostrado na Figura 1, podem ser classificados como compósitos naturais constituídos de biomateriais introduzidos em uma matriz proteica, outros materiais orgânicos e água (BOANINI, GAZZANO E BIGI, 2010; KANNAN *ET AL.*, 2008; SADAT-SHOJAI *ET AL.*, 2013). Entre os CaP, a hidroxiapatita (HA) é a fase cristalina termodinamicamente mais estável, similar à fase mineral dos ossos e dentes (BOANINI, GAZZANO E BIGI, 2010; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). Entretanto, a HA dos ossos, esmalte e dentina diferem da HA sintética em vários aspectos, tais como nas suas pequenas dimensões de cristais, na sua baixa cristalinidade e maior solubilidade, além da presença de substituintes iônicos, como mostrado na Tabela 1. Além da HA, outros fosfatos de cálcio também ocorrem em tecidos biológicos, normalmente em calcificações patológicas, como fosfato de cálcio amorfo (ACP), fosfato dicálcico di-hidratado (DCPD), fosfato de octacálcico (OCP), fosfato de b-tricálcico substituído por Mg (β -TCMP) (Tabela 2).

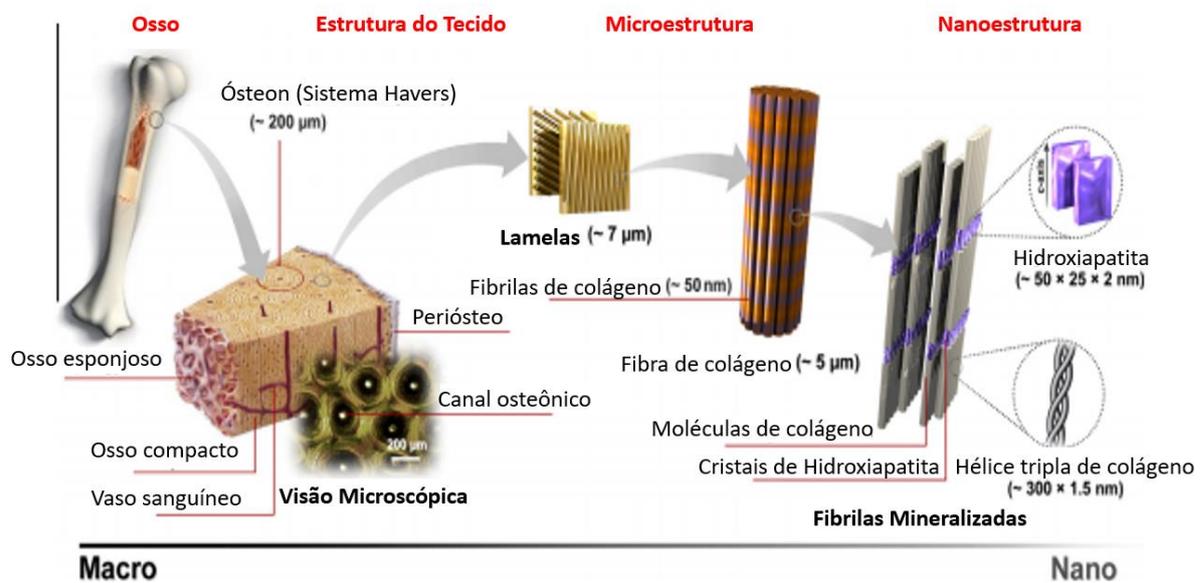


Figura 1. Estrutura típica do osso em várias escalas. A microestrutura do osso cortical ou compacto consiste em sistemas haversianos (círculos em corte transversal e vista microscópica) com canais osteônicos e lamelas e, em escala nanométrica, a estrutura

estrutural é composta por fibras de colágeno compostas por feixes de fibrilas de colágeno mineralizadas com apatitas biológicas (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

Tabela 1. Composição comparativa e parâmetros estruturais da HA encontrada em tecidos calcificados humanos e HA sintetizada em laboratório pelos métodos convencionais (KANNAN *et al.*, 2008).

Composição (% massa)	Esmalte	Dentina	Ossos	HA
Ca	36,5	35,1	34,8	39,6
P	17,7	16,9	15,2	18,5
Ca/P	1,63	1,61	1,71	1,67
Na	0,5	0,6	0,9	-
Mg	0,44	1,23	0,72	-
K	0,08	0,05	0,03	-
CO₃²⁻	3,5	5,6	7,4	-
F	0,01	0,06	0,03	-
Cl	0,30	0,01	0,13	-
Parâmetros de Rede ($\pm 0,003 \text{ \AA}$)				
eixo a	9,441	9,421	9,410	9,398 ^a
eixo c	6,880	6,887	6,890	6,886 ^a

^a Os dados nessas linhas são dados da Ref. (DE ANDRADE *et al.*, 2004) do arquivo CIF utilizados nos refinamentos Rietveld .

A HA possui fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e razão Ca/P de 1,67, sendo o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel de todos. Cristais de HA podem apresentar célula unitária com duas estruturas cristalográficas distintas (hexagonal ou monoclinica), com 4 unidades da fórmula por célula unitária; onde uma transição de fase do sistema monoclinico para estrutura hexagonal é observada a 370°C (SANTOS, 2014). A HA sofre cristalização preferencial no sistema hexagonal, nos quais os cristais prismáticos são normalmente terminados em faces dipiramidais (SANTOS E BATISTA, 2016).

A Figura 2 mostra uma representação da célula unitária da hidroxiapatita, onde pode-se observar os sítios de:

(a) Fosfato (PO_4^{3-}), formados por tetraédricos de fósforos (P^{5+}) coordenado a 4 oxigênios (O^{2-});

(b) Ca1, onde quatro dos íons cálcio (Ca^{2+}) estão dispostos em colunas paralelas ao eixo c e rodeados por nove átomos de oxigênio;

(c) Ca2, para outros seis íons cálcio (Ca^{2+}) arranjados em dois triângulos equiláteros dispostos ao longo do eixo c , chamando canal aniônico;

(d) Hidroxila (OH^-), normalmente chamados de canais de hidroxilas.

Tabela 2. Principais sais de fosfato de cálcio (SZCZE, HO E CHIBOWSKI, 2017).

Ca/P	Nome	Símbolo	Fórmula
0,5	Fosfato de cálcio monobásico monohidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,5	Fosfato de cálcio monobásico	MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1,0	Fosfato de cálcio dibásico dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,0	Fosfato de cálcio dibásico	DCP	CaHPO_4
1,33	Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,5	Fosfato tricálcico do tipo α	α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5	Fosfato tricálcico do tipo β	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,2 – 2,2	Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$
1,67	Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

A HA exibe parâmetros de rede $a = b = 9,398 \text{ \AA}$ e $c = 6,868 \text{ \AA}$ (DE ANDRADE *et al.*, 2004) e pertencente ao grupo espacial P_{63}/m , onde P indica o sistema hexagonal primitivo, 6 indica o eixo principal rotacional de ordem 6 (rotação de 60 graus), o 3 significa deslocamento de meia célula unitária e m significa plano perpendicular. Além dos dois sítios de cálcio distintos, a HA ainda apresenta os íons fosfatos (PO_4^{3-}) acomodados de modo que permitam a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano basal. O primeiro canal é ocupado por átomos de Ca1 paralelos aos eixos ternários e com diâmetro de 2 \AA , localizados em $z = 0$ e $z = 1/2$ do parâmetro de rede cristalino. O segundo canal possui diâmetro de 3 a $3,5 \text{ \AA}$ sendo formado por íons Ca2

com, localizados em $z = 1/4$ e $z = 3/4$. No interior desses canais estão localizados os íons hidroxilas (OH^-) (HEIMANN, 2013; MAVROPOULOS *et al.*, 2004).

Uma das características estruturais interessantes da hidroxiapatita é que ela permite a substituição dos íons Ca^{2+} , OH^- e PO_4^{3-} por outros grupos e essas mudanças ocasionam importantes implicações nas suas propriedades estruturais, dependendo do tipo de substituinte (HEIMANN, 2013). Os efeitos das substituições de cátions e ânions na HA dependem da fração e do tamanho de íon a ser substituído. A HA é eficiente em acomodar esses dopantes ou aditivos na sua rede durante o processo de síntese, tal fato é de extrema importância para suas aplicações. As substituições apresentam efeito sobre os parâmetros de rede, distorcendo o arranjo cristalino primitivo dos íons nas posições que ocupam na estrutura. Em geral, quando o íon incorporado à rede é maior do que o substituído, espera-se uma expansão dos parâmetros de rede. Entretanto, quando o íon substituído é de tamanho menor, ambos os parâmetros tendem a diminuir.

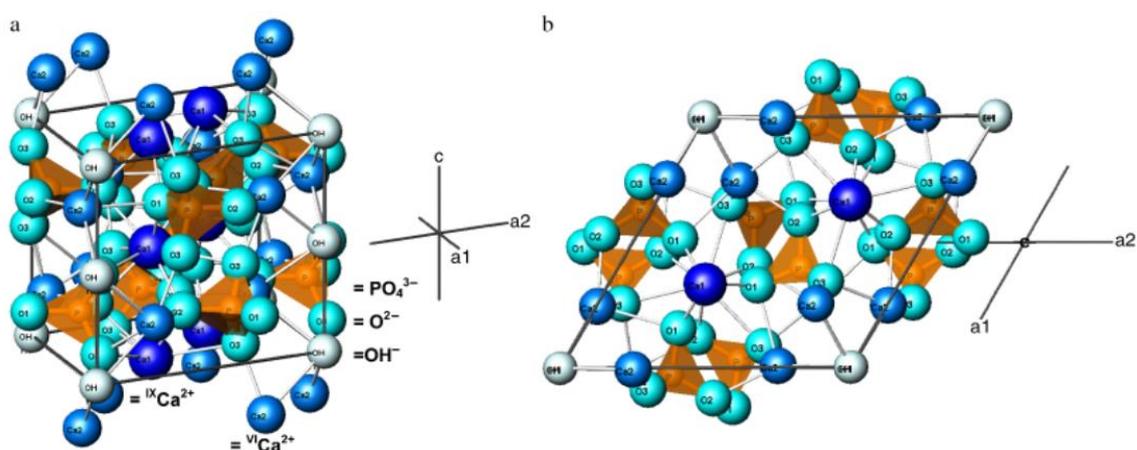


Figura 2. (a) Estrutura cristalina da HA (projeta perpendicular ao eixo c) e (b) projetada no plano (001) (KANNAN *et al.*, 2008).

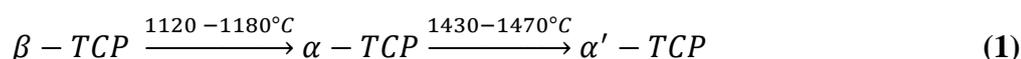
A ocorrência de 2 sítios de cálcio traz consequências relevantes para as hidroxiapatitas que possuem impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem sofrer mudanças sujeitas ao sítio ocupado pelo cátion da impureza. E existe uma grande variedade de elementos substituintes, tais como: Cu^{2+} (KOKSAL *et al.*, 2019), Zn^{2+} (KOKSAL *et al.*, 2019), Sr^{2+} (ULLAH *et al.*, 2018), Co^{2+} (RENAUDIN, GOMES E NEDELEC, 2017), Fe^{2+} (WU *et al.*, 2007), Na^+ (MOSTAFA, HASSAN E ELKADER, 2011), Ag^+ (JACOBS *et al.*, 2019; SANTOS E BATISTA, 2016), Mn^{2+}

(PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2010) etc. Essas substituições normalmente alteram a cristalinidade, as dimensões dos cristais, a textura, a estabilidade e a solubilidade da HA.

A HA possui propriedades interessantes para aplicações no campo biomédico, como excelentes biocompatibilidades (não induzir respostas biológicas adversas – reações alérgicas e inflamatórias), osteocondutividade (estimular o crescimento de células ósseas), bioatividade (capacidade do material se unir ao tecido biológico), permite a proliferação de células ósseas (fibroblastos e osteoblastos) e hidrofiliçidade (afinidade pela água) (BOANINI, GAZZANO E BIGI, 2010; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). Diante desses fatos a HA tem sido amplamente estudada e comumente utilizada para várias aplicações biomédicas, como por exemplo, substituição de defeitos ósseos e periodontais, sistemas de engenharia tecidual, agente de administração de medicamentos, materiais dentários, revestimentos em implantes ósseos metálicos, etc.

3.2 Fosfato Tricálcico (TCP)

Há vários ortofosfatos de cálcio (Tabela 2) que apresentam aplicações biomédicas além da HA, entre eles se destacam os fosfatos tricálcicos (TCP), sendo que HA e TCP exibem propriedades biológicas diferenciadas. O TCP pode cristalizar em outras formas polimórficas, onde as temperaturas de transição são descritas a seguir (1) (CHAAIR, LABJAR E BRITEL, 2017; GUASTALDI E APARECIDA, 2010; KANNAN *et al.*, 2008):



O fosfato tricálcico do tipo β (β -TCP), também conhecido como *whitlockite* (BOANINI, GAZZANO E BIGI, 2010; DICKENS E SCHROEDER, 1974; KANNAN *et al.*, 2008), é a fase de maior estabilidade térmica até cerca de 1120°C (DOROZHKIN, 2009). Possui fórmula química $Ca_3(PO_4)_2$, razão Ca/P de 1,5 e é mais solúvel que a HA (DUARTE, 2009).

O β -TCP cristaliza no grupo espacial romboédrico $R\bar{3}c$ e apresenta parâmetros de rede $a = 10,4352 \text{ \AA}$ e $c = 37,4039 \text{ \AA}$ (YASHIMA, SAKAI E KAMIYAMA, 2003), com 21 unidades de $Ca_3(PO_4)_2$ por célula unitária (CHAAIR, LABJAR E BRITEL, 2017; DICKENS E SCHROEDER, 1974). A estrutura pode ser descrita como tetraedros de

PO_4^{3-} em camadas e os íons cálcio no centro dessas camadas (Figura 3). Possui cinco sítios diferentes de Ca em sua estrutura cristalina (Figura 4), sendo o sítio Ca4 triplamente coordenado com átomos de oxigênio e possuindo um fator de ocupação de 0,5, ao contrário dos sítios de Ca1, Ca2, Ca3 e Ca5 que são totalmente ocupados por átomos de Ca e coordenados a sete, oito, oito e seis átomos de oxigênio, respectivamente (KANNAN *et al.*, 2008).

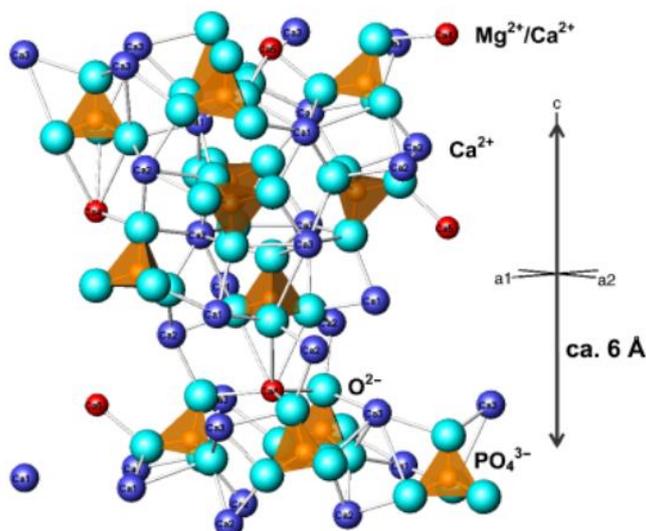


Figura 3. Estrutura cristalina da β -TCP, projetada perpendicular ao eixo c (KANNAN *et al.*, 2008).

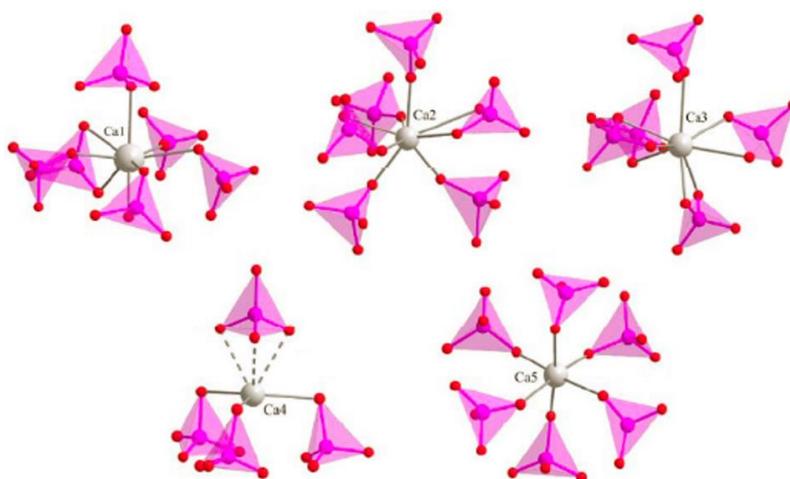
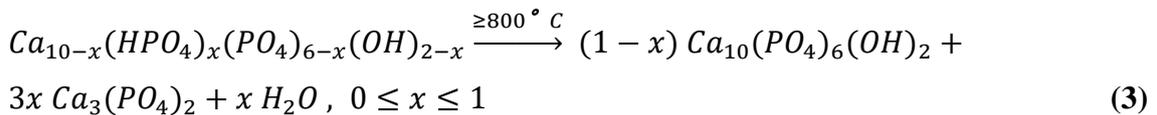


Figura 4. Sítios de Ca na estrutura do β -TCP (esferas cinza representam os átomos de cálcio e tetraedros rosa representam os grupos fosfato) (RENAUDIN, GOMES E NEDELEC, 2017).

As propriedades apresentadas pelo β -TCP são: (i) possibilidade de substituições catiônicas (para o caso do Mg^{2+} , esse pode substituir os sítios de Ca em até 15% sem causar mudanças significativas na estrutura), (ii) bioatividade e osteocondutividade, (iii) biodegradação (quando aplicado juntamente com a HA pode acelerar a velocidade de reabsorção da HA) (GHOMASH PASAND *et al.*, 2012; GUASTALDI E APARECIDA, 2010; KIVRAK E TAS, 2010; RANGAVITTAL *et al.*, 2000). Devido ao comportamento mais biodegradável o β -TCP, este vem sendo aplicado na ortopedia e odontologia em preenchimento de cavidades e defeitos ósseos em associação à HA como forma de se encontrar um equilíbrio entre velocidades de degradação e regeneração do tecido (GUASTALDI E APARECIDA, 2010).

O β -TCP pode ser obtido através do tratamento térmico da HA deficiente em cálcio acima de $700^{\circ}C$ (ISHIKAWA, DUCHEYNE E RADIN, 1993; KUMTA *et al.*, 2005; TÕNSUAADU *et al.*, 2012). As apatitas com razões Ca/P < 1,67 são consideradas não estequiométricas ou cálcio deficientes e essa deficiência depende das condições de síntese, como precipitação, hidrólise, pH e temperatura. A deficiência em Ca pode ser criada voluntariamente pela diminuição da concentração do precursor iônico de Ca ou aumento da concentração do precursor de P durante a síntese, essa perda de Ca^{2+} pode levar a formação de apatitas com outras espécies iônicas na sua estrutura ($Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$) (KANNAN *et al.*, 2008; SIDDHARTHAN, SESHADRI E SAMPATH KUMAR, 2004), como resultado da formação de ligações de hidrogênio com grupos PO_4^{3-} (2) (SIDDHARTHAN, SESHADRI E SAMPATH KUMAR, 2004). O tratamento térmico de tais apatitas pode resultar na formação de misturas bifásicas HA/ β -TCP (3) (KANNAN *et al.*, 2008; KIVRAK e TAS, 2010):



3.3 Precipitação Assistida por Síntese de Micro-ondas

Vários métodos diferentes de síntese são propostos para a obtenção da HA, como precipitação, sol-gel, emulsão, deposição por mimetização, eletrodeposição, solvotermal, hidrotermal, micro-ondas, entre outros (DOROZHKIN, 2009; KUMTA *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2004; ŠUPOVÁ, 2015). Sendo a precipitação um dos métodos mais frequentemente utilizado. Entretanto, a síntese de HA por precipitação (Figura 5) exige o controle de inúmeras variáveis que afetam a formação da mesma (CUNHA, 2010; HENCH E WILSON, 1993a).

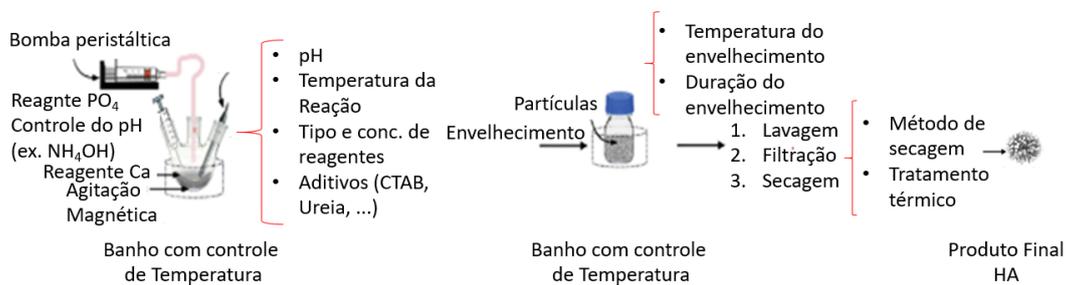
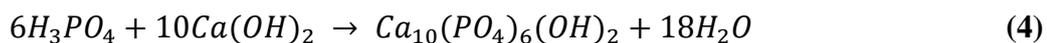


Figura 5. Síntese química de nanopartículas de HA por precipitação (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

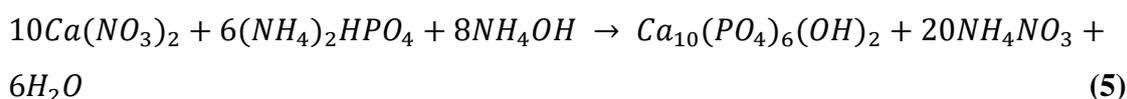
Podemos citar algumas variáveis, como: pH, temperatura de síntese e de calcinação, concentração molar dos reagentes, taxa de adição de reagentes, tempo de envelhecimento e a cinética de reação são os parâmetros críticos para a pureza e características cristalográficas do produto. Uma rápida precipitação durante a síntese pode conduzir a uma falta de homogeneidade química da HA. Sendo uma precipitação lenta preferível, pois o produto obtido é quimicamente mais homogêneo e estequiométrico. O pH é outro fator de grande influência na síntese de HA, sendo determinante na incorporação de grupos H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} a sua estrutura (GUASTALDI E APARECIDA, 2010). Os métodos comerciais empregados para obtenção de HA por precipitação são baseados nos métodos de Rathje e também no de Hayek e Newesely (HENCH E WILSON, 1993b).

O método de Rathje consiste em uma adição gota a gota de ácido fosfórico em uma suspensão sob agitação de hidróxido de cálcio (4):



O produto obtido é posteriormente filtrado, lavado, seco e moído até a formação de um pó fino. O grande atrativo desse processo de síntese está no subproduto de reação, água.

O método de Hayek e Newesely consiste na reação entre nitrato de cálcio e fosfato de amônio, empregando-se adição de hidróxido de amônio (NH₄OH) para aumentar o pH da reação (5):



Esse processo de síntese é sensível à concentração de cada um dos reagentes e a variações de pH. Deve-se fazer o controle de todos os parâmetros da síntese para obter-se uma HA que não sofra transformações em fases indesejáveis. A síntese por precipitação é bem vantajosa quando comparada a outras rotas de síntese, devido a sua simplicidade e baixo custo (RIGO, GEHRKE e CARBONARI, 2007). Normalmente, esse método pode ser combinado com outros métodos não convencionais e muito eficientes, ideais para a produção de nanopartículas de HA, como por exemplo síntese por micro-ondas.

Devido aos enormes avanços na técnica de micro-ondas (MW) como uma forma de aquecimento alternativo, tem ocorrido um contínuo interesse na utilização desse método em sínteses químicas. A preparação de HA via síntese por MW produz cristalitos de tamanhos homogêneos, além de um aumento na cristalinidade do pó de HA, porosidade e morfologia (FIHRI *et al.*, 2017). Na figura 6 temos as principais rotas de síntese por micro-ondas, que consiste na associação de vários métodos usados para preparação da HA e MW. Dois fatores de ativação contribuem para síntese MW: i) uma origem puramente térmica, resultando em agitação molecular causada pela inversão do dipolo com as alternâncias extremamente rápidas do campo elétrico (Figura 7), e ii) uma origem eletrostática, envolvendo interações como dipolo-dipolo entre as moléculas polares e o campo elétrico (HASSAN *et al.*, 2016). Esses fatores tem efeitos diretos na cinética química, através da diminuição da energia de ativação (FIHRI *ET AL.*, 2017; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

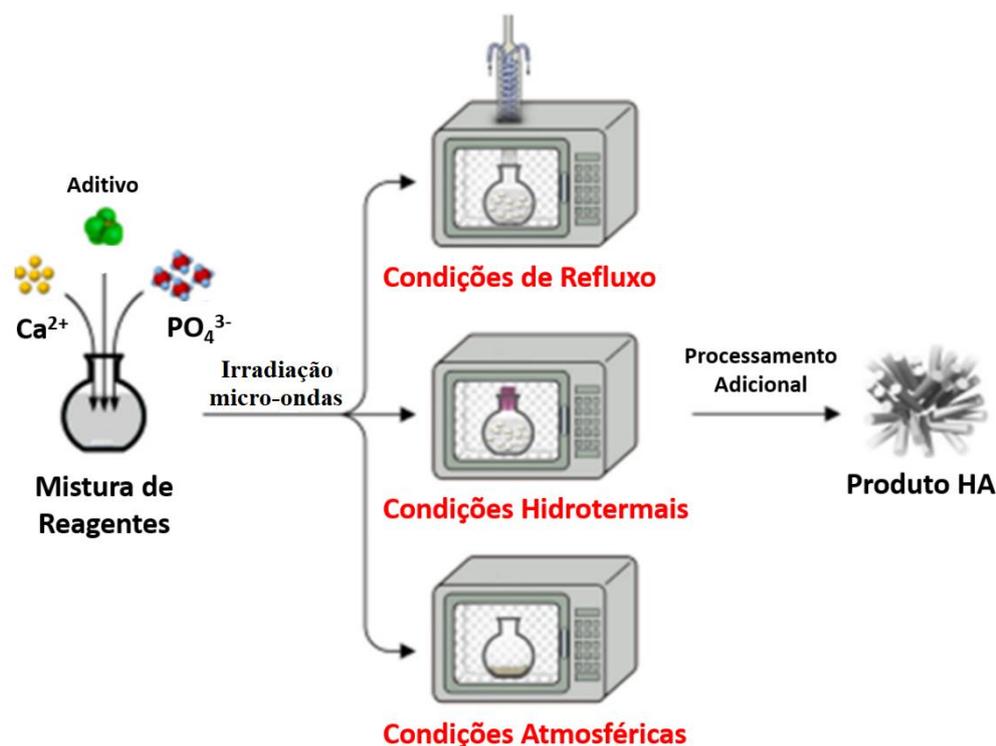


Figura 6. Principais rotas das sínteses por micro-ondas para preparação de HA (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013).

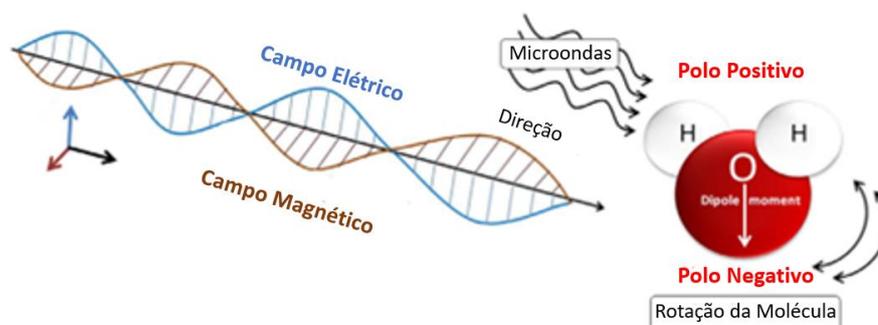


Figura 7. Interação de MW com uma molécula dielétrica (por exemplo, molécula da água) (HASSAN *et al.*, 2016).

O aquecimento por micro-ondas não possui grandes gradientes térmicos como aqueles observados em aquecimentos convencionais o que leva a reações eficientes e uniformes, apresenta um aumento rápido de temperatura, menor consumo de energia e maior qualidade e propriedades dos materiais sintetizados (FIHRI *et al.*, 2017; SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013). Deste modo, vários materiais nanoestruturados com base na HA foram preparados pelo método de síntese por micro-ondas na fase líquida, incluindo

nanopartículas e nanoestruturas compósitas para aplicações biomédicas (CAI *et al.*, 2015; PETCHSANG *et al.*, 2009; QI *et al.*, 2013; RAMYA *et al.*, 2014; SZCZE, HO E CHIBOWSKI, 2017).

3.4 Óxido de Manganês (Mn_3O_4)

O manganês pode formar uma grande gama de compostos solúveis e insolúveis. Este último inclui diversos minerais, como rodocrosita (carbonato), rodonita (silicato), alabandita (sulfetos) e vários óxidos metálicos. A figura 8 apresenta as condições de temperatura e pressão de oxigênio nas quais diferentes óxidos de manganês podem se formados com diferentes estados de oxidação. Dentre eles, o Mn_3O_4 tem despertado interesse em diversas aplicações por suas propriedades químicas e físicas.

O óxido de manganês (Mn_3O_4), também conhecido como hausmanita, apresenta uma estrutura espinélio, de grupo espacial $I4_1/amd$ ($Z = 4$) com uma distorção tetragonal devido à existência dos íons Mn^{3+} (BAYKAL *et al.*, 2010; VÁZQUEZ-OLMOS *et al.*, 2005). Os íons manganês são distribuídos em sítios tetraédricos (Mn^{2+}) e sítios octaédricos (Mn^{3+}) na célula unitária do Mn_3O_4 como mostrado na Figura 9.

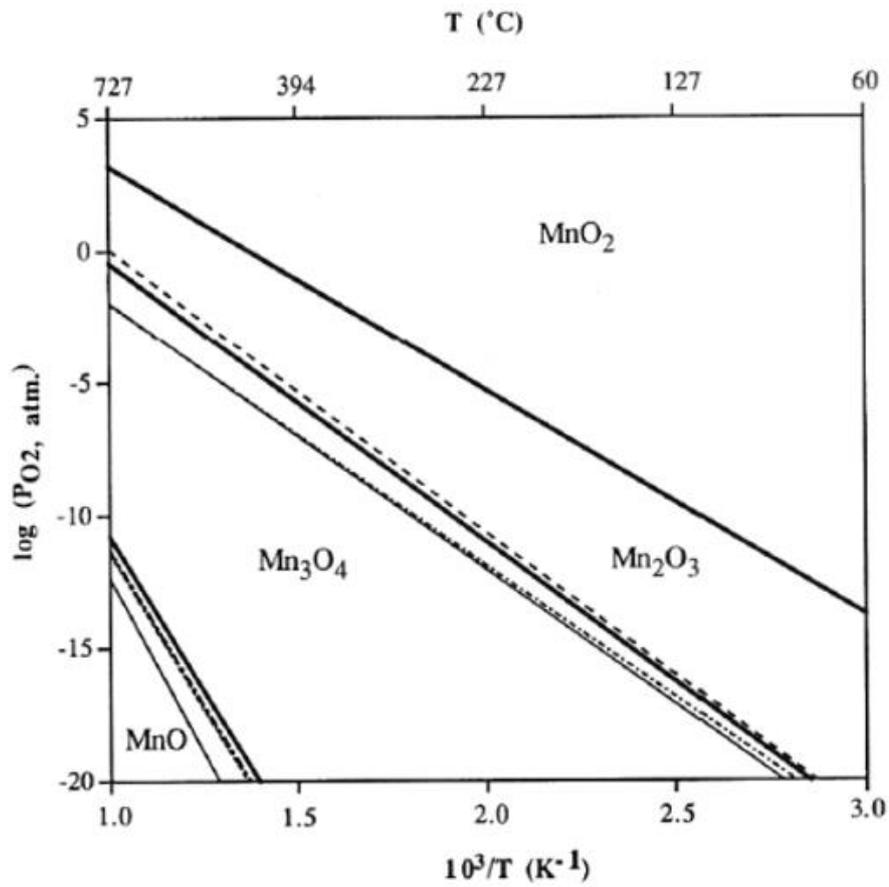


Figura 8. Diagrama de estabilidade de óxidos de manganês em função da temperatura e pressão parcial de oxigênio (DOUGLAS E MCDANIEL, 1994).

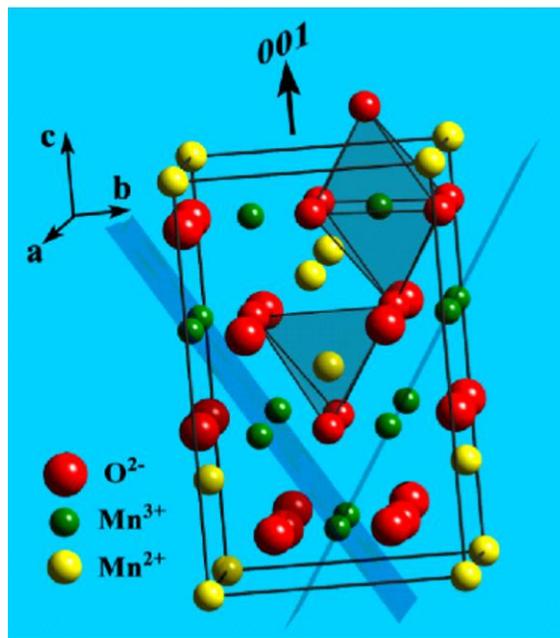


Figura 9. Célula unitária do óxido de Mn₃O₄ (VÁZQUEZ-OLMOS *et al.*, 2005).

3.5 Método Rietveld e Mapas de Densidade Eletrônica

A caracterização dos materiais dispõe de um método de refinamento estrutural, o Método Rietveld (MR), tal método tem dado enorme contribuição na definição de parâmetros da estrutura cristalina e as espécies atômicas que ocupam os sítios da rede e desse modo vem ajudando na compreensão das propriedades dos materiais (RIETVELD, 1967; RIETVELD, 1969). Primeiramente, o MR foi desenvolvido pelo físico holandês Hugo M. Rietveld usando dados de difração de nêutrons para refinamento de estruturas cristalinas, entretanto, a partir de 1977 o método foi utilizado para refinamento de difratogramas de raios X (KISI e HOWARD, 2008). O MR consiste em refinar os parâmetros estruturais da amostra a partir das linhas de difração de um DRX conhecido (Figura 10) (PAIVA-SANTOS, 2004; MCCUSKER *et al.*, 1999), utilizando um modelo de parâmetros no cálculo de um padrão de difração através das informações providas pelo operador. O refinamento pelo MR ocorre através da minimização do somatório dos quadrados das diferenças entre as intensidades calculadas e observadas, a partir de um modelamento matemático (método dos mínimos quadrados) (PAIVA-SANTOS, 2004). O parâmetro a ser minimizado é o resíduo R, que de acordo com a equação (6) é (ZHOU *et al.*, 2018; YOUNG, 1993):

$$R = \sum_i w_i (y_{i(obs)} - y_{i(calc)})^2 \quad (6)$$

onde w_i é o peso atribuído a cada intensidade, $y_{i(obs)}$ e $y_{i(calc)}$ são as intensidades observada e calculada para cada ponto do padrão de difração i (na escala 2θ).

De modo geral, durante o refinamento pelo MR, um grupo de parâmetros são calculados e refinados a partir dos difratogramas observados, sendo os principais (GOBBO, 2009; SANTOS, 2013): (a) fator de escala (correção de proporcionalidade entre o padrão de difração calculado e observado), (b) linha de base ou *background* (essa correção é realizada a partir dos dados do difratograma e da interpolação entre estes pontos), (c) perfil de pico (um grupo de equações analíticas na quais são modelados o perfil de pico, por diferentes tipos de funções Pseudo-Voigt, Pearson VII, Gaussian Lorentz e modificações da função de Lorentz), (d) fator de estrutura (fornece a intensidade dos picos de difração, bem como onde os picos devem aparecer no difratograma), (e) parâmetros de célula (a indexação dos picos no difratograma é realizada a partir dos

parâmetros de célula e a intensidade calculada), (f) orientação preferencial (correção de textura).

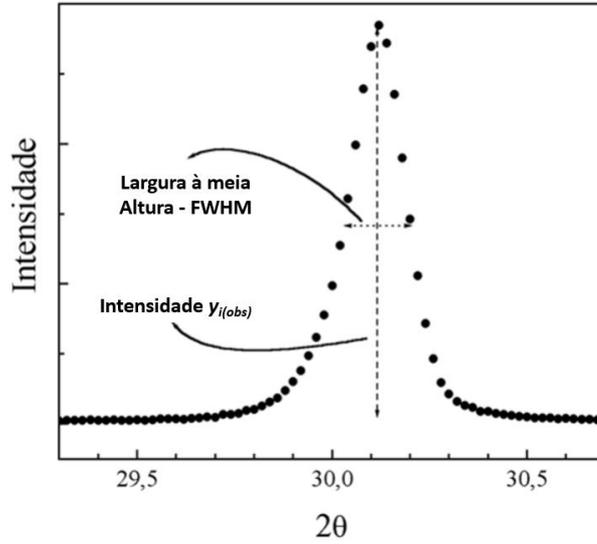


Figura 10. Pico difratado no raios X, mostrando a intensidade ($y_{i(obs)}$) e largura à meia altura (FWHM) (KINAST, 2000).

Sendo que, todos esses parâmetros devem ser levados em consideração na descrição analítica do difratograma de raios X.

Os parâmetros mais utilizados para avaliar o índice de concordância dos refinamentos são R_{wp} (*R-weighted pattern*) (7) e GoF (*goodness-of-fit*) (8) (McCUSKER *et al.*, 1999; ZHOU *et al.*, 2018):

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_{i(obs)} - y_{i(calc)})^2}{\sum_i w_i (y_{i(obs)})^2}} \quad (7)$$

$$GoF = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_{i(obs)} - y_{i(calc)})^2}{n-p}} \quad (8)$$

onde n é o número de pontos i , e p é o número de parâmetros refinados. Quanto menores os valores obtidos de R_{wp} e GoF melhor é a qualidade do refinamento. Valores de R_{wp} menores que 15 e GoF menores que 5 são valores de refinamentos aceitáveis (LALA *et al.*, 2016; FAHAMI *et al.*, 2017). Segundo YOUNG (1993) além dos critérios numéricos de R_{wp} e GoF , devem ser considerados os critérios gráficos do refinamento, representado pela diferença entre as curvas dos dados calculados e os dados observados e, de modo óbvio, o modelo refinado deve continuar aceitável do ponto de vista físico e químico.

Existem atualmente inúmeros programas computacionais dedicados à implementação do método de refinamento Rietveld, dentre esses programas destacam-se, devido ao seu uso na literatura o programa Fullprof (RODRÍGUEZ-CARVAJAL, 1993) e HighScore Plus, os mesmo utilizados nesse estudo. A Figura 11 mostra as interfaces dos respectivos programas. Os programas ajustam um difratograma obtido experimentalmente a um difratograma calculado segundo um padrão cristalográfico definido (utilizando-se arquivos com informações estruturais tipo CIF). GOBBO (2009) apresenta um fluxograma a ser seguido das etapas realizadas durante o refinamento pelo programa X'pert HighScore Plus (Figura 12).

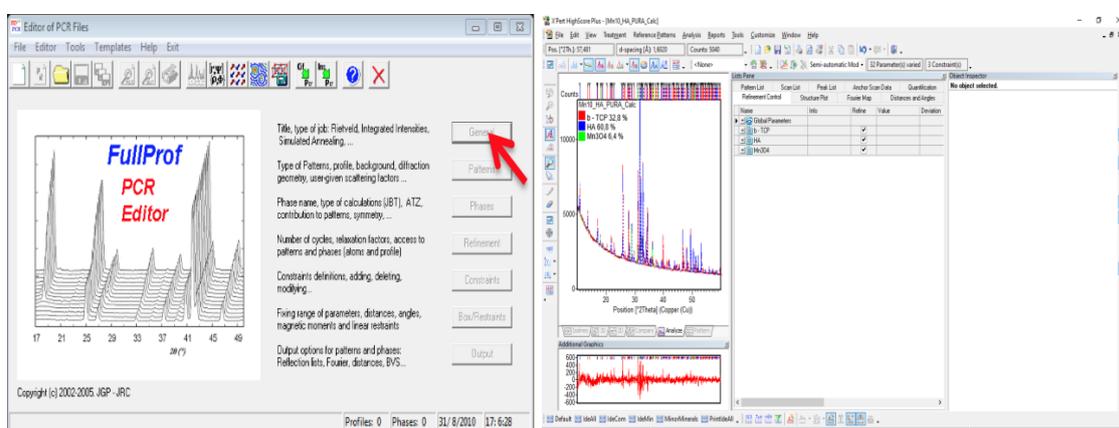


Figura 11. Interfaces dos programas. Fullprof e HighScore Plus.

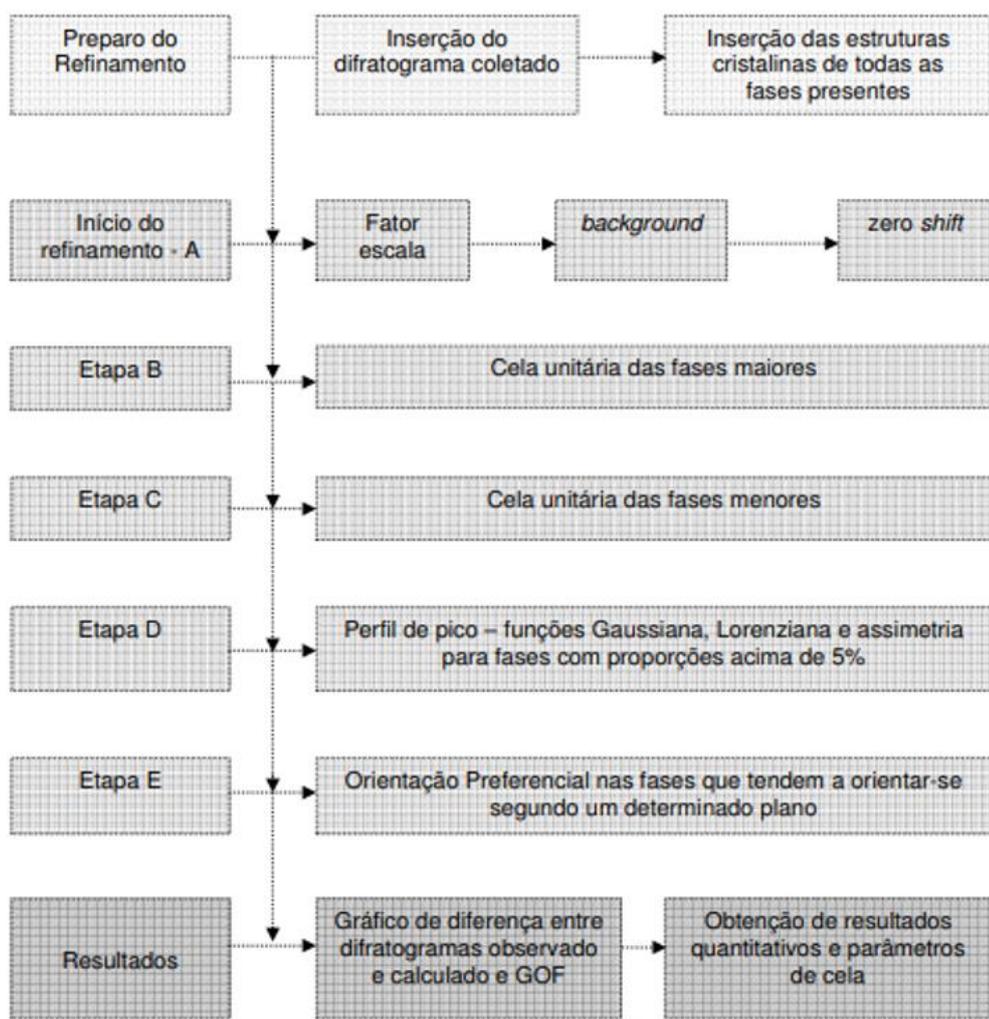


Figura 12. Fluxograma das etapas empregadas no refinamento pelo MR no programa X'pert HighScore Plus (GOBBO, 2009).

Vale salientar que para se obter um bom resultado de refinamento é necessário ter bons dados do padrão de difração além da experiência e capacidade do usuário para escolher uma sequência de parâmetros a serem refinados.

Como na estrutura da HA podemos ter substituintes iônicos nos seus sítios e esses por sua vez modificam além da estrutura da HA também suas propriedades físicas e químicas, se faz de suma importância a busca por compreensão das interações entre as espécies quando essas se distribuem ao longo das estruturas dos materiais (SPALDIN, CHEONG e RAMESH, 2010; BUFAIÇAL, 2006). O método Rietveld fornece subsídio para construção da estrutura e efeitos dos substituintes na estrutura do material, bem como o uso dos programas no refinamento da estrutura nos fornece informações sobre as interações entre espécies nas estruturas dos materiais através dos mapas de densidade eletrônica, estes são úteis na busca por uma melhor compreensão do ponto de vista

estrutural de quais posições são ocupadas pelos cátions e ânions no plano cristalográfico da célula unitária, bem como possíveis ocupações ou deslocamentos atômicos.

A Teoria de Ligação de Valência (TLV) nos diz que durante a formação das ligações químicas a camada de valência dos átomos é deformada e ocorrem mudanças nas densidade eletrônicas (ρ), enquanto as camadas mas internas permanecem inalteradas (SHRIVER e ATKINS, 2008). Desse modo, a densidade eletrônica ($\rho(r)$) total de um átomo pode ser descrita pela soma das densidades do núcleo e da camada de valência (9) (COPPENS, 1997; KORITSANSZKY, COPPENS, 2001).

A densidade eletrônica $\rho(x, y, z)$ numa posição (x, y, z) da célula unitária é dado por (9):

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l [F(hkl)] \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (9)$$

onde V é volume da célula unitária e $F(hkl)$ é o fator de estrutura de cada reflexão (hkl) (COPPENS, 1997; KORITSANSZKY, COPPENS, 2001).

Por meio da difratometria de raios X e refinamento Rietveld, pode-se calcular facilmente as densidades eletrônicas das estruturas analisadas a partir dos fatores de estrutura obtidos das fases analisadas. Assim, na difratometria de raios X, a densidade eletrônica é calculada matematicamente ao passo que na microscopia eletrônica de transmissão, as imagens de densidade eletrônica são obtidas diretamente pelo espalhamento dos elétrons nas nuvens eletrônicas dos átomos que compõem a fase.

O mapeamento das densidades eletrônicas ($\Delta\rho(r)$) obtidos dos refinamentos contém informações relevantes sobre a posição dos átomos e distâncias de ligação. A possibilidade de se subtrair os mapas de densidade eletrônica obtidos experimentalmente de uma fase do mapa calculado ou teórico da fase padrão, permite ainda que seja possível a avaliação detalhada da existência de defeitos pontuais (vacâncias, átomos substitucionais e intersticiais) nas fases. A Figura 13 mostra um típico mapa de Fourier da diferença de densidade eletrônica obtido via refinamento Rietveld para a fase Na_3PSe_4 no plano xy em $z = 0$.

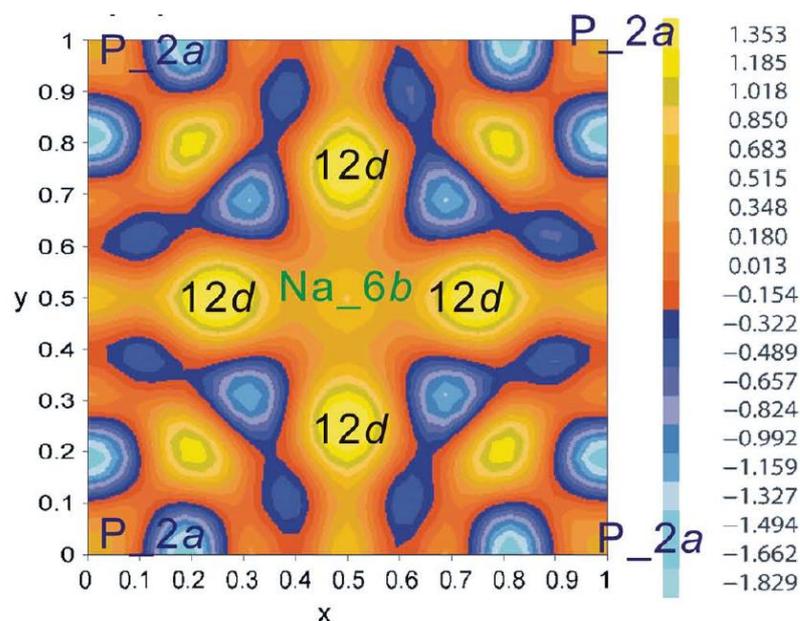


Figura 13. Mapa de Fourier da diferença de densidade eletrônica obtido via refinamento Rietveld para a fase Na_3PSe_4 no plano xy em $z = 0$ mostrando as posições de átomos de P e Na (ZHANG *et al.*, 2015).

Resíduos positivos de densidade eletrônica indicam que átomos mais pesados estão presentes nos sítios ou apenas a presença dos mesmos átomos deslocalizados das posições padrão na célula unitária. Da mesma forma, a existência de resíduos negativos indica que átomos estão ausentes naquela região ou foram deslocados, ou mesmo substituídos por átomos mais leves (de menores números atômicos). Portanto, na Figura 13, as regiões de densidade mais positivas ao redor do sítio do Na indicam a provável existência de átomos adicionais em difusão nessas posições, deslocalizados. Isso demonstra que os mapas de Fourier são de fundamental importância para o estudo detalhado de estruturas cristalinas e, principalmente, de dopagem e formação de defeitos pontuais.

3.6 Substituição De Cálcio Por Metais Em Apatitas

As propriedades biológicas e físico-química da hidroxiapatita podem ser melhoradas usando substituições catiônicas e aniônicas na rede da HA na tentativa de reproduzir com melhor precisão a química óssea, onde temos uma apatita não estequiométrica, constituída de substituintes catiônicos (Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+}) e aniônicos (CO_3^{2-} ou HPO_4^{2-}) (ANWAR E AKBAR, 2018) (Tabela 2). Mesmo pequenas

substituições demonstraram efeitos significativos na estabilidade térmica, solubilidade, respostas de osteoblastos e osteoclastos *in vitro*, regeneração e degradação óssea *in vivo*.

A inserção de Mn na HA induz a formação de cristais menores e imperfeitos, semelhantes aos cristais de uma bioapatita, que são mais reabsorvíveis e, portanto, mais biocompatíveis (MAYER, 2008). O Mn regula a remodelação óssea, com diminuição de síntese de matriz orgânica e retardamento da osteogênese endocondral sempre que existe (ŠUPOVÁ, 2015), deficiência desse elemento no corpo aumenta a possibilidade de anormalidades ósseas, como diminuição da espessura ou comprimento ósseo (MEDVECKÝ *et al.*, 2006). A importância do Mn no desenvolvimento e crescimento ósseo foi relatada pela primeira vez em 1936 (NATASHA, SOPYAN E ZURAIDA, 2008). A suplementação com Mn de ratas ovariectomizadas inibiu de forma eficaz a perda de massa óssea (BOANINI, GAZZANO E BIGI, 2010). RAMESH *et al.* (2007) relatou que o Mn atuou como aditivo de sinterização da hidroxiapatita e inibiu a formação de fase secundária como o CaO. Estudos realizados por PALUSZKIEWICZ *et al.* (2010) sobre HA contendo 1% e 5% em mol de Mn^{2+} , mostrou características estruturais de uma HA. Os resultados do DRX mostram que amostras contendo 5% de Mn sofre uma transformação de fase a 800°C para α -TCP, β -TCP e possuiu a formação de Mn_3O_4 como fase secundária. Após tratamento térmico a 1250°C toda HA foi decomposta para α -TCP confirmado por FTIR e Raman. Alguns trabalhos têm conduzido a considerações sobre aspectos ligados a outras formas de inclusão do manganês na estrutura da HA diferente de Mn (II). Em seu trabalho, Mayer *et al.* (MAYER *et al.*, 2008) tentaram analisar os possíveis estados de oxidação do manganês na estrutura de HA, no entanto concluíram apenas que boa parte dos átomos de Mn se encontrava na forma de Mn^{2+} , não descartando a possibilidade de mais estados de oxidação. Embora a HA substituída por Mn^{2+} não demonstre um desvio significativo da estrutura (LI, TECKNAM E PINGOOI, 2009), a superfície revestida com HA dopada com manganês exibiu resistência superior à corrosão sobre a superfície revestida com HA (HUANG *et al.*, 2013). Segundo MAYER *et al.* (2009) e SINGH *et al.* (2019) os íons Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} e Ni^{2+} podem substituir completamente o cálcio na posição Ca do β -TCP, entretanto a dopagem desses cátions nos sítios Ca^{2+} na HA não é possível de ser notada.

A obtenção de Mn_3O_4 em HA dopada com Mn coloca uma possibilidade de utilização desses sistemas em aplicações biomédicas. Nanopartículas baseadas em Mn surgiram como uma nova classe de materiais para imagens por ressonância magnética nuclear devido a sua capacidade de contraste. XIAO *et al.* (2013) demonstraram que

nanopartículas de Mn_3O_4 eram duas vezes mais eficientes que agentes de contrastes comerciais a base de gadolínio (Gd-DTPA). A Figura 14 demonstra a interação das nanopartículas com a água, as nanopartículas de Mn_3O_4 apresentam uma maior interação com a água, por possuir elétrons desemparelhados nos íons Mn^{2+} , justificando assim a eficiência superior das nanopartículas de Mn_3O_4 , sendo essa eficiência associada a capacidade de uma produção de imagem superior quando no organismo, pois pode melhor se relacionar com o meio. As nanopartículas de Mn_3O_4 foram sintetizadas por uma rota de sintética simples e verde, na qual foram produzidas nanopartículas com biocompatibilidade satisfatória tanto *in vitro* quanto *in vivo* tendo como base na toxicidade intrínseca do Mn.

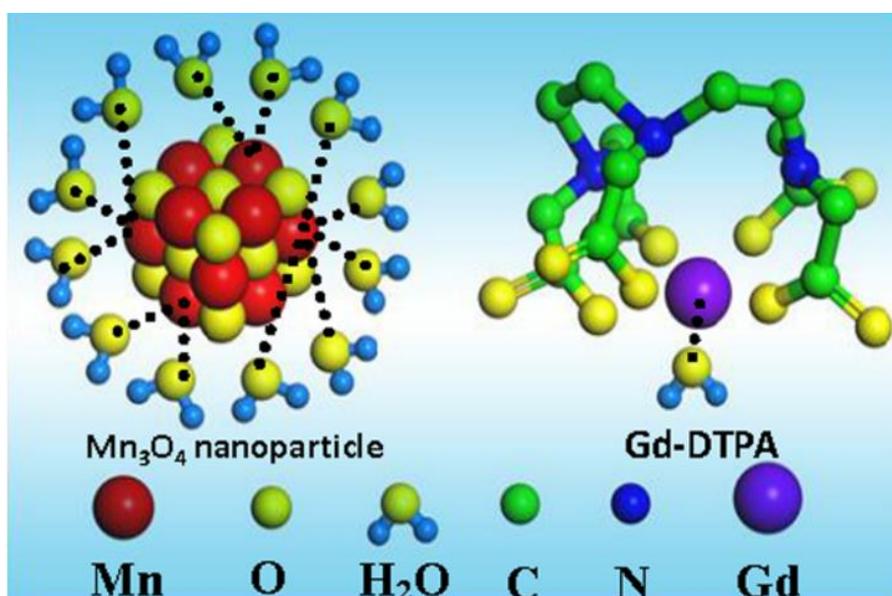
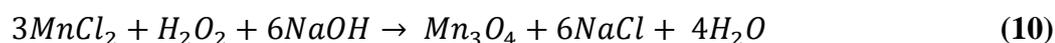


Figura 14. Esquema ilustrativo da interação entre o agente de contraste (Mn_3O_4 – lado esquerdo e Gd-DTPA – lado direito) e água (XIAO *et al.*, 2013).

CHEN *et al.* (2006) descreveu a síntese controlada para formação de nanocristais de hausmanita. Neste trabalho, os nanocristais de Mn_3O_4 foram preparados por um método de precipitação homogênea e foram formados monocristais incluindo nanopartículas, nanobastões e nanofractais. A reação de síntese pode ser descrita a seguir (10):



Onde $\text{NaOH}_{(aq)}$ foi gotejado em solução contendo os reagentes a 200°C . Para promover a precipitação dos nanocristais de Mn_3O_4 a solução foi suspensa por um período de 2 horas. Os resultados obtidos por CHEN *et al.* (2006) indicaram que as nanopartículas de Mn_3O_4 com estrutura tetragonal podem ser produzidas por meio de reações químicas envolvendo surfactantes e soluções alcalinas.

IQBAL *et al.* (2018) sintetizaram nanocompósitos $\text{Mn}_3\text{O}_4\text{-TiO}_2$ revestido de Pluronic® F-127 para aplicação como agente de contraste em RMN e em terapia fotodinâmica (TFD) para cânceres *in vivo e in vitro*. As nanopartículas se mostraram estáveis e eficientes na penetração do citoplasma e área perinucleares. Além disso, a utilização do TiO_2 um fotossensibilizador inorgânico permitiu a ablação de tumor por TFD *in vitro* e *in vivo* em baixa intensidade de radiação ultravioleta ($5,6 \text{ mW/cm}^2$), esses resultados corroboram para utilização do sistema em terapia para o tratamento de câncer.

Capítulo 4 – METODOLOGIA

4.1 SÍNTESES

4.1.1 Hidroxiapatita pura

Uma hidroxiapatita de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ foi sintetizada pelo método de precipitação em meio aquoso (MOREIRA *et al.*, 2016) via reação ácido-base realizadas no *Laboratório de Biomateriais* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais (DCEM) da UFS, conforme equação abaixo (11).



Uma solução de ácido fosfórico ($0,220 \text{ mol L}^{-1}$) foi gotejada sob uma taxa de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ em $0,334 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de cálcio sob agitação constante a 60°C (Figura 15). O pH foi mantido em 10 durante toda a síntese com adição de KOH. Após a adição completa dos reagentes, a suspensão foi envelhecida durante 20 min sob refluxo num forno de micro-ondas operando a 700 W e 2,5 GHz. O precipitado foi filtrado, lavado em água destilada até que o meio fosse neutro ($\text{pH} \sim 7$) e seco por 120°C durante 24 h.

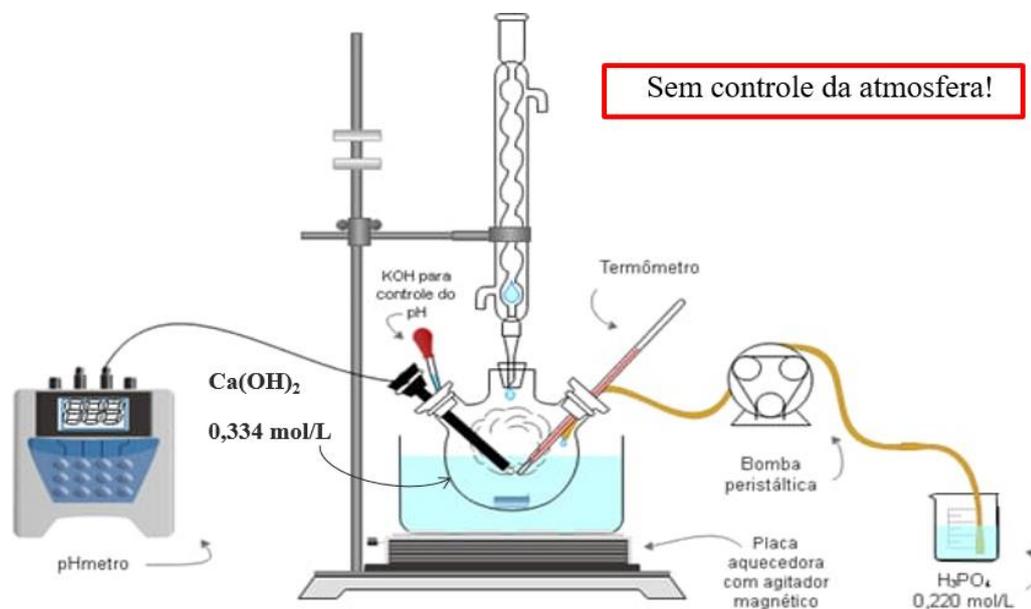


Figura 15. Arranjo experimental da síntese de hidroxiapatita: solução de H_3PO_4 foi gotejada sobre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre agitação, aquecimento e refluxo; o controle do pH do meio foi feito com adição de KOH, quando necessário.

O pó obtido foi triturado usando-se um almofariz de ágata e peneirado (malha de 180 μm), amostra intitulado de verde. Os reagentes utilizados tinham uma pureza superior a 98% e foram adquiridos da Sigma-Aldrich ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, KOH e H_3PO_4) e Neon ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$).

4.1.2 Hidroxiapatita contendo Mn^{2+}

As hidroxiapatitas contendo manganês foram sintetizadas segundo o protocolo descrito no item 4.1.1. A fonte de manganês utilizadas foi o nitrato de manganês II tetra-hidratado [$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$] o qual foi adicionado no ácido fosfórico para evitar oxidação durante a síntese, segundo as razões molares $[\text{M}^{x+}/(\text{M}^{x+}+\text{Ca}^{2+})] \times 100\%$: 0%, 5%, 10%, 15% e 20%. Um resumo de todo o esquema de síntese está inserido na Figura 16.

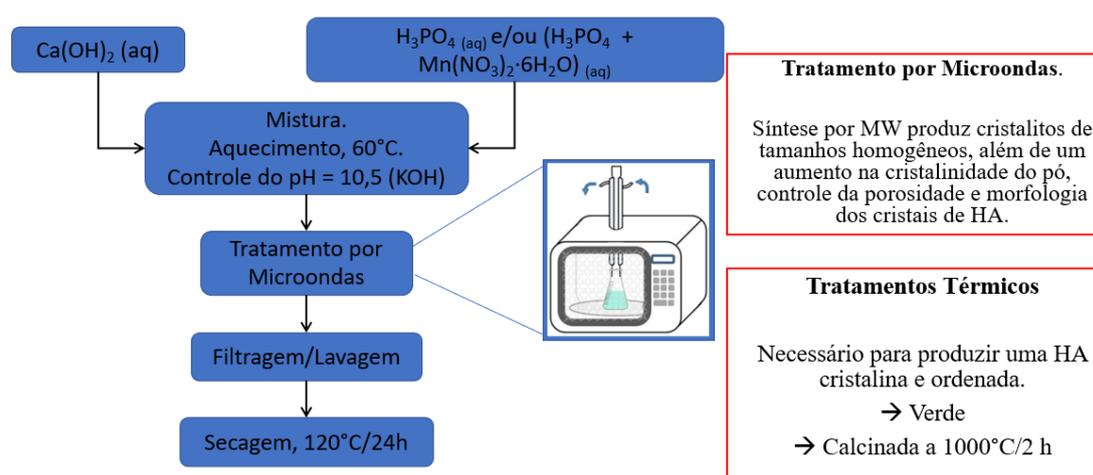


Figura 16. Fluxograma das etapas de síntese envolvida na preparação das hidroxiapatitas.

4.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

4.2.1 Tratamento Térmico

A estabilidade térmica das amostras obtidas foi avaliada através da calcinação de parte dos pós obtidos. As amostras foram submetidas a um tratamento térmico a 1000°C por 2 h sob uma taxa de aquecimento de aproximadamente 2°C min^{-1} , em forno sem controle de atmosfera.

4.2.2 Mecanismo de Segregação de Fase

A segregação da fase Mn_3O_4 da amostra de menor concentração de Mn (4,9%) foi estudada em diferentes temperaturas: 400, 600, 800 e 1000°C. As amostras foram aquecidas sob uma taxa de 2°C min⁻¹ e permaneceram apenas 5 min sob as temperaturas pretendidas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

4.3.1 Composição Elementar

Os elementos presentes em cada amostra e as suas concentrações foram medidos no *Laboratório de Técnicas de Raios X* (DCEM/UFS) utilizando fluorescência de raios X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF), utilizando um espectrômetro Bruker S8-Tiger 4 kW equipado com cristais LiF 200, PET, XS-5 e XS-C. Os pós obtidos foram submetidos diretamente às análises sob uma atmosfera de He. Uma curva de calibração foi estabelecida usando um pó padrão de hidroxiapatita (Ca/P = 1,67) moído homogeneamente em um aparato de moinho de bolas por 30 min a 350 rpm com diferentes concentrações de um pó padrão de MnO para análise das amostras contendo Mn.

4.3.2 Difractometria de Raios X

As amostras sintetizadas e após tratamento térmico foram analisadas por DRX. Os padrões de difração foram coletados em um difratômetro Empyrean PANalytical usando uma radiação de CuK_{α} (filtro de Ni) a 40 kV e 40 mA instalado no *Laboratório de Preparação e Materiais Magnéticos* da UFS (Campus Itabaiana). Os dados foram registrados a partir de $2\theta = 10^\circ$ a 60° com um passo de $0,013^\circ$ e um tempo de contagem de 2s. A estrutura cristalina foi resolvida e refinada usando o método de refinamento da estrutura Rietveld conforme implementado nos softwares Fullprof (versão 07/2017) (RODRÍGUEZ-CARVAJAL, 1993) e HighScore Plus. O refinamento foi conduzido a partir de estruturas padrão previamente conhecidas, obtidas em *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD). As estruturas utilizadas incluíram uma apatita de cálcio puro

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ICSD n° 151414), um óxido de manganês puro Mn_3O_4 (ICSD n° 68174) e um fosfato β -tricálcico puro $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ICSD n° 410782).

Linha de base (função polinomial com até 4 coeficientes), fator de escala, deslocamento de amostra, parâmetros de rede (a e c), perfil de pico (parâmetros Caglioti, assimetria e formato de pico) e orientação (função March-Dollase) foram refinados para calcular a diferença entre os mapas de Fourier observados e calculados ($F_{\text{obs}} - F_{\text{cal}}$). Somente para obtenção dos mapas de Fourier as ocupações dos sítios não foram refinadas, pois a intenção era evidenciar as diferenças entre o padrão de difração observado e o calculado. A diferença dos mapas de Fourier foram sobrepostas em um volume de 8 unidades de célula usando o software Vesta (MOMMA E IZUMI, 2008). O tamanho do cristalito e a tensão residual foram estimados a partir do refinamento de Rietveld considerando as mudanças nos parâmetros de Cagliotti (U e V) entre um perfil de instrumento padrão e as amostras.

A partir dos mapas de Fourier podemos extrair informações importantes das densidades eletrônicas dos átomos na estrutura cristalina da HA. Os mapas de Fourier são utilizados para inferir as principais perturbações ocorridas na vizinhança dos grupos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- da fase HA sintetizada.

4.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

As amostras sintetizadas e tratamento térmico foram analisadas por FTIR. As análises foram conduzidas em modo de absorvância de 4000 a 400 cm^{-1} (tamanho do passo de 1 cm^{-1}) usando um espectrômetro Varian (640-IR) instalado no *Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia* (LCNT-NUPEG/UFS). Para a realização das análises foi utilizado aproximadamente 10 mg dos pós sintetizados e 10 mg de KBr para formar uma pastilha. O intervalo entre 500 e 650 cm^{-1} foi usado para observar o comportamento dos grupos HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} e OH^- . A região entre 850-890 cm^{-1} foi usada para acompanhar a inserção dos grupos CO_3^{2-} nos sítios PO_4^{3-} e OH^- da fase de hidroxiapatita. As posições da banda de absorção foram baseadas no trabalho anterior de Eichert *et al.* (EICHERT, 2009).

Foi utilizado o método matemático de deconvolução com números de onda da literatura como guia para os grupos $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ e $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ (Tabela 3). O método foi utilizado para acompanhar a evolução de grupamentos apatíticos e possíveis substituições dos grupos PO_4^{3-} e OH^- por carbonatos ou espécies ácidas – HPO_4^{2-} (EICHERT, 2009;

ELLIOTT, 1994; FLEET, LIU E KING, 2004; LEORS, TAHERI, QUIROLOGICO, 1980; WOPENKA E PASTERIS, 2005). A deconvolução envolveu ajustes de curvas gaussianas utilizando o software OriginPro 2016.

Tabela 3. Principais grupos químicos presentes em apatitas nanocristalinas e seus modos vibracionais correspondentes no infravermelho (IR) (BRANGULE E GROSS, 2015).

Grupos Químicos	IR (cm⁻¹)
HPO ₄ ²⁻ não-apatítico	535
TCPPO ₄ ³⁻	550
HPO ₄ ²⁻ apatítico	551
v ₄ PO ₄ ³⁻	562, 575 e 603
HPO ₄ ²⁻ não-apatítico	617
v _L OH ⁻	632
v ₂ CO ₃ ²⁻ não-apatítico	866
v ₂ CO ₃ ²⁻ Tipo B	871
v ₂ CO ₃ ²⁻ Tipo A	880

4.2.4 XPS

A amostra contendo 4,9% de Mn e aquelas tratadas termicamente a 800°C/5 min e a 1000°C/2 h foi observada por foram analisadas por espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS). As análises foram realizadas em um espectrômetro Thermo Scientific ESCALab 250Xi usando uma fonte monocromática de raios-X Al K α . A energia de ligação foi calibrada com C 1s (284,8 eV) (QIAO *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). Os espectros Mn 2p_{3/2} foram deconvoluídos após a subtração da linha de base para calcular a área relativa sob as curvas correspondentes a Mn (II) (641,4 eV: MnO), Mn (III) (642,1 eV: Mn₂O₃) e Mn (IV) (642,9 eV: MnO₂) estados de oxidação (HUANG *et al.*, 2015; KILROY, DALLEK E ZAYKOSKI, 2002; MOSIAŁEK *et al.*, 2011; TÖPFER *et al.*, 1992).

4.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A amostra contendo 4,9% de Mn e calcinada a 1000°C/2 h foi observada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico JEOL JEM-2100F (*Centro Brasileiro de Pesquisa em Física - Brasil*) e em um microscópio eletrônico JEOL JEM-ARM200CF (*Universidade de Illinois em Chicago - EUA*) corrigido por aberração, ambos equipados com um canhão de emissão de campo (FEG) e operando a 200 kV. A composição elementar em diferentes regiões dos aglomerados de cristal foi obtida por espectroscopia de energia dispersiva por raios X (EDS).

O tamanho médio dos cristais de Mn₃O₄ foi estimado através do tratamento de imagens usando o software Image J. O diâmetro médio foi obtido a partir de 27 cristais distintos em 5 imagens.

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

4.3.1 Teste de Citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada através do método colorimétrico do MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio]*}. Nesse ensaio, o MTT é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, transformando-se de um composto de coloração amarela, em cristais de formazan {*E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-1,3-difenilformazan*} de coloração violeta e insolúveis em água. Para a leitura do resultado, o formazan produzido foi dissolvido em isopropanol acidificado. A clivagem do MTT fornece parâmetros de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que este é clivado por todas as células vivas, metabolicamente ativas, com exceção de eritrócitos.

Células de osteossarcoma humano da linhagem MG-63, cedidos pela Universidade Federal Fluminense do Rio de Janeiro, foram utilizados para avaliar a citotoxicidade *in vitro* das amostras na Sala de Cultura de Células do *Laboratório de Biomateriais* do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS. As células foram cultivadas em meio de cultivo (DMEM) (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de L-glutamina e 1% penicilina/estreptomicina. As células

foram expandidas em atmosfera umidificada (37°C e 5% de CO₂) em incubadora (LS Logen).

Com a finalidade de eliminar todos os microrganismos das amostras, evitando interferências nas análises biológicas, as pastilhas de HA, HA contendo 4.9% Mn e contendo 6.0% Fe foram esterilizadas em estufa a 180°C durante 120 minutos, antes da sua efetiva utilização nos ensaios celulares (KIDO, 2015).

Inicialmente, as amostras sem inserção do Mn e contendo 4,9% de Mn foram alocadas em placas de cultura de 24 poços e expostas a 1000 µL de meio de cultura suplementado por um período de durante 2 horas para adesão das proteínas e aclimação das amostras. Posteriormente o meio foi retirado e cerca de 10⁵ células suspensas em 20 µL de meio de cultura foram inoculadas no centro do material e em poços vazios para servirem de controle. Trinta minutos após a inoculação adicionou-se 1000 µL de meio de cultura em cada um dos poços, e as placas de cultura foram então incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi removido, e adicionado 500 µL de MTT (Sigma-Aldrich). As amostras foram recolocadas na incubadora por 3 horas, tempo previsto para o MTT ser clivado. Na sequência, o MTT foi removido e 500 µL de isopropanol acidificado (HCl a 0,3% de isopropanol) foi adicionado, por um período de 10 minutos para a dissolução dos cristais de formazan. A leitura da absorbância foi feita em um leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Reade) com um filtro de 570 nm. Como controle positivo (citotóxico) do experimento, células foram inoculadas diretamente na placa e posteriormente adicionou-se uma solução de 100% de Triton X-100 e como o controle negativo (não citotóxico) células foram inoculadas na placa com adição de DMEM (LUPU E POPESCU, 2013; YANG *et al.*, 2015).

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão. A significância estatística dos dados obtidos foi avaliada através de análise de variância ANOVA seguido de correção por teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar os grupos. A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição Elementar

Os elementos presentes nas amostras foram quantificados por WDXRF (Tabela 4). A concentração de cálcio (Ca) diminui com o aumento da concentração de Mn adicionado, enquanto a concentração de fósforo (P) teve uma leve diminuição em comparação com a amostra sem Mn. As razões Ca/P calculadas para as HAs substituídas por manganês (Mn) estiveram abaixo da razão estequiométrica de 1,67, independentemente da concentração de Mn, indicando a formação de uma HA deficiente de Ca. Sendo essa deficiência de Ca geralmente causada pela entrada de outras espécies químicas na estrutura da hidroxiapatita durante a síntese (por exemplo, fosfatos mais ácidos (HPO_4^{2-}) e/ou íons carbonatos (CO_3^{2-})). No entanto, a relação (Ca+M)/P foi superior a 1,67 para todas as amostras contendo Mn, indicando excesso de cátions ou falta de grupos PO_4^{3-} . A concentração relativa (% M experimental) de Mn, isto é, a razão $\text{M}/(\text{M}+\text{Ca})$, calculada para as amostras obtidas, foi ligeiramente diferente daquela calculada para a síntese, especialmente para as maiores concentrações de Mn. Isso significa que, durante o processo de síntese parte do Mn adicionado foi lixiviado durante os processos de lavagem.

Tabela 4. Quantidades relativas (% em mol) de Ca, P e Mn nas amostras medidas por WDXRF. As relações Ca/P, (Ca+M)/P e M/(M+Ca) são informadas para cada condição.

% Mn (Teórico)	% Mn (Experimental) Mn/(Mn+Ca)	Ca	P	Mn	Ca/P	(Ca+Mn)/P
0%	0.0%	61.9	38.1	0.0	1.62	1.62
5%	4.9%	60.3	36.6	3.1	1.65	1.73
10%	9.3%	58.6	35.5	6.0	1.65	1.82
15%	13.9%	56.4	34.5	9.1	1.63	1.90
20%	16.7%	54.5	34.5	10.9	1.58	1.90

5.2 Composição de Fases e Segregação de Mn₃O₄

Os resultados obtidos por DRX das amostras pura e contendo Mn (Figura 17) confirmaram a presença de uma única fase de HA com baixa cristalinidade, o que foi evidenciado pelo alargamento dos picos característicos da fase HA especialmente nas amostras com concentrações crescentes de Mn. Se levarmos em conta que nenhuma outra fase foi observada, podemos sugerir que a quantidade de átomos de Mn determinada por WDXRF foi inserida na estrutura da HA. Normalmente as apatitas sintetizadas em meio aquoso (sem tratamento térmico) são constituídas de uma camada hidratada estruturada contendo grupos iônicos móveis facilmente permutáveis (Ca^{2+} , OH^- e PO_4^{3-}), pouco cristalinas e, geralmente, não estequiométricas (KANNAN *et al.*, 2011).

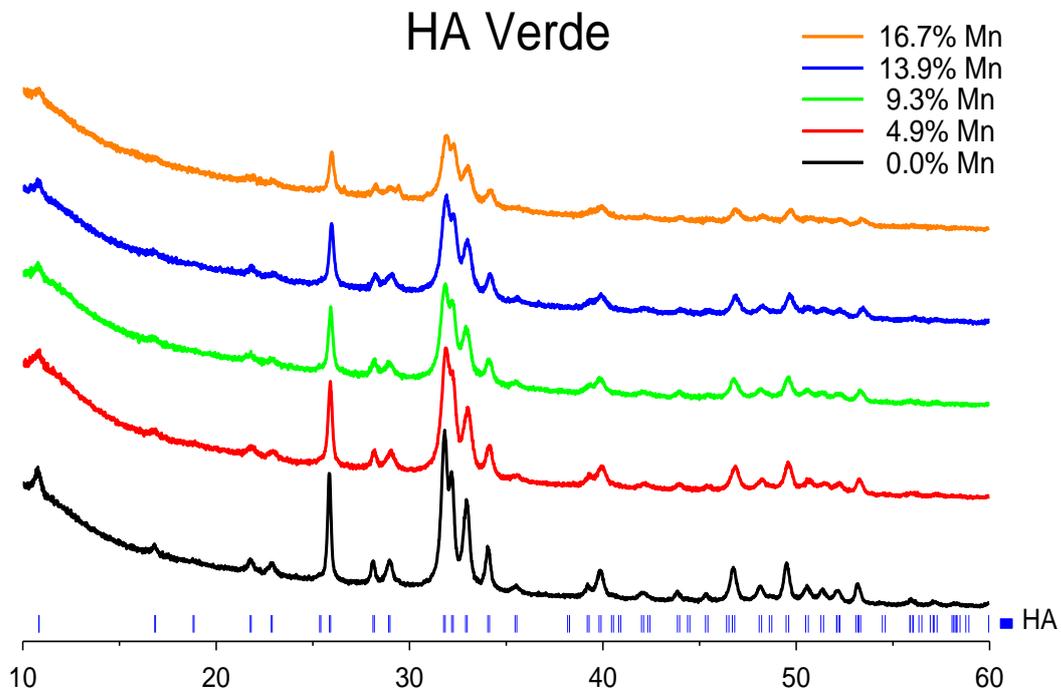


Figura 17. Difratogramas de raios X obtidos das amostras verdes para concentrações crescentes de Mn. As reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostradas abaixo.

Observou-se também que o aumento da concentração de Mn nas amostras levou à uma diminuição gradual da concentração de Ca e como dito antes, um alargamento dos picos principais da HA, o que indica uma perturbação da rede cristalina da HA. De fato, a inserção de Mn na estrutura da HA causa uma desordem atômica pronunciada sendo verificada pelo aumento gradual das tensões residuais e a formação de pequenos

tamanhos de cristalito (menores que 50 nm para todas as amostras sintetizadas) (Figura 18), tais dados foram estimados a partir do refinamento Rietveld (Figura 22-26).

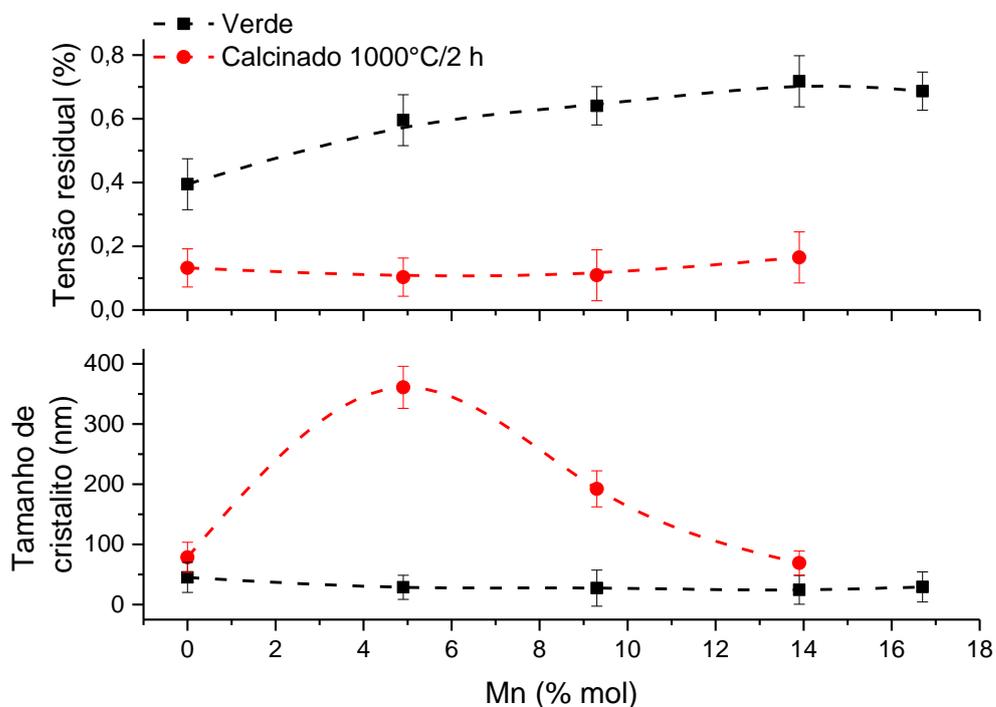


Figura 18. Tensões residuais e tamanhos de cristalitos calculados para a fase HA em função do aumento da concentração de Mn via refinamento de Rietveld.

A HA muitas vezes será utilizada em reparos ósseos que necessitam de uma certa resistência mecânica, tal resistência pode ser adquirida através de tratamentos térmicos da HA. Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das amostras foram realizados tratamentos térmicos a 1000°C/2 h. Desse modo, observou-se que a calcinação promoveu um relaxamento da rede uma vez que as tensões residuais são diminuídas (Figura 18), além de que, a calcinação promoveu um aumento dos tamanhos de cristalito, principalmente nas amostras contendo 4,9% de Mn. Outro efeito evidente do tratamento térmico foi o reflexo nas transformações de fases das amostras (Figura 19). Tais dados foram adquiridos dos refinamentos Rietveld das amostras após tratamento térmico 1000°C/2 h (Figura 27-31). Somente a amostra sem inserção de Mn (0,0% de Mn) não sofreu transformações após a calcinação. Para todas as amostras contendo Mn, a transformação de fase produziu óxido de manganês (Mn_3O_4) (Figura 20). Apesar da possibilidade de ocupação dos sítios de Ca da HA, o Mn apresenta alta afinidade pelo

oxigênio durante aquecimento (Figura 8) e o tratamento térmico evidenciou tal efeito. As transições sofridas pelo Mn durante o tratamento térmico são mostradas abaixo (12) (MOREIRA *et al.*, 2016).



Como o tratamento térmico aconteceu a 1000°C/2 h, foi fornecida temperatura suficiente para ocorrer a segregação do Mn₃O₄ (MAYER, 2008; MOREIRA *et al.*, 2016). O aumento da concentração de Mn produziu um aumento constante da concentração de Mn₃O₄. Acima de 4,9% de Mn, também foi verificada a transformação da HA em β-TCP (Figura 19 e 20). Conforme o diagrama de fases da Figura 21, onde está relacionado razão Ca/P e temperatura com fases de HA, a linha em vermelho mostra a temperatura e razões Ca/P próximas as obtidas nesse trabalho, através disso podemos entender porque HA sofreu transformação em β-TCP e possíveis óxidos produzidos durante os tratamentos térmicos (Figura 20). A quantidade de β-TCP também aumentou com o aumento da concentração de Mn, visto que a inserção de Mn causou aumento da desordem da rede da HA (Figura 18). Para a maior concentração de Mn (16,7% de Mn), toda a HA foi transformada em β-TCP e Mn₃O₄. Como em 16,7% de Mn a fase HA não foi mais observada nas amostras, o tamanho do cristalito e as tensões residuais (Figura 18) não foram calculados para essa concentração específica.

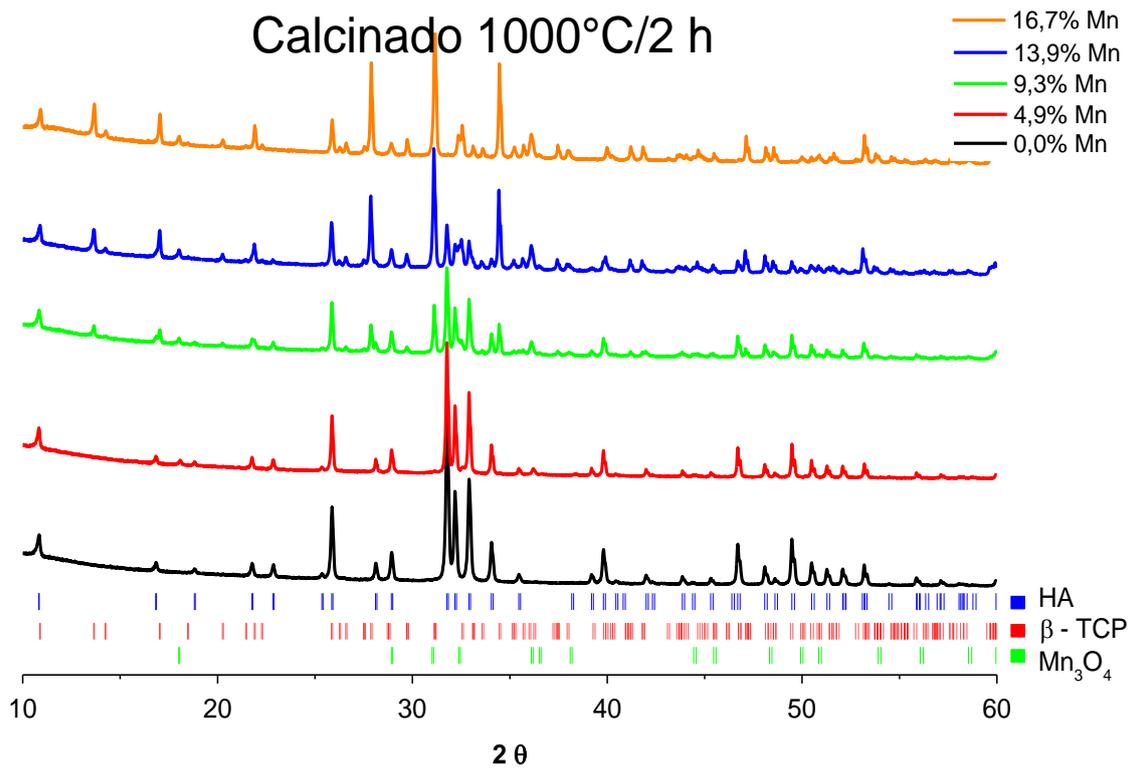


Figura 19. Difratoigramas de raios X obtidos das amostras calcinadas a 1000°C/2 h para concentrações crescentes de Mn. As reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo das curvas.

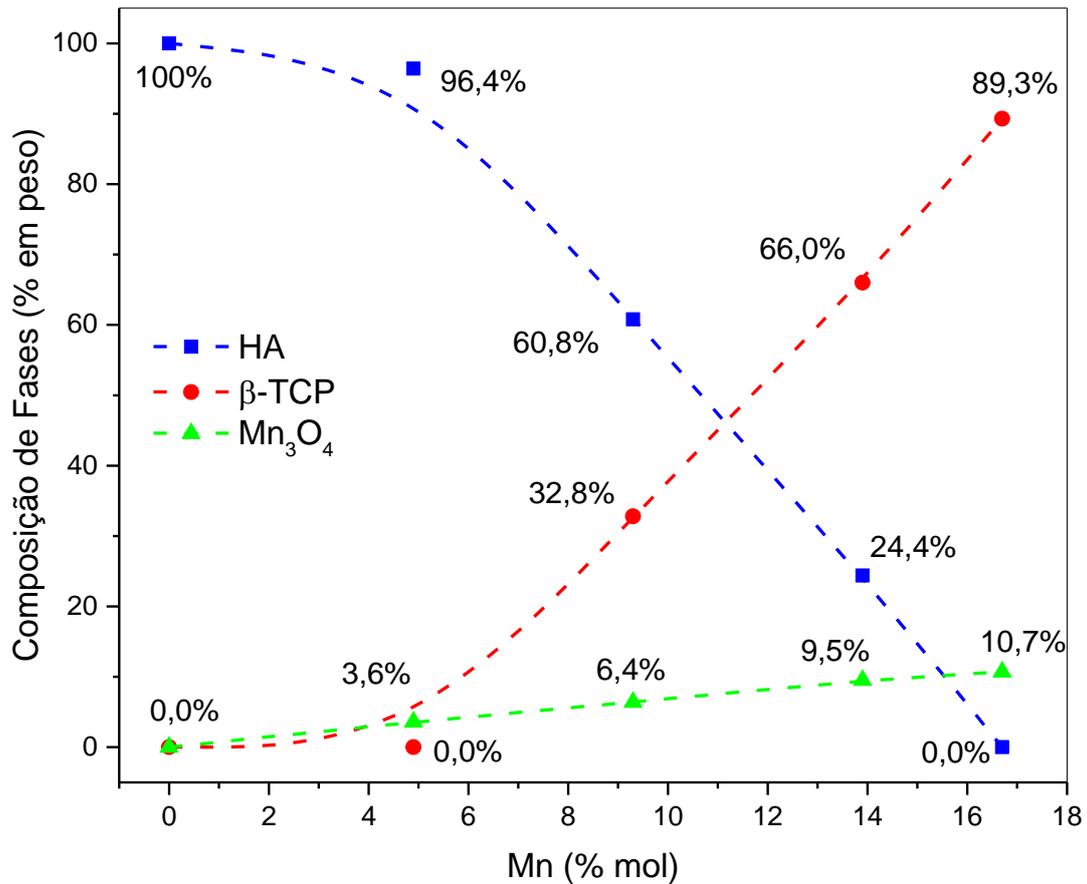


Figure 20. Composição de fases das amostras após calcinação a 1000°C/2 h para diferentes concentrações de Mn.

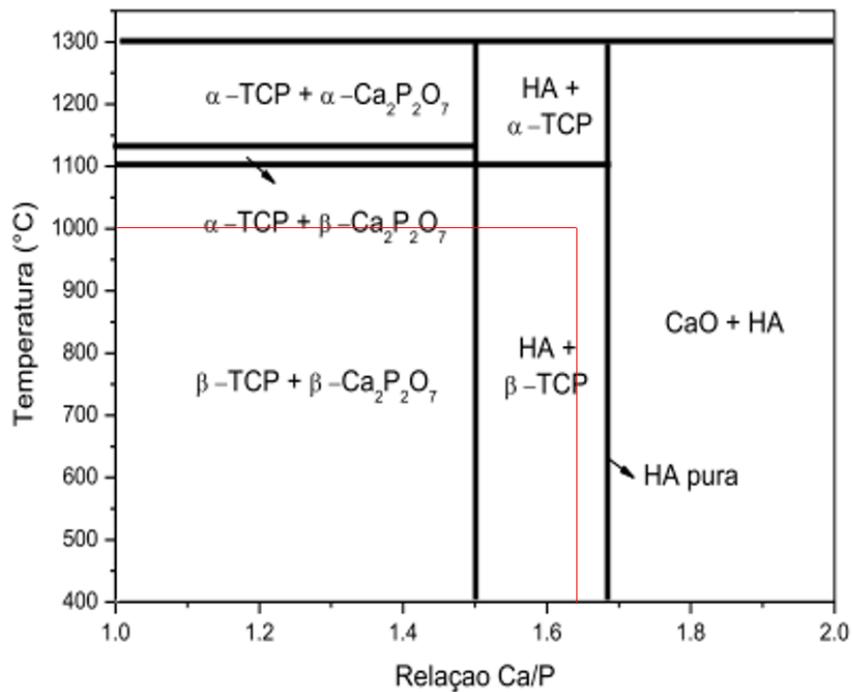


Figura 21. Diagrama de fases de fosfatos de cálcio e suas transformações em função da temperatura e razão Ca/P (SILVA, 2019).

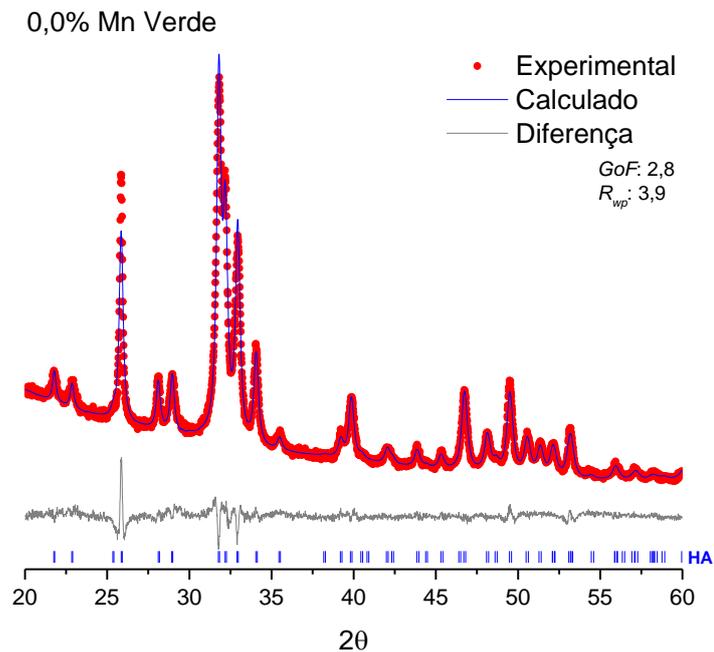


Figura 22. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 0,0% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

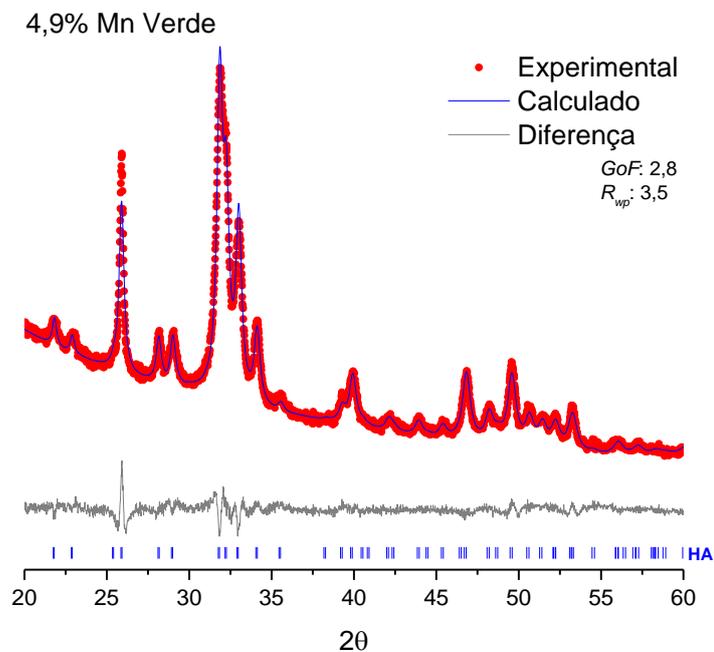


Figura 23. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde

contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

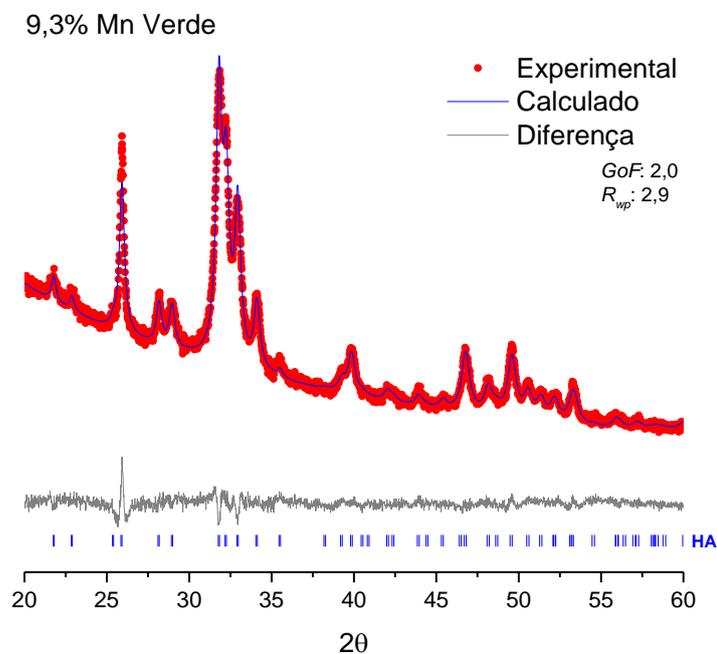


Figura 24. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 9,3% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

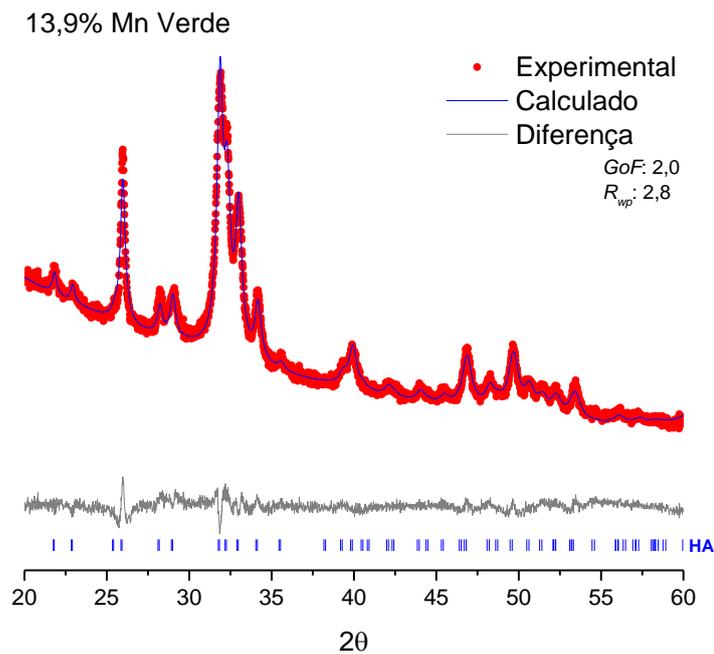


Figura 25. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde contendo 13,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

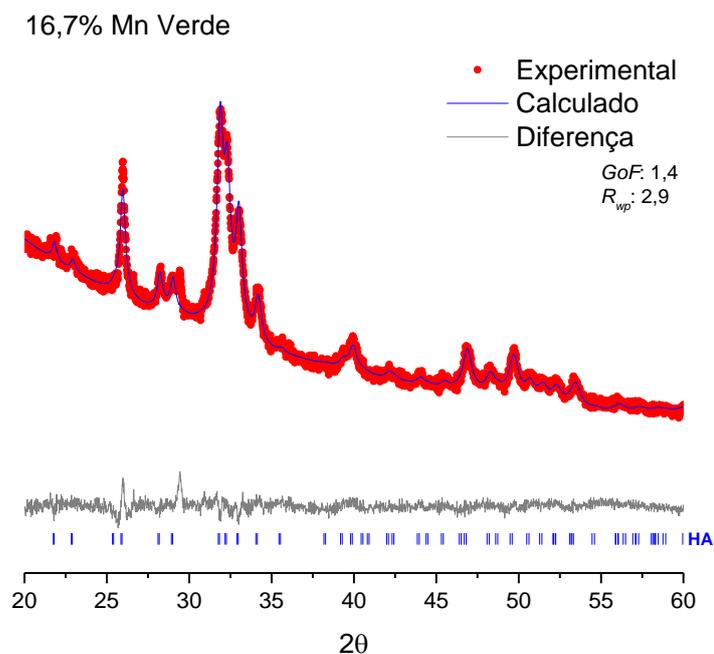


Figura 26. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra verde

contendo 16,7% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

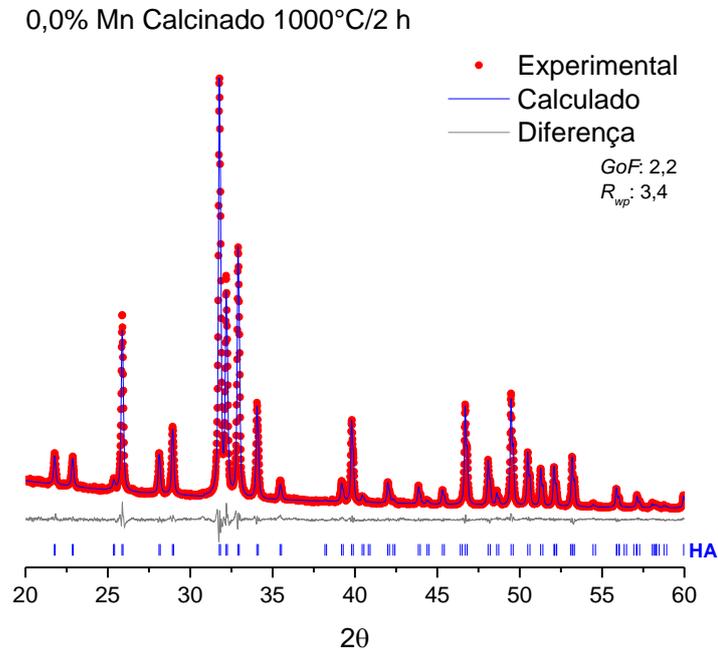


Figura 27. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 0,0% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

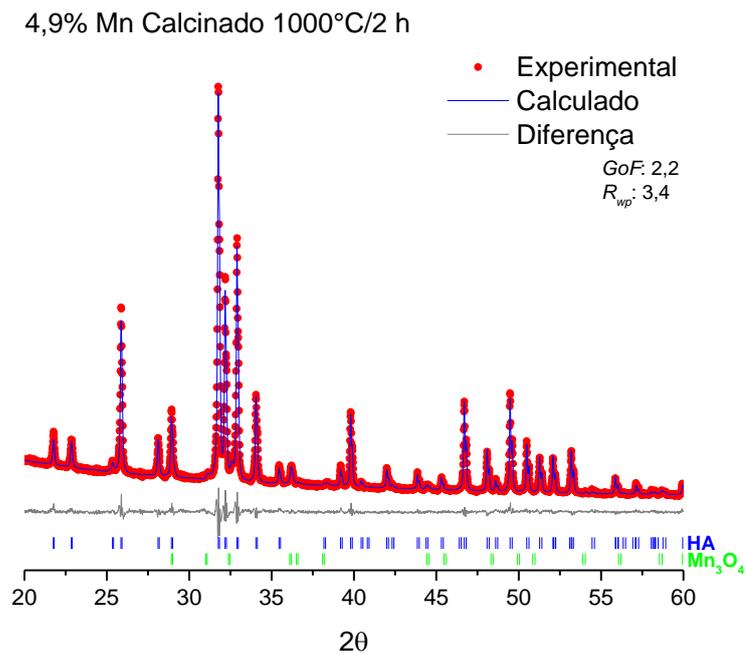


Figura 28. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

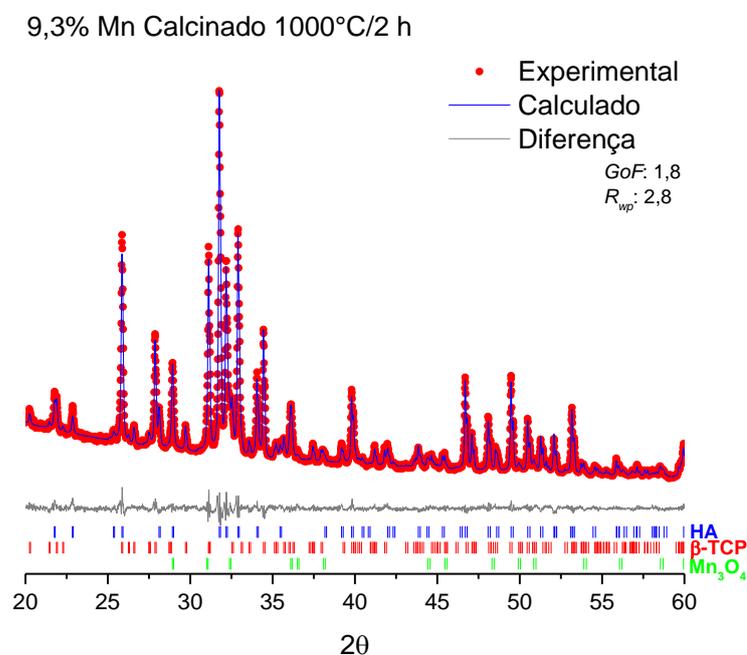


Figura 29. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 9,3% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase

encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

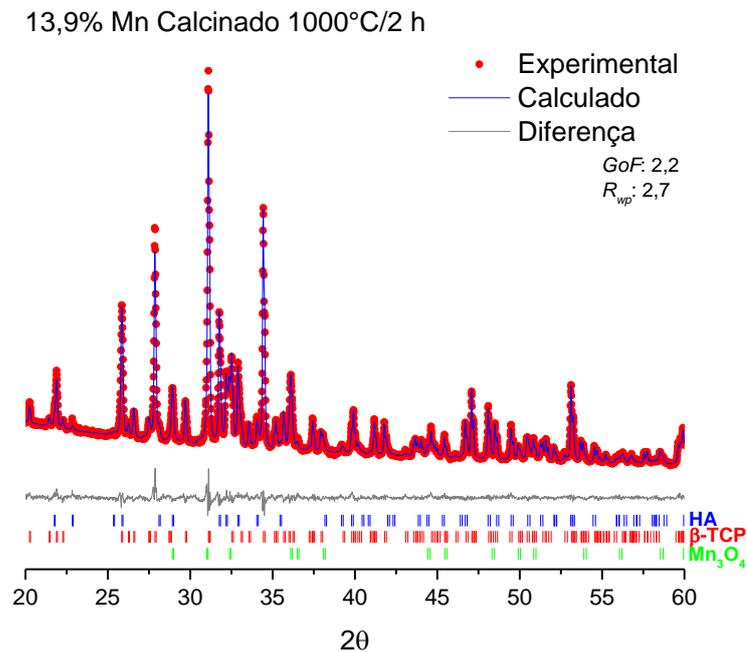


Figura 30. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 13,9% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

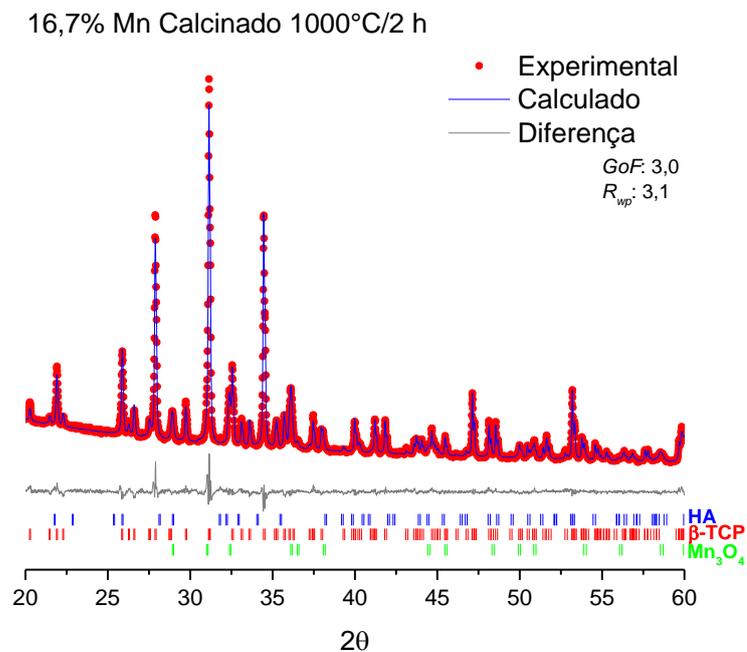


Figura 31. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra calcinadas a 1000°C/2 h contendo 16,7% de Mn (círculos vermelhos) e dados calculados a partir do

refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

5.3 Estrutura Cristalina

A Figura 32 permite uma análise da evolução dos parâmetros de rede e volume da célula unitária das amostras com aumento da concentração de Mn, os valores foram obtidos através do refinamento Rietveld (Figura 22-31). Em geral, os parâmetros de rede (a e c) e volume de célula unitária da HA das amostras verdes diminuíram com o aumento de Mn (Figura 32). O eixo a e o volume da célula unitária foram menos perturbados, entretanto, o eixo c foi muito sensível à quantidade de Mn, apresentando um decréscimo quase linear com o aumento da concentração de Mn. MAYER *et al.* (2008) não observaram efeito aparente do Mn nos parâmetros de rede da hidroxiapatita para concentrações entre 0,14 e 1,08%. Os resultados de PALUSZKIEWICZ *et al.* (2010) mostraram um leve decréscimo do eixo c para hidroxiapatitas contendo entre 0 e 5% em peso de Mn após a calcinação a 800°C. Eles também mostraram um aumento evidente no volume da unidade celular para as amostras, especialmente para as amostras tratamento térmico a 1250°C. Eles atribuíram esse aumento à inserção de Mn nos sítios PO_4^{3-} sob a forma de MnO_4^{3-} .

Após a calcinação, a presença de 4,9% de Mn reduziu os parâmetros de rede em relação à HA pura. No entanto, a partir de 9,3% de Mn, os parâmetros aumentaram novamente, atingindo valores superiores aos observados para a hidroxiapatita pura. Em 16,9% do Mn, apenas a fase β -TCP foi observada, o que impossibilitou o cálculo dos parâmetros da rede de hidroxiapatita. Enquanto o Ca^{2+} possui um raio iônico de aproximadamente 1,00 Å nas coordenações octaédricas, o Mn^{2+} pode ter raios iônicos distintos de 0,67 Å e 0,83 Å para o mesmo número de coordenação nas ligações de *spin* baixo e alto (RENAUDIN, GOMES E NEDELEC, 2017a), respectivamente. O Mn^{3+} apresenta raios iônicos ainda menores para o mesmo número de coordenação (0,58 Å e 0,64 Å em ligações de *spin* baixo e alto, respectivamente). Por conseguinte, espera-se que a inserção de Mn numa estrutura de fosfato de cálcio induza uma diminuição dos parâmetros de rede. De fato, LEORS *et al.* (1980) demonstraram que o Mn tende a diminuir o volume da célula unitária das apatitas. Outros trabalhos MAYER *et al.* (2006) e MOREIRA *et al.* (2016) também demonstraram que a inserção de Mn^{2+} na estrutura β -TCP levou a uma diminuição dos parâmetros de rede. KANDORI *et al.* (2018) e

KANDORI E YAMAGUCHI (2017) sintetizaram uma série de hidroxiapatitas contendo Mn em condições similares às utilizadas em nosso trabalho e encontraram uma diminuição dos parâmetros de rede com a concentração de Mn. Seus resultados também demonstraram que a diminuição do eixo *c* foi muito mais pronunciada do que a observada para o eixo *a*, exatamente como observado nesse trabalho.

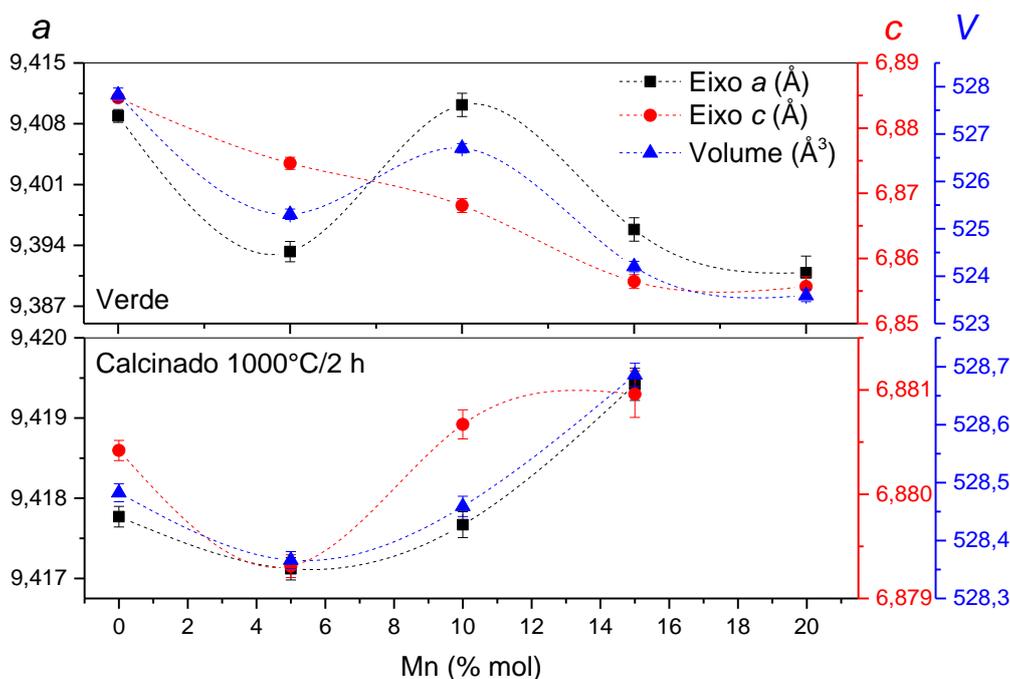


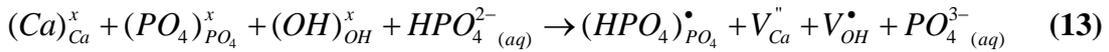
Figura 32. Parâmetros de rede (eixos *a* e *c*) e volume de unidade celular (*V*) calculados a partir da fase de hidroxiapatita verde e calcinada a 1000°C/2 h, através do refinamento de Rietveld para as amostras com aumento da concentração de Mn.

5.4 Ocupação dos Sítios da HA

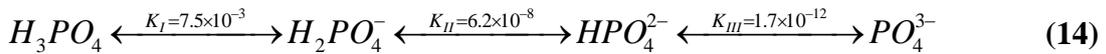
5.4.1 Evolução dos Grupos OH⁻, PO₄³⁻ e CO₃²⁻

Os resultados de FTIR demonstraram que as bandas de absorção em 632 cm⁻¹ associadas ao modo vibracional dos grupos hidroxila ($\nu_{\text{L}}\text{OH}^-$) foram reduzidas com o aumento da concentração de Mn mesmo nas amostras verdes, contudo tal observação fica mais evidente após a calcinação (Figura 33). As bandas de absorção relativas aos grupos PO₄³⁻ da hidroxiapatita têm três modos de estiramento assimétricos - ν_4 para as ligações O-P-O, aparecendo em 565, 571 e 602 cm⁻¹ (Figura 33). Com o aumento da concentração

do Mn pode-se verificar o alargamento e redução de intensidade dessas bandas de absorção. As características das bandas de absorção dos grupos HPO_4^{2-} foram observadas como ombros em torno de 551 cm^{-1} para as amostras verdes, que diminuíram com o aumento da concentração de Mn. Como mencionado anteriormente nossas amostras de HA são cálcio deficiente, essa deficiência de Ca é geralmente causada pela entrada de H_2O , de fosfatos mais ácidos (HPO_4^{2-}) e/ou íons carbonatos (CO_3^{2-}) na estrutura da hidroxiapatita durante a síntese. De fato, os espectros de FTIR (Figura 33 e 34a) obtidos na região entre $680 - 520 \text{ cm}^{-1}$ ν_4 dos fosfatos revelou a presença de HPO_4^{2-} apatítico nas amostras verdes. As deconvoluções dos espectros na região do $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ (Figura 33) exibem sobreposições das bandas de grupos OH^- (632 cm^{-1}), fosfatos ($603, 575$ e 565 cm^{-1}) e HPO_4^{2-} (551 cm^{-1}) (BRANGULE E GROSS, 2015). A inserção deste íon na estrutura da HA gera vacâncias de Ca^{2+} (V''_{Ca}) e OH^- (V'_{OH}), que podem ser representadas na notação de Kröger-Vink (KRÖGER E VINK, 1956; LEEUW, BOWE E RABONE, 2007; MAEYER E VERBEECK, 1994) (13):



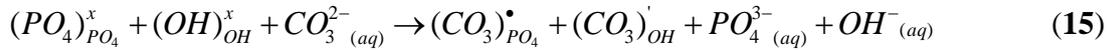
De acordo com o equilíbrio ácido-base observado para os ânions ortofosfatos (14), sabe-se que nas condições de pH utilizadas neste trabalho (pH = 10), a espécie protonada HPO_4^{2-} tende a predominar no meio reacional (KANDORI *et al.*, 2018; LI, WIDODO E LIM, 2012), facilitando sua entrada na estrutura da hidroxiapatita (DOROZHKIN, 2009):



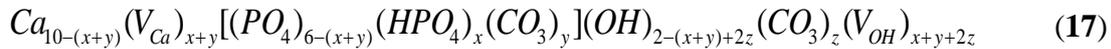
De fato, a análise as deconvoluções de FTIR demonstraram a presença de HPO_4^{2-} nas amostras mesmo na presença de Mn, entretanto, com a inserção do Mn a contribuição da banda de HPO_4^{2-} diminuem com aumento da concentração (Figura 33).

As bandas de absorção dos grupos CO_3^{2-} foram verificadas, principalmente nas amostras verdes independente da presença de Mn (Figura 33). A banda em 870 cm^{-1} é atribuída a vibração ν_2 fora do plano dos grupos O-C-O provenientes do carbonato e caracteriza-se por indicar uma ocupação dos sítios de PO_4^{3-} (substituição do tipo B) e a banda em 880 cm^{-1} é atribuída a presença de carbonato nos sítios OH^- (substituição do tipo A), indicando à presença de ambas as substituições (Figura 35). A entrada de CO_3^{2-}

nos sítios PO_4^{3-} (tipo B) e OH^- (tipo A) é descrita pelos seguintes mecanismos (notação de Kröger-Vink) (LEORS *et al.*, 1980; ORTALI *et al.*, 2017) (15-16):



Segundo esse mecanismo, uma provável fórmula química para a fase de hidroxiapatita sintetizada sem Mn poderia ser representada da seguinte forma (ORTALI *et al.*, 2017) (17):



As bandas nessa região foram deconvoluídas de modo a avaliarmos as mudanças nessas ocupações com a inserção do Mn. A inserção de Mn deslocou a banda para a região dos grupos CO_3^{2-} do tipo B com um efeito de alargamento da banda, além de que, as bandas sofrem uma diminuição em torno de 60% da intensidade com a inserção de Mn.

Após a calcinação a $1000^\circ C/2$ h, verificaram-se bandas típicas de absorção de PO_4^{3-} presentes em β -TCP em 551 e 603 cm^{-1} (Figuras 33 e 34b), especialmente nas amostras com inserção de Mn a partir de 9,3% e apenas a amostra de hidroxiapatita pura permaneceu com bandas de absorção na região CO_3^{2-} .

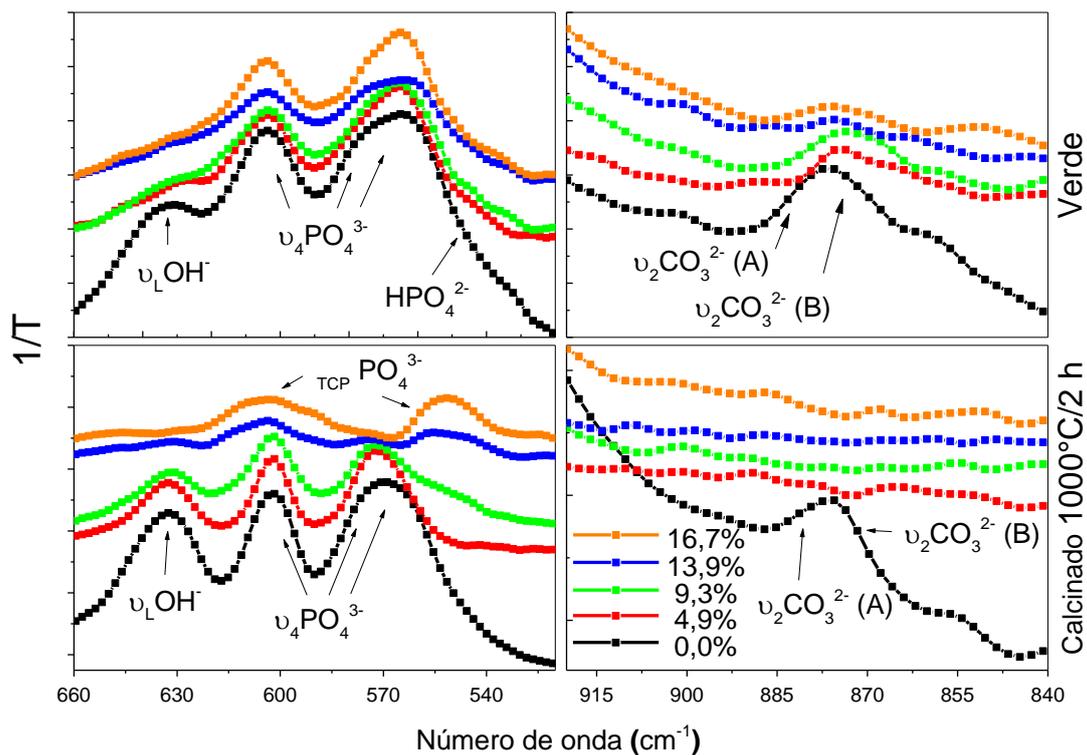


Figura 33. Espectros de FTIR das bandas de absorção de $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$, $\nu_L \text{OH}^-$, HPO_4^{2-} e $\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$ obtidas a partir de amostras contendo Mn verde e calcinada a 1000°C/2 h (abaixo).

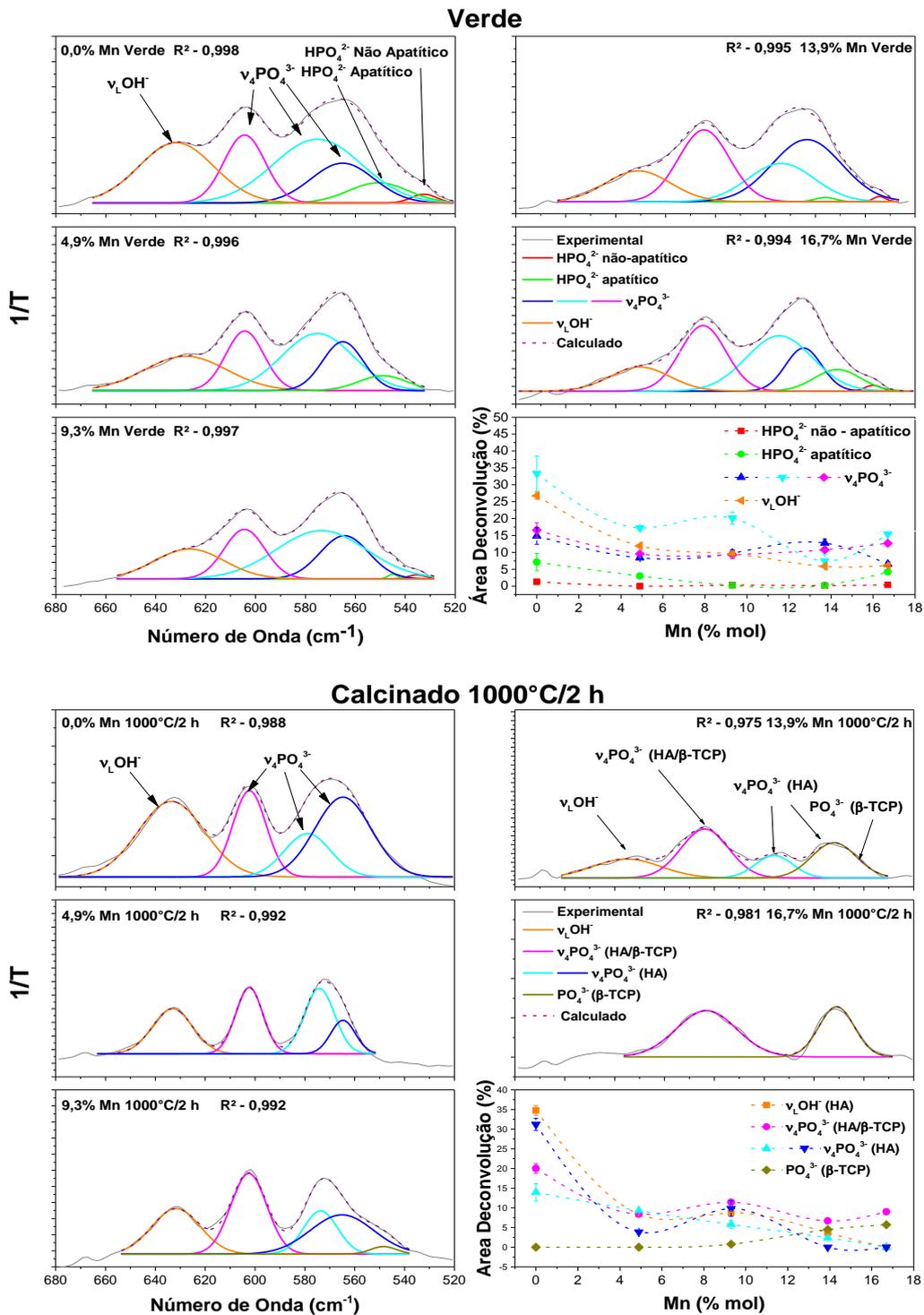


Figura 34. Deconvoluções do espectro de FTIR das bandas do fosfato – $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ ($680 - 520 \text{ cm}^{-1}$) das amostras de HA com diferentes concentrações de Mn: verde e calcinada a $1000^\circ\text{C}/2 \text{ h}$.

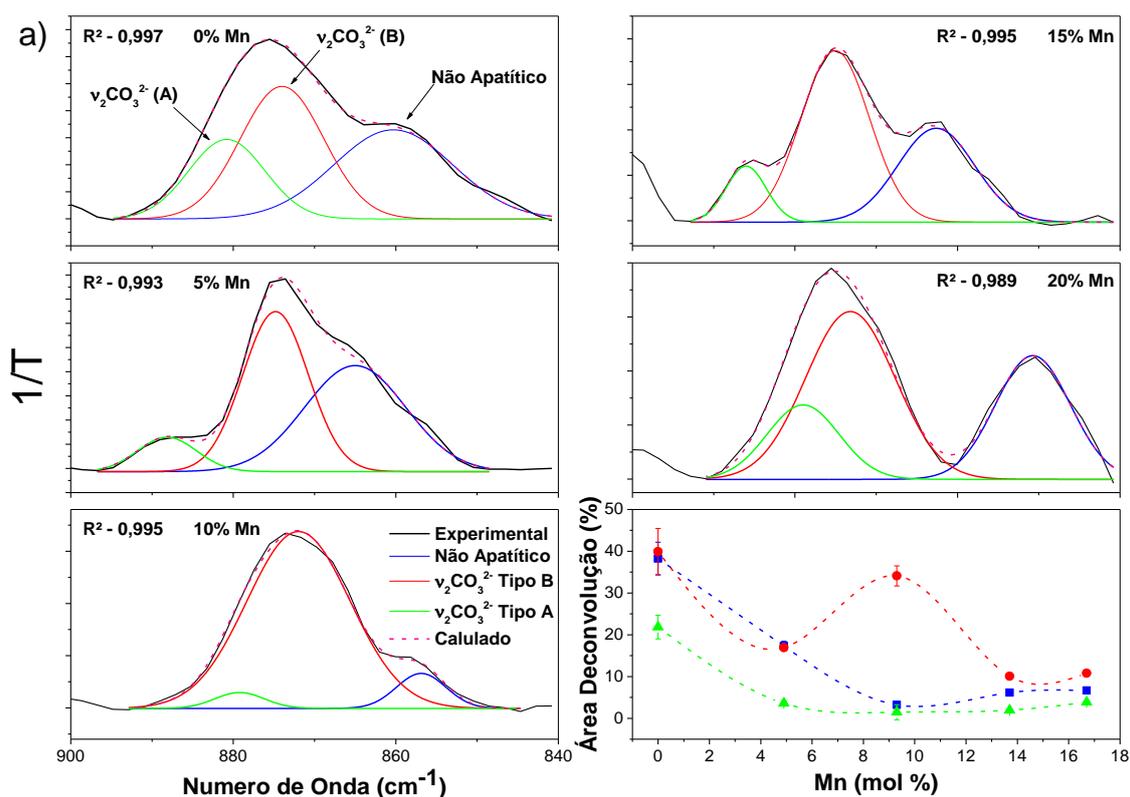
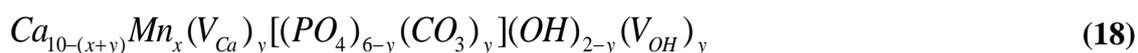


Figura 35. Deconvoluções do espectro de FTIR das bandas do carbonato – $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ ($900 - 840 \text{ cm}^{-1}$) das amostras verdes.

5.4.2 Mapas de Fourier

A partir dos refinamentos Rietveld (Figuras 22 a 31) foi possível obter os mapas de Fourier e extrair informações importantes das densidades eletrônicas dos átomos na estrutura cristalina da HA. Os mapas de Fourier foram utilizados para inferir as principais perturbações ocorridas na vizinhança dos grupos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- da fase HA sintetizada. Os mapas foram calculados apenas para a HA pura (0,0%) e contendo 4,9% de Mn, uma vez que nessa condição a HA sofre pouca transformação, sem a presença do β -TCP. Para a amostra de HA pura, os sítios de Ca2 (posição de Wyckoff 6h) apresentaram um resíduo de espalhamento negativo, sugerindo a presença de vacâncias com Ca^{2+} (Figura 36). As regiões próximas aos sítios P1 (posição de Wyckoff 6h) apresentaram um resíduo de espalhamento positivo, especialmente entre os sítios P1 e Ca2 (posição de Wyckoff 6h) na vizinhança dos grupos PO_4^{3-} , demonstrando claramente a presença de moléculas substitucionais ou rotação do grupo PO_4^{3-} original. A região dos oxigênios O4 dos grupos hidroxilas (entre dois sítios H1 adjacentes), ambos na posição

4e de Wyckoff, foram ligeiramente positivas. De fato, a presença de espécies HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} na estrutura da HA foi confirmado por FTIR e pode ser visto como causador de tais perturbações nos sítios PO_4^{3-} e OH^- . A diferença dos mapas de Fourier em torno dos sítios de PO_4^{3-} pode ser entendido como a entrada de carbonato, onde temos que, embora o carbono (C: $17,86 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) e o fósforo (P: $15,26 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) tenham comprimentos de espalhamentos de raios X próximos, a geometria das moléculas de CO_3^{2-} e PO_4^{3-} são diferentes, que geram perturbações ao redor do sítio P1. Além disso, o espalhamento positivo observado nos sítios O4 (pertencentes aos grupos hidroxila) também sugere sua ocupação pelo CO_3^{2-} . Quando os grupos hidroxila são substituídos por CO_3^{2-} , a presença de carbono com maior densidade de comprimento de espalhamento do que o oxigênio (O: $9,74 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) tende a aumentar a densidade eletrônica na região O4, como observado nos mapas de Fourier. Tal hipótese é confirmado nos FTIR, onde vemos ambas as contribuições de bandas de carbonato do tipo A e tipo B na estrutura da HA. A inserção de 4,9% de Mn na estrutura de hidroxiapatita diminuiu fortemente a negatividade dos sítios de Ca2, mantendo um resíduo positivo entre os sítios de Ca2 e PO_4^{3-} . Ao mesmo tempo, os sítios Ca1, P1 e hidroxila tornam-se negativos. Com as mudanças de espalhamento nos sítios de OH^- após a inserção do Mn, nos leva a supor que, o CO_3^{2-} prefere ocupar os sítios PO_4^{3-} , gerando vacâncias nas hidroxilas (V_{OH}^-), que são expressas como um resíduo de espalhamento negativo nos mapas de Fourier. Considerando o espalhamento negativo observado nos sítios de Ca1 e a predominância de regiões positivas entre os sítios de Ca2 e PO_4^{3-} , é possível levantar a hipótese de que os átomos de Mn tenham preferência para serem acomodados nos sítios de Ca2, impondo a inserção de CO_3^{2-} (uma molécula muito maior) na posição OH^- . Todos esses fatos adicionados à redução das bandas no FTIR de absorção de HPO_4^{2-} observadas após a inserção do Mn nos permitem assumir uma provável fórmula química para essa fase de hidroxiapatita contendo Mn (18):



O mecanismo pelo qual os átomos de Mn são inseridos nas hidroxiapatitas ainda não é claramente entendido, especialmente a ocupação de seus sítios [36, 21, 31]. Uma das descrições mais detalhadas para a ocupação dos sítios de Ca para Mn em apatitas foi dada por SUTCH *et al.* (1985). Eles observaram que os íons Mn^{2+} tiveram uma

preferência por sítios de Ca1 em fluorapatitas sintéticas calcinados a 900°C usando análises de espectroscopia de difração de nêutrons, refinamento Rietveld e espectroscopia no infravermelho (IV). Mais tarde, HUGHES E CAMERON (1991) também apontaram a preferência de Mn^{2+} por sítios de Ca1 em apatitas naturais, o que foi acompanhado por outros estudos (TAREEN, BHANDAGE E KUTTY, 1988). No entanto, em todos os casos, os autores analisaram o comportamento de Mn^{2+} em fluorapatitas com composições elementares complexas e não em hidroxiapatitas. Por exemplo, a composição da fluorapatita natural usada por HUGHES E CAMERON (1991) foi tão amplo quanto $(Ca_{8,81}Mn_{1,00}Fe_{0,10}Na_{0,07}Ce_{0,02})_{10}P_6O_{24}(F_{1,48}OH_{0,52})$. A presença de flúor no lugar dos grupos hidroxila nos canais hexagonais altera completamente o comportamento da apatita (TAREEN, BHANDAGE E KUTTY, 1988). Consequentemente, mecanismos de dopagem e acomodação de átomos específicos na estrutura da apatita também podem ser alterados, especialmente em apatitas simultaneamente substituídas (FERREIRA, 2009). Além disso, a hidroxiapatita verde estudada nesse trabalho é muito mais desordenada do que as duas fluorapatitas citadas acima.

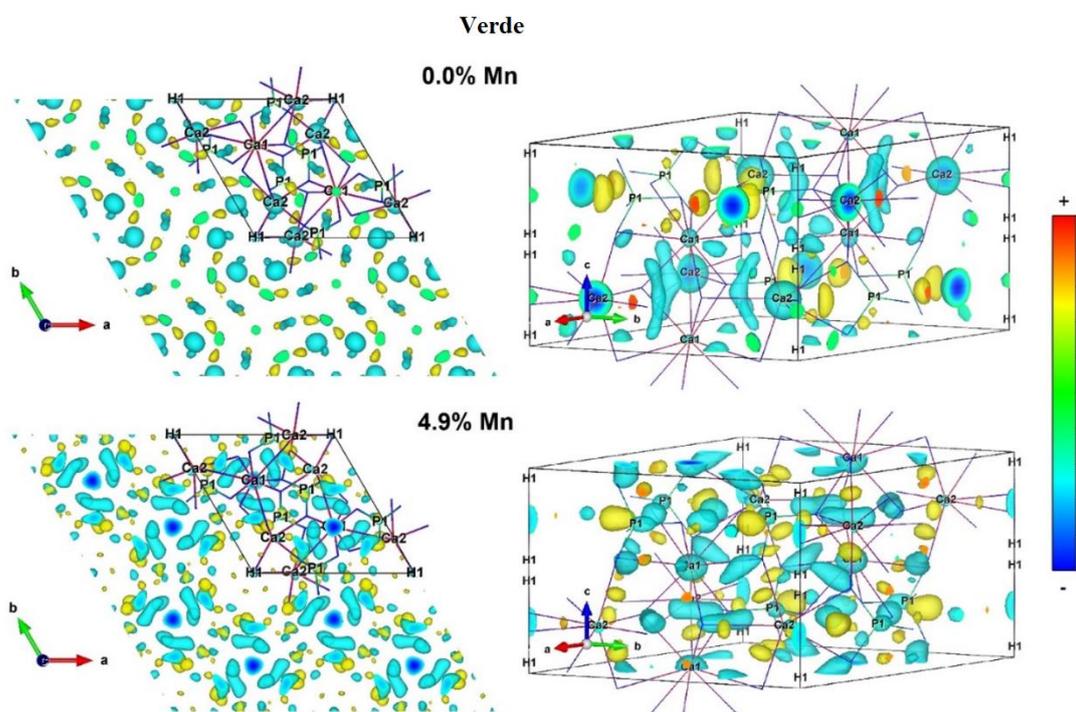


Figura 36. 3D Mapas de Fourier da diferença ($F_{obs} - F_{cal}$) obtidos a partir das fases de hidroxiapatita contendo 0,0 e 4,9% molar de Mn, amostras verdes. Os sítios Ca1, Ca2, P1 e H1 são mostrados na célula unitária hexagonal da hidroxiapatita.

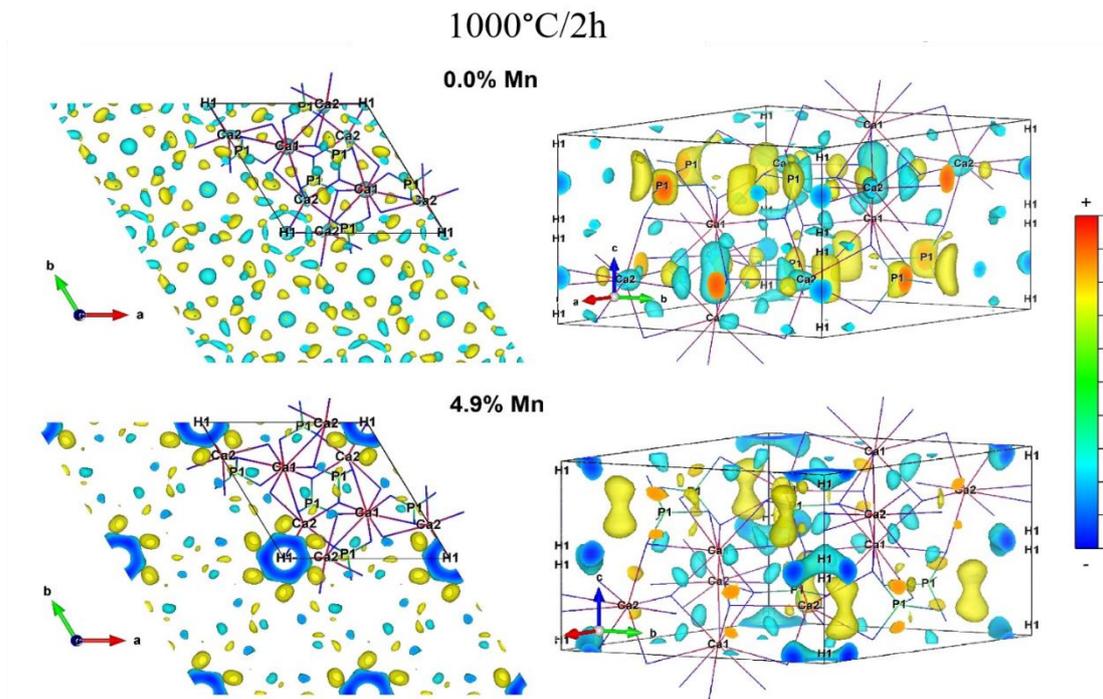


Figura 37. 3D Mapas de Fourier da diferença (Fobs - Fcal) obtidos a partir das fases de hidroxiapatita contendo 0,0 e 4,9% molar de Mn amostras calcinadas a 1000 °C/2 h (taxa de aquecimento de 2°C/min).

Após a calcinação (Figura 33), o mapa de Fourier demonstra que os sítios de Ca2 da HA pura tornam-se menos perturbados do que antes da calcinação, enquanto a coluna entre dois sítios Ca1 (no meio dos três sítios O1/O2) ao longo da direção [0 0 1] apresentam uma nítida redução das densidades eletrônicas. Observa-se nítidas distorções nas densidades eletrônicas da HA após tratamento térmico, os sítios P1 apresentam resíduos de espalhamentos positivos enquanto os sítios OH tornam-se negativos. A presença de 4,9% de Mn levou a uma forte perturbação no canal da hidroxila. Observa-se perturbações próximas aos sítios de Ca2 e surgiram perturbações de densidade negativa na forma de um anel ao redor do sítio de H1. Os sítios de P1 ainda foram positivos, mas a região do Ca1 ficaram menos perturbadas. Todos os resultados apresentados nesse trabalho indicam fortemente que a acomodação de átomos de Mn na hidroxiapatita verde contendo CO_3^{2-} levou a várias perturbações em torno dos sítios de Ca2 e OH^- , sugerindo a ocupação de sítios de Ca2 por átomos de Mn.

5.4.3 Efeito da Temperatura na Acomodação do Mn

Para estudar-se os efeitos das acomodações de Mn na rede cristalina da HA foram realizados refinamentos das amostras contendo 4,9% de Mn tratadas em diferentes temperaturas (Figuras 38 a 41), baixa temperatura (ambiente até 800 °C) e alta temperatura (800 a 1000 °C), de forma a fazer as diferenças entre os mapas de Fourier observados e calculados (Fobs - Fcal).

Observa-se que a inserção do Mn nas amostras tratadas a 400 e 600°C não provocaram grandes perturbações nos sítios de cálcio (Figura 42). Entretanto, com o aumento da temperatura de tratamento para 800°C e 1000°C foram verificadas alterações nos mapas de densidade eletrônica com espalhamentos positivos entre os sítios Ca2 e P1. Ao passo que quando passamos para as amostras tratadas a 1000°C verificamos um aumento da cristalinidade e alguns átomos de Mn começaram a segregar, gerando 1,8% em peso de Mn₃O₄, o que significa que aproximadamente 2,6% de Mn permaneceram na fase de hidroxiapatita o que provocou, além disso foram verificados resíduos de espalhamento na forma de anel em torno dos sítios de H1 (Figura 42). A inserção do Mn levou a perturbações de espalhamento positiva dos sítios de Ca1, sugerindo efetivamente sua ocupação pelos átomos de Mn restantes na estrutura da HA, observa-se que tais sítios não apresentavam resíduos de espalhamento positivo em temperaturas inferiores a 1000°C. Isso parece indicar que para uma hidroxiapatita altamente ordenada livre de CO₃²⁻, átomos de Mn têm preferência por sítios Ca1, como anteriormente observado por SUTCH *et al.* (1985) em fluorapatitas tratadas termicamente a 900 ° C. Os sítios de Ca2 tornam-se menos perturbados, indicando também uma possível ocupação.

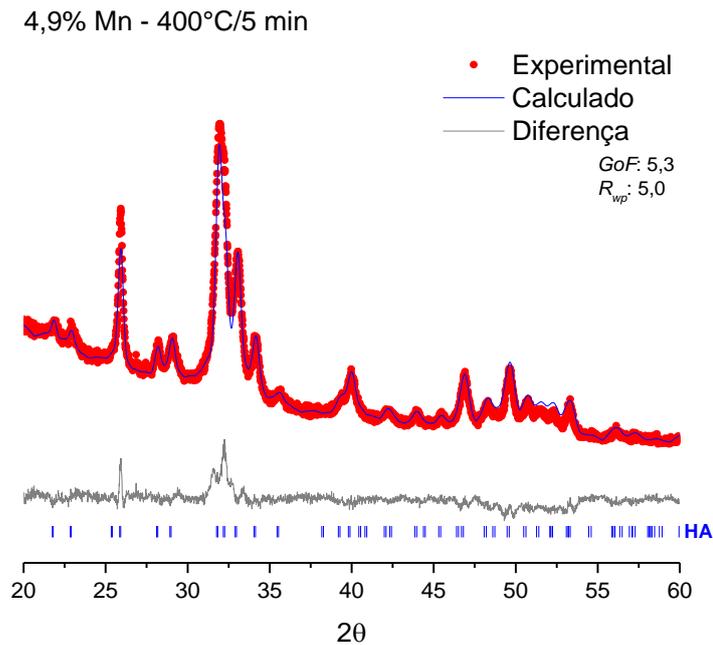


Figura 38. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinada a 400°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

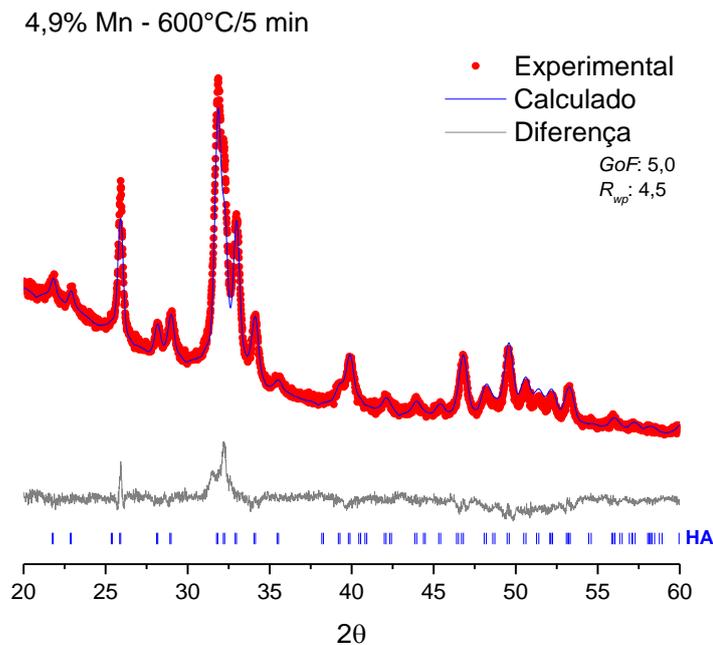


Figura 39. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo

4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinação a 600°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

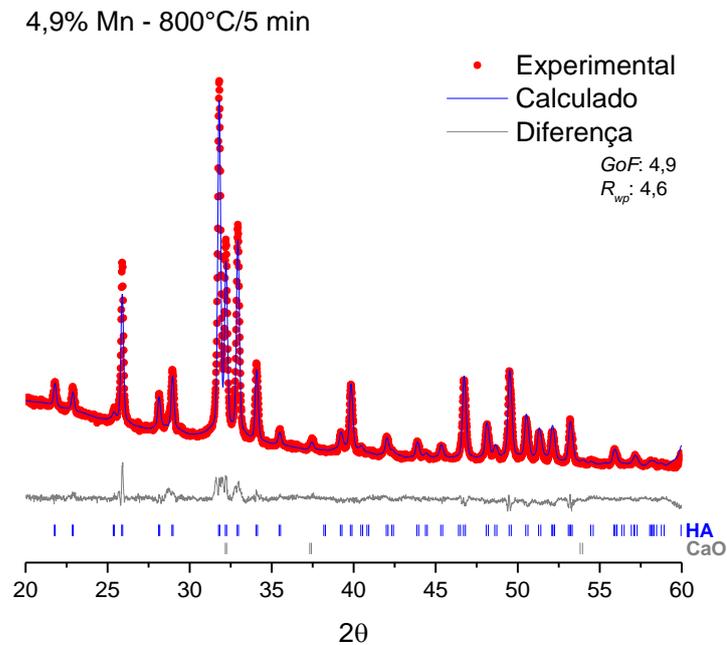


Figura 40. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinação a 800°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

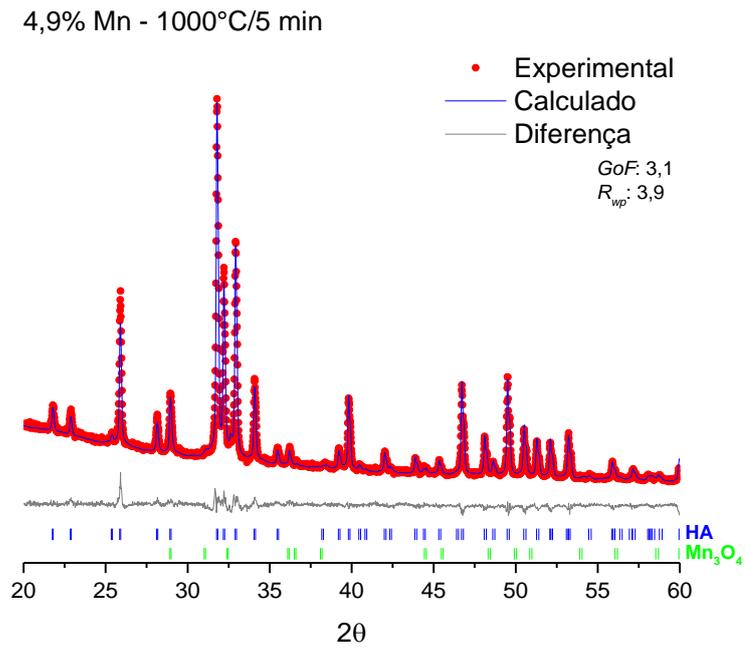


Figura 41. Padrão de difração obtido experimentalmente da amostra contendo 4,9% de Mn (círculos vermelhos) após calcinada a 1000°C/5 min e dados calculados a partir do refinamento Rietveld (linha azul). A diferença (linha cinza) e reflexões teóricas da fase encontrada (traços verticais) são mostrados abaixo.

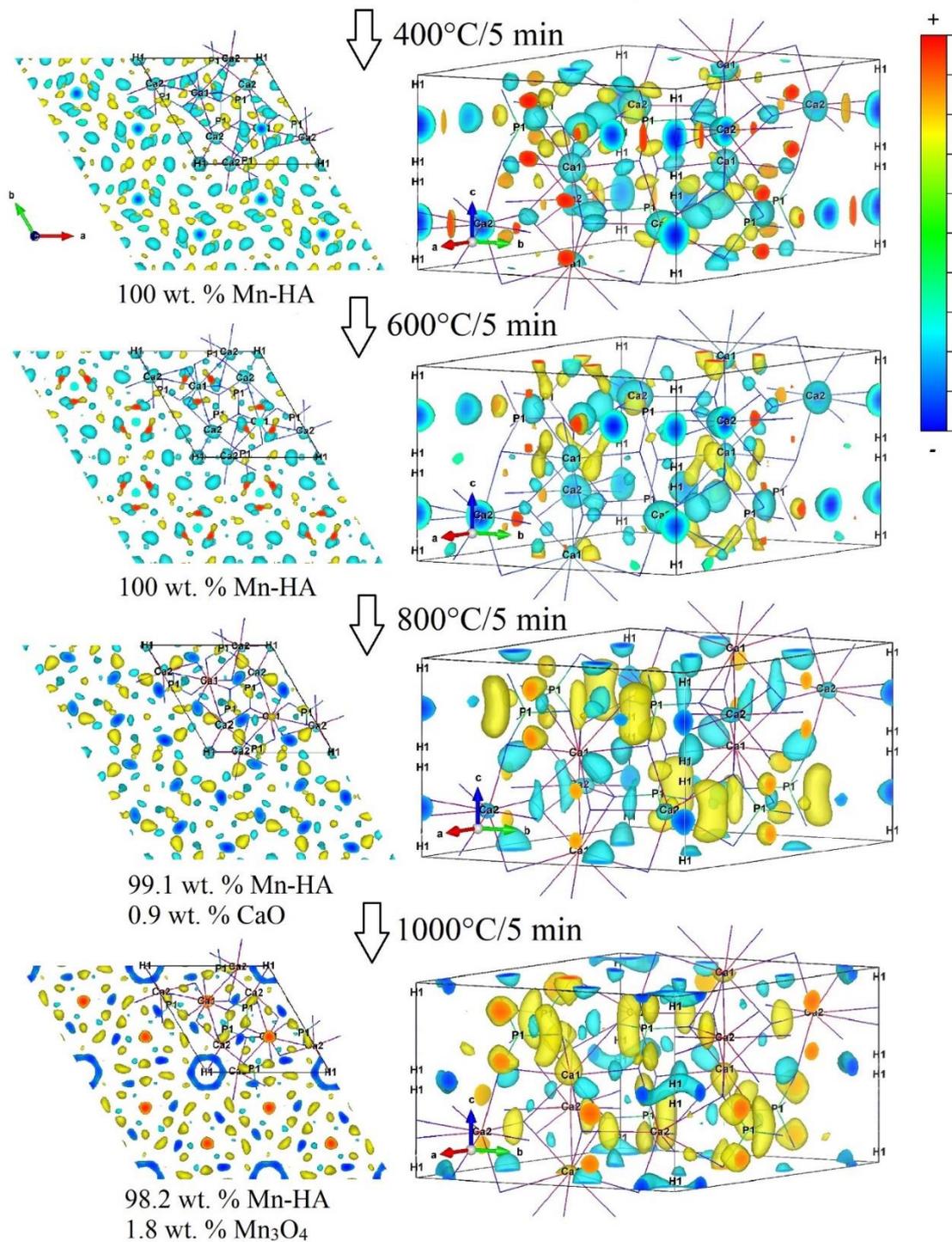


Figura 42. 3D Mapas de Fourier da diferença (Fobs - Fcal) obtidos a partir da fase hidroxiapatita contendo 4,9% mol de Mn após serem calcinados por 5 min a 400, 600, 800 e 1000°C, com taxa de aquecimento de 2°C/min.

5.4.4 XPS

Observou-se mudanças de colorações das amostras da HA contendo Mn, e esta é uma forte evidência de que os íons Mn^{2+} foram oxidados durante o procedimento de síntese e inseridos na rede de apatita em estados de oxidação mais elevados. Essa evidência é ainda mais forte se considerarmos os seguintes aspectos:

a) A cor das amostras sintetizadas contendo 4,9% de Mn era verde-cinza, em contraste com a cor branca observada para as amostras sem Mn. Em geral, o desenvolvimento de cor em apatitas contendo Mn envolve estados de oxidação de Mn mais elevados do que Mn (II) (LACHWA E REINEN, 1989; MAYER *et al.*, 2003).

b) A quantidade de Ca encontrada nas amostras com concentrações crescentes de Mn diminuiu em uma taxa menor do que o aumento de Mn, conforme mostrado na tabela x. Ao mesmo tempo, a quantidade de P diminuiu quando o Mn foi adicionado, o que significa que o Mn provavelmente substituiu não apenas o Ca, mas também os sítios P.

Para entender tais fatos, foram realizados XPS das amostras contendo 4,9% de Mn antes e após os tratamentos térmicos a $800^{\circ}C/5$ min e $1000^{\circ}C/2$ h (Figura 43), pois ocorreram mudanças de coloração. A amostra contendo 4,9% Mn mudou de verde-cinza antes calcinação para castanho escuro após calcinação a $1000^{\circ}C$, sendo que esta mudança de cor pode estar diretamente relacionada a segregação de Mn_3O_4 . Já na amostra tratada termicamente a $800^{\circ}C/5$ min foi observada uma cor cinza escuro sem ocorrer a formação de Mn_3O_4 , podendo ser indicativo de redução de espécies oxo Mn(V) azul/verde (PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2010; YUBAO *et al.*, 1993). As figura 39a-c mostram que os estados de oxidação podem ser observados por XPS em energias de ligação mais altas do que Mn (IV) (642,9 eV), a saber, 643,5 eV Mn (VI), 644,4 eV Mn (VI) e 645,5 eV Mn (VII) (KILROY, DALLEK E ZAYKOSKI, 2002; MOSIAŁEK *et al.*, 2011). Com o aumento dos estados de oxidação observa-se um aumento linear na energia de ligação do Mn $2p^{3/2}$ XPS (Figura 43d). Como as curvas Mn $2p_{3/2}$ XPS obtidas para nossas amostras foram distribuídas em direção a energias de ligação mais altas, as inserções de íons MnO_4^{3-} na rede de apatita devem ser considerados. Foram verificados em artigos recentes a presença das espécies Mn (III) e Mn (IV) em uma hidroxiapatita sintetizada sob condições semelhantes às utilizadas em nosso trabalho (KANDORI E YAMAGUCHI, 2017; ZOU *et al.*, 2020). KANDORI E YAMAGUCHI (2017) explicaram a presença desses estados de oxidação do Mn pelas condições alcalinas e pela disponibilidade de oxigênio na reação de síntese. Nessas condições, os íons Mn^{2+} podem ser facilmente

oxidados, gerando íons com valências mais altas. Embora os íons Mn^{2+} estivessem previamente dissolvidos na solução de H_3PO_4 para evitar a oxidação, a reação com $Ca(OH)_2$ ocorreu em pH elevado (pH = 10), conforme descrito no item 4.1.1. Usando espectroscopia EPR, MAYER *et al.* (2003) observaram apenas Mn (II) em suas amostras de hidroxiapatita sintetizada. No entanto, neste caso, a síntese ocorreu em condições ácidas, o que provavelmente evitou a oxidação do Mn^{2+} durante a precipitação da apatita.

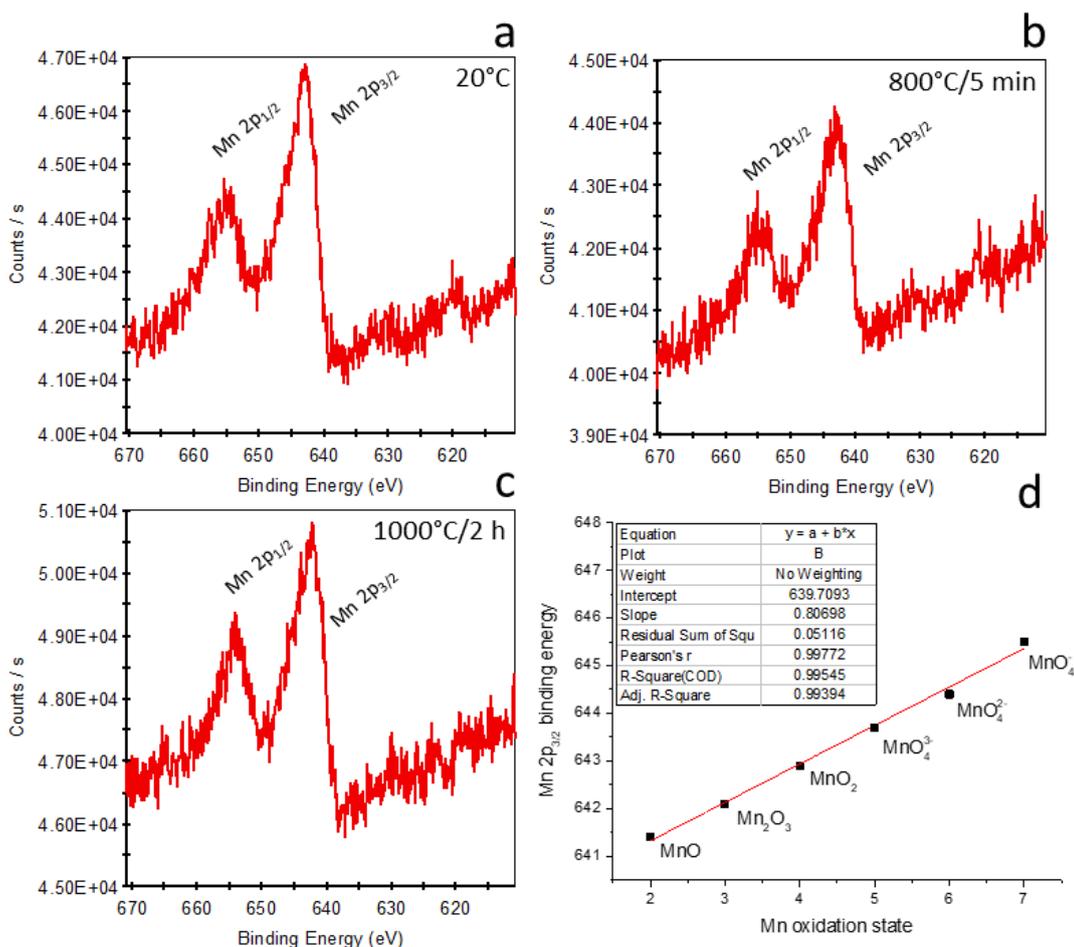


Figura 43. Espectros de XPS Mn 2p obtidos a partir da amostra sintetizada contendo 4,9 mol% de Mn: (a) 20°C (como sintetizada), (b) 800°C/5 min e (c) 1000°C/2 h. (d) Curva linearizada de energias de ligação de Mn 2p_{3/2} conhecidas contra o estado de oxidação de Mn.

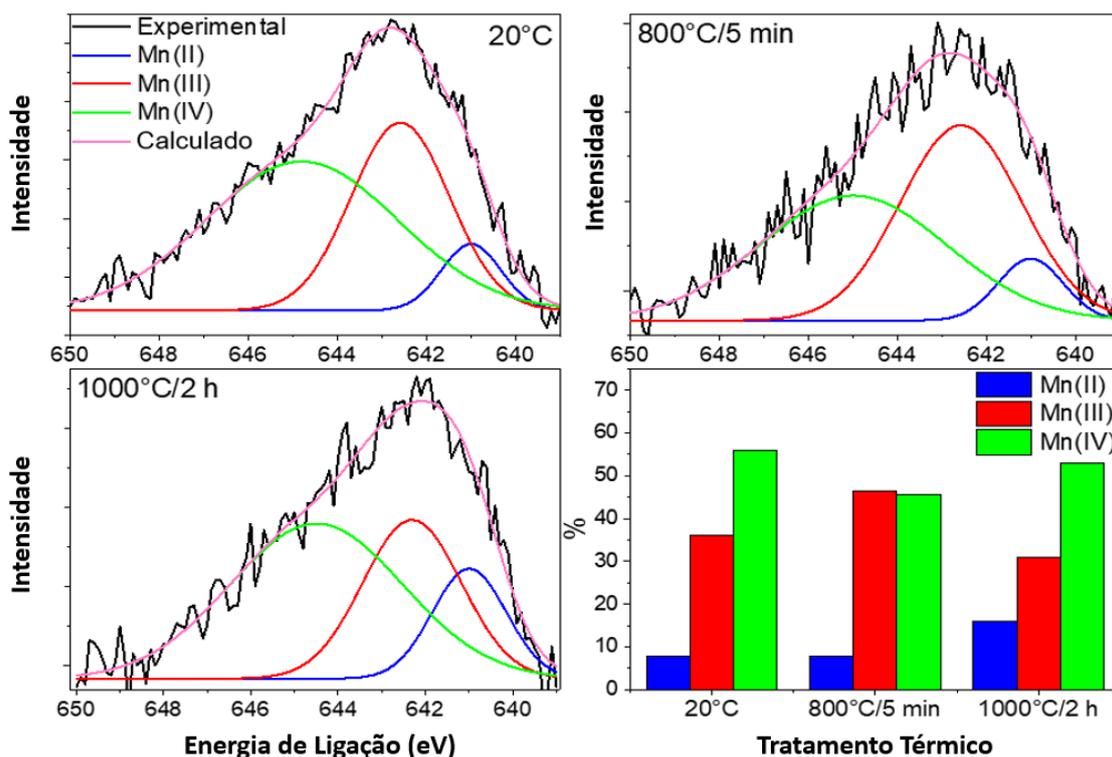


Figura 44. Deconvolução dos espectros de XPS em Mn $2p_{3/2}$ para as espécies Mn (II), Mn (III) e Mn (IV) da amostra sintetizada contendo 4,9 mol% Mn: (a) 20 ° C (como sintetizada), (b) após calcinação a 800°C/5 min, (c) 1000°C/2h e (d) área relativa sob as curvas associadas a Mn (II), Mn (III) e Mn (IV) para cada condição.

Portanto, nossos resultados indicaram fortemente que a acomodação de átomos de Mn em uma hidroxiapatita deficiente em cálcio sintetizada contendo CO_3^{2-} com baixa cristalinidade levou a várias perturbações em torno dos sítios Ca2 e OH^- , sugerindo a ocupação de sítios de Ca2 não apenas por íons Mn^{2+} , mas também por espécies Mn^{n+} em estados de oxidação mais elevados. Além disso, as perturbações observadas em torno dos sítios PO_4^{3-} (Figura 36) sugeriram que Mn também poderia substituir esses grupos na forma de espécies oxo (MnO_4^{n-}), como sugerido anteriormente por MAYER *et al.* (2003). Nos íons MnO_4^{3-} , MnO_4^{2-} e MnO_4^- , os átomos de Mn assumem os estados de oxidação V, VI e VII, respectivamente. Para entendermos os estados de oxidação e espécies de Mn presentes nas nossas amostras foram feitas deconvoluções do espectro de XPS (Figura 44). As curvas foram deconvoluídas e mostraram uma baixa quantidade de Mn^{2+} , mas uma alta quantidade de formas oxidadas de Mn, notadamente Mn^{3+} e Mn^{4+} . Após calcinação a 800°C/5 min, a quantidade de Mn^{3+} aumentou, enquanto a quantidade de Mn^{4+} diminuiu e a quantidade de Mn^{2+} permaneceu a mesma. No entanto, após 1000°C

por 2 h, toda a curva mudou para uma energia de ligação mais baixa, o que aumentou a quantidade relativa de íons Mn^{2+} .

De fato, os resultados do XPS demonstraram que a 800° C, a área sob a curva Mn (III) aumentou ligeiramente, enquanto a área associada ao Mn (IV) diminuiu. Como discutido acima, esta região também está associada às altas energias de ligação das espécies MnO_4^{n-} . Observando os mapas de Fourier de diferença obtidos para as amostras calcinadas por 5 min a 800 e 1000°C (Figura 42), é possível ver uma perturbação positiva muito forte em torno dos sítios de P1, com lóbulos positivos entre os oxigênios se formando o PO_4^{3-} tetraedro. LACHWA E REINEN (1989) mostraram que MnO_4^{3-} tetraedro pode se adaptar a sítios de vanadato e arseniato de clorapatitas sob condições isomórficas. Em particular, as espécies de MnO_4^{3-} são conhecidas por serem estabilizadas em várias redes de fosfato alcalino-terroso, como as apatitas (KINGSLEY, PRENER e SEGAL, 1965; LACHWA E REINEN, 1989). Obviamente, a inserção de todas essas espécies de Mn pode gerar uma estrutura de apatita muito instável, observado pelo aumento das tensões residuais e alargamento dos picos de XRD, conforme observado nas Figuras 18 e 17, respectivamente.

5.6 Morfologia das Partículas de Mn_3O_4

A morfologia das amostras partículas foram obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão por varredura (STEM) da amostra contendo 4.9% após tratamento térmico por 2 h demonstraram a formação de nanocristais de Mn_3O_4 , causados pela segregação de Mn da hidroxiapatita (Figura 45). Os nanocristais de Mn_3O_4 segregados da fase de hidroxiapatita contendo Mn após tratamento térmico (acima, Figura 45) demonstram morfologia esférica com tamanhos médios em torno de 140 nm. Os mapas elementares obtidos por espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) mostram a localização dos nanocristais de Mn_3O_4 segregados da fase de hidroxiapatita contendo Mn após a calcinação (Figura 45, superior).

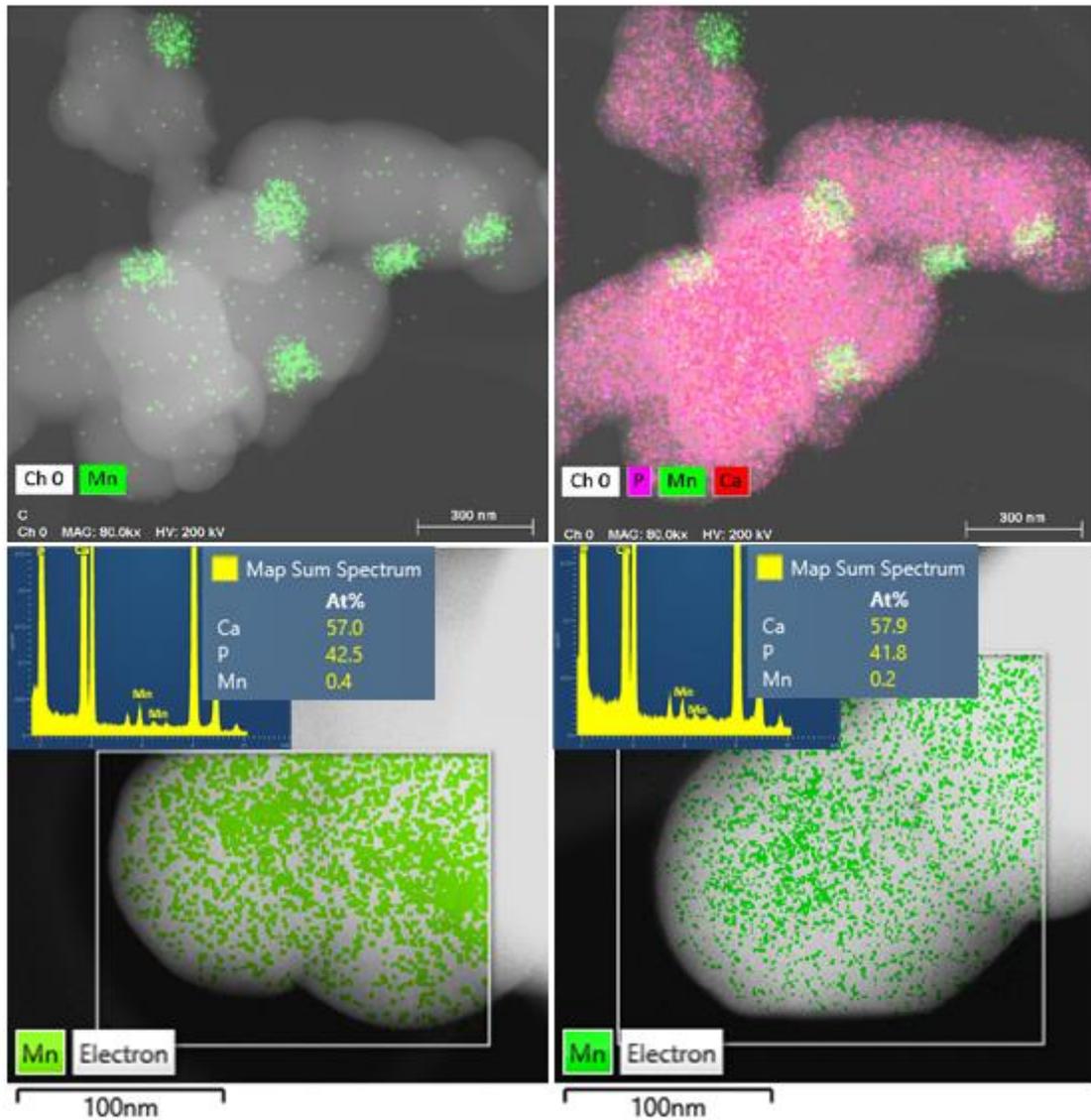


Figura 45. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) da amostra contendo 4,9% de Mn após tratamento térmico a 1000°C/2 h. Os mapas elementares da espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) mostram a localização dos nanocristais de Mn_3O_4 segregados da fase de hidroxiapatita contendo Mn após a calcinação (acima). Mapas detalhados de EDS (abaixo) adquiridos em regiões distantes dos nanocristais de Mn_3O_4 mostram a distribuição heterogênea de Mn ao longo dos cristais de hidroxiapatita.

Os mapas adquiridos em regiões distantes dos nanocristais de Mn_3O_4 mostram a distribuição heterogênea de Mn ao longo dos cristais de hidroxiapatita (Figura 45, inferior). A quantidade relativa de Mn, isto é, $Mn/(Mn+Ca)$ % at., em duas áreas distintas, conforme detalhado na Figura 41, foi de 0,34 e 0,70%. Assim sendo, podemos sugerir

que o tempo de 2 h utilizado para tratamento térmico não foi suficiente para concluir o evento da segregação total do Mn em nanocristais de Mn_3O_4 , visto que os mapas de EDS mostraram uma distribuição heterogênea de Mn ao longo dos cristais de hidroxiapatita. A quantidade relativa de Mn de 0,34 e 0,70% nos cristais de HA distantes dos nanocristais de Mn_3O_4 , contribuem para as observações na diminuição dos parâmetros de rede da HA com 4,9% de Mn (Figura 32), visto que o Mn^{2+} possui raio iônico menor que o Ca^{2+} , causando assim uma contração da célula unitária.

5.7 Testes de Citotoxicidade

A Figura 46 apresenta os valores médios de absorvância (densidade óptica) em 570 nm para as amostras de hidroxiapatita com e sem inserção de Mn e os controles positivo e negativo. Para a metodologia adotada, quanto maior os valores de absorvância maior o número de células vivas e, por conseguinte menor a citotoxicidade.

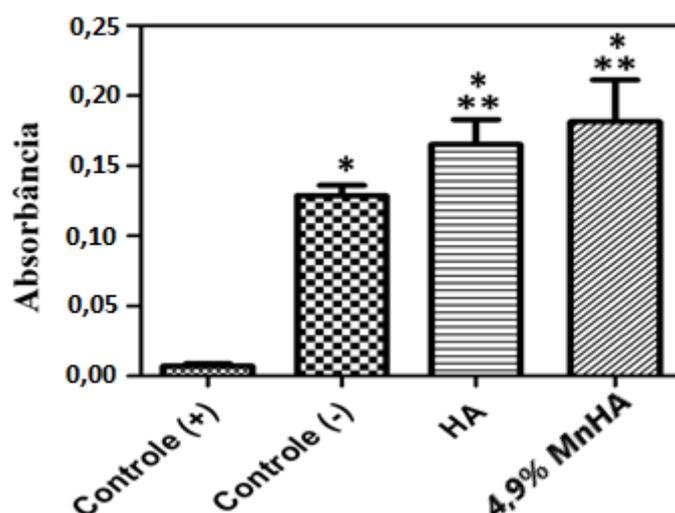


Figura 46. Teste de citotoxicidade das amostras. * Diferença significativa ($n = 10$; $p < 0,05$) do controle positivo em relação aos demais grupos, ** diferença significativa do controle negativo em relação às amostras de HA e MnHA.

Quando se compara o controle positivo com todos os demais grupos é possível observar que ocorre diferença significativa. No entanto, quando se compara o controle negativo com os materiais em estudo, observa-se uma diferença significativa com relação às amostras HA e 4.9% MnHA, indicando que essas amostras apresentavam uma maior

densidade celular. A amostra 4.9% MnHA não apresentou diferença significativa dentro da margem de erro do estudo quando comparadas com HA. Vários estudos da literatura tem relatado HA substituídas por diferentes quantidades de manganês, desde quantidades de alguns ppm a 11,9% em peso (HUANG *et al.*, 2016; MAYER *et al.*, 2010; PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2010; SOPYAN *et al.*, 2011; TORRES *et al.*, 2014). No entanto, é importante observar que estudos *in vitro* de viabilidade celular com células de osteoblastos apresentaram resultados significativamente melhores para baixos teores de Mn (MEDVECKÝ *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2014), enquanto uma concentração de 1% em peso de Mn foi avaliada alta e acarretou uma viabilidade celular drasticamente menor (PALUSZKIEWICZ *et al.*, 2010). Contrariamente, os resultados aqui relatados apresentaram viabilidade celular para a amostra com teores de 4,9 mol% de Mn.

Com os resultados de citotoxicidade demonstraram que os materiais produzidos não apresentam toxicidade para as células após o contato de um dia. No entanto, torna-se necessários estudos celulares mais aprofundado para avaliar com maior clareza os efeitos da adição de Mn na hidroxiapatita.

Capítulo 6 – CONCLUSÃO

A inserção Mn na estrutura da hidroxiapatita diminuiu sua cristalinidade e aumentou as tensões residuais promovendo forte instabilidade térmica. Os parâmetros de rede da hidroxiapatita diminuíram com o aumento da concentração de Mn, e o eixo *c* foi o mais sensível a essa diminuição. De forma geral, o Mn induziu várias perturbações ao longo dos canais hexagonais da hidroxila, seja nos sítios OH ou nos sítios Ca2 que formam esses canais. Este comportamento indica fortemente que Mn prefere ocupar sítios de Ca2 em baixas temperaturas, particularmente quando a rede de hidroxiapatita é mal ordenada e tem CO₃²⁻ em uma posição do tipo B. Os íons MnO₄³⁻ substituíram parcialmente os sítios de PO₄³⁻. O aumento da temperatura até 800°C permitiu a liberação dos grupos CO₃²⁻ e causou um melhor ordenamento da estrutura; por sua vez, os sítios Ca1 foram ocupados preferencialmente por átomos de Mn, enquanto os íons MnO₄³⁻ nos sítios PO₄³⁻ foram reduzidos. Acima de 800°C, os átomos de Mn tenderam a ser segregados da estrutura da hidroxiapatita através dos canais de hidroxila e formaram a fase Mn₃O₄. Durante esse processo difusivo, a acomodação de Mn nos sítios de Ca2 tornou-se novamente favorável. Através dos testes de citotoxicidade podemos concluir que ambas as amostras não são citotóxicas para as células analisadas.

Capítulo 7 – PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Incorporação de Mn conjunta com outros íons como F⁻ ou Cl⁻, na tentativa de aumentar o teor de Mn incorporado na estrutura da HA sem causar instabilidades térmicas e promover ainda.

2. Estudo das propriedades magnéticas das amostras de HA contendo Mn na rede após o tratamento térmico a 1000°C/2 h.

3. Inserção de Mn e outros elementos metálicos (por exemplo, Fe) através da co-dopagem da HA, para verificar os efeitos na estrutura da HA, bem como propriedades magnéticas do sinergismo dos elementos metálicos.

4. Estudo da resposta biológica mais detalhadas das amostras de HA com Mn.

Capítulo 8 – REFERÊNCIAS

- ANWAR, A.; AKBAR, S. "Novel continuous microwave assisted flow synthesis of nanosized manganese substituted hydroxyapatite". *Ceramics International*, v. 44, n. 9, p. 10878–10882, 2018.
- BAYKAL, A.; KAVAS, H.; DURMUŞ, Z.; *et al.* "Sonochemical synthesis and characterization of Mn₃O₄ nanoparticles". *Central European Journal of Chemistry*, v. 8, n. 3, p. 633–638, 2010.
- BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature". *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 6, p. 1882–1894, 2010.
- BRACCI, B.; TORRICELLI, P.; PANZAVOLTA, S. *et al.* "Effect of Mg²⁺, Sr²⁺, and Mn²⁺ on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings". *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 103, n. 12, p. 1666–1674, 2009.
- BRANGULE, A.; GROSS, K. A. "Importance of FTIR spectra deconvolution for the analysis of amorphous calcium phosphates". *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, v. 012027, n. 77, p. 1–5, 2015.
- BUFAIÇAL, L. F. S. "Investigação das propriedades estruturais, eletrônicas e magnéticas dos óxidos com estrutura perovskita dupla Ca_{2-x}LaxFeIrO₆". Tese D.Sc., Instituto de Física "Gleb Wataghin"/UNICAMP, Campinas, SP, 2006.
- CAI, Z. Y.; PENG, F.; ZI, Y. P.; *et al.* "Microwave-assisted hydrothermal rapid synthesis of calcium phosphates: Structural control and application in protein adsorption". *Nanomaterials*, v. 5, n. 3, p. 1284–1296, 2015.
- CHAAIR, H.; LABJAR, H.; BRITEL, O. "Synthesis of b -tricalcium phosphate". *Morphologie*, v. 101, n. 334, p. 120–124, 2017.
- CHEN, Z. W.; LAI, J. K. L.; SHEK, C. H. "Shape-controlled synthesis and nanostructure evolution of single-crystal Mn₃O₄ nanocrystals". *Scripta Materialia*, v. 55, n. 8, p. 735–738, 2006.
- COPPENS, P. "X-ray Charge Densities and Chemical Bonding". New York: Oxford University Press, 4 ed., p. 1-372, New York, US, 1997.
- CUNHA, M. A. "Síntese e caracterização de Hidroxiapatita nanoestruturada obtidos por aspersão de solução em chama". Dissertação de M.Sc., CEEMA/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2010.
- DE ANDRADE, A. V. C.; DA SILVA, J. C. Z.; PAIVA-SANTOS, C. O. *et al.* "Synthesis and crystal phase evaluation of hydroxylapatite using the Rietveld - maximum entropy method". *Ceramic Engineering and Science Proceedings*, v. 25, n. 4, p.639-645, 2004.
- DICKENS, B.; SCHROEDER, L. W. "Crystallographic Studies of the Role of Mg as a Stabilizing Impurity in b-Ca₃(PO₄)₂". *Journal of Solid State Chemistry*. v. 10, p. 232–248, 1974.
- DOROZHKIN, S. V. "Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine". *Materials (Basel)*, v 2, n. 2, p. 399–498, 2009.
- DOUGLAS, B. E.; MCDANIEL, D. H.; ALEXANDER, J. J. "Concepts and Models of

Inorganic Chemistry". Wiley, 3 ed, New York, US, 1994.

DUARTE, E. B. "*Processamento De Hidroxiapatita Por Microondas: Síntese De Pós E Sinterização De Peças*". Dissertação de M.Sc., DEMM/UFC, Fortaleza, CE, Brasil, 2009.

EICHERT, D. "*Nanocrystalline apatite-based biomaterials*". Nova Science Publishers, 1 ed., London, UK, 2009.

ELLIOTT, J. C. "*Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*", Elsevier Science, 1 ed., v. 18, Amsterdam, NL, 1994.

FAHAMI, A.; NASIRI-TABRIZI, B.; BEALL, G.W. *et al.* "Structural insights of mechanically induced aluminum-doped hydroxyapatite nanoparticles by Rietveld refinement". *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v.25, pp. 238–247, 2017.

FIHRI, A.; LEN, C.; VARMA, R. S.; SOLHY, A. "*Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis*". *Coordination Chemistry Reviews*, v. 347, p. 48–76, 2017.

FLEET, M. E.; LIU, X.; KING, P. L. "*Accommodation of the carbonate ion in apatite: An FTIR and X-ray structure study of crystals synthesized at 2-4 GPa*". *American Mineralogist*, v. 89, n. 10, p. 1422–1432, 2004.

GHOMASH PASAND, E.; NEMATI, A.; SOLATI-HASHJIN, M.; *et al.* "*Microwave assisted synthesis & properties of nano HA-TCP biphasic calcium phosphate*". *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials*, v. 19, n. 5, p. 441–445, 2012.

GOBBO, L. de A. "*Aplicação da difração de raios-x e método de Rietveld no estudo de cimento Portland*". Tese de D.Sc., PPGRMH/USP, São Paulo, SP, 2009.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. "*Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos*". *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1352–1358, 2010.

HASSAN, M. N.; MAHMOUD, M. M.; EL-FATTAH, A. A.; *et al.* "*Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes*". *Ceramics International*, v. 42, n. 3, p. 3725–3744, 2016.

HEIMANN, R. B. "*Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings*". *Surface and Coatings Technology*, v. 233, n. October 2013, p. 27–38, 2013.

HEM, J. "*Chemical equilibria and rates of manganese oxidation*". *Geological Survey*, chapter A-1667, Washington, US, 1963.

HENCH, L. L.; WILSON, J. "*An Introduction to Bioceramics*". *World Scientific*, London, UK, Advanced Series in Ceramics, v. 1, n. April, 1993.

HUANG, Y.; DING, Q.; HAN, S. *et al.* "*Characterisation, corrosion resistance and in vitro bioactivity of manganese-doped hydroxyapatite films electrodeposited on titanium*". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 24, n. 8, p. 1853–1864, 2013.

HUANG, Y.; QIAO, H.; NIAN, X.; *et al.* "*Improving the bioactivity and corrosion*

resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion". *Surface & Coatings Technology*, v. 291, p. 205–215, 2016.

HUANG, Z.; ZHOU, W.; OUYANG, C. *et al.* "High performance of Mn-Co-Ni-O spinel nanofilms sputtered from acetate precursors". *Scientific Reports*, v. 5, p. 2–9, 2015.

IQBAL, M. Z.; REN, W.; SAEED, M. *et al.* "A facile fabrication route for binary transition metal oxide-based Janus nanoparticles for cancer theranostic applications". *Nano Research*, v. 11, n. 10, p. 5735–5750, 2018.

ISHIKAWA, K.; DUCHEYNE, P.; RADIN, S. "Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 4, n. 2, p. 165–168, 1993.

J.M. HUGHES, M. CAMERON, K. D. C. "Ordering of divalent cations in the apatite structure: crystal structure refinements of natural Mn- and Sr-bearing apatite". *Am. Mineral.*, v. 76, p. 1857–1862, 1991.

JACOBS, A.; GAULIER, M.; DUVAL, A. *et al.* "Silver Doping Mechanism in Bioceramics — From". *Crystals*, v. 9, n. 326, p. 1-16, 2019.

KANDORI, K.; MURATA, R.; YAMAGUCHI, Y. *et al.* "Protein adsorption behaviors onto Mn(II)-doped calcium hydroxyapatite particles with different morphologies". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 167, p. 36-43, 2018.

KANDORI, K.; YAMAGUCHI, Y. "Synthesis And Characterization Of Mn-Doped Calcium Hydroxyapatite Particles". *Phosphorus Research Bulletin*, v. 33, p. 26–34, 2017.

KANNAN, S.; GOETZ-NEUNHOEFFER, F.; NEUBAUER, J. *et al.* "Ionic substitutions in biphasic hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate mixtures: Structural analysis by rietveld refinement". *Journal of the American Ceramic Society*, v. 91, n. 1, p. 1–12, 2008.

KANNAN, S.; VIEIRA, S. I.; OLHERO, S. M. *et al.* "Synthesis , mechanical and biological characterization of ionic doped carbonated hydroxyapatite / β -tricalcium phosphate mixtures". *Acta Biomaterialia*, v. 7, n. 4, p. 1835–1843, 2011.

KAYGILI, O.; DOROZHKIN, S. V.; ATES, T. *et al.* "Dielectric properties of Fe doped hydroxyapatite prepared by sol-gel method". *Ceramics International*, v. 40, n. 7 PART A, p. 9395–9402, 2014.

KIDO, H. W. "Ação Da Vitrocerâmica Bioativa (Biosilicato®) No Processo De Reparação Óssea Em Ratos". Tese de D.Sc., DePBT/UFSCAR, São Paulo, SP, 2015.

KILROY, W. P.; DALLEK, S.; ZAYKOSKI, J. "Synthesis and characterization of metastable Li-Mn-O spinels from Mn(V)". *Journal of Power Sources*, v. 105, n. 1, p. 75–81, 2002.

KINAST, E. J. "Refinamento estrutural com o método rietveld: implementação e ensaios com o programa com o Fullprof*". Dissertação de M.Sc., IF/UFRGS, Porto Alegre, RS, 2000.

KINGSLEY, J. . D.; PRENER, J. . S.; SEGAL, B. "Spectroscopy of Mn^{04 3-} in Calcium Halophosphates". *Physical Review*, v. 137, n. 1a, 1965.

KIVRAK, N.; TAS, A. C. "ChemInform Abstract: Synthesis of Calcium Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate (HA-TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior". *ChemInform*, v. 29, n. 49, p. no-no, 2010.

KISI, E. H.; HOWARD, C. J. "Applications of neutron powder diffraction". Oxford: University Press, 1 ed., Oxford, UK, 2008.

KLUNCKER, M.; TAHIR, M. N.; DÖREN, N. et al. "Iron Oxide Superparticles with Enhanced MRI Performance by Solution Phase Epitaxial Growth". *Chemistry of Materials*, v. 30, n. 13, p. 4277–4288, 2018.

KOKSAL, O. K.; WROBEL, P.; APAYDIN, G. et al. "Elemental analysis for iron, cobalt, copper and zinc decorated hydroxyapatite synthetic bone dusts by EDXRF and SEM". *Microchemical Journal*, v. 144, n. August 2018, p. 83–87, 2019.

KORITSANSZKY, T. S.; COPPENS, P. "Chemical Applications of X-ray Charge-Density Analysis". *Chemical Reviews*, v. 101, p. 1583-1627, 2001.

KRÖGER, F. A.; VINK, H. J. "Relations between the Concentrations of Imperfections in Crystalline Solids". *Solids State Physics*, v. 3, p. 307-435, 1956.

KUMTA, P. N.; SFEIR, C.; LEE, D. H. et al. "Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: Novel synthesis and characterization". *Acta Biomaterialia*, v. 1, n. 1, p. 65–83, 2005.

KYRIACOU, A.; LEVENTOURI, T.; CHAKOUMAKOS, B. C. et al. "Combined X-ray and neutron diffraction Rietveld refinement in iron-substituted nano-hydroxyapatite". *Journal of Materials Science*, v. 48, n. 9, p. 3535–3545, 2013.

LACHWA, H.; REINEN, D. "Color and Electronic Structure of Manganese(V) and Manganese(VI) in Tetrahedral Oxo Coordination". *A Spectroscopic Investigation. Inorganic Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 1044–1053, 1989.

LALA, S.; GHOSH, M.; DAS, P.K. et al. "Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement". *Materials Chemistry and Physics*, v.170, pp.319-329, 2016.

LALA, S.; MAITY, T. N.; SINGHA, M. et al. "Effect of doping (Mg,Mn,Zn) on the microstructure and mechanical properties of spark plasma sintered hydroxyapatites synthesized by mechanical alloying". *Ceramics International*, v. 43, n. 2, p. 2389–2397, 2017.

LEEuw, N. H. DE; BOWE, J. R.; RABONE, J. A. L. "A computational investigation of stoichiometric and calcium-deficient oxy- and hydroxy-apatites". *RSC Faraday Discuss*, v. 134, p. 195–214, 2007.

LEORS, R. Z.; TAHERI, M. H.; QUIROLOGICO, G. B. et al. "Formation and stability of apatites: effects of some cationic substituents". *2nd International congress on phosphorus compounds proceedings*, Boston, US, v. 21–25, n. april, p. 1–16, 1980.

LI, Y.; TECKNAM, C.; PINGOOI, C. "Iron(III) and manganese(II) substituted hydroxyapatite nanoparticles: Characterization and cytotoxicity analysis". *Journal of Physics: Conference Series*, v. 187, 2009.

- LI, Y.; WIDODO, J.; LIM, S. "Synthesis and cytocompatibility of manganese (II) and iron (III) substituted hydroxyapatite nanoparticles". *J. Mater. Sci.*, v. 47, p. 754–763, 2012.
- LIU, J.; LI, K.; WANG, H. *et al.* "Rapid formation of hydroxyapatite nanostructures by microwave irradiation". *Chemical Physics Letters*, v. 396, n. 4–6, p. 429–432, 2004.
- LUPU, A. R.; POPESCU, T. "Toxicology in Vitro The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays". *Toxicology in Vitro*, v. 27, n. 5, p. 1445–1450, 2013.
- MAEYER, E. A. P. DE; VERBEECK, R. M. H. "Optimalization of the preparation of Nat- and CO ~ -containing hydroxyapatite by the hydrolysis of monetite". *Journal of Crystal Growth*, v. 135, p. 539–547, 1994.
- MAVROPOULOS, E.; ROCHA, N. C. C.; MOREIRA, J. C. *et al.* "Characterization of phase evolution during lead immobilization by synthetic hydroxyapatite". *Materials Characterization*, v. 53, n. 1, p. 71–78, 2004.
- MAYER, I. "TEM study of the morphology of Mn²⁺-doped calcium hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate". *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 102, p. 311–317, 2008.
- MAYER, I.; COHEN, S.; GDALYA, S. *et al.* "Crystal structure and EPR study of Mn-doped b-tricalcium phosphate", *Materials Research Bulletin*, v. 43, p. 447–452, 2008.
- MAYER, I.; CUISINIER, F. J. G.; POPOV, I. *et al.* "Phase Relations Between β -Tricalcium Phosphate and Hydroxyapatite with Manganese (II): Structural and Spectroscopic Properties", *Eur. J. Inorg. Chem.*, p. 1460–1465, 2006.
- MAYER, I.; GDALYA, S.; BURGHAUS, O. *et al.* "A spectroscopic and structural study of M(3d)²⁺-doped β -tricalcium phosphate - the binding properties of Ni²⁺ and Cu²⁺ in the pseudo-octahedral Ca(5)O₆ host-sites". *Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie*, v. 635, n. 12, p. 2039–2045, 2009.
- MAYER, I.; JACOBSON, O.; NIAZOV, T. *et al.* "Manganese in precipitated hydroxyapatites". *European Journal of Inorganic Chemistry*, n. 7, p. 1445–1451, 2003.
- MAYER, I.; PET, G.; KARACS, A. *et al.* "Divalent Mn in calcium hydroxyapatite by pulse laser deposition" *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 104, p. 1107–1111, 2010.
- MCCUSKER, L. B.; VON DREELE, R. B.; COX, D. E. *et al.* "Rietveld refinements Guideline". *Journal of Applied Crystallography*, v. 32, p. 36 - 50, 1999.
- MEDVECKÝ, Ľ.; ŠTULAJTEROVÁ, R.; PARILÁK, Ľ. *et al.* "Influence of manganese on stability and particle growth of hydroxyapatite in simulated body fluid". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 281, n. 1–3, p. 221–229, jun. 2006.
- MOMMA, K.; IZUMI, F. "VESTA: a three-dimensional visualization system for electronic and structural analysis", *J. Appl. Cryst.*, v. 41, p. 653–658, 2008.
- MONDAL, S.; MANIVASAGAN, P.; BHARATHIRAJA, S. *et al.* "Magnetic hydroxyapatite: A promising multifunctional platform for nanomedicine application", *International Journal of Nanomedicine*, v. 12. p. 8389–8410, 2017.

MOREIRA, M. P.; SOARES, G. D. A.; DENTZER, J. *et al.* "Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium". *Materials Science & Engineering C*, v. 61, p. 736–743, 2016.

MOSIAŁEK, M.; MORDARSKI, G.; NOWAK, P. *et al.* "Phosphate-permanganate conversion coatings on the AZ81 magnesium alloy: SEM, EIS and XPS studies". *Surface and Coatings Technology*, v. 206, n. 1, p. 51–62, 2011.

MOSTAFA, N. Y.; HASSAN, H. M.; ABD ELKADER, O. H. "Preparation and Characterization of Na₁, SiO₄, and CO₃ Co-Substituted Hydroxyapatite". *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 1590, n. 28231, p. 1584–1590, 2011.

NARAYANI, L.; JAGADEESHA ANGADI, V.; SUKHDEV, A. *et al.* "Mechanism of high temperature induced phase transformation and magnetic properties of Mn₃O₄ crystallites". *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 476, p. 268–273, 2019.

NATASHA, A. N.; SOPYAN, I.; ZURAIIDA, A. "Fourier transform infrared study on sol-gel derived manganese-doped hydroxyapatite". *Advanced Materials Research*, v. 47-50 PART, p. 1185–1188, 2008.

OSCAR, J. B. F. "Síntese Do A-Fosfato Tricálcico E Estudo Da Modificação De Cimentos De Fosfato De Cálcio Com Silicato Tricálcico". Dissertação de M.Sc., CEEMA/UFRGS, Porto Alegre, RS., 2009.

ORTALI, C.; JULIEN, I.; VANDENHENDE, M. *et al.* "Consolidation of bone-like apatite bioceramics by spark plasma sintering of amorphous carbonated calcium phosphate at very low temperature". *Journal of the European Ceramic Society*, v. 38, n. 4, p. 2098-2109, 2017.

PAIVA-SANTOS, C. O. "Aplicações do Método de Rietveld e Potencialidades do Método de Scarlett – Madsen". Editora da Universidade Estadual paulista, Instituto de Química – LabCACC, 1 ed., Araraquara, BR, 2004.

PALUSZKIEWICZ, C.; ŚLÓŠARCZYK, A.; PIJOCHA, D. *et al.* "Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite". *Journal of Molecular Structure*, v. 976, n. 1–3, p. 301–309, jul. 2010.

PEREIRA, M.; DULCE, G.; SOARES, D. A. *et al.* "Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium". *Materials Science & Engineering C*, v. 61, p. 736–743, 2016.

PETCHSANG, N.; PON-ON, W.; HODAK, J. H. *et al.* "Magnetic properties of Co-ferrite-doped hydroxyapatite nanoparticles having a core/shell structure". *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 321, n. 13, p. 1990–1995, 2009.

PON-ON, W.; MEEJOO, S.; TANG, I. M. "Substitution of manganese and iron into hydroxyapatite: Core/shell nanoparticles". *Materials Research Bulletin*, v. 43, n. 8–9, p. 2137–2144, 2008.

QI, C.; ZHU, Y. J.; ZHAO, X. Y. *et al.* "Highly stable amorphous calcium phosphate porous nanospheres: Microwave-assisted rapid synthesis using ATP as phosphorus source and stabilizer, and their application in anticancer drug delivery". *Chemistry - A European Journal*, v. 19, n. 3, p. 981–987, 2013.

QIAO, H.; Zhang, C.; Dang, X. *et al.* "Gallium loading into a polydopamine-functionalised SrTiO₃ nanotube with combined osteoinductive and antimicrobial activities". *Ceramics International*, v. 45, n. 17, p. 22183–22195, 2019.

RAMESH, S.; TAN, C. Y.; PERALTA, C. L. *et al.* "The effect of manganese oxide on the sinterability of hydroxyapatite". *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 8, n. 4, p. 257–263, 12 jan. 2007.

RAMYA, J. R.; ARUL, K. T.; ELAYARAJA, K. *et al.* "Physicochemical and biological properties of iron and zinc ions co-doped nanocrystalline hydroxyapatite, synthesized by ultrasonication". *Ceramics International*, v. 40, n. 10, p. 16707–16717, 2014.

RANGAVITTAL, N.; LANDA-CÁNOVAS, A. R.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. *et al.* "Structural study and stability of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate: Two important bioceramics". *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 51, n. 4, p. 660–668, 2000.

RENAUDIN, G.; GOMES, S.; NEDELEC, J.-M. "First-Row Transition Metal Doping in Calcium Phosphate Bioceramics: A Detailed". *Materials*, v. 92, n. 10, p. 1–22, 2017.

RIETVELD, H. M. "Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement". *Acta Crystallographica*, v. 22, n. 1, 1967.

RIETVELD, H. M. "A profile refinement method for nuclear and magnetic structures". *Journal of Applied Crystallography*, v. 2, p. 65-71, 1969.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. "Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação". *Revista Dental Press de Periodontia e Implantologia*, v. 1, p. 39–50, 2007.

ROBLES-ÁGUILA, M. J.; REYES-AVENDAÑO, J. A.; MENDOZA, M. E. "Structural analysis of metal-doped (Mn , Fe , Co , Ni , Cu , Zn) calcium hydroxyapatite synthesized by a sol-gel microwave-assisted method". *Ceramics International*, v. 43, n. 15, p. 12705–12709, 2017.

RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. "Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction". *Phys. B Condens. Matter.*, v. 192, p. 55–69, 1993.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; DINPANAH-KHOSHDARGI, E.; JAMSHIDI, A. "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures". *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.

SANTOS, T.; BATISTA, D. A. "Hidroxiapatita e β -Fosfato Tricálcio como absorvedores do ultravioleta", *EDIFS - Editora do Instituto Federal de Sergipe*, 1 ed., Aracaju, BR, 2016.

SANTOS, W. C. "Síntese e Caracterização Estrutural, Magnética e Térmica da Hidroxiapatita Dopada com Ferro". *Dissertação de M.Sc., DEF/UFRN*, Natal, RN, 2014.

SIDDHARTHAN, A.; SESHADRI, S. K.; SAMPATH KUMAR, T. S. "Microwave accelerated synthesis of nanosized calcium deficient hydroxyapatite". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, n. 12, p. 1279–1284, 2004.

SILVA, L. M. "Efeitos Da Inserção Simultânea Dos Íons Mg²⁺, Mn²⁺ E Sr²⁺ Sobre

Hidroxiapatita Em Processo De Precipitação E Troca Iônica". Tese de D.Sc., P2CEM/UFS, São Cristóvão, SE, 2019.

SINGH, R. P.; SINGH, G.; SINGH, H. "Sub-micrometric mesoporous strontium substituted hydroxyapatite particles for sustained delivery of vancomycin drug". *Journal of the Australian Ceramic Society*, v. 55, n. 2, p. 405–414, 2019.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. "Química Inorgânica". Artmed Editora S. A., 4 ed., Porto Alegre, BR, 2008

SOPYAN, I.; NATASHA, A. N. "Preparation of nanostructured manganese-doped biphasic calcium phosphate powders via sol – gel method", *Ionics*, v. 15, p. 735–741, 2009.

SOPYAN, I.; RAMESH, S.; NAWAWI, N. A. et al. "Effects of manganese doping on properties of sol – gel derived biphasic calcium phosphate ceramics", *Ceramics International*, v. 37, n. 8, p. 3703–3715, 2011.

SPALDIN, N. A.; CHEONG, S-W.; RAMESH, R. "Multiferroics: Past, present and future". *Physics Today*, v. 63, p. 38-43, 2010.

SUITCH, P. R.; LACOUT, J. L.; HEWAT, A. et al. "The Structural Location and Role of Mn 2+ Partially Substituted for Ca 2+ in Fluorapatite", *Acta Cryst.*, v. 41b, p. 173–179, 1985.

ŠUPOVÁ, M. "Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review". *Ceramics International*, v. 41, n. 8, p. 9203–9231, 2015.

SZCZE, A.; HO, L.; CHIBOWSKI, E. "Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications", *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 249, n. April, p. 321–330, 2017.

TAMPIERI, A.; ALESSANDRO, T. D.; SANDRI, M. et al. "Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite". *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 2, p. 843–851, 2012.

TAREEN, J. A. K.; BHANDAGE, G. T.; KUTTY, T. R. N. "Hydrothermal stability of some manganese oxides", *Bull. Mater. Sci.*, v. 10, n. 3, p. 199–203, 1988.

TÖNSUAADU, K.; GROSS, K. A.; PLUDUMA, L.; VEIDERMA, M. "A review on the thermal stability of calcium apatites". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 110, n. 2, p. 647–659, 2012.

TÖPFER, J.; FELTZ, A.; GRÄF, D. et al. "Cation Valencies and Distribution in the Spinels NiMn₂O₄ and M_zNiMn_{2-z}O₄ (M = Li, Cu) Studied by XPS". *Physica Status Solidi (a)*, v. 134, n. 2, p. 405–415, 1992.

TORRES, P. M. C.; VIEIRA, S. I.; CERQUEIRA, A. R. et al. "Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of β -tricalcium phosphate". *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 136, p. 57–66, 2014.

ULLAH, I.; LI, W.; LEI, S. et al. "Simultaneous co-substitution of Sr²⁺/Fe³⁺ in hydroxyapatite nanoparticles for potential biomedical applications". *Ceramics International*, v. 44, n. 17, p. 21338–21348, 2018.

VÁZQUEZ-OLMOS, A.; REDÓN, R.; RODRÍGUEZ-GATTORNO, G. *et al.* "One-step synthesis of Mn₃O₄ nanoparticles: Structural and magnetic study". *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 291, n. 1, p. 175–180, 2005.

WOPENKA, B.; PASTERIS, J. D. "A mineralogical perspective on the apatite in bone". *Materials Science and Engineering C*, v. 25, n. 2, p. 131–143, 2005.

WU, H.-C.; WANG, T.-W.; SUN, J.-S. *et al.* "A novel biomagnetic nanoparticle based on hydroxyapatite". *Nanotechnology*, v. 18, n. 16, p. 165601, 25 abr. 2007.

XIAO, J.; TIAN, X. M.; YANG, C. *et al.* "Ultra-high relaxivity and safe probes of manganese oxide nanoparticles for in vivo imaging". *Scientific Reports*, v. 3, p. 1–7, 2013.

YANG, H.; LIU, Q.; MASSE, S. *et al.* "Hierarchically-organized, well-dispersed hydroxyapatite-coated magnetic carbon with combined organics and inorganics removal properties". *Chemical Engineering Journal*, v. 275, p. 152–159, 2015.

YASHIMA, M.; SAKAI, Ñ. A.; KAMIYAMA, T. "Crystal structure analysis of b - tricalcium phosphate Ca₃(PO₄)₂ by neutron powder diffraction", *Journal of Solid State Chemistry*, v. 175, p. 272–277, 2003.

YOUNG, R. A. "Introduction to the Rietveld Method". Oxford: University Press, Oxford, UK, 1993.

YU, L.; QIAN, S.; QIAO, Y. *et al.* "Multifunctional Mn-containing titania coatings with enhanced corrosion resistance, osteogenesis and antibacterial activity". *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, n. 33, p. 5397–5408, 2014.

YU, L.; TIAN, Y.; QIAO, Y. *et al.* "Mn-containing titanium surface with favorable osteogenic and antimicrobial functions synthesized by PIII&D". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 152, p. 376–384, 2017.

YUBAO, L.; KLEIN, C. P. A. T.; XINGDONG, Z. *et al.* "Relationship between the colour change of hydroxyapatite and the trace element manganese", *Biomaterials*, v. 14, n. 13, p. 969–972, 1993.

ZHANG, C.; LAN, J.; WANG, S.; *et al.* "Silver nanowires on acid-alkali-treated titanium surface: Bacterial attachment and osteogenic activity". *Ceramics International*, v. 45, n. 18, p. 24528–24537, 2019.

ZHANG, L.; YANG, K.; MI, J.; *et al.* "Na₃PSe₄: A Novel Chalcogenide Solid Electrolyte with High Ionic Conductivity", *Adv. Energy Mater.*, ed. 5, n. 1501294, p. 1-5, 2015.

ZILM, M. E.; YU, L.; HINES, W. A. *et al.* "Magnetic properties and cytocompatibility of transition-metal-incorporated hydroxyapatite", *Materials Science & Engineering C*, v. 87, n. September 2017, p. 112–119, 2018.

ZOU, Q.; WEI, Y.; ZHANG, W. *et al.* "Synergistic activation of peroxydisulfate for organic pollutants degradation with hydroxyapatite/manganese oxides hybrid catalysts". *Applied Surface Science*, v. 501, p. 144322, 2020.

Capítulo 9 – ANEXOS E ARQUIVOS SUPLEMENTARES

9.1 FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)

Os espectros de FTIR das amostras são mostrados nas Figuras a seguir. Os espectros demonstram bandas de absorção de vários grupos químicos presentes na HA/ β -TCP.

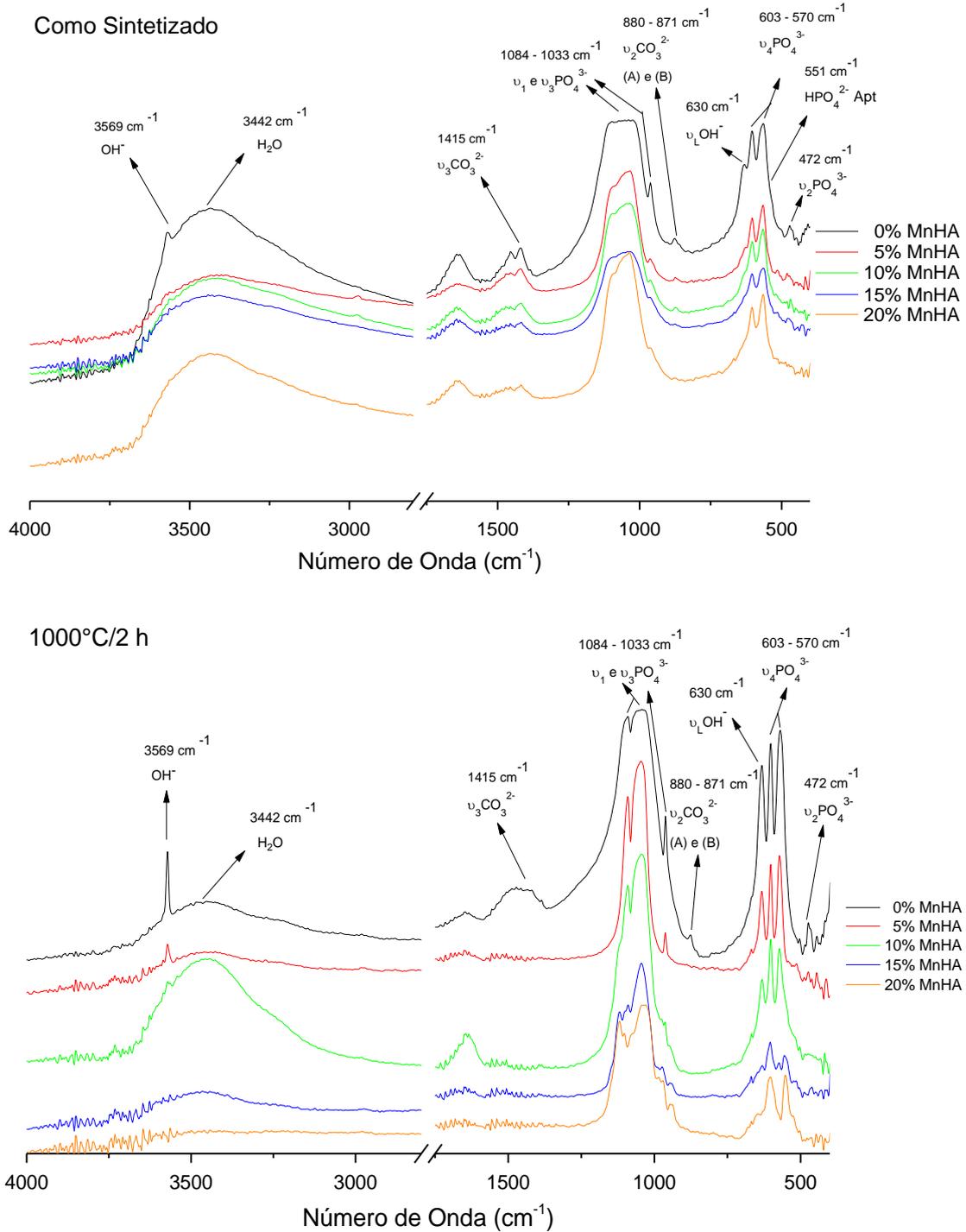


Figura A1. Espectros de FTIR (4000 – 400 cm⁻¹) das amostras com diferentes concentrações de Mn na HA: verde e 1000°C/2 h.

9.2 Produção Científica

Produção científica referente a tese

OLIVEIRA, P.H.; SANTANA, L.A.B.; FERREIRA, N.S.; SHARIFI-ASL, S.; SHOKUH FAR, T.; SHAHBAZIAN-YASSAR, R.; DALMÔNICO, G.M.L.; WERCKMANN, J.; FARINA, M.; DOS SANTOS, E.A. Manganese behavior in hydroxyapatite crystals revealed by X-ray difference Fourier maps. **CERAMICS INTERNATIONAL**, v. 1, p. 1-45, 2020.

Produções científicas em colaboração

SANTANA, L.A.B.; **OLIVEIRA, P.H.**; DAMIA, C.; TAVARES, D. S.; DOS SANTOS, E.A. Bioactivity in SBF versus trace element effects: The isolated role of Mg^{2+} and Zn^{2+} in osteoblast behavior. **MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C**, v. 118, p. 1 -13, 2021.

DORIA, A. R.; SILVA, R. S.; **OLIVEIRA JUNIOR, P. H.**; SANTOS, E. A.; MATTEDI, S.; HAMMER, P.; Salazar-Banda, G.R.; EGUILUZ, K. I. B. Influence of the RuO_2 layer thickness on the physical and electrochemical properties of anodes synthesized by the ionic liquid method. **ELECTROCHIMICA ACTA**, v. 354, p. 136625, 2020.