



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS – P²CEM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS MICRO E
NANOESTRUTURADOS BASEADOS EM COMPOS-
TOS DA FAMÍLIA DOS FOSFATOS DE CÁLCIO PA-
RA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA E RE-
CONSTITUIÇÃO DENTÁRIA

por

JANAÍNA ALVES PEIXOTO

Universidade Federal de Sergipe

Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de Campos”

São Cristóvão – Sergipe – Brasil

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS MICRO E NANOESTRUTURADOS BASEADOS EM COMPOS- TOS DA FAMÍLIA DOS FOSFATOS DE CÁLCIO PA- RA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA E RE- CONSTITUIÇÃO DENTÁRIA

JANAÍNA ALVES PEIXOTO

**Dissertação apresentada ao núcleo de
pós-graduação em ciências e engenharia
dos materiais da Universidade Federal
de Sergipe, como um dos requisitos para
a obtenção do título de mestre em Ciên-
cia e Engenharia dos Materiais.**

Orientador: Mário Ernesto G. Valério

São Cristóvão

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Peixoto, Janaína Alves.
P379d Desenvolvimento de biomateriais micro e nanoestruturados baseados em compostos da família dos fosfatos de cálcio para aplicação em regeneração óssea e reconstituição dentária / Janaína Alves Peixoto. – São Cristóvão, 2011.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Mário Ernesto Giroldo Valério

1. Nanoestruturas. 2. Hidroxiapatita. 3. Biomateriais. 4. Regeneração óssea. 5. Reconstituição dentária. I. Título.

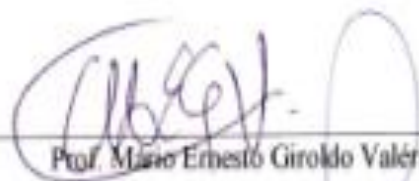
CDU 620.3:616.71

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAS MICRO E NANOESTRUTURADOS
BASEADOS EM COMPOSTOS DA FAMÍLIA DOS FOSFATOS DE CÁLCIO PARA
APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA E RECONSTITUIÇÃO DENTÁRIA.

JANAÍNA ALVES PEIXOTO

DISSERTAÇÃO 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 MESTRE EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS.

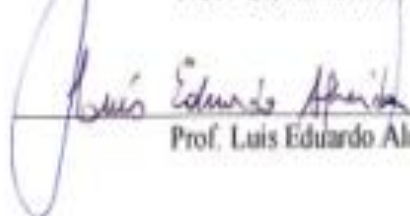
Aprovada por:



Prof. Mano Ernesto Giroldo Valério, Dr.



Prof. Giovanna Machado, Dr.



Prof. Luis Eduardo Almeida, Dr.

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2011

*Dedico este trabalho ao meu
marido Davidson e a minha querida filha Ana Carolina*

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo amor, compreensão e apoio durante a vida acadêmica.

Ao meu marido Davidson pelo carinho, paciência, compreensão e o principal incentivador da minha vida acadêmica. E a minha filha Ana Carolina pelos momentos de alegria que me proporciona.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Ernesto Giroldo Valério, pela amizade, confiança, incentivo, paciência e orientação deste trabalho.

As minhas queridas amigas Elisângela, Renata, Mirna, Verônica e Cristiane por todo carinho e companheirismo.

Aos amigos e colegas do laboratório Ramon, Ricardo, Bruna e Thiago, pela ajuda, pelas sugestões e discussões.

As secretárias Kaká, Geo e Cláudia pela eficiência e presteza com as questões burocráticas.

Ao professor Euler Araújo pelas importantes sugestões, discussões e direcionamento para o melhoramento do trabalho.

A técnica do Departamento de Física, Adriana pela ajuda nas medidas de DRX.

Ao CETENE, Recife-PE, pela realização das medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura.

A UFS e CNPQ pelo apoio à pesquisa e a CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos aqueles, inclusive não citados, que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência de diferentes tempos de maturação (26 a 120 horas) e de temperaturas de tratamentos térmicos (100 a 600° C) na morfologia e tamanho de partícula/cristalito de nanocristais de hidroxiapatita (HAP) produzidas através da precipitação controlada de uma solução contendo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (nitrato de cálcio tetrahidratado) em outra contendo $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (fosfato de amônio bibásico). Os resultados de difração de raios X (DRX) revelaram a formação da fase hexagonal da HAP em todas as amostras. Os resultados de estimativa de tamanho de cristalito calculados pelo método de Scherrer e de Williamson-Hall mostraram que não houve variação significativa de tamanho dos cristalitos com a variação de temperatura ou de tempo de maturação. Os resultados de grau de cristalinidade obtidos por dois métodos diferentes, o da largura à meia altura do pico (002) (Método 1) e o do vale entre os picos (112) e (300) (Método 2) indicaram que o grau de cristalinidade é máximo para amostras tratadas a 300° C. Já na análise de tempo de maturação, pelo método 1 foi verificado uma diminuição no grau de cristalinidade com o aumento do tempo de maturação, o que não foi verificado pelo método 2. As análises de espectroscopia RAMAN comprovaram a formação de HAP observada no DRX, visto que os espectros das amostras mostram os modos de vibração ativos típicos do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$. O modo ν_1 aparece em grande intensidade em torno de 962 cm^{-1} , sendo característico da HAP. As análises morfológicas de MET mostraram a existência de partículas nanométricas com bom grau de cristalinidade formando aglomerados. Esses aglomerados também são observados em maior escala nas imagens de MEV. Os resultados de espalhamento dinâmico de luz (EDL) juntamente com os de raios X, os de Raman e as estimativas de tamanho de cristalitos por Scherrer e W-H confirmam que há uma pequena variação nas distribuições de tamanhos das partículas em função da temperatura de tratamento térmico e que esta variação pode ser correlacionada ao grau de cristalinidade. Isso permitiu propor um modelo para os estágios iniciais de formação da HAP. As imagens de MET confirmam que há modificação da morfologia com diferenças no tratamento térmico, mas que isso não acontece com variações no tempo de maturação.

Palavras-chave: hidroxiapatita, tempo de maturação, tratamento térmico, morfologia, tamanho de cristalito.

ABSTRACT

The main aim of the present work is to study the effect of different maturation times (26 to 120h) and different heat treatments (100 to 600°C) in the morphology and particle or crystallite sizes of nanopowders of hydroxyapatite (HAP) produced by a controlled precipitation method, where a solution containing $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ is slowly mixed to a solution containing $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. The results of X-ray diffraction revealed the formation of hexagonal phase of HAP in all samples. The results of X-ray diffraction (XRD) revealed the formation of hexagonal phase of HAP in all samples. The Scherrer and Williamson-Hall methods were used to obtain the crystallite sizes of the samples and the results revealed that the changes in the average nanoparticle sizes with the heat treatment temperature and maturation time is very small. The results of degree of crystallinity obtained by two different methods, FWHM peak (002) (Method 1) and the valley between the peaks (112) and (300) (Method 2), indicated that the higher crystallinity was obtained for the sample treated at 300°C. On the other hand the degree of crystallinity decreased as the maturation time increased and that was observed only by the method 1. Raman spectroscopy results confirmed the formation of HAP observed in the XRD, since the spectra of all samples showed the typical vibrational modes of the $(\text{PO}_4)^{3-}$ groups. The symmetric stretching mode ν_1 , around 962cm^{-1} , is very intense and that is characteristic of HAP crystalline matrix. TEM results showed the existence of well crystalline nanometric particles forming agglomerates. Such clusters are also observed on a larger scale in SEM images. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements combined with those of TEM, X-rays and Raman confirm that the variations in the distribution of the particle sizes can be correlated to the degree of crystallinity of the samples as a function of the temperature of the heat treatment. And that can be explained in terms of the evolution of the HAP formation in the initial stages during heat treatment. TEM images also confirms that is the morphology of the particles change as a function of the heat treatment temperature, but it does not happen with variations in the maturation time.

Keywords: hydroxyapatite, maturation time, heat treatment, morphology, crystallite size.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Tipos de fosfatos de cálcio, fórmulas estruturais e solubilidade em meio fisiológico.....	9
Tabela 2: Parâmetros obtidos através do refinamento no programa PowderCell das amostras de HAP: fator de qualidade (S), parâmetros U, V e W e parâmetros de rede a e c.	45
Tabela 3: valores do tamanho de cristalito das amostras calculado através dos modelos de Scherrer e Williamson-Hall.	50
Tabela 4: grau de cristalinidade das amostras de hidroxapatita.....	53
Tabela 5: Distâncias P-O e ângulos O-P-O no grupo (PO ₄) ³⁻ , na estrutura da HAP, obtidos com base na estrutura cristalina do padrão ICSD 15 1414	57
Tabela 6 : deslocamento Raman do modo ν_1 das amostras de HAP em comparação com grau de cristalinidade.....	58
Tabela 7: valores de FWHM da banda de Raman e valores de cristalinidade obtidos por DRX. Fazer igual ao anterior, colocando as duas colunas do Xc.....	60
Tabela 8: distâncias interplanares e família de planos das amostras de HAP	69
Tabela 9: Valores das estimativas de tamanho de cristalito e partícula das amostras de HAP pelas diferentes técnicas de caracterização: DRX, MET e EDL	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplos da Aplicação dos biomateriais	4
Figura 2- Cela unitária da HAP, destacando os sítios de Ca(I) em azul, Ca(II) em lilás e átomos de fósforo em amarelo, oxigênio em vermelho e hidrogênio em verde.....	11
Figura 3- Projeção da estrutura da hidroxiapatita no plano perpendicular ao eixo c	13
Figura 4 – Detalhe do sítio de Ca(I) e do P mostrando os poliedros de coordenação dos sítios e o alinhamento dos poliedros de Ca(I) ao longo do eixo c do cristal. (a) Canal do Ca(I) visto ao longo do eixo c na cela unitária da HAP [46]. (b) Projeção no plano ab da célula unitária da HAP. (c) visão tridimensional de uma célula unitária da HAP.....	13
Figura 5- Detalhe do sítio do Ca(II).(a): projeção no plano ab mostrando o arranjo hexagonal dos Ca(II) no canal do OH. (b) visão tridimensional realçando os dois planos (001) nos quais os triângulos de Ca(II) se distribuem.	14
Figura 6- Detalhe do tetraedro de coordenação do P na HAP	14
Figura 7- Efeito de diferentes íons na forma do cristal de hidroxiapatita.	16
Figura 8 – À esquerda, amostras de HAP em fase gel, após o processo de filtração e lavagem com água destilada. À direita, amostras de HAP em pó, após tratamento térmico	20
Figura 9- Fluxograma geral do processo de preparação da HAP sintética pelo método de precipitação via úmida controlada e técnicas usadas para caracterizar os pós cerâmicos.....	20
Figura 10 – Figura 10: Difração de raios X por um cristal, e a dedução da Lei de Bragg.....	22
Figura 11- Quadro geral do refinamento no programa PowderCell.....	24
Figura 12- Quadro relativo aos parâmetros de rede no programa PowderCell	25
Figura 13- Quadro relativo às posições atômicas no programa PowderCell.....	26
Figura 14- Modelo de Scherrer para o cálculo de tamanho de partícula.....	27
Figura 15- Gráfico de W-H para estima de tamanho de cristalito e deformação da rede.....	29
Figura 16- Diagrama energético em que as linhas horizontais representam distintos estados de energia e que mostra as transições entre estados energéticos para diferentes interações luz-matéria.....	32
Figura 17- Bandas Rayleigh, Stokes e anti-Stokes.....	34
Figura 18- Função de correlação utilizada pelo ZS nano para análise de distribuição de tamanho de partícula.....	36
Figura 19 – Equipamento Zetasizer ZS para análise de distribuição do tamanho de partícula	37
Figura 20 – Estrutura esquemática de um microscópio eletrônico de transmissão.....	38

Figura 21 – Difrátogramas de raios X de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ produzida com diferentes tempos de maturação em comparação com o padrão ICSD 151414.....	42
Figura 22 - Difrátogramas de raios X de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ produzida com diferentes tempos de maturação em comparação com o padrão ICSD 151414	42
Figura 23 - Difrátograma simulado da HAP com base no padrão ICSD 151414 comparando a condição de medida perfeitamente monocromática, com a presença apenas da linha $K\alpha_1$ com a situação mais realista das medidas que apresenta a superposição $K\alpha_1 + K\alpha_2$	44
Figura 24 - Refinamento da amostra seca a temperatura ambiente.....	46
Figura 25 - Diferentes ajustes lineares de uma única amostra (HAP_{300}). Em (a), curva gerada pelos pontos de toda a região do difratograma experimental de 10° a 80° em 2θ . A figura (b) contém dois pontos, um no início e outro no final, a mais que a figura (c). As equações obtidas do ajuste lineares nos dois casos são mostradas nos gráficos correspondentes.	48
Figura 26 – gráficos de Williamson-Hall das amostras de HAP.....	49
Figura 27 – Gráfico dos graus de cristalinidade X_c das amostras calculados pelas equações 4.1 (curvas em preto) e 4.2 (curvas em vermelho) em função da temperatura de tratamento térmico (a) e do tempo de maturação (b).....	54
Figura 28 – Espectro Raman das amostras de HAP maturadas por 50 horas que passaram por diferentes tratamentos térmicos.	56
Figura 29 – Espectro Raman das amostras de HAP com diferentes tempos de maturação (26h, 50h e 5 dias) e calcinadas a 400°C por 1 hora.....	56
Figura 30 - (a) Representação dos 9 modos de vibração do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$, 1 modo A_1 com frequência ν_1 , 2 modos E degenerados com frequência ν_2 , 6 modos T_2 divididos em 2 grupos triplamente degenerados, um com frequências ν_3 e ν_4 [60]. (b) Tetraedro do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$ na matriz da HAP	57
Figura 31 – banda do modo ν_1 das amostras de HAP. (a) HAP com diferentes tratamentos térmicos. (b) HAP com diferentes tempos de maturação	59
Figura 32 – Posição espectral do modo ν_1 em função da temperatura de tratamento térmico (a) e do tempo de maturação das amostras (c). Largura a meia altura (FWHM) do modo ν_1 em função da temperatura de tratamento térmico (b) e do tempo de maturação das amostras (d).	60
Figura 33 - MEV da amostra de HAP maturada por 50h e seca a temperatura ambiente ($\text{HAP}_{\text{AMBIENTE}}$). (a) aglomerados de partícula de $2\text{ }\mu\text{m}$ de tamanho de forma arredondada, (b) ampliação da imagem anterior, (c) e (d), aglomerado de partículas de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{m}$	62

Figura 34 - MEV da amostra de HAP maturada por 50hs e seca a 100°C/2dias (HAP100). (a) placas de HAP com comprimentos em torno de 10 µm; (b) placa de HAP compacta, de baixa porosidade, com aproximadamente 500 nm de espessura; em (c) placa com pequenos aglomerados arredondados de partícula; e (d) aglomerado arredondado, com diâmetro menor que 1 µm.....	63
Figura 35 - MEV da amostra de HAP maturada por 50h e tratada a 600°C/1h (HAP600) Em (a) aglomerado isolado esférico menor que 1 µm. Em (b), aglomerado com diâmetro maior que 5 µm, e em (c) aproximação da figura anterior.	64
Figura 36 – MET da HAP maturada por 50h e seca a temperatura ambiente (HAP 0); (a) partículas aglomeradas, (b) partículas sobrepostas, (c) partícula com forma hexagonal.....	65
Figura 37 - MET de alta resolução da HAPAMBIENTE. As regiões marcadas na figura da esquerda foram analisadas por transformada de Fourier e os resultados estão na figura da direita	66
Figura 38 - MET de alta resolução da HAP100. A região marcada na figura da esquerda foi analisada por transformada de Fourier e os resultados estão na figura da direita.....	67
Figura 39 – MET de alta resolução da amostra HAP400 (26H). A região marcada na figura da esquerda foi analisada por transformada de Fourier e os resultados estão na figura da direita.....	67
Figura 40 - MET da HAP maturada por 50hs e calcinada a 400°C/1h (HAP400); (a) e (b) partículas aglomeradas e sobrepostas, (c) MET de alta resolução (a região marcada foi analisada por transformada de Fourier (figura da direita)).....	68
Figura 41 - Gráfico de intensidade e do número de partículas obtidos das medidas de EDL em função do tamanho das nanopartículas de HAP das amostras maturadas por 50 horas e tratadas a diferentes temperaturas.	71
Figura 42 - Gráficos da distribuição da intensidade e do número de partículas obtidos das medidas de EDL em função do tamanho das nanopartículas de HAP das amostras tratadas a 400°C e maturadas por 26 horas e 5 dias.....	72
Figura 43 - Correlação entre o tamanho das menores partículas, determinadas pela posição dos picos nos gráficos de DLS, com o grau de cristalinidade, em função da temperatura de tratamento térmico das amostras.	74

ABREVIATURAS

HAP: hidroxiapatita

TCP: fosfato tricálcico

nm: nanômetros

μm : micrômetro

Å: ângston

HAP_{AMBIENTE}: hidroxiapatita seca a temperatura ambiente

HAP₁₀₀: hidroxiapatita seca a 100°C por dois dias

HAP₂₀₀: hidroxiapatita tratada a 200°C por 1 hora

HAP₃₀₀:hidroxiapatita tratada a 300°C por 1 hora

HAP₄₀₀: hidroxiapatita tratada a 400°C por 1 hora

HAP₅₀₀: hidroxiapatita tratada a 500°C por 1 hora

HAP₆₀₀: hidroxiapatita tratada a 600°C por 1 hora

HAP_{400 (26h)}:hidroxiapatita tratada a 400°C por 1 hora e maturada por 26 horas

HAP₄₀₀:hidroxiapatita tratada a 400°C por 1 hora e maturada por 50 horas

HAP_{400 (5dias)}:hidroxiapatita tratada a 400°C por 1 hora e maturada por 5 dias

β , FWHM: largura à meiaaltura (*Full Width of Half Maximum*)

W-H: Williamson-Hall

λ : comprimento de onda

θ_{β} : ângulo de Bragg

K: fator de forma

t, D_v : tamanho de cristalito

ϵ : deformação da rede

ν : frequência

η : viscosidade

D: coeficiente de difusão

d_h : diâmetro hidrodinâmico

$g(\tau)$: função de correlação

d: distância interplanar

n: ordem de difração

KeV: quilo elétron-volt

S: fator de qualidade

X_c : grau de cristalinidade

FFT: transformada de Fourier

B (002): largura a meia altura do pico 002

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

EDL: espalhamento dinâmico de luz

DRX: difratometria de Raios X

R_{wp} , R_w e R_{exp} : fatores de ajuste

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 Considerações iniciais	1
1.2 Objetivos	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Os Biomateriais	3
2.2 Biocerâmicas	7
2.3 Cerâmicas de Fosfato de Cálcio	8
2.3.1 A Hidroxiapatita (HAP)	10
2.4 Biocerâmicas Nanoestruturadas	16
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Introdução	18
3.2 Preparação das amostras via Precipitação Controlada	18
3.3 Difractometria de Raios X	21
3.3.1 Método de Rietveld	22
3.3.2 Tamanho de cristalito e deformações da rede	26
3.4 Espectroscopia Raman	30
3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz	35
3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	38
3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Difractometria de Raios X e tamanho dos cristalitos	41
4.2 Difractometria de Raios X e grau de cristalinidade	52
4.3 Espectroscopia Raman	55
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	65
4.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)	70
5. CONCLUSÕES	75
6. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1.INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 *Considerações iniciais*

O desenvolvimento de novos biomateriais é um dos principais focos das pesquisas vinculadas à biotecnologia. Esses materiais podem ser usados em contato com o organismo no tratamento, substituição ou ampliação de tecidos, órgãos ou determinadas funções corporais, resultando em uma melhoria na qualidade e na expectativa de vida da população. Esses materiais se destacam por apresentarem biocompatibilidade com o organismo.

Os biomateriais mais empregados como substituto ósseo são as biocerâmicas à base de fosfato de cálcio. O desenvolvimento dessas biocerâmicas é um mercado que vem apresentando grande expansão devido a propriedades como biocompatibilidade e ausência de toxicidade local ou sistêmica e taxas de degradação variáveis [1]. A hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um exemplo de fosfato de cálcio. A hidroxiapatita(HAP) sob forma sintética vem sendo bastante utilizada devido a suas semelhanças com a fase mineral de ossos e dentes, o que favorece o crescimento ósseo nos locais onde ela se encontra, estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, sendo que as células não distinguem entre hidroxiapatita e a superfície óssea [2].

Na literatura, vários métodos têm sido reportados para síntese de hidroxiapatita, tais como reação de estado sólido, método sol-gel, método hidrotermal e método de precipitação [3,4,5,6], sendo este último bastante usado pela comunidade científica.

Características diferentes de partículas de hidroxiapatita tais como morfologia, cristalinidade e tamanho de partícula, têm mostrado diferentes consequências biológicas [6,7]. Foi relatado que pequenas mudanças no tamanho de partícula e morfologia do compósito HAP/polietileno têm efeito significativo nas propriedades mecânicas do compósito [8]. Dentes humanos naturais são compostos de nanobastões de hidroxiapatita, tipicamente menores que 100 nm, dispostos em lamelas e estão vinculados ao colágeno [9]. Devido ao seu tamanho na escala nanométrica, cristais de hidroxiapatita têm uma grande superfície, o que permite reabsorção homogênea por osteoclastos [10]. Por-

tanto, a sintetização de nanopós de hidroxiapatita é de grande interesse como reforço da fase biocompatível em aplicações biomédicas.

1.2 Objetivos

Estudos anteriores foram realizados sobre a influência das condições de síntese na morfologia, cristalinidade e no tamanho de partícula da hidroxiapatita [3,4,5]. Estudos mostram que o aumento da temperatura de calcinação e do tempo de maturação resulta em um aumento na cristalinidade e no tamanho de partícula de HAP [3,5,11,12]. Nesse trabalho apresentamos o desenvolvimento e estudo de nanohidroxiapatita sintética pelo método via úmida de precipitação controlada, tendo como objetivo a análise do efeito de diferentes tempos de maturação (26h, 50h e 5 dias) e diferentes tratamentos térmicos (temperatura ambiente a 600°C) na morfologia, cristalinidade e tamanho de partícula. Esses valores de tempo de maturação foram escolhidos por serem próximos aos utilizados no processo de produção via úmida encontrado na literatura [3,4,5]. Já as temperaturas de tratamento térmico foram escolhidas nessa faixa porque as variações de cristalinidade e tamanho são pequenas [3] e a maioria dos trabalhos só faz esse estudo a temperaturas maiores que 600°C.

Para cumprimento dos objetivos propostos, serão feitas análises de difratometria de Raios X, espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e espalhamento dinâmico de luz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os Biomateriais

Os biomateriais são amplamente usados na área da saúde, sobretudo em dispositivos temporário ou permanentemente implantados no corpo humano, de modo que sua utilização no reparo de partes danificadas do tecido ósseo tem revolucionado a ortopedia e odontologia atual. A evolução dos biomateriais é relativamente recente. No entanto, é possível dividi-los em três gerações:

- Primeira geração – implantes ósseos: ligas metálicas (primeira articulação artificial de quadril desenvolvida em 1961);
- Segunda geração – dispositivos bioativos: desenvolvimento de biovidros e bio-cerâmicas fosfatadas (iniciou-se nos anos 70);
- Terceira geração – engenharia de tecidos (até a atualidade).

O termo biomaterial foi definido na Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, a qual diz que se entende por biomaterial como “Toda substância (com exceção de fármacos) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais” [13]. No entanto, recentemente, uma definição mais complexa foi publicada: “Um biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, sozinho ou como parte de um complexo sistema, é usado para o controle das interações com componentes de sistemas vivos, no curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico em medicina humana ou veterinária” [14].

Em geral, os biomateriais são utilizados na interface com tecidos biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo [15,16]. Por isso, um biomaterial tem que apresentar compatibilidade bioquímica, ausência de efeitos tóxicos para o organismo e propriedades biomecânicas capazes de responderem às solicitações dinâmicas e estáticas a que estará sujeito durante a sua vida útil.

Devido a suas distintas propriedades e formas, os biomateriais podem ser aplicados em diversas partes do corpo (Figura 1). Muitos materiais da área médica são biomateriais: lentes intraoculares, enxertos, próteses, cateteres, “stents”, tubos de circulação extra-corpórea e arcabouços (“scaffolds”) empregados na Engenharia de tecidos, dentre outros. [17].

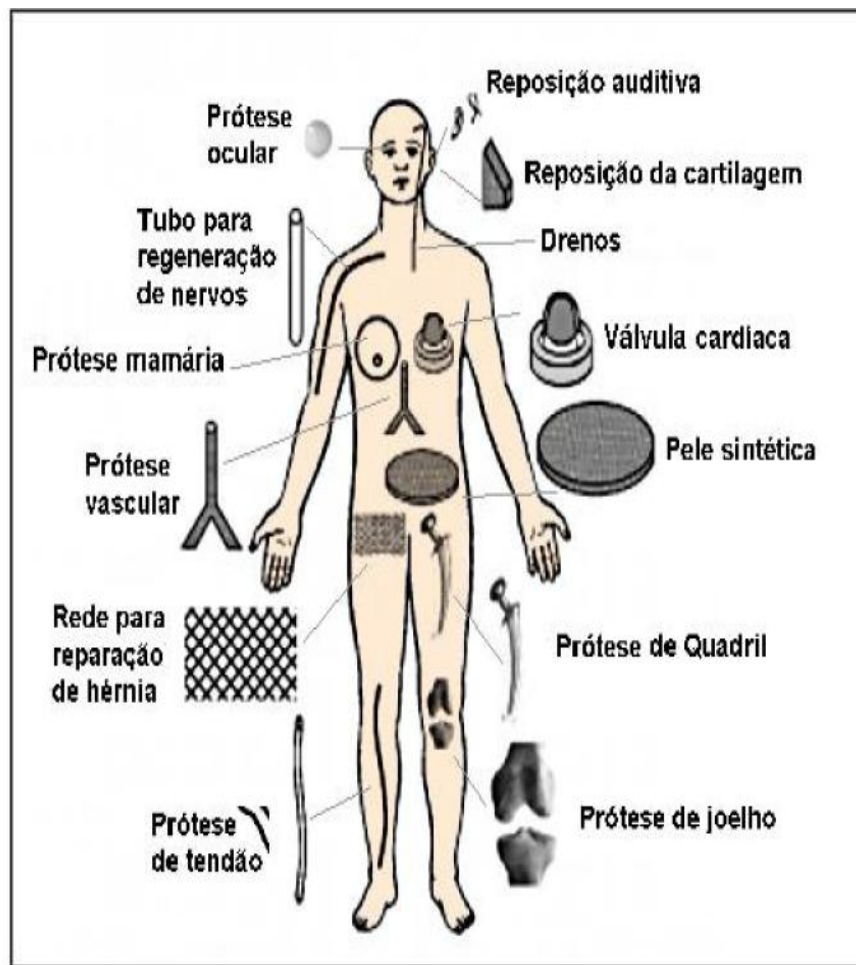


Figura 1: Exemplos da Aplicação dos biomateriais [18].

A principal diferença entre biomateriais e as outras classes de materiais é a sua capacidade de permanecer em um sistema biológico sem danificar o ambiente e sem ser danificado durante esse processo. O estudo destes materiais envolve diferentes áreas do conhecimento científico: física, química, biologia, engenharia de materiais e farmacologia, e o objetivo final de todos os estudos é fazer com que os biomateriais implantados

desempenhem adequadamente a função do corpo que lhe foi designada, chegando o mais próximo possível da função substituída.

Com o aumento do número de materiais utilizados como biomateriais e os diversos aspectos envolvidos na interação com tecidos biológicos, têm-se procurado classificá-los em diversos grupos. De uma forma geral, os biomateriais podem ser classificados em função do comportamento fisiológico e em função da sua natureza e origem.

Segundo o comportamento fisiológico, os biomateriais podem ser classificados em biotoleráveis, bioinertes e bioativos[19]:

- Biotoleráveis - materiais tolerados pelo organismo, que se caracterizam pela formação de uma camada envoltória de tecido fibroso que oferece um isolamento dos tecidos adjacentes. Essa camada é formada devido à liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros que se formam a partir do material implantado. Quanto maior a camada de tecido fibroso formada, menor a tolerância dos tecidos ao material implantado. São exemplos de materiais biotoleráveis praticamente todos os polímeros sintéticos, bem como a grande maioria dos metais. Dentre os metais e suas ligas, os mais utilizados são o ouro, as ligas de aço inoxidável e as ligas de CrCoMo.
- Bioinertes – materiais também tolerados pelo organismo, mas a formação de tecido envoltório tem espessura mínima, sendo menos suscetíveis a causar uma reação biológica adversa. Esses materiais liberam quantidades mínimas de produtos químicos, favoráveis à interação com os tecidos vivos. São exemplos de materiais bioinertes alguns metais, como o titânio e algumas cerâmicas, como a alumina, a zircônia e aquelas a base de carbono.
- Bioativos – materiais em que se observa a formação de uma interação firme com os tecidos adjacentes. A bioatividade é definida como sendo a propriedade de formar tecido sobre a superfície de um biomaterial e estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais. Os materiais bioativos utilizados na substituição de tecido ósseo possuem normalmente na sua composição química íons livres de cálcio e fósforo superficiais, que promovem uma ligação físico-química com o tecido ósseo envolvente, estabelecendo uma interface capaz de favorecer o desenvolvimento de processos como fixação do implante, biocolonização e regeneração de tecidos anfitriões. Os principais materiais dessa classe são os bio-

vidros, as vitrocerâmicas, e os fosfatos de cálcio (hidroxiapatita e o fosfato tricálcico).

Além da classificação referida, encontram-se incluídas nos comportamentos fisiológicos as denominações de biocompatibilidade e osteocondutividade. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade do material ter uma resposta apropriada numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos. É importante destacar que a bioatividade representa um caso específico de biocompatibilidade, pois materiais que propiciam a formação de tecido fibroso ao seu redor são considerados biocompatíveis, mas não bioativos. Já a osteocondutividade é a propriedade que alguns materiais possuem de poder guiar a formação óssea na sua superfície, quando são implantados em tecido ósseo. Este processo ocorre pela penetração de vasos nos espaços e/ou nos poros existentes na estrutura do material, que vão induzir a deposição de novo osso [20]. Quase todos os materiais bioativos, habitualmente usados, podem ser classificados como sendo materiais osteocondutores.

Quanto ao tipo de material utilizado, os biomateriais podem ser classificados de acordo com sua natureza e origem em quatro grandes famílias [21,22]:

- Autólogos – o biomaterial é obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo;
- Homólogos – são obtidos de indivíduos da mesma espécie do receptor;
- Xenogênicos – são obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor, sendo mais comumente obtidos de bovinos;
- Aloplásticos – podem ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica.

Os biomateriais podem ser classificados ainda como bioestáveis ou bioabsorvíveis [23]:

- Bioestáveis – permanentes. Materiais utilizados na substituição de um tecido lesado por tempo indeterminado, devendo possuir características mecânicas e físico-químicas compatíveis com a função a qual foi designado;
- Bioabsorvíveis – temporários. Materiais que substituem tecidos que necessitam de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se cicatrize, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Após certo período de tempo em contato com os tecidos, esses materiais

acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do material do implante. Os principais exemplos desses materiais são os fosfatos tricálcicos (TCP), ácido polietático e gesso.

2.2 Biocerâmicas

Biocerâmicas podem ser definidas como biomateriais de origem cerâmica. Em geral, são consideradas biocompatíveis e frágeis, e satisfazem necessidades requeridas em algumas aplicações, tais como: excelente resistência à compressão; alta resistência ao desgaste; pequeno coeficiente de atrito, o que é interessante para aplicação em articulações; boa aparência estética que se assemelha com o dente natural e fácil aplicação [24]. As biocerâmicas podem ser produzidas em uma variedade de formas e fases e podem cumprir diferentes papéis na reparação do corpo. As biocerâmicas podem ter funções estruturais, como em próteses; podem ser utilizadas como revestimentos para melhorar a biocompatibilidade de implantes metálicos; bem como funcionar como reticulados reabsorvíveis, funcionando como estruturas temporárias que são dissolvidas quando o corpo reconstrói o tecido ou órgão danificado. Outras são utilizadas como sistema de entrega de medicamentos (drug delivery).

Tem-se conhecimento do uso de cerâmicas como biomateriais desde 1892, quando Dressman relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos, além de servir como preenchimento de cavidades ósseas. Entretanto, suas propriedades pouco atraentes, como baixa resistência e rápida absorção pelo organismo, geravam a fragmentação e degradação desse material em pouco tempo. Outros estudos pioneiros sobre a utilização de materiais cerâmicos como biomateriais foram realizados por Albee, em 1930 [25], utilizando uma cerâmica de fosfato tricálcico para regenerar um defeito ósseo e para a formação de osso novo. Cinquenta anos depois começaram a surgir diferentes tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio como materiais implantáveis para aplicação em medicina e odontologia. Em 1974 foi publicada a primeira aplicação odontológica do β -fosfato tricálcico no tratamento de doenças periodontais [26,27], seguindo-se em 1975, pelo trabalho de Nery *et al* [28], com β -fosfato tricálcico, com a

introdução do conceito de porosidade como uma característica importante para estes tipos de biocerâmicas.

Alguns trabalhos existentes na literatura demonstram que as cerâmicas à base de fosfatos de cálcio são bioativas e sua bioatividade depende fundamentalmente da composição química e da microestrutura da biocerâmica. Como exemplo tem-se os fosfatos de cálcio.

2.3 Cerâmicas de Fosfato de Cálcio

A grande aceitação das biocerâmicas à base de sais de fosfato de cálcio deve-se, principalmente, a sua semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; ao seu alto grau de biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade [28].

Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, que por serem formados basicamente por íons cálcio e fósforo, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica [29].

As principais limitações do uso de fosfatos de cálcio com biomateriais são as suas propriedades mecânicas, por serem frágeis e apresentarem baixa resistência à fadiga. Os pobres comportamentos mecânicos são ainda mais evidentes em cerâmicas porosas, visto que porosidade superior a 100 μ m é uma exigência para que ocorra uma vascularização adequada e colonização de células ósseas [30-32]. É por isso que, em aplicações biomédicas, os fosfatos de cálcio são usados principalmente como revestimentos e enxertos.

Há várias fases de fosfatos de cálcio, como exemplo tem-se a bruxita $[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, o fosfato tricálcio $[\text{TCP}, \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e a hidroxiapatita $[\text{HAP}, \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ [33], sendo esta última fase similar à fase inorgânica constituinte do osso humano. O tipo de fase de fosfato de cálcio formado irá depender das condições do meio utilizado durante o processo de síntese, tais como temperatura, pH, concentração de íons e razão Ca/P.

Os fosfatos de cálcio são classificados pela sua razão Ca/P que pode variar de 0,5 a 2,0. A estabilidade das fases de fosfato de cálcio depende da temperatura e do pH do meio[34].

A solubilidade é uma das mais importantes propriedades dos compostos de fosfato de cálcio. Para a maioria dos fosfatos de cálcio, à medida que a razão Ca/P aumenta, o produto da solubilidade diminui, ou seja, há uma redução da razão de degradação desses materiais in vivo [35]. A tabela 1 mostra os tipos de fosfatos de cálcio, suas fórmulas estruturais e solubilidade em meio fisiológico.

Tabela 1: Tipos de fosfatos de cálcio, fórmulas estruturais e solubilidade em meio fisiológico.

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P	Solubilidade a 25°C, g/L
Fosfato Monocálcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	~18
Fosfato Dicálcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	~0.088
Fosfato Octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	~ 0.0081
α -Fosfato Tricálcico (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	~0.0025
β -Fosfato Tricálcico (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	~0.0005
Apatita com deficiência de cálcio (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} (0 < x < 1)$	1.5-1.67	~0.0094
Hidroxiapatita (HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	~0.0003
Fluorapatita (FA ou FAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1.67	~0.0002
Fosfato Tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	~0.0007

Fonte: adaptado de [33]

Dentre todos os fosfatos de cálcio, o β -fosfato tricálcico (β -TCP) e a hidroxiapatita (HAP) são os que têm despertado maior interesse de estudo para aplicações biológicas devido a suas excelentes respostas biológicas em ambientes fisiológicos [36-38]. Devido à semelhança química entre a hidroxiapatita e o osso mineralizado, a HAP sintética apresenta forte afinidade com os tecidos hospedeiros. Por outro lado, o β -TCP tem mostrado ser reabsorvível *in vivo*, resultando em um crescimento de novos ossos substituindo o implante [39].

2.3.1 A Hidroxiapatita (HAP)

A hidroxiapatita é um sal à base de fosfato de cálcio, formando a principal fase inorgânica dos tecidos duros do corpo humano.

Além da sua ocorrência biológica, a hidroxiapatita pode ser sintetizada em laboratório por reações de estado sólido e por métodos úmidos. As sínteses no estado sólido requerem altas temperaturas, mas o material obtido é muito cristalino e geralmente estequiométrico. Os métodos úmidos são método de precipitação em solução aquosa, método hidrotermal, método sol-gel, método de microemulsão, entre outros. Por meio dos métodos úmidos podem-se preparar materiais com diferentes morfologias, estequiometria e diferentes cristalinidades. No método de precipitação, a temperatura de preparação não excede os 90°C, podendo ser preparados cristais de dimensões nanométricas com formas variadas: do tipo agulha, lâmina, bastões, etc. As condições de preparação influenciam diretamente a estequiometria, razão Ca/P e cristalinidade da HAP [40].

A HAP sintética apresenta alta similaridade estrutural, química e física com a matriz mineral óssea; biocompatibilidade; bioatividade e osteocondutividade, ou seja, capacidade de formar ligação química com o osso, acelerando a formação do novo osso ao redor do implante e, com isso, acelerando o tempo de cicatrização, diminuindo, consequentemente, o tempo total de tratamento. Além desta característica, a HAP tem elevada capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, tornando-a substituta do osso humano em próteses e implante e do controle da perda óssea, sendo utilizada também no tratamento de tumores ósseos, através da ação prolongada de fármacos anticancerígenos; e no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos, provenientes da indústria metalúrgica e da incineração de lixo industrial. Na catálise industri-

al a cerâmica HAP aparece como uma base sólida capaz de catalisar a decomposição de álcoois, assim com a oxidação do metano [41].

A hidroxiapatita estequiométrica é o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel de todos. Possui fórmula estrutural $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 [42]. Devem ser considerados dois tipos de HAP: as sintetizadas em baixas temperaturas, que apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos, e as sintetizadas a altas temperaturas, que apresentam alta cristalinidade e tamanho de cristais grandes.

Em aspectos estruturais, até a temperatura de 250°C a hidroxiapatita pura cristaliza-se na forma monoclinica com grupo espacial $P2_1/b$; entretanto, acima de 250°C ocorre uma transição alotrópica para a forma hexagonal, com grupo espacial $P6_3/m$ [43,44]. No entanto, algumas impurezas ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal à temperatura ambiente. Esse é o motivo pelo qual os monocristais naturais de hidroxiapatita geralmente exibem uma conformação hexagonal, que possui cela unitária com parâmetros de rede: $a = b = 9,3983 \text{ \AA}$ e $c = 6,8677 \text{ \AA}$. A cela unitária da HAP está representada na Figura 2.

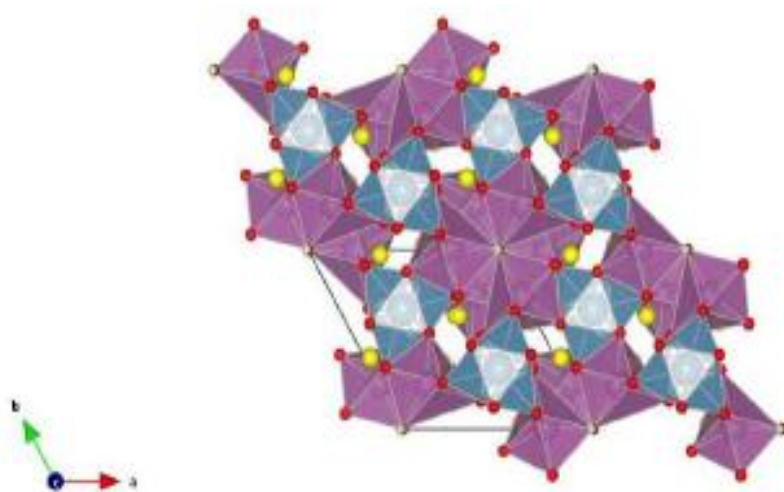
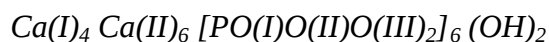


Figura 2: Cela unitária da HAP, destacando os sítios de Ca(I) em azul, Ca(II) em lilás e átomos de fósforo em amarelo, oxigênio em vermelho e hidrogênio em verde [45].

A hidroxiapatita com cela unitária hexagonal é formada por 6 átomos de fósforo, 2 íons de hidroxila OH⁻, 10 íons de cálcio e 24 átomos de oxigênio. Os íons de Ca²⁺ estão agrupados em dois sítios não equivalentes, quatro íons no sítio Ca(I) e seis íons no sítio Ca(II). Os 24 átomos de oxigênio ocupam 3 sítios na estrutura, os 6 átomos de fósforo e o grupo OH⁻ ocupam um sítio.



Os Ca²⁺ situados no sítio Ca(I) estão alinhados paralelamente ao eixo *c* e cercados por átomos de oxigênio, formando pirâmides poliédricas. As bases triangulares dessas pirâmides são ocupadas acima e abaixo por 3 átomos de O(I) e por 3 átomos de O(II), respectivamente, conforme é mostrado na figura 3 e 4. Os dois tetraedros do poliedro de Ca(I) são rodados um em relação ao outro de forma que os oxigênios não são alinhados, como pode ser visto na figura 4b. Além disso, as distâncias Ca-O são diferentes. Enquanto as distâncias Ca(I)-O(I) estão entre de 2,3864 a 2,387Å, as distâncias Ca(I)-O(II) estão entre 2,438 a 2,4386Å [46].

Os sítios de Ca(II) são octaédricos bastante distorcidos, e os 6 átomos de Ca estão dispostos em dois triângulos equiláteros perpendiculares ao eixo *c*: um no plano (001) com *z*=0,25 e outro *z*=0,75, de maneira que sua projeção no plano *ab* forma um hexágono, figura 5. Os triângulos de Ca²⁺ têm 0,408 nm de lado, formando um canal ao longo do eixo *c*. Os íons OH situam-se no centro do canal dos Ca²⁺ logo abaixo do plano dos Ca²⁺ (em *Z* = ~0.7), como mostrado nas figuras 3 e 5. Os íons do sítio Ca(I) estão coordenados a seis átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO₄ e a outros três átomos de oxigênio relativamente distantes. Já os íons do sítio Ca(II) estão coordenados a outros cinco oxigênios e a uma hidroxila.

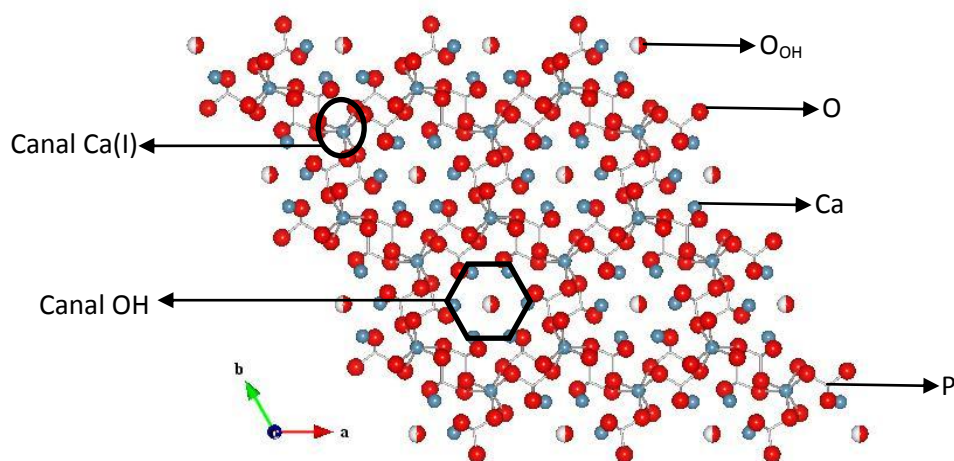


Figura 3: Projeção da estrutura da hidroxiapatita no plano perpendicular ao eixo c .

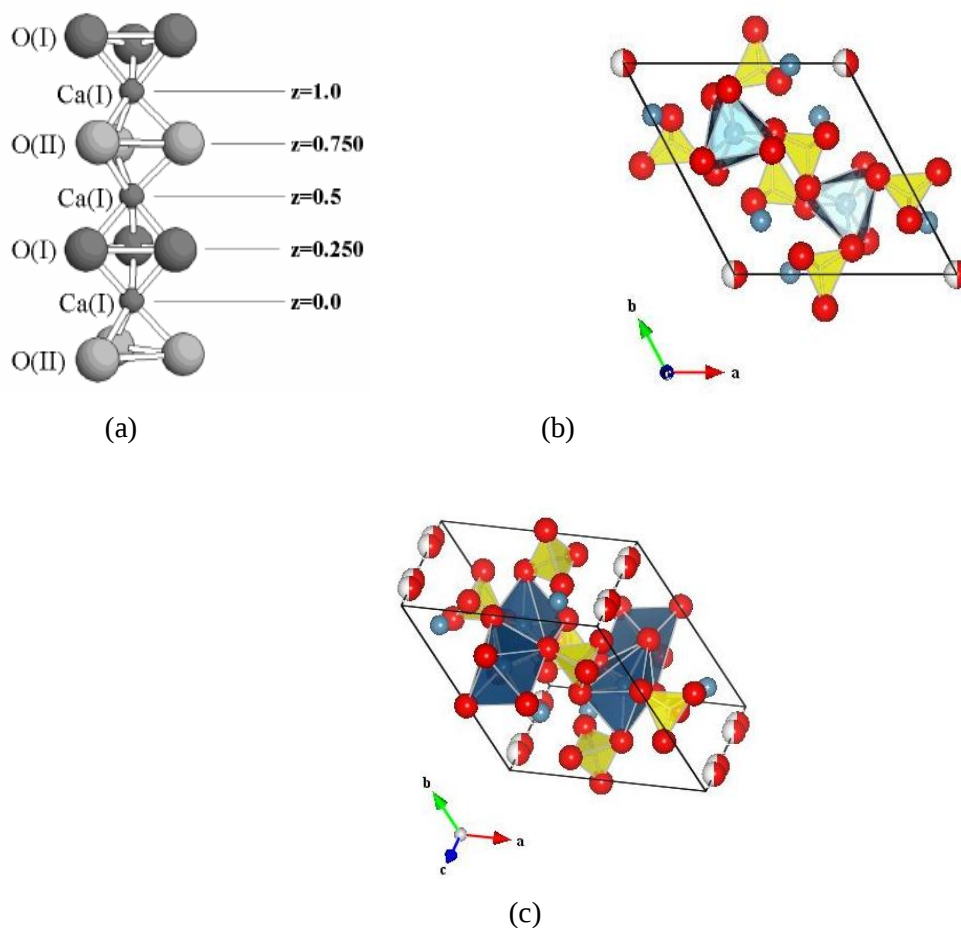


Figura 4: Detalhe do sítio de Ca(I) e do P mostrando os poliedros de coordenação dos sítios e o alinhamento dos poliedros de Ca(I) ao longo do eixo c do cristal. (a) Canal do Ca(I) visto ao longo do eixo c na cela unitária da HAP [46]. (b) Projeção no plano ab da célula unitária da HAP. (c) visão tridimensional de uma célula unitária da HAP.

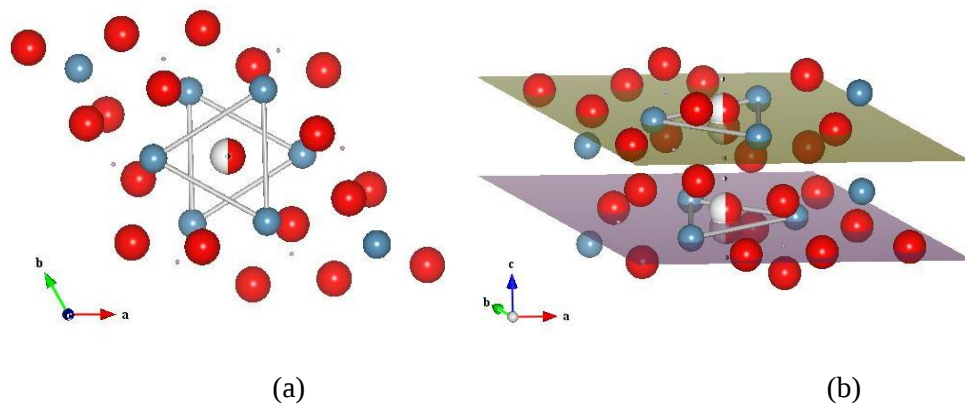


Figura 5: Detalhe do sítio do Ca(II). (a): projeção no plano ab mostrando o arranjo hexagonal dos Ca(II) no canal do OH. (b) visão tridimensional realçando os dois planos (001) nos quais os triângulos de Ca(II) se distribuem.

Cada um dos 6 átomos de fósforo está coordenado a 4 átomos de O, denominados de O(I), O(II) e O(III), dando origem a 6 tetraedros de PO_4 que formam a base estrutural unitária da hidroxiapatita. Os tetraedros de PO_4 estão ligados a dois ou três átomos de cálcio, de acordo com o número de coordenação do oxigênio.

Os tetraedros são ligeiramente distorcidos de forma que as distâncias são: $\text{P-O(I)}=1.5515$, $\text{P-O(II)}=1.5391$ e $\text{P-O(III)}=1.5396$. Devido a esta deformação, os ângulos internos ao tetraedro também são diferentes e se agrupam em três valores: 3 ângulos $\phi_{\text{O2-P1-O3}} = \phi_{\text{O2-P1-O3}} \sim 107^\circ$, 2 ângulos $\phi_{\text{O1-P1-O3}} \sim 110^\circ$ e $\phi_{\text{O2-P1-O1}}=112.5^\circ$. A figura 6 mostra detalhe do arranjo dos íons P e O no tetraedro PO_4 da HAP. Os tetraedros de PO_4 estão ligados a dois ou três átomos de Ca, de acordo com o número de coordenação do oxigênio.

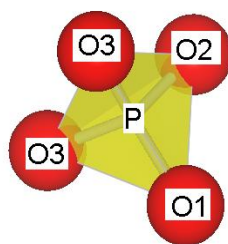


Figura 6: Detalhe do tetraedro de coordenação do P na HAP.

Por último, o grupo hidroxila ocupa um sítio 4e na estrutura da HAP cuja coordenada $z=0.205$ (coordenada do O) está próxima da coordenada especial $z=1/4$ e por isso são dois sítios muito próximos ao longo do eixo c. Como o fator de ocupação do sítio é 50%, isso significa que quando o sítio imediatamente abaixo de $(0\ 0\ 1/4)$ está ocupado, o imediatamente acima está vazio e vice versa.

Quase todas as posições atômicas da hidroxiapatita são iguais as da fluoroapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$, com exceção do grupo hidroxila, que se encontra deslocado $0,20\text{ \AA}$ para cima ou para baixo ao longo do eixo c em relação ao centro do triângulo formado pelo sítio de Ca_2 [47,48].

A estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , etc. As hidroxilas podem ser trocadas por carbonatos, flúor e cloro e os grupos fosfatos por carbonatos e vanadatos. Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade, a solubilidade e as propriedades de adsorção da estrutura da hidroxiapatita, dependendo do sítio ocupado [49].

O íon carbonato CO_3^{2-} possui grande relevância biológica. O teor de carbonato presente na fase mineral da dentina, esmalte e ossos varia de 4-8%. A hidroxiapatita com teor de carbonato é chamada de apatita carbonatada, podendo ser de dois tipos: tipo A, quando o íon carbonato entra no sítio do íon hidroxila, o que resulta em uma expansão do eixo “a” e uma contração do eixo “c” da estrutura da HAP; e tipo B, quando o íon carbonato substitui o íon fosfato retraindo o eixo “a” e expandindo o eixo “c”, diminuindo a cristalinidade e o tamanho do cristal, alterando a forma acicular para alongada e achatada, aumentando assim a dissolução das apatitas carbonatadas em meio biológico, como mostrado na figura 7 [39]. Tanto a substituição do grupo hidroxila quanto do grupo fosfato pelo grupo carbonato precisa ser acompanhada de outras alterações estequiométricas já que a valência do carbonato é 2-, em relação a 1- da hidroxila e 3- do grupo fosfato.

A substituição de OH^- pelo F^- causa contração no eixo “a” sem efeitos significativos no eixo “c”. A cristalinidade é aumentada, formando-se cristais maiores e mais compactos. A apatita torna-se mais estável e menos solúvel. Esse tipo de mecanismo é

empregado para inibição de cáries dentárias. A adição e incorporação de fluoreto aumentam a razão Ca/P, aproximando-a do valor estequiométrico [39], ver figura 7.

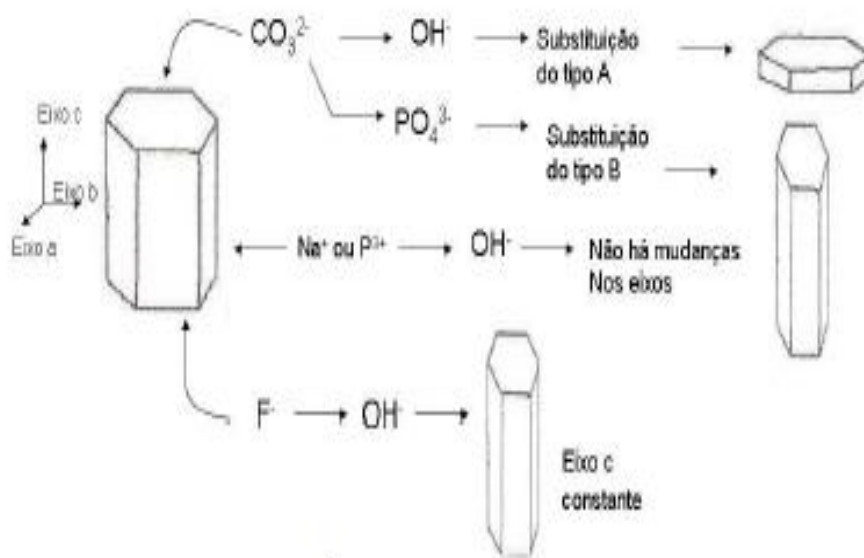


Figura 7: Efeito de diferentes íons na forma do cristal de hidroxiapatita adaptado de [39].

2.4 Biocerâmicas Nanoestruturadas

Um material nanocristalino é definido como sendo “um material que é composto de muitos cristais, a maioria dos quais uma ou mais dimensões são da ordem de 1 a 100 nm ou menos” [50].

Nanopós são pós extremamente finos com um tamanho médio de partículas na faixa de 1 a 100 nm e nanofibras são fibras com diâmetro dentro de 1 a 100 nm [33].

O grande interesse pelas biocerâmicas nanoestruturadas está relacionado às novas características que esses materiais podem oferecer, tais como, a microestrutura e nanoestrutura microporosas, elevada área superficial de grãos e de microporos, estrutura cristalográfica similar a do esqueleto humano e a boa biocompatibilidade.

De acordo com muitos estudos, as dimensões das apatitas biológicas em tecidos calcificados são sempre no intervalo de poucas centenas de nanômetros, com os menores blocos na escala de tamanho manométrico [33].

O desenvolvimento de biomateriais baseados em fosfatos de cálcio se beneficia da nanotecnologia, que oferece uma abordagem única para superar as deficiências de diversos materiais convencionais. Por exemplo, cerâmicas em nanoescala podem apresentar ductilidade significativa antes de sofrer uma fratura pelos contornos de grão. Em 1987 Karchet Al.[51] relatou que, com dimensões nano, uma cerâmica frágil pode sofrer uma grande deformação plástica, de até 100%. Além disso, a cerâmica nanoestruturada pode ser sinterizada a uma temperatura mais baixa, reduzindo os problemas associados com o processo de sinterização a altas temperaturas. Assim, biocerâmicas nanométricas e nanocristalinas representam uma classe promissora na área de implantes ortopédicos e dentários, representando uma melhora nas propriedades biológicas e biomecânicas.

Estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” evidenciaram o aumento da viabilidade celular óssea com o emprego de biocerâmicas nanométricas de alumina, hidroxiapatita e de titânia. Essas cerâmicas, quando na forma particulada esférica e/ou equi-axiais com diâmetro inferior a 100 nm, proporcionam em suas superfícies a liberação de íons de Ca e P, aumentando a absorção de cálcio e favorecendo a mineralização precoce da matriz óssea [52]. Diferentes estudos constataram que a utilização de biomateriais nanoestruturados favorece a osseointegração, a osseoindução através da proliferação de células de osteoblastos, e outras células ósseas sobre a superfície das nanopartículas e para o interior dos microporos e nanoporos dos grânulos.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Introdução

Os compostos propostos nesse trabalho foram produzidos através do método de reação de precipitação controlada. A síntese de pós por este método é muito utilizada pela comunidade científica, visto que é uma técnica de baixo custo e as partículas obtidas apresentam composição homogênea, muito fina e com granulometria estreita.

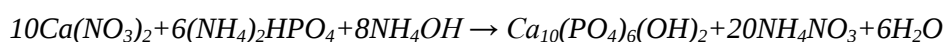
Uma das principais desvantagens da produção da hidroxiapatita por este método é que, geralmente, resulta em pós com partículas aglomeradas. Os aglomerados formam grânulos, ao se consolidarem, característica muitas vezes indesejável para um pó cerâmico.

3.2 Preparação das amostras via Precipitação Controlada

Os reagentes de partida utilizados foram nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ a 0,167 mol, como fonte de íons Ca^{2+} ; fosfato de amônio bibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ a 0,1 mol, como fonte de fosfato (PO_4^{3-}); e uma base fraca, hidróxido de amônio $[\text{NH}_4\text{OH}]$, usada no controle do pH.

A metodologia para produção de hidroxiapatita consiste em três etapas:

(I) A reação de precipitação via úmida ocorre gotejando de forma controlada ($\sim 2\text{mL/min}$) uma solução de nitrato de cálcio em uma solução de fosfato de amônio, mantendo-se durante todo o processo o pH em torno de 10,4 da mistura através da adição de hidróxido de amônio. Todo esse processo ocorre sob agitação constante com uma taxa de 10.000 rpm, para garantir uma boa homogeneização da reação. Para evitar mais uma variável no processo de síntese, é necessário um controle da temperatura. A temperatura de síntese usada foi 27°C . A reação que representa a síntese do material é a seguinte:



(II) Maturação da solução: após a reação, a amostra fica maturando, para que haja continuação da reação acima citada e crescimento dos grãos, formando-se uma suspensão, que é, então, filtrada e lavada com água destilada, resultando em um gel de cor esbranquiçada.

Foram produzidos três lotes de amostras, sendo que a diferença de um lote para outro foi o tempo de maturação.

- Lote 1: amostra maturada por 26 horas;
- Lote 2: amostra maturada por 50 horas;
- Lote 3: amostra maturada por 5 dias (120 horas).

(III) Tratamento térmico em atmosfera aberta. Após o processo de filtragem, foram empregados diferentes tratamentos térmicos no material em forma de gel.

A amostra maturada por 50 horas foi dividida em sete amostras, sendo que o que diferenciou uma das outras foi o tratamento térmico pela qual passaram:

- Amostra seca a temperatura ambiente, por meses, denominada $HAP_{AMBI-ENTE}$;
- Amostra seca a 100°C por 2 dias, denominada HAP_{100} ;
- Amostra calcinada a 200°C por 1 hora, denominada HAP_{200} ;
- Amostra calcinada a 300°C por 1 hora, denominada HAP_{300} ;
- Amostra calcinada a 400°C por 1 hora, denominada HAP_{400} ;
- Amostra calcinada a 500°C por 1 hora, denominada HAP_{500} ;
- Amostra calcinada a 600°C por 1 hora, denominada HAP_{600} ;

As amostras maturadas há 26 horas e 5 dias foram calcinadas a 400°C por uma hora, sendo denominadas de $HAP_{400 (26h)}$ e $HAP_{400 (5 DIAS)}$.

A calcinação das amostras foi feita em um forno modelo N1100-HC, a uma taxa de 10 °C/min., em atmosfera aberta. A figura 8 ilustra o aspecto das amostras produzidas em fase gel, após o processo de filtragem e lavagem com água destilada; e em pó, após tratamento térmico. Vale ressaltar que as amostras que passaram por diferentes tratamentos térmicos, apresentaram-se como pós-brancos.

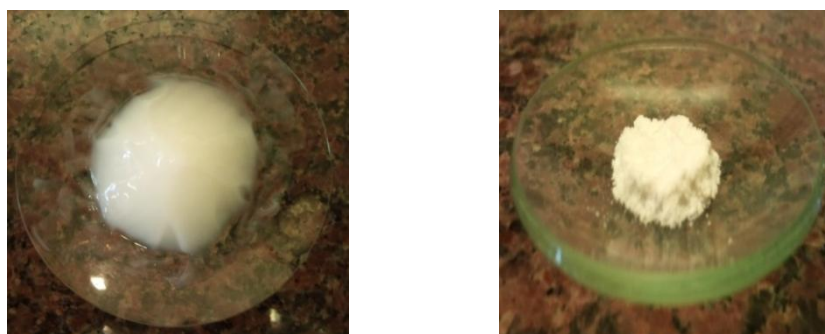


Figura 8: À esquerda, amostras de HAP em fase gel, após o processo de filtração e lavagem com água destilada. À direita, amostras de HAP em pó, após tratamento térmico.

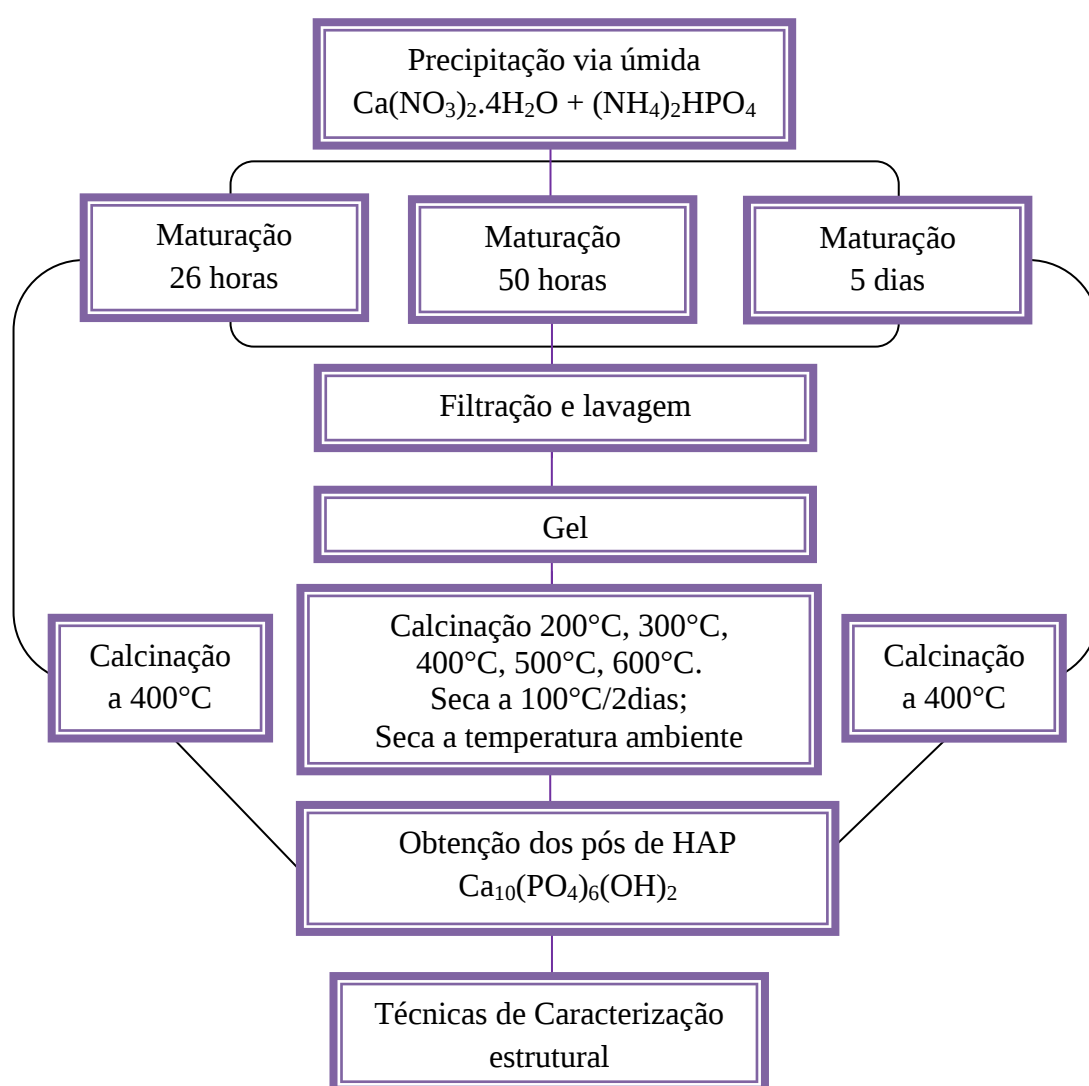


Figura 9: Fluxograma geral do processo de preparação da HAP sintética pelo método de precipitação via úmida controlada e técnicas usadas para caracterizar os pós-cerâmicos

3.3 Difratometria de Raios X

A difratometria de raios X é uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, oferecendo informações sobre a geometria da rede, identificação de materiais desconhecidos, orientação de um cristal, defeitos e outros parâmetros estruturais.

Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente (sem perda de energia). Esse tipo de fenômeno é chamado de espalhamento coerente. O fóton de raios X depois da colisão com o elétron muda de trajetória, porém, mantém a mesma energia e mesma fase do fóton incidente.

Quando os átomos que geram este espalhamento estiverem espaçados regularmente, como em uma estrutura cristalina, e apresentarem entre eles espaçamentos comparáveis em magnitude ao comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que efeitos de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos.

Para planos paralelos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios X vão depender da diferença de caminho percorrida pelos raios X e do comprimento de onda da radiação incidente. Essa condição é expressa pela Lei de Bragg:

$$n.\lambda = 2d.\sin\theta \quad (3.1)$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, d a distância entre planos paralelos da estrutura cristalina, n a um número inteiro (ordem de difração) e θ ao ângulo de incidência dos raios X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos).

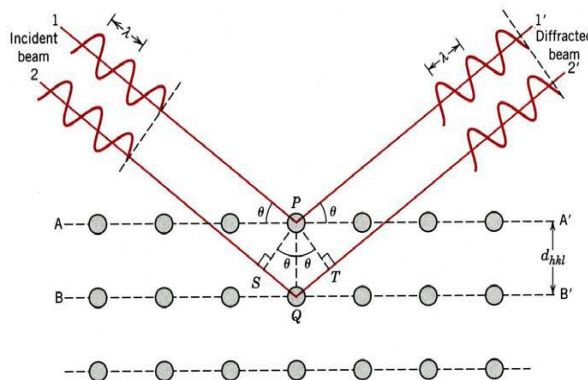


Figura 10: Difração de raios X por um cristal, e a dedução da Lei de Bragg [53]

As medidas de difração de raios X foram realizadas num difratômetro da marca RigakuUltima+RINT 2000/PC, com feixe de radiação Cu K $_{\alpha}$ ($\lambda=1.5406$ Å), operando no regime 40 KV/40 mA, num intervalo de varredura 2θ entre 8° e 80° , sendo utilizado o modo varredura contínua com velocidade de $2^{\circ}/\text{min}$. Para análise qualitativa das fases existentes, foi utilizado o banco de dados ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database, Germany*), através do portal periódicos da CAPES [46].

3.3.1 Método de Rietveld

A análise de estruturas cristalinas por difração de raios X em pó é de grande importância para a identificação dos materiais. No entanto, essa análise se restringe muitas vezes na identificação das reflexões de Bragg e na comparação com um banco de dados onde é possível identificar o material e determinar as possíveis fases formadas. O método de Rietveld é uma técnica utilizada para a determinação da estrutura cristalina e análise quantitativa de fases, através dos espectros de difração (de raios X ou de nêutrons).

Este método é baseado na comparação do espectro de difração de raios X obtido, com um espectro calculado a partir dos dados das estruturas (parâmetros cristalográficos) das fases existentes. Utilizando o método dos pós, são usuais duas situações:

1) obtido o espectro de difração de um material puro é possível efetuar o refinamento da respectiva estrutura cristalina, isto é a obtenção do grupo de simetria, dos parâmetros de rede e, eventualmente as posições atômicas e os fatores térmicos;

2) conhecida a estrutura cristalina das fases presentes na amostra, é possível quantificar as fases, refinando simultaneamente os parâmetros das respectivas estruturas, e obter o tamanho do cristalito.

3.3.1.1 Indicadores estatísticos

O critério usado para avaliar a qualidade do refinamento, ou seja, a convergência dos parâmetros refinados é feito por indicadores estatísticos numéricos utilizados durante o processo de cálculo e após o término deste. É por meio desses indicadores que se pode avaliar o andamento do refinamento, optando-se por dar prosseguimento, parar ou finalizá-lo.

Em seguida, são apresentados alguns indicadores estatísticos usados para estimar a qualidade do ajuste:

$$R_{wp} = \left[\frac{\sum_i w_i (Y_{io} - Y_{ic})^2}{\sum_i w_i (Y_{io})^2} \right]^{1/2} \times 100\% \quad (3.2)$$

$$R_p = \left[\frac{\sum_i |Y_{io} - Y_{ic}|}{\sum_i |Y_{io}|} \right] \times 100\% \quad (3.3)$$

$$R_{exp} = \left[\frac{N+P-C}{\sum_i w_i (Y_{io})^2} \right]^{1/2} \times 100\% \quad (3.4)$$

Onde Y_{io} e Y_{ic} são respectivamente as intensidades observadas e calculadas no i -ésimo passo (na escala 2θ), w_i é um fator de peso da distribuição, N é o número total de pontos, P é o número de parâmetros ajustados e C é o número de vínculos aplicados.

O indicador de qualidade do ajuste que ao final do refinamento deve estar próximo de 1 é dado por:

$$S = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \quad (3.5)$$

O programa utilizado para o refinamento das estruturas foi o PowderCell. Através deste software é possível ajustar, gradualmente, a estrutura cristalina, com o objetivo de tornar o cálculo comparativo entre os difratogramas experimentais e teóricos os mais próximos possíveis [54].

3.3.1.2 Parâmetros do Refinamento

O PowderCell permite a visualização simultânea do espectro experimental e do espectro teórico, ao mesmo tempo em que fornece os valores de R_p , R_{wp} e R_{exp} . Os parâmetros envolvidos na otimização devem ser ajustados gradualmente, em virtude do elevado número dos mesmos, partindo dos mais relevantes. Na figura 11 observam-se os primeiros parâmetros a serem refinados: fator de escala, grau do polinômio, zero do goniômetro e deslocamento da amostra [54].

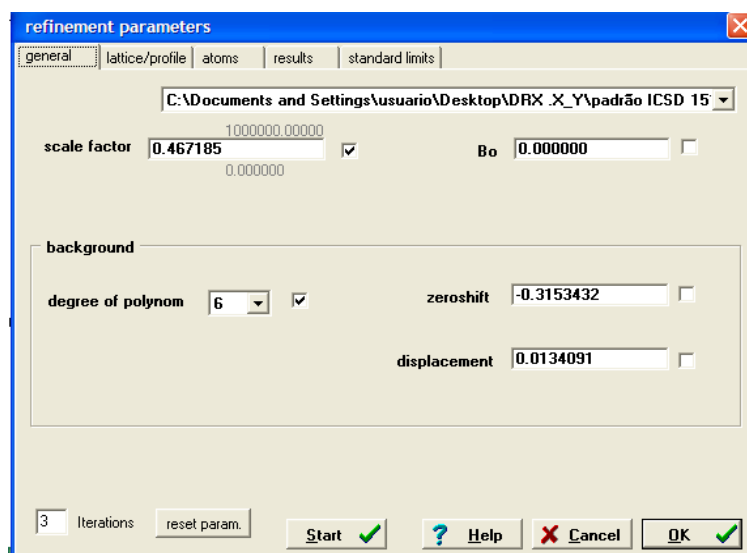


Figura 11: Quadro geral do refinamento no programa PowderCell

Existe um conjunto de funções analíticas onde são modelados os efeitos relacionados com o perfil do pico de difração. Algumas equações analíticas propostas para

corrigir estes efeitos são a Gaussiana, a Lorentziana e a Pseudo-Voigt. Os picos de difração foram ajustados a uma função Pseudo-Voigt1, que é uma combinação das funções Gaussiana ($\mu = 0$) e Lorentziana ($\mu=1$) (equação 3.6)

$$y = y_0 + A \left\{ \mu \frac{2}{\pi} \cdot \frac{w}{4(x-x_0)^2 + w^2} + (1 - \mu) \sqrt{4 \ln 2} \exp \left[-\frac{4 \ln 2}{w^2} (x - x_0)^2 \right] \right\} \quad (3.6)$$

onde μ é o fator de forma da curva, w é a largura à meia altura, A é a área do pico, x_0 o centro do pico, e y_0 o deslocamento na origem.

Os próximos parâmetros a variar são os parâmetros da rede a , b e c , e, em seguida, os parâmetros relacionados com a largura a meia altura dos picos, U , V e W (figura 12). Esses parâmetros se relacionam com a largura a meia altura da seguinte forma:

$$FWHM^2 = U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W \quad (3.7)$$

Figura 12: Quadro relativo aos parâmetros de rede no programa Powder-Cell

Os últimos parâmetros a serem ajustados são as posições atômicas e o fator de ocupação atômica (figura 13).

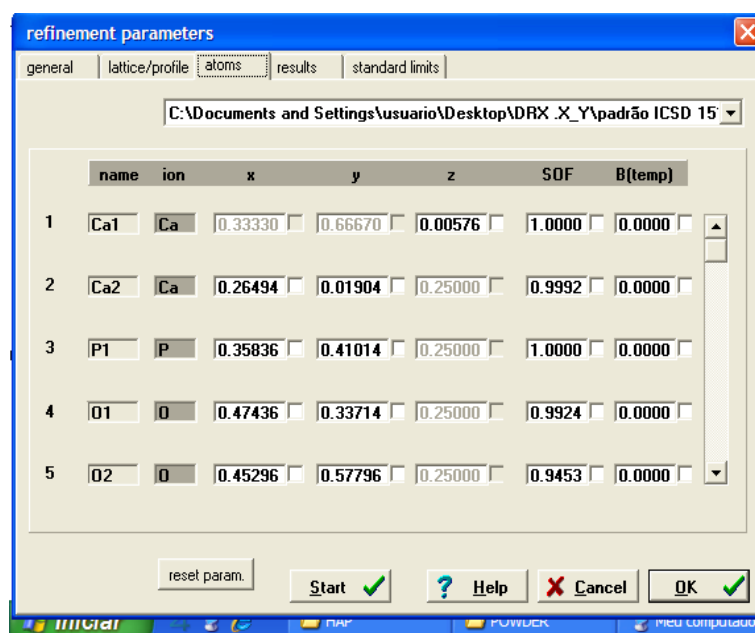


Figura 13: Quadro relativo às posições atômicas no programa PowderCell

O refinamento de todas as amostras foi feito sempre com a mesma sequência de passos.

3.3.2 Tamanho de cristalito e deformações da rede

O alargamento do pico de difração é basicamente de uma combinação entre o tamanho reduzido dos cristalitos e a deformação induzida da rede. Para estimativa de tamanho de cristalito, foram usados dois modelos: o modelo de Scherrer e o método de Williamson-Hall (W-H).

3.3.2.1 Método de Scherrer

A equação de Scherrer é uma das formas mais utilizadas para calcular tamanho de partícula através da difração de raios X. Esse método considera que o alargamento do pico de difração é provocado pelo tamanho de cristalito. Essa fórmula relaciona o tamanho do cristalito (t) com a largura à meia altura (FWHM – *Full Widthat Half Maximum*) do pico principal de difração (β), o comprimento de onda da radiação incidente (λ), o ângulo de difração ou ângulo de Bragg (θ_β) e um fator de forma das partículas (K), que corresponde a 0,89 para cristalitos esféricos, como mostrado na demonstração abaixo:

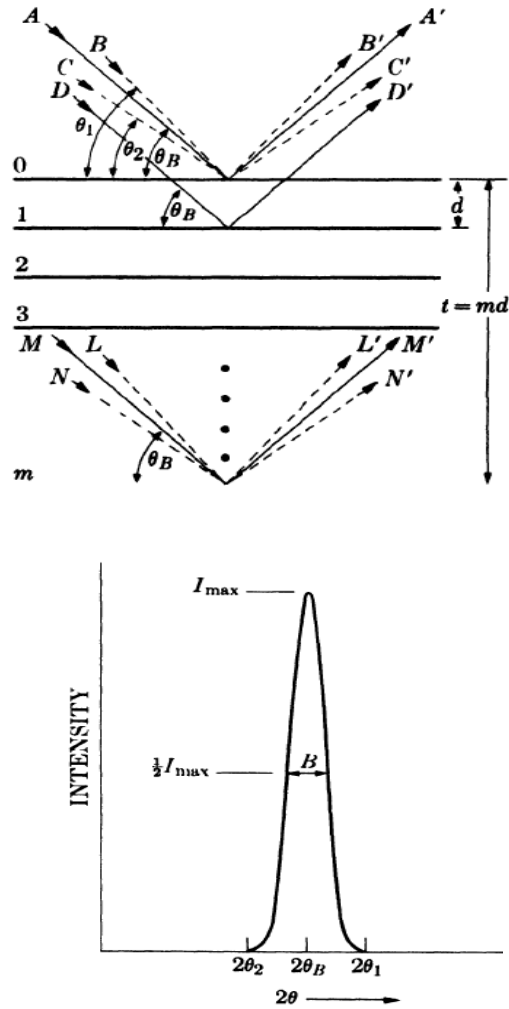


Figura 14: Modelo de Scherrer para o cálculo de tamanho de partícula [55].

Considerando a figura 14, e que θ_1 e θ_2 sejam limites em torno de θ_B , para os quais a interferência seja completamente destrutiva, tem-se:

$$\theta_B \rightarrow \Delta = n\lambda \quad (\text{Eq.3.8})$$

$$\theta_1 \rightarrow \Delta = \frac{2n+1}{2} \cdot \lambda \quad (\text{Eq.3.9})$$

$$\theta_2 \rightarrow \Delta = \frac{2n-1}{2} \cdot \lambda \quad (\text{Eq.3.10})$$

Tendo o tamanho do cristalito como o produto do número de planos (m) pela distância interatômica (d):

$$t = m.d \quad (Eq.3.11)$$

O FWHM do pico principal observado (β) pode ser estimado como:

$$\beta = \frac{1}{2} (2\theta_1 - 2\theta_2) = \theta_1 - \theta_2 \quad (Eq.3.12)$$

Aplicando a equação de Bragg a esses dois ângulos, tem-se:

$$\begin{cases} 2t \sin \theta_1 = \frac{(2m+1)}{2} \cdot \lambda \\ 2t \sin \theta_2 = \frac{(2m-1)}{2} \cdot \lambda \end{cases}$$

Logo,

$$2t(\sin \theta_1 - \sin \theta_2) = \lambda \quad (Eq.3.13)$$

Sabe-se que: $\sin \theta_1 - \sin \theta_2 = \cos \left(\frac{\theta_1}{2} + \frac{\theta_2}{2} \right) \sin \left(\frac{\theta_1}{2} - \frac{\theta_2}{2} \right)$

Então:

$$2t \left[\cos \left(\frac{\theta_1}{2} + \frac{\theta_2}{2} \right) \sin \left(\frac{\theta_1}{2} - \frac{\theta_2}{2} \right) \right] = \lambda \quad (Eq.3.14)$$

Por aproximações, tem-se que $\theta_1 + \theta_2 = 2\theta_\beta$

Como $\left(\frac{\theta_1}{2} - \frac{\theta_2}{2} \right)$ é muito pequeno, $\sin \left(\frac{\theta_1}{2} - \frac{\theta_2}{2} \right) \approx \left(\frac{\theta_1}{2} - \frac{\theta_2}{2} \right)$

Combinando as equações 3.6 e 3.8, e as aproximações acima, tem-se por fim:

$$t = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta_\beta} \quad (Eq.3.15)$$

3.3.2.1 Método de Williamson-Hall (W-H)

O modelo de W-H é uma ampliação do modelo de Scherrer, onde é considerado que o alargamento do pico de difração é uma combinação de duas contribuições: o tamanho do cristalito e as deformações induzidas (stress) da rede, como mostrado na equação a seguir[56]:

$$\beta \cos \theta = \left(\frac{K\lambda}{D_v} \right) + 4\varepsilon \sin \theta \quad (3.16)$$

Nesta equação, λ é o comprimento de onda dos raios X, β é a largura à meia altura (em rad), θ é o ângulo de Bragg, D_v o tamanho de cristalito, K o fator de forma do cristalito e ε a microdeformação da rede.

Para estimar o tamanho médio e a microdeformação dos cristalitos por esse modelo é necessário construir um gráfico de $\beta \cos \theta$ em função de $4 \sin \theta$, como mostrado na figura 15.

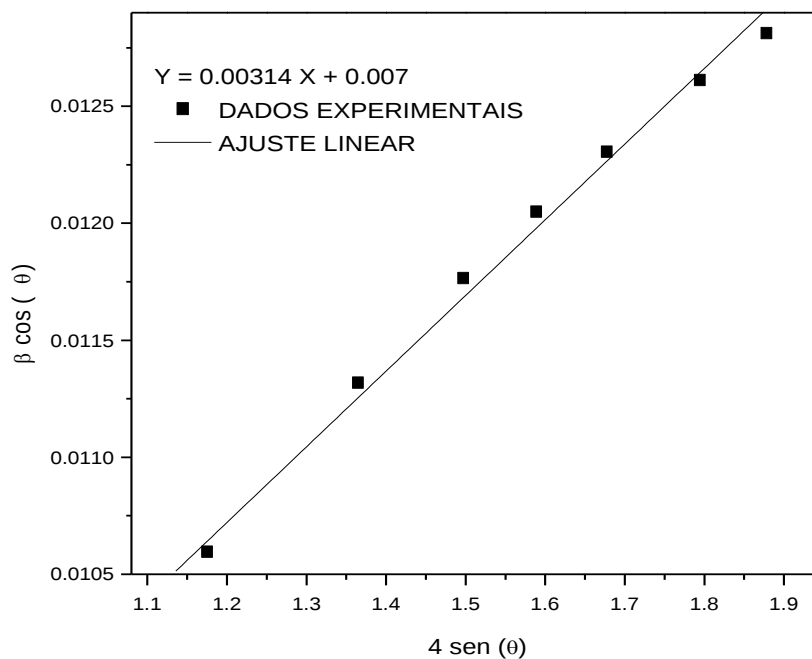


Figura 15: Gráfico de W-H para estimativa de tamanho de cristalito e deformação da rede

A microdeformação presente no material e o tamanho de cristalito são extraídos, respectivamente, dos coeficientes angular e linear do ajuste linear feito com os pontos experimentais, de acordo com a equação 3.16.

Para o cálculo da estimativa de tamanho de cristalito por ambos os modelos, foram utilizados os valores de β da largura à meia altura do pico da amostra, após o ajuste a uma função pseudo-voigt. O valor experimental de β deve ser corrigido através da equação (3.17), onde β_i é a largura a meia altura do pico de difração de um monocristal de referência (largura instrumental), cujo tamanho de cristalito é consideravelmente maior que 200 nm. O LaB₆ (Hexaborreto de Lantânio, padrão NIST) foi utilizado como monocristal de referência, cujo valor de β_i usado foi de 0.004.

$$\beta = \beta_o^2 - \beta_i^2 \quad (3.17)$$

Uma vez que durante o refinamento, o programa PowderCell otimiza os parâmetros U , V e W , obtendo a largura a meia altura dos picos da amostra pela equação 3.7, o cálculo do tamanho do cristalito (D_v) e das deformações da rede (ϵ_t) é igualmente efetuado.

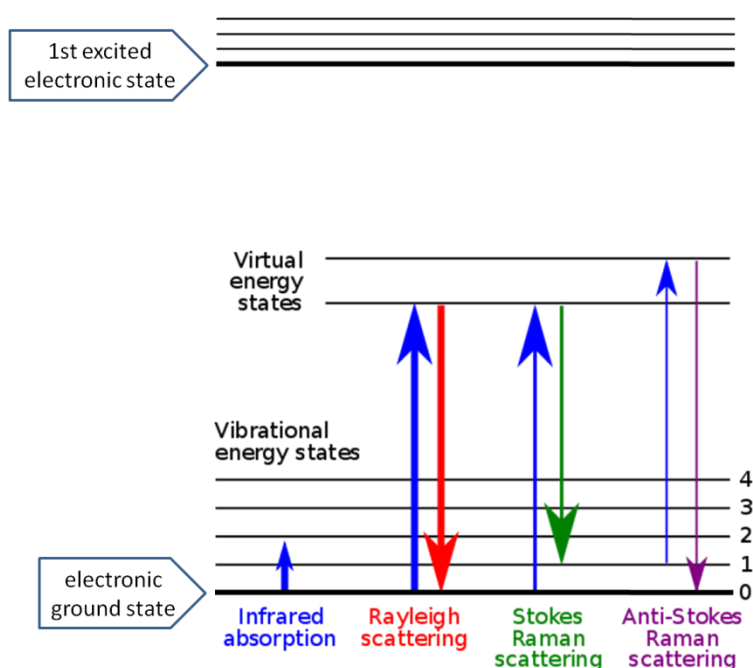
Os resultados de tamanho de cristalito calculados pelo modelo de Scherrer foram obtidos através da média dos valores de todos os picos da HAP com 2θ entre 10-80°.

3.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que proporciona em poucos segundos informação estrutural de materiais orgânicos e inorgânicos, notadamente da ordem local, permitindo assim sua identificação. Sua análise se baseia no exame da luz dispersada por um material ao incidir com um feixe de luz monocromática. Trata-se de uma técnica de análise que leva somente em consideração o material que está sendo analisado, não necessitando de nenhum tipo de preparação nem alteração da superfície em que vai ser feita a análise [57].

A análise de espectroscopia Raman se baseia em incidir um feixe de luz monocromática de frequências ν_0 sobre uma amostra cujas características se desejam determinar, e examinar a luz espalhada pela amostra. A maior parte da luz espalhada apresenta a mesma frequência da luz incidente, mas uma fração muito pequena apresenta uma mudança na sua frequência, resultante da interação da luz com a matéria. A luz que mantém a mesma frequência ν_0 da luz incidente é chamada de espalhamento Rayleigh e não fornece nenhuma informação sobre a composição da amostra analisada. A luz espalhada que apresenta frequências diferentes da radiação incidente é a que fornece informações sobre a composição molecular da amostra e é chamada de espalhamento Raman. As novas frequências, $\nu_0 + \nu_r$ e $\nu_0 - \nu_r$, são as frequências Raman, características da natureza química e do estado físico da amostra e independentes da radiação incidente.

As variações de frequência observadas no fenômeno de espalhamento Raman são equivalentes a variações de energia entre o fóton absorvido e o espalhado. Os íons e átomos ligados quimicamente para formar moléculas e redes cristalinas, estão submetidos a constantes movimentos vibracionais e rotacionais; estas oscilações são realizadas em frequências bem determinadas, em função da massa das partículas envolvidas e do comprimento dinâmico das ligações existentes. Cada um dos movimentos vibracionais e rotacionais de uma molécula corresponderá, portanto, a um valor determinado de quantum de energia vibracional. Um diagrama energético em que cada estado de energia é representado por uma linha horizontal é mostrado na figura 16.



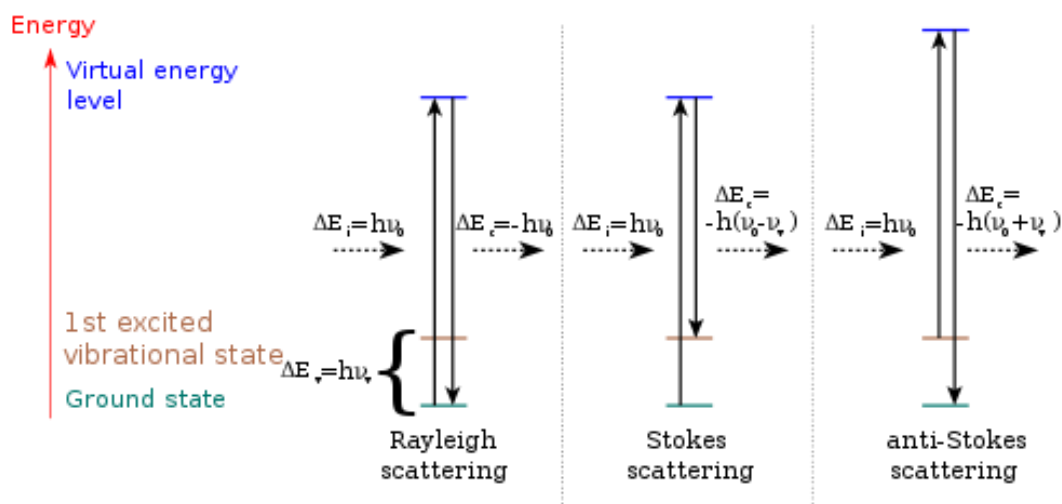


Figura 16: Diagrama energético em que as linhas horizontais representam distintos estados de energia e que mostra as transições entre estados energéticos para diferentes interações luz-matéria.

Quando os fótons de feixe de luz, com energia $h\nu_0$ muito maior que a diferença de energia entre os níveis vibracionais (ou rotacionais) da molécula e muito menor do que a energia necessária para excitar os estados eletrônicos, chocam-se com ela, a maior parte dos fótons atravessa, mas uma pequena fração é espalhada (da ordem de 1 fóton dispersado por cada 10^{11} incidentes). Esse espalhamento pode ser interpretado pelo seguinte processo: um fóton incidente leva uma molécula transitoriamente a um nível superior não permitido também chamado de níveis virtuais, a qual retorna rapidamente a um dos níveis de energia permitidos, emitindo um fóton; a frequência do fóton emitido dependerá do tipo de interação com os níveis vibracionais da molécula em questão.

Podem ocorrer os seguintes casos:

- Se a interação fóton-molécula é um fóton espalhado na mesma frequência do fóton incidente, diz-se que o choque é elástico já que nem o fóton nem a molécula sofrem variações em seus estados energéticos; a molécula volta ao mesmo nível de energia que tinha antes do choque e o fóton espalhado tem a mesma frequência ν_0 que o fóton incidente. Esse fenô-

meno é chamado de espalhamento Rayleigh. A maior parte da luz espalhada pela molécula é devido a este tipo de fenômeno.

- Se o resultado da interação fóton-molécula é um fóton espalhado com frequência distinta do fóton incidente, diz-se que o choque é inelástico (existe transferência de energia entre a molécula e o fóton); e neste caso podem acontecer dois fenômenos:
 - se o fóton espalhado tem frequência menor que a do feixe incidente, ocorre uma transferência de energia do fóton para a molécula que, depois de saltar para um estado de energia não permitido, retorna para um estado vibracional ou rotacional permitido maior que o inicial, sendo o fóton espalhado com frequência $\nu_0 - \nu_r$. Esse fenômeno é chamado de espalhamento Raman Stokes.
 - se o fóton espalhado tem uma energia maior que a do feixe incidente, ocorre uma transferência de energia da molécula para o fóton; isto significa que a molécula inicialmente, antes do choque, não se encontrava em seu estado vibracional fundamental e sim em um de maior energia e depois do choque passa para esse estado (fundamental); sendo o fóton espalhado com frequência $\nu_0 + \nu_r$. Esse fenômeno é chamado de espalhamento Raman anti-Stokes.

Assim o espalhamento Raman Stokes ou Anti-Stokes é uma forma de provar as frequências dos modos vibracionais de uma determinada molécula. Cada molécula tem um conjunto de valores ν_r característicos de sua estrutura poliatômica e da natureza das ligações químicas que a formam.

Como pode ser observado na figura 17 o espectro Raman é formado por uma banda principal Rayleigh e duas séries de bandas secundárias correspondentes as bandas Raman Stokes e anti-Stokes, situadas simetricamente em ambos os lados da banda Rayleigh.

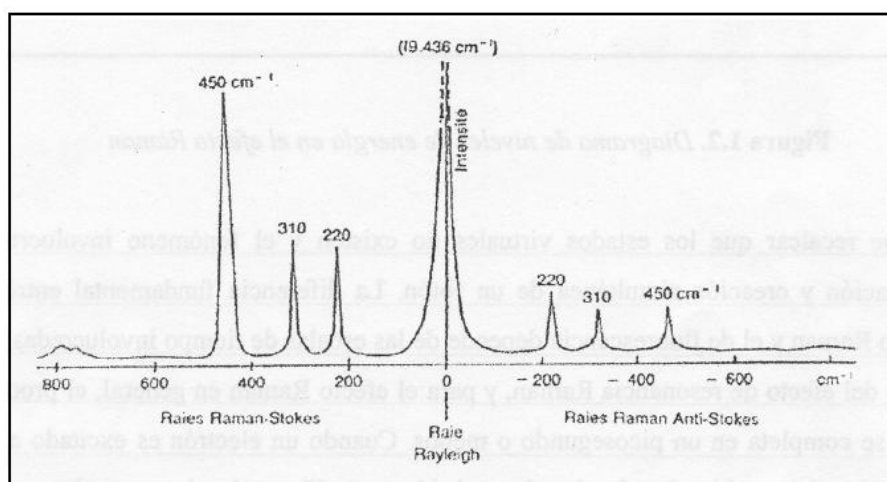


Figura 17: Bandas Rayleigh, Stokes e anti-Stokes [57]

É importante ressaltar que o deslocamento das frequências Raman é independente da frequência ν_0 da radiação incidente.

Quando uma determinada molécula encontra-se dentro de uma matriz sólida, os modos rotacionais e vibracionais sofrem interferências da estrutura cristalina ou da matriz amorfa do hospedeiro. Em sistemas cristalinos, por exemplo, é bastante comum a completa supressão dos modos rotacionais de um grupo molecular devido à ligação dos átomos/íons que constituem o grupo com o restante da matriz. As frequências características dos modos de vibração também podem ser alteradas já que a presença de outros átomos/íons nas proximidades do grupo molecular de interesse modifica a natureza das ligações entre as espécies químicas alterando tanto o comprimento de equilíbrio das ligações, quanto a constante de força da ligação. Alterações nos ângulos de ligação de grupos moleculares também alteram as frequências dos modos de vibração. Desta forma, a espectroscopia Raman não só ajuda a identificar espécies químicas em um determinado sólido ou líquido, mas como também permite a interpretação de mudanças de simetria local em torno do grupo de interesse.

As medidas de espectroscopia Raman das HAP's foram realizadas com o intuito de observar a presença dos grupos funcionais da HAP ativos em Raman. Para realização das medidas, a amostra em pó foi depositada em uma lâmina e colocada no suporte do equipamento. O espectrômetro utilizado foi um micro-Raman, modelo Senterra, fabricado pela Bruker, com laser de Ar de 785 nm, e potência de 50 mW.

3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz

A utilização do espalhamento dinâmico de luz se deve à capacidade desta técnica não invasiva de investigar o tamanho das partículas isoladas e moléculas contidas em arranjos polidispersivos isotrópicos e não isotrópicos.

A técnica se baseia no fato de que partículas quando suspensas em um solvente estão em movimento Browniano, e que se movem em consequência das colisões com partículas constituintes dos solventes. Sabemos que partículas pequenas se movem mais rapidamente que partículas grandes. Iluminando estas partículas alvo com um feixe de laser por um determinado período de tempo t a luz espalhada por todas as direções interfere construtivamente em um detector. Entretanto, como as moléculas se movem através de movimento browniano no solvente, há flutuação da radiação espalhada devido ao efeito Doppler, e, portanto as ondas podem interferir destrutivamente em outro momento t' gerando a diminuição ou ausência de sinal no sistema de detecção. Esta flutuação do sinal da intensidade da luz espalhada fornece dados sobre tamanho médio das partículas e potencial Zeta [58].

Para uma dispersão de partículas esféricas, com viscosidade do solvente η , sob temperatura constante T , o coeficiente de difusão D é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico d_h das partículas, como mostra a equação de Stokes-Einstein,

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta d_h} \quad (3.18)$$

Devido ao movimento Browniano, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo. Supondo que haja uma janela de dimensão reduzida, através da qual a luz espalhada pelas partículas alcança um detector, a intensidade da luz que atinge o detector irá flutuar devido ao movimento das partículas. Esta flutuação da intensidade de luz espalhada ocorrerá com maior velocidade quando a dispersão contiver partículas pequenas, as quais se movimentam mais rapidamente e passam diante da janela um número maior de vezes dentro de um determinado intervalo de tempo.

Portanto, existe uma relação entre a velocidade de flutuação da luz espalhada e o coeficiente de difusão das partículas. Existe também uma função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada. Após o espalhamento da luz do laser pelas partículas, as intensidades da flutuação da luz espalhada são convertidas em pulsos eletromagnéticos, sendo tratados e processados por um correlator digital através da comparação direta da intensidade de luz espalhada em sucessivos intervalos, gerando uma função de correlação bem definida:

$$g(t) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (3.19)$$

A teoria da função de correlação (3.11) fundamenta-se na comparação da intensidade de espalhamento que adentra no correlator em um determinado tempo t , esta intensidade é muito semelhante a outras intensidades em instantes após um curto período de tempo ($t + \tau$), portanto, estes dois sinais são correlacionados. Entretanto, considerando a intensidade do sinal em um período t com outra intensidade coletada a um período muito posterior ($t + 10^4\tau$), não há relação entre os dois sinais, já que a intensidade decai rapidamente em função do tempo de correlação entre um sinal e outro devido às partículas se moverem em direções randômicas no meio [59]. Portanto, a correlação decai exponencialmente em função do tempo, conforme é mostrado na figura 18.

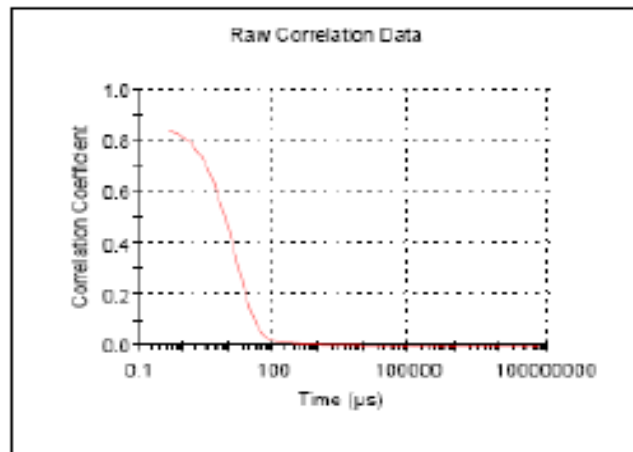


Figura 18: Função de correlação utilizada pelo ZS nano para análise de distribuição de tamanho de partícula da amostra de HAP

A função de correlação pode ser reescrita em função do coeficiente de difusão das moléculas no meio:

$$g(t) = A + \sum B e^{(-2q^2 D \tau)} \quad (3.20)$$

onde A corresponde a amplitude da onda, B representa a linha de base para tempo infinito, D o coeficiente de difusão do meio e q o vetor de espalhamento, que é dado por:

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda_0} \right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.21)$$

onde n é o índice de refração do líquido que dispersa as partículas, θ é o ângulo de detecção da luz espalhada e λ_0 é o comprimento de luz da radiação incidente.

Os dados de saída de uma medida do espalhamento dinâmico das partículas isoladas podem ser apresentados como uma distribuição da intensidade de espalhamento, do número de partículas e volume em função do diâmetro hidrodinâmico das partículas.

As medidas de espalhamento dinâmico de luz foram realizadas no equipamento Zetasizer ZS fabricado por Malvern Instruments, UK, com detector fixo em um ângulo de 173° e feixe de laser 35mW, 633nm He-Ne, ilustrado na figura 19.



Figura 19: Equipamento Zetasizer ZS para análise de distribuição do tamanho de partícula

Para realização das medidas foi necessária a suspensão de 4 mg da amostra em pó em uma solução sob agitação de 10.000 rpm contendo 40 mL de água ultra pura + 0.6 µL de tenso ativo Tween 80 (usado com o intuito de reduzir a formação de aglomerados e portanto de precipitados na suspensão).

Posteriormente a solução foi colocada em um ultrassom de ponta com amplitude de 25% (Cole Parmer Ultrasonic Processor 505 com 500 wats) por quinze minutos para desaglomerar as partículas para formar uma nanosuspensão homogênea dos nanopós e

uma alíquota de 5mL desta nanosuspensão foi retirada à meia altura e depositada em uma cubeta de poliestireno (modelo DTS 1060) apropriada para a análise do tamanho de partículas.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Um microscópio eletrônico de transmissão (MET) consiste de um feixe de elétrons que é emitido em direção a uma amostra ultrafina, interagindo com a amostra enquanto a atravessa. É composto também por um conjunto de lentes magnéticas, que servem para condensar o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10^{-5} mm Hg, para que o feixe de elétrons percorra toda a coluna sem ser detido por moléculas de ar [60]. Através de uma pequena amostra, com secção muito fina colocada no porta-amostras, a imagem é formada na interação dos elétrons transmitidos, sendo ampliada e focada em um dispositivo de imagem, como uma tela fluorescente, ou uma camada de filme fotográfico, ou é detectada por um sensor como uma câmara CCD. Através dessa técnica é possível verificar a distribuição atômica, morfologia e defeitos cristalinos, além da identificação química de um único monocristal. A figura 20 mostra estrutura esquemática de um microscópio eletrônico de transmissão.

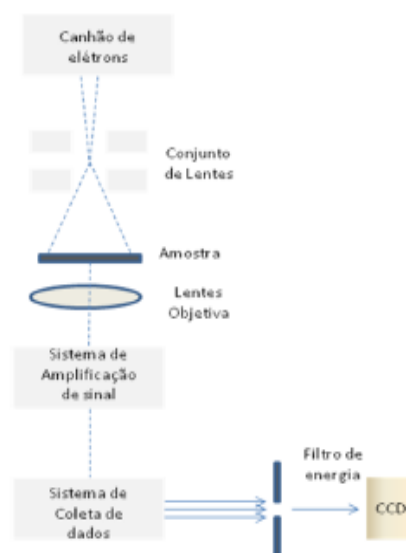


Figura 20: Estrutura esquemática de um microscópio eletrônico de transmissão

O objetivo de se utilizar essa técnica foi obter um conhecimento mais detalhado da morfologia dos grãos das amostras preparadas. As amostras foram analisadas no CETENE- Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, localizado em Recife-PE, através de um microscópio eletrônico de transmissão fabricado pela FEI, Tecnai20 com resolução pontual de 0,2 nm com magnificação de até 1 milhão de vezes.

Para a preparação das amostras utilizou-se 2 mg de nanopós em uma suspensão diluída 10:1 partes de solvente (álcool isopropílico). Posteriormente, para uma melhor homogeneização na suspensão das nanopartículas em pó a solução foi agitada por 5 minutos sobre amplitude de 25% através do ultrassom de ponta (Parmer Ultrasonic Processor modelo 505 de 500 watts). Um micropipetador comercial (0,1 μ l a 2,5 μ l) foi utilizado para deposição de uma única gota da solução sobre as grades do porta-amostras de Cu com recobrimento de filme carbono de 200mesh (Eletronic Microscopy Sciences). Todas as amostras, após a preparação, foram mantidas por 24 horas em dissecador a vácuo até o momento da realização das medidas. O software ES vision - Tecnai foi utilizado para a análise das imagens de MET.

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Um microscópio eletrônico de varredura é constituído por um feixe de elétrons numa coluna sob vácuo com pressão inferior a 10^{-4} mbar. A energia de um elétron do feixe pode ser de algumas centenas de eV a 100 keV. O percurso do feixe de elétrons é feito através das lentes condensadoras e dirigido a incidir numa pequena superfície da amostra. Um conjunto de bobinas defletoras permite, através da aplicação de campos elétricos, a varredura do feixe na superfície da amostra. Quanto mais lento for a varredura, melhor será a qualidade da imagem. À medida que os elétrons incidem na amostra, várias interações podem ocorrer, resultando na emissão de elétrons da sua superfície. Parte desses elétrons produz a chamada imagem de ES (elétrons secundários). Outra parte desses elétrons emitidos é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE - imagem de elétrons retroespalhados. Ocorre também a emissão de raios X pela amostra durante o bombardeamento de elétrons, que fornece a composição química elemental de um ponto ou região da superfície, possibilitando a identi-

ficação de praticamente qualquer elemento presente, ou mesmo fazer o mapeamento que contém a distribuição espacial dos elementos da área varrida. Podem ser analisadas porções ou fases de uma amostra com diâmetro mínimo de 1 μm . O volume analisado dependerá da energia dos elétrons incidentes.

Para a preparação das amostras utilizou-se 2 mg de nanopós em uma suspensão diluída 10:1 partes de solvente (álcool isopropílico). Posteriormente, para uma melhor homogeneização na suspensão das nanopartículas em pó a solução foi agitada por 5 minutos sobre amplitude de 25% através do ultrassom de ponta (Parmer Ultrasonic Processor modelo 505 de 500 watts). Uma lixa d'água 2000 foi utilizada para polir o porta amostra. Um micropipetador comercial (0,1 μl a 2,5 μl) foi utilizado para deposição de uma única gota da solução sobre o “stuby” (porta amostra).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Difratometria de Raios X e tamanho dos cristalitos

A difratometria de raios x foi utilizada nesse trabalho com dois objetivos principais. O primeiro deles é realizar um estudo qualitativo das fases cristalográficas presentes nos pós produzidos, através da identificação de suas fases cristalinas e usar estas informações para realimentar a etapa de produção das amostras. O segundo objetivo foi o de avaliar o tamanho médio dos cristalitos das amostras produzidas em diferentes condições de temperatura de tratamento térmico e/ou de tempo de maturação.

As figuras 21 e 22 mostram os difratogramas das amostras produzidas com diferentes tempos de maturação: HAP_{400(26h)}, HAP₄₀₀, HAP_{400(5DIAS)}; e as amostras que passaram por diferentes processos de tratamento térmico: HAP_{AMBIENTE}, HAP₁₀₀, HAP₂₀₀, HAP₃₀₀, HAP₄₀₀, HAP₅₀₀ e HAP₆₀₀.

O padrão de referência utilizado foi o difratograma da hidroxiapatita hexagonal de ficha cristalográfica número 151414, obtido no banco de dados ICSD, acessado via portal da pesquisa da CAPES [46].

Através dos difratogramas, notou-se que em todas as amostras houve a formação de uma estrutura típica da HAP hexagonal com relação sinal ruído indicando bom grau de cristalinidade, onde os picos de maior intensidade são observados nos ângulos de difração 2θ de 26° e 32° a 34° , referentes aos planos cristalinos (002), (211), (112) e (300), respectivamente.

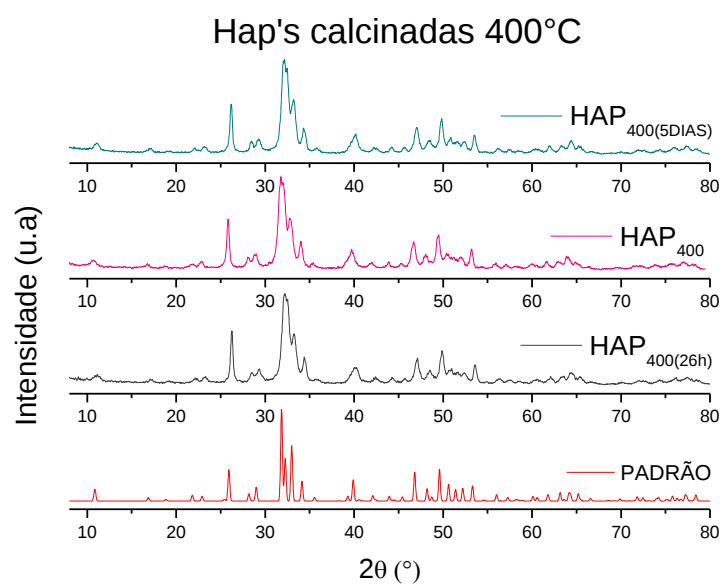


Figura 21: Difratomogramas de raios X de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ produzida com diferentes tempos de maturação em comparação com o padrão ICSD 151414.

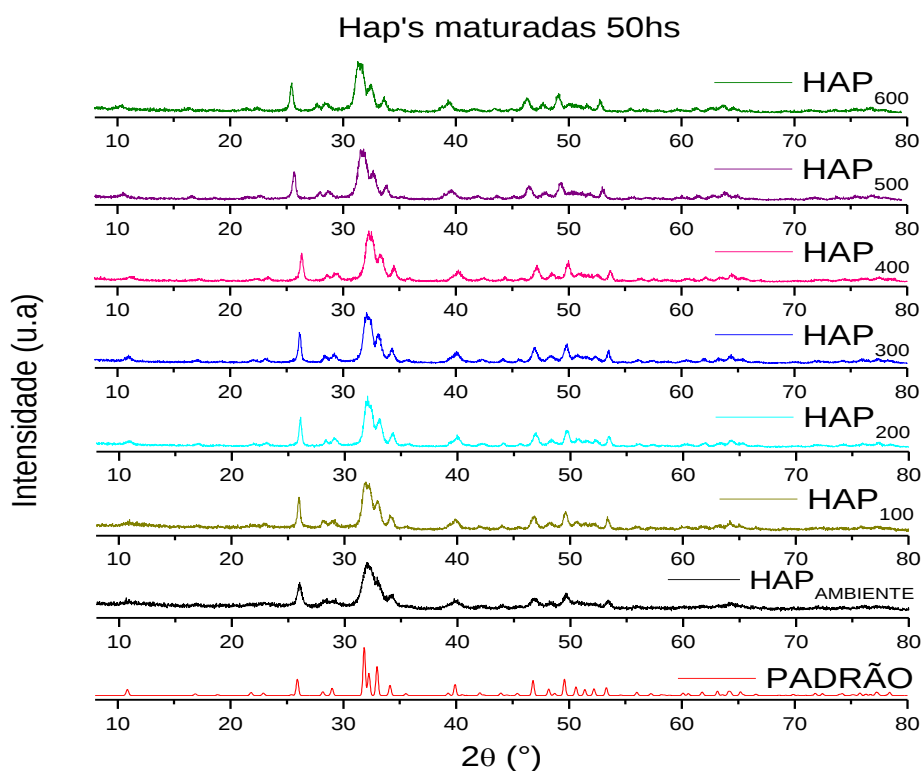


Figura 22: Difratomogramas de raios X de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ produzida com diferentes tempos de maturação em comparação com o padrão ICSD 151414.

Para determinar o tamanho de cristalito das amostras via o método de Scherrer ou método de Williamson-Hall (W-H) conforme descrito no capítulo 3– Materiais e Métodos precisamos determinar as larguras a meia altura de vários picos do difratograma de raios X e destes valores, descontar o alargamento instrumental relacionado com as características do equipamento utilizado nas medidas. No caso da HAP, o difratograma sempre apresenta os principais picos muito próximos e superpostos. Mesmo o pico correspondente ao plano (002) que teria intensidade suficiente para uma análise direta da largura a meia altura está próximo do pico relacionado ao plano (201) que apesar de ter uma intensidade baixa nas condições usuais de medida, pode influenciar a largura a meia altura principalmente no caso de amostras com tamanho pequeno de cristalito, na escala nanométrica, que é exatamente o caso das amostras em estudo. Outro efeito que pode distorcer o valor da largura a meia altura determinado diretamente dos dados experimentais é o fato da radiação incidente na amostra não ser monocromática. Apesar do difratômetro usado nas medidas contar com um monocromador instalado antes do detector que separa as linhas $K\alpha$ das demais linhas de fluorescência de Raios-X do tubo de Cu, o sistema não separa as linhas $K\alpha_1$ da $K\alpha_2$, que tem comprimentos de onda muito próximos (1,540598 e 1,544426Å, respectivamente). Na figura 23 pode-se ver o efeito do alargamento devido à superposição das linhas $K\alpha_1$ da $K\alpha_2$ para o padrão da HAP. Os dois difratogramas foram simulados no PowderCell usando as mesmas condições com a diferença da superposição $K\alpha_1$ da $K\alpha_2$.

Assim, a medida da largura a meia altura de qualquer pico de difração diretamente dos dados é susceptível a estas diferentes fontes de erros, a menos que a amostra seja altamente cristalina, com cristalitos de grande tamanho e com picos no difratograma razoavelmente isolados e em baixos ângulos (o efeito de superposição das linhas $K\alpha_1$ da $K\alpha_2$ é tanto maior quanto maior for o 2θ).

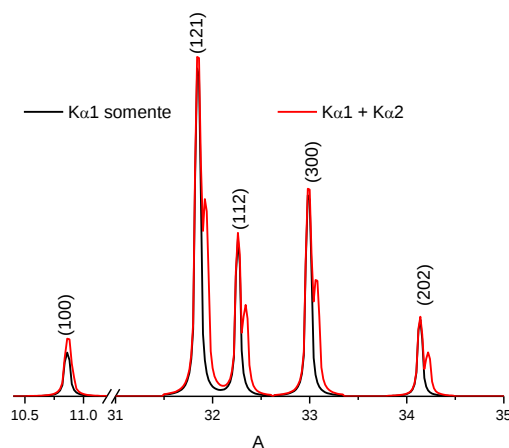


Figura 23: Difratoograma simulado da HAP com base no padrão ICSD 15-1414 comparando a condição de medida perfeitamente monocromática, com a presença apenas da linha $K\alpha 1$ com a situação mais realista das medidas que apresenta a superposição $K\alpha 1 + K\alpha 2$.

Para contornar estes problemas, já que as amostras não satisfazem as condições acima, a estratégia adotada foi a seguinte:

Passo 1: Usando técnicas de refinamento das medidas de raios X, através do PowderCell, obtém-se as informações necessárias para a determinação das larguras de diversos picos. Ou seja, usando os parâmetros refinados U, V e W, que definem o perfil dos picos de difração, é possível calcular a largura à meia altura das medidas para cada ângulo que corresponde a um pico de difração da HAP. Como no refinamento é possível incluir explicitamente a contribuição das raiais $K\alpha 1$ da $K\alpha 2$ do Cu, este efeito é compensado na determinação do padrão de raios X refinado.

Passo 2: Para contornar o problema do alargamento instrumental, uma medida de uma amostra padrão NIST 660a (LaB_6) foi realizada e foi feito o refinamento no Powdercell. Os valores do U_{ins} , V_{ins} e W_{ins} do padrão foram obtidos.

Passo 3: Usando os U, V e W de cada amostra e os valores de U_{ins} , V_{ins} e W_{ins} , os alargamentos reais dos picos são obtidos das equações 3.7 e 3.17, discutidas no capítulo 3- Materiais e Métodos.

A tabela 2 apresenta o fator de qualidade, os parâmetros U, V e W e os parâmetros de rede a e c , obtidos no refinamento das amostras.

Tabela 2: Parâmetros obtidos através do refinamento das amostras de HAP no programa PowderCell: fator de qualidade (S), parâmetros U, V e W e parâmetros de rede a e c .

AMOSTRA	FATOR DE QUALIDADE (S)	PARÂMETROS da função de perfil Pseudo-Voight			PARÂMETROS DE REDE			
		U	V	W	a (Å)	c (Å)	$\Delta a(\%)$	$\Delta c(\%)$
PADRÃO ICSD 151414	-	-	-	-	9.3983	6.8677	-	-
HAP _{AMBIENTE}	1.18	-0.5	4.9167	-0.5	9.4265	6.8673	0.30	-0.01
HAP ₁₀₀	1.40	-0.5	1.1018	0.1660	9.4101	6.8664	0.13	-0.02
HAP ₂₀₀	2.27	-0.5	1.7071	-0.0526	9.4137	6.8693	0.16	0.02
HAP ₃₀₀	2.20	-0.0469	1.3955	0.0285	9.4002	6.8610	0.02	-0.10
HAP ₄₀₀	1.03	0.0637	1.1626	0.1306	9.3799	6.8522	-0.20	-0.23
HAP ₅₀₀	1.78	-0.5	1.7557	0.0374	9.4236	6.8754	0.27	0.11
HAP ₆₀₀	2.70	-0.3402	1.6592	0.0348	9.3979	6.8659	0.00	-0.03
HAP _{400(26h)}	1.22	-0.5	1.7815	0.0086	9.4230	6.8762	0.26	0.12
HAP _{400(5DIAS)}	1.80	0.1321	1.2606	0.0513	9.4025	6.8638	0.04	-0.06

Observando-se a tabela 2, percebe-se que houve pequenas variações, sempre menores do que $\pm 0.3\%$, dos parâmetros de rede a e c das amostras tratadas com diferentes temperaturas em relação ao padrão do banco de dados ICSD 15-1414. Nas amostras tratadas a temperatura ambiente, a 100°C, a 300°C e 400°C (maturada 5 dias) houve uma expansão do eixo a e uma contração do eixo c da estrutura. Nas amostras tratadas a 200°C, 500°C e 400°C (maturada 26 horas) houve uma expansão dos dois eixos. Já nas amostras tratadas a 600°C e 400°C (maturada 50 horas) ocorreu o oposto, houve contração dos dois eixos da estrutura.

A figura 24 apresenta como exemplo, o resultado do refinamento efetuado ao difratograma de raios X da amostra seca a temperatura ambiente. O difratograma experimental é apresentado em preto e o padrão do banco de dados ICSD 151414 refinado em vermelho. O gráfico inferior em verde representa às diferenças entre as intensidades experimentais e as calculadas ao final do processo de refinamento. Observando-se os valores do fator de qualidade (S) (tabela 2), verifica-se visualmente um bom ajuste entre o espectro simulado e o experimental.

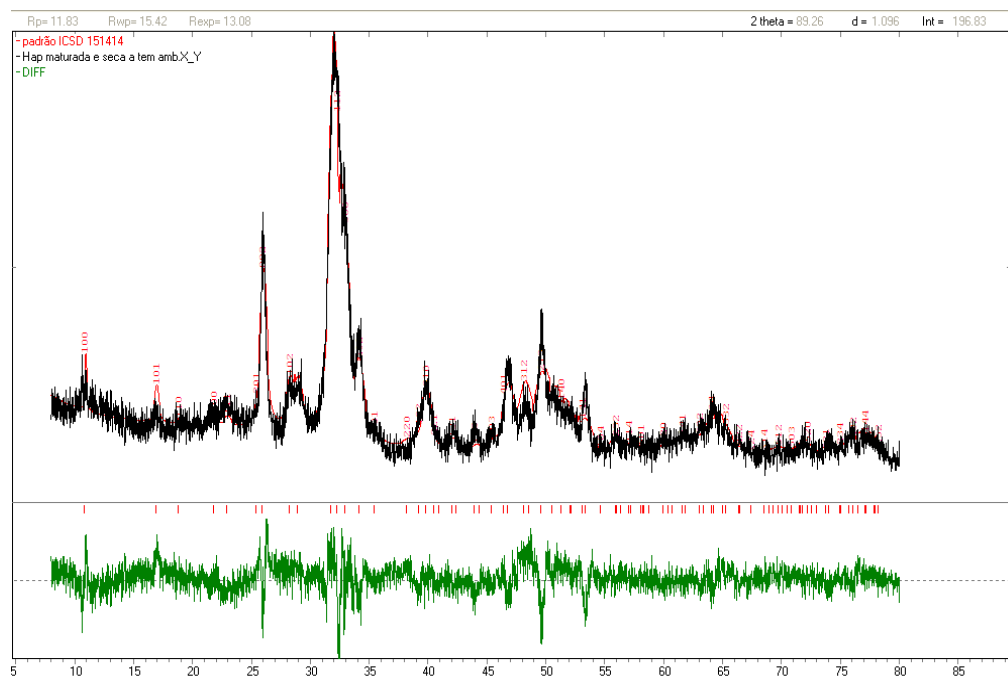


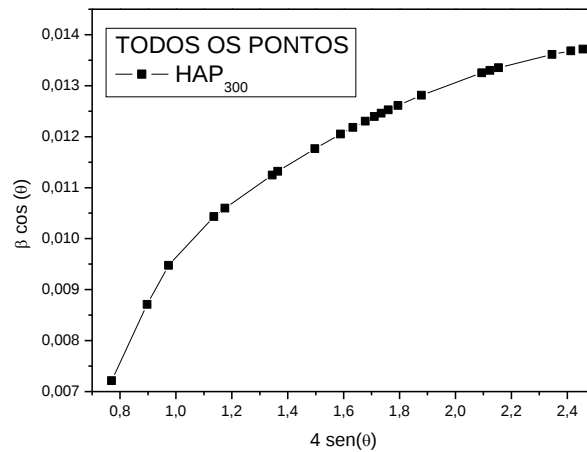
Figura 24: Refinamento da amostra seca a temperatura ambiente.

De posse dos valores dos alargamentos reais dos picos de difração das diferentes amostras, é possível estimar o tamanho médio dos cristalitos. Para tanto, foram usados dois modelos: 1- estimativa pela fórmula de Scherrer diretamente, e 2- método de Williamson-Hall. Conforme mostrado no capítulo 3- Materiais e Métodos, o alargamento dos picos de difração tem basicamente duas origens, o tamanho reduzido dos cristalitos e a deformação induzida da rede.

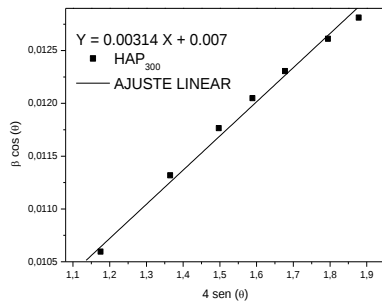
O modelo de Scherrer só considera que o alargamento é devido à redução do tamanho de cristalito e é usado largamente na literatura para avaliar o efeito da escala nanométrica no padrão de difração. O método de Scherrer fornece apenas um comportamento qualitativo. Segundo *K. Venkateswarlu et al.*[56], o modelo de W-H é uma sofisticação do modelo de Scherrer, onde é considerado que a largura à meia altura é uma combinação da contribuição do tamanho do cristalito e da deformação induzida da rede.

A figura 25(a) mostra a curva gerada pelos pontos de todos os picos de difração em toda a região medida de 10° a 80° em 2 θ . Pode-se notar que a curva não pode ser representada por uma reta única o que seria um indício de que o modelo de Williamson-Hall não pode ser usado neste caso. Nos poucos casos encontrados na literatura do uso do modelo de W-H para a HAP, normalmente os autores apresentam somente a região

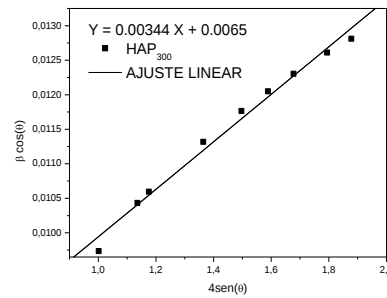
de $4\sin\theta$ entre ~ 0.9 e 2 , que corresponde a θ aproximadamente entre 13° e 30° , o que equivale aos picos do difratograma entre 26° e 60° em 2θ , ou seja a região principal com os picos mais intensos[56]. Apesar de não existir nada no modelo de W-H que justifique formalmente isso, a ideia que está por trás e que normalmente não é comentada, é que os picos da HAP fora desta região, por serem de menor intensidade são mais suscetíveis aos erros experimentais inerentes ao método. Os picos em ângulos abaixo de $10-11^\circ$ em 2θ sofrem do efeito do espalhamento a baixos ângulos que gera uma curva de fundo bastante intensa. Já os picos em altos ângulos em 2θ têm o efeito ampliado da contribuição das raias $K\alpha_1$ e $K\alpha_2$ do Cu. No entanto, mesmo dentro da “região ótima” ou região mais confiável do difratograma, existe uma arbitrariedade na escolha do ponto a partir do qual se deve considerar o ajuste linear no modelo. Verificou-se que na diferença mínima de um ponto a mais ou a menos no gráfico, gera uma modificação no ajuste linear, que aparentemente parece ter pouca importância, mas que, torna-se significativa no cálculo do tamanho de cristalito através do coeficiente linear da reta gerada no ajuste. As figuras 25(b) e (c) mostram dois ajustes lineares de uma única amostra (HAP₃₀₀), em que a diferença entre eles foi gerada apenas pela remoção de dois pontos, resultando em uma diferença de aproximadamente 2nm no tamanho de cristalito calculado. Esse resultado mostra que o modelo de W-H tem suas limitações, pois pontos diferentes geram ajustes lineares diferentes e tamanhos de cristalitos diferentes. Pode-se considerar então que, no caso das amostras deste trabalho, a precisão do método de W-H na determinação do tamanho do cristalito deve ser da ordem de 2nm, pelo menos. Como a precisão do método está relacionada diretamente com as características do padrão de difração de raios X da matriz cristalina, com o grau de complexidade do difratograma, a região na qual os picos são mais isolados ou mais superpostos e a região na qual se encontra os picos de maior intensidade, pode-se generalizar que no caso da HAP, a própria natureza do presente método fornece resultados de tamanho de cristalito com incertezas da ordem de alguns nanômetros.



(a)



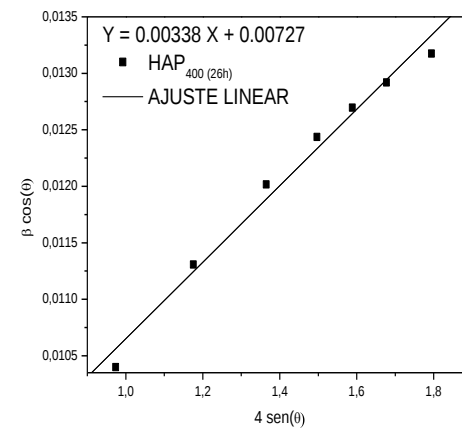
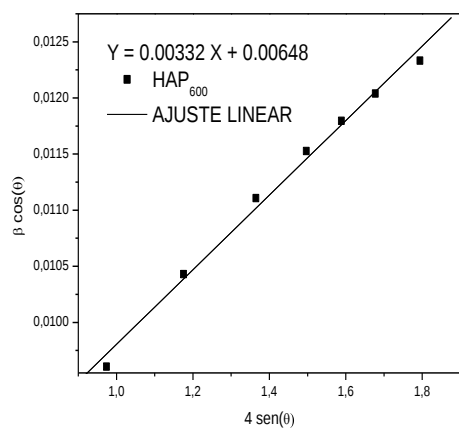
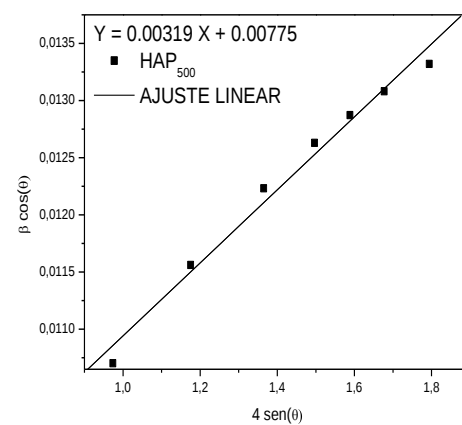
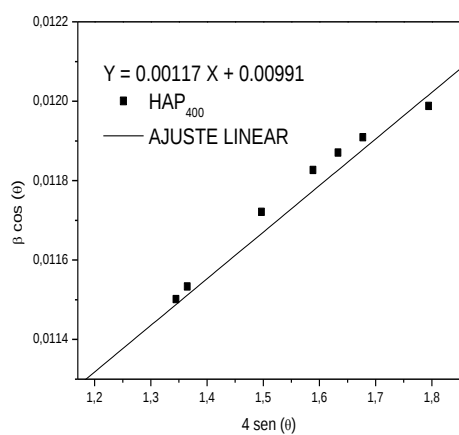
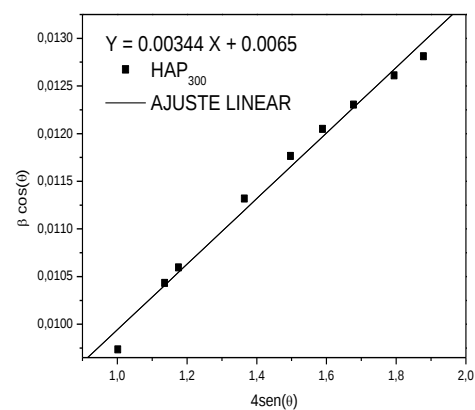
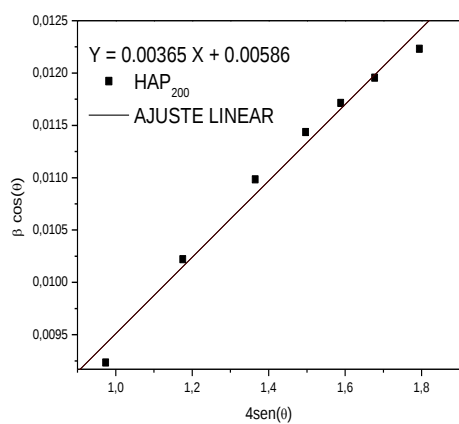
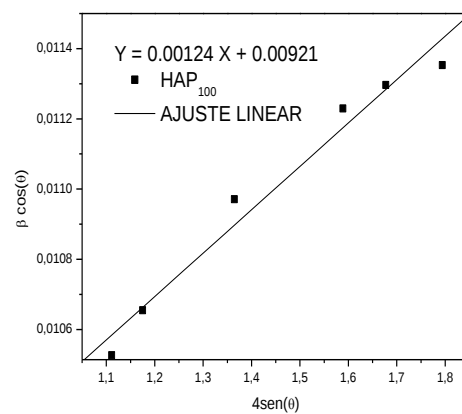
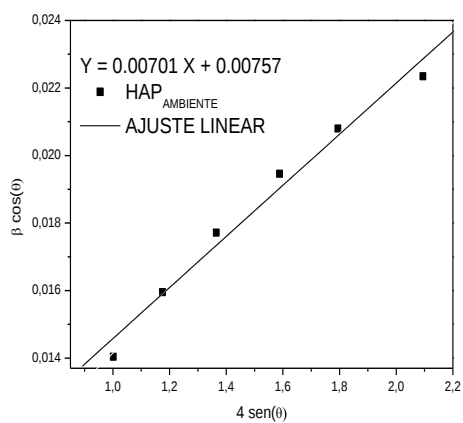
(b)



(c)

Figura 25: Diferentes ajustes lineares de uma única amostra (HAP₃₀₀). Em (a), curva gerada pelos pontos de toda a região do difratograma experimental de 10° a 80° em 2θ . A figura (c) contém dois pontos, um no início e outro no final, a mais que a figura (b). As equações obtidas do ajuste lineares nos dois casos são mostradas nos gráficos correspondentes.

Para as demais amostras adotou-se o intervalo de $(1 - 1.2) \leq 4 \text{ sen} \theta \leq (1.8 - 2.1)$ e os resultados dos gráficos de W-H são exibidos na figura 26. Para cada amostra também é mostrado o ajuste linear obtido e os valores do coeficiente angular e linear da reta ajustada.



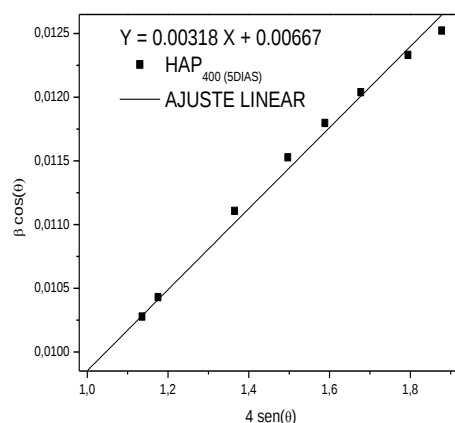


Figura 26: gráficos de Williamson-Hall das amostras de HAP

Na tabela 3 estão os valores de tamanho de cristalito calculados através do modelo de Scherrer e do de W-H. Como, a priori e apenas com as medidas de difratometria de raios X não se obtém a morfologia das amostras, o cálculo do tamanho foi feito com os extremos dos valores de fator de forma do cristalito (K) para que resultasse em uma maior confiabilidade dos dados obtidos. Foram usados $K = 0,89$ (partícula esférica) e $K = 1,39$. O que está apresentado na tabela 3, na realidade, é um intervalo de tamanho de cristalito para cada amostra. No caso dos valores obtidos pelo método de Scherrer, cada número da tabela indica a média calculada de todos os picos do difratograma da HAP e suas incertezas foram obtidas através do desvio padrão de cada amostra.

Tabela 3: valores do tamanho de cristalito das amostras calculado através dos modelos de Scherrer e Williamson-Hall.

AMOSTRA	TAMANHO ESTIMADO (nm)			DEFORMAÇÃO INDUZIDA
	SCHERRER		W-H	
	K=0,89	K=1,39		
HAP _{AMBIENTE}	7,6±1,7	11,9±2,8	(18,1-28,3)±2,0	0,00757
HAP ₁₀₀	13,3±0,6	19,6±0,9	(14,9-23,3)±2,0	0,00124
HAP ₂₀₀	13,9±1,8	21,6±1,8	(23,4-36,5)±2,0	0,00365
HAP ₃₀₀	14,5±2,1	22,6±3,3	(21,1-33,0)±2,0	0,00344
HAP ₄₀₀	12,1±0,7	20,2±1,2	(13,8-21,6)±2,0	0,00117
HAP ₅₀₀	12,0±1,2	18,8±1,9	(17,7-27,6)±2,0	0,00319
HAP ₆₀₀	11,2±1,0	17,5±1,6	(21,2-33,1)±2,0	0,00332
HAP _{400(26HS)}	12,3±1,3	19,3±2,1	(18,9-29,5)±2,0	0,00338
HAP _{400(5DIAS)}	13,0±1,6	20,3±2,5	(20,6-32,1)±2,0	0,00318

O tamanho de cristalito estimado pelo modelo de W-H foi sempre maior que o estimado pelo de Scherrer, o que era de se esperar, já que o de W-H considera que a largura à meia altura de um pico (FWHM) é uma combinação da contribuição tanto do

tamanho como da deformação induzida da rede. No geral, é observado que no cálculo realizado pelos dois modelos não houve variação significativa de tamanho de cristalito nas amostras tratadas a diferentes temperaturas. Os tamanhos de todas as amostras ficaram entre 10 e 20nm, pelo método de Scherrer, considerando os extremos de K (0,89 e 1,39) e entre 20 e 30nm pelo método de W-H. Apenas na amostra seca a temperatura ambiente ($HAP_{AMBIENTE}$), pelo modelo de Scherrer foi verificada um tamanho menor em relação às outras. Nota-se que a incerteza inerente aos métodos de W-H ($\sim 2\text{nm}$) e de Scherrer são desprezíveis diante das flutuações existentes na determinação do método que é carregada pela arbitrariedade no valor da constante K. Uma conclusão importante é que os dois métodos só podem ser melhorados em termos de sua precisão se o formato dos cristalitos for conhecido o que requer necessariamente a comparação com resultados de microscopia eletrônica.

Segundo *I. Mobasherpouret*. [61] e *K.P. Sanosh et.* [3], um aumento na temperatura de calcinação resulta em um aumento no tamanho de cristalito. Em seus trabalhos foram verificados uma pequena variação de tamanho de cristalito na faixa de temperatura abaixo de 600 °C. Em seus cálculos de tamanho, não foram considerados nenhuma das correções incluídas no presente trabalho (alargamento instrumental, efeito do fator de forma K, região do gráfico de W-H, e outros). Os autores utilizaram um único fator de forma ($K = 0,89$), considerando que todas as partículas eram esféricas. Os resultados destes autores são no mínimo questionáveis e inconclusivos, se todas as demais correções não forem corretamente avaliadas e descontadas. No presente trabalho foi possível mostrar que uma simples modificação na região do gráfico de W-H pode modificar o tamanho médio de cristalito de 2nm e uma mudança no fator de forma pode provocar uma modificação da ordem de 10nm.

Em relação às amostras com diferentes tempos de maturação, também não foi verificado variação de tamanho. Segundo *YingJun Wang et.* [6] um aumento no tempo de maturação resulta em um aumento de tamanho de cristalito. A diferença de tamanho estimado entre uma amostra maturada por 24 horas e outra maturada por 96 horas foi menor que 2nm. Em seus cálculos, assim como dos autores anteriores, não foi descontado o fator da deformação induzida e do alargamento instrumental do pico e considerou o fator de forma de partícula esférica. Novamente, os resultados são no mínimo questio-

náveis e a diferença de 2nm pode muito bem ser relacionado à deformação induzida nos cristalitos ou ao alargamento instrumental, por exemplo.

Uma conclusão que pode ser tirado desta parte do trabalho é que a determinação de tamanho de cristalito via difratometria de raios X é uma ferramenta útil, mas deve ser analisada com cautela. Os valores obtidos devem ser encarados com uma estimativa do tamanho médio de cristalito e deve-se sempre tomar o cuidado de analisar as possíveis fontes de erros na determinação dos tamanhos e o efeito que elas terão nos resultados finais. A melhor opção parece ser a de fornecer um intervalo de tamanhos e não somente um único valor. Mesmo quando a forma dos cristalitos é conhecida e, portanto, o valor de K pode ser definido em bases sólidas, as demais aproximações feitas ao longo do processo sempre induzirão flutuações que devem ser avaliadas e citadas corretamente.

4.2 Difratometria de Raios X e grau de cristalinidade

Segundo *K.P. Sanosh et al.*[3] e *E. Landi et al.*[62], o grau de cristalinidade pode ser estimado através da seguinte relação:

$$X_c = 1 - (v_{112/300} / I_{300}) \quad (4.1)$$

onde I_{300} é a intensidade do pico correspondente ao plano (300) e $v_{112/300}$ corresponde a intensidade do vale entre os picos (112) e (300) do difratograma. Esse vale desaparece completamente em amostras não cristalinas, ou seja, totalmente amorfas, já que a tendência é que os picos (112) e (300) se alarguem e se fundam a medida que a amostra se torna mais amorfa, fazendo com que $v_{(112)/(300)} \rightarrow I_{(300)}$ e portanto $X_c \rightarrow 0$. A segunda coluna da tabela 4 apresenta os valores de grau de cristalinidade $X_c \left(\frac{v_{112}}{300} \right)$ calculados pela expressão (4.1) para as amostras de HAP.

Landi et. al. [62] também discutem que a expressão (4.1) é altamente dependente do tamanho dos cristalitos. Isto é particularmente importante no caso do presente trabalho já que os resultados da sessão anterior mostram que os cristalitos são nanométricos e este fato é evidenciado no alargamento dos picos da difratometria de raios X.

Quanto menor for o cristalito, mas largo o pico deve ser e, portanto mais difícil será em identificar o valor correto do vale entre os picos (112) e (300). Os autores propuseram um segundo método baseado na largura a meia altura do pico (002) (veja equação (4.2)) para verificar o grau de cristalinidade das amostras por eles estudadas. Segundo eles, a diferença dos resultados obtidos pelos dois métodos foi sempre inferior a 10%. Mas analisando atentamente o trabalho, é possível perceber que eles consideraram apenas amostras tratadas acima de 750°C e mesmo assim para a grande maioria das amostras eles só calcularam o X_c para tratamentos acima de 850°C. Nestas temperaturas é conhecido na literatura [5,11,12] que os cristalitos da HAP crescem bastante permitindo um correto uso da equação (4.1).

No segundo método proposto por Landi e colaboradores, e descrito pela equação (4.2) abaixo, $B_{(002)}$ é a largura a meia altura do pico relativo a reflexão (002), dado em graus, e a constante 0,24 [62] foi determinada para um família bastante vasta de HAP's.

$$B_{(002)} \sqrt[3]{X_c} \approx 0,24 \quad (4.2)$$

Na segunda coluna da tabela 3, os valores de X_c (B_{002}) determinados via equação (4.2) são apresentados.

Tabela 4: grau de cristalinidade das amostras de hidroxiapatita

AMOSTRA	$X_c(\nu_{112/300})$ Eq. (4.1)	$X_c(B_{002})$ Eq. (4.2)	DIFERENÇA (%)
HAP _{AMBIENTE}	0,62±0,02	0,16±0,01	387%
HAP ₁₀₀	0,75±0,04	0,58±0,03	29%
HAP ₂₀₀	0,76±0,02	0,58±0,03	31%
HAP ₃₀₀	0,77±0,01	0,67±0,03	15%
HAP ₄₀₀	0,68±0,03	0,41±0,02	66%
HAP ₅₀₀	0,72±0,05	0,45±0,02	60%
HAP ₆₀₀	0,71±0,04	0,59±0,02	20%
HAP _{400(26HS)}	0,78±0,03	0,43±0,02	81%
HAP _{400(5DIAS)}	0,70±0,06	0,38±0,02	84%

Na terceira coluna da tabela 4, são apresentadas as diferenças entre os dois métodos de cálculo do grau de cristalinidade. Os valores de incerteza obtidos pelos dois métodos, $X_c(\nu_{112/300})$ e $X_c(B_{002})$, foram calculados através da propagação de incertezas das fórmulas 4.1 e 4.2. Como era esperado, existe uma diferença apreciável entre os

valores obtidos pelos dois métodos que só pode estar conectado ao fato das amostras do presente trabalho estar na escala nanométrica. A diferença é maior exatamente para a amostra apenas seca a temperatura ambiente. Este resultado está de acordo com o que foi obtido por difratometria de raios X que indica que esta amostra é a que apresenta menores cristalitos e, portanto o valor de $X_c(\nu_{112/300})$ calculado pela eq. (4.1) é mais susceptível a erros.

Pode-se verificar ainda que não há uma relação claramente linear entre o grau de cristalinidade e a temperatura de tratamento térmico. Segundo Y. Jun Wang et. [6], há um aumento da cristalinidade com o aumento do tempo de maturação. O comportamento de X_c calculado pelos dois métodos pode ser mais bem visualizado na figura 27 (a), em função da temperatura de tratamento térmico, e na figura 27(b), em função do tempo de maturação.

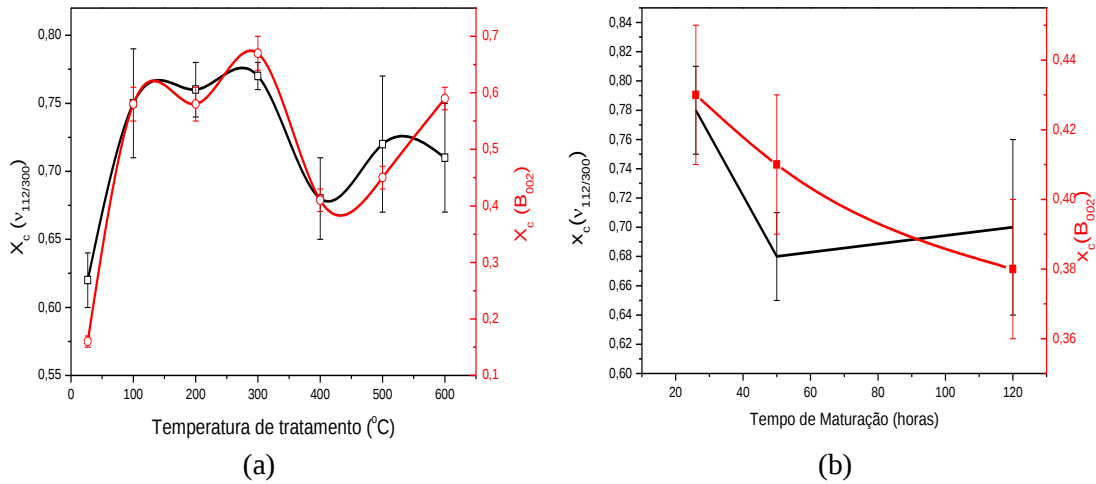


Figura 27: Gráfico dos graus de cristalinidade X_c das amostras calculados pelas equações 4.1 (curvas em preto) e 4.2 (curvas em vermelho) em função da temperatura de tratamento térmico (a) e do tempo de maturação (b).

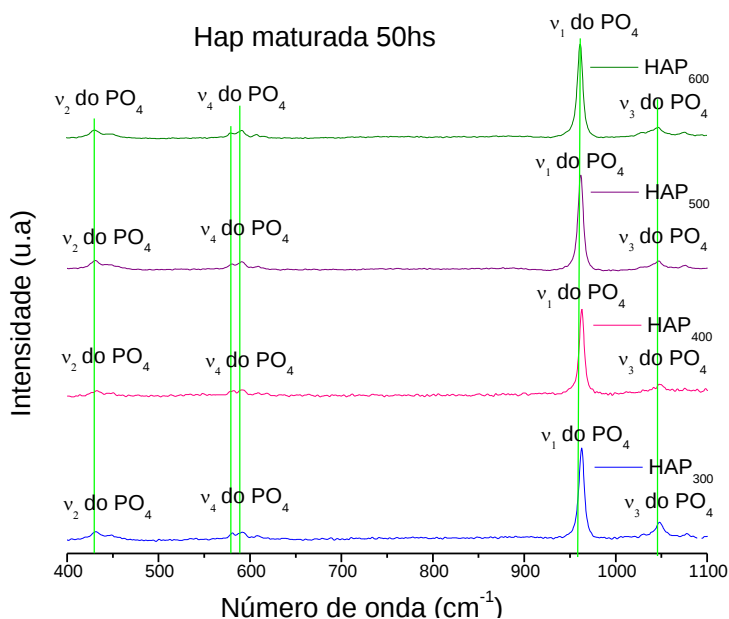
A figura 27(a) indica que o comportamento do X_c obtido pelos dois métodos é basicamente o mesmo, embora os valores absolutos de X_c por cada método sejam muito diferentes. Já os resultados da figura 27(b) demonstram que a influência do tempo de maturação é diferente nos dois métodos de cálculo do X_c . Considerando que o $X_c(B_{002})$ é que apresenta menores chances de ser influenciado pelo tamanho de cristalito na escala nanométrica, pode-se concluir que o aumento do tempo de maturação di-

minui o grau de cristalinidade da amostra, dentro do intervalo estudado. Este resultado é exatamente o oposto do obtido por *K.P.Sanosh. et al* [3]. No entanto os autores usaram apenas o método baseado no vale entre os picos das reflexões dos planos (112) e (300), que apresentam maiores possibilidades de ser mascarados pelo efeito do alargamento dos picos de difração devido ao tamanho nanométrico dos cristalitos.

A amostra HAP₃₀₀ foi a que apresentou maior grau de cristalinidade nos dois métodos. Essa discrepância com a literatura tanto no estudo do tempo de maturação como no de temperatura de tratamento será melhor investigada na continuidade deste trabalho. É importante lembrar que as medidas de DRX usadas para estimar o grau de cristalinidade foram realizadas no modo varredura contínua, já as encontradas nos trabalhos de *Sanosh. et al* [3] essas medidas foram realizadas no modo *stepscan*, que oferece um melhor resolução no difratograma e uma melhor relação sinal ruído. Nas próximas etapas deste trabalho as medidas serão refeitas em modo *stepscan* e pretende-se estender o estudo em função do tempo de maturação tanto para valores menores do que 24 horas, quanto para maiores do que 5 dias, e da temperatura para valores maiores do que 600°C.

4.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman das amostras de HAP produzidas com diferentes tratamentos térmicos e diferentes tempos de maturação são representados nas figuras 28 e 29, respectivamente.



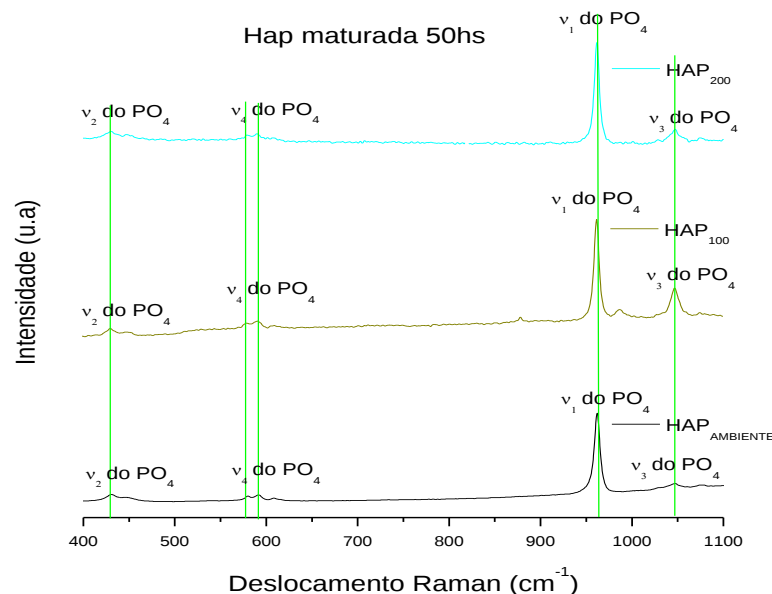


Figura 28: Espectro Raman das amostras de HAP maturadas por 50 horas que passaram por diferentes tratamentos térmicos.

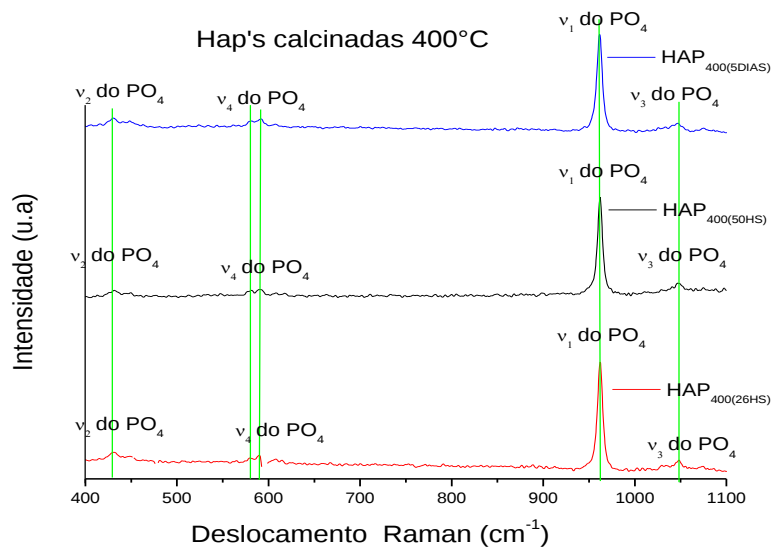


Figura 29: Espectro Raman das amostras de HAP com diferentes tempos de maturação (26h, 50h e 5 dias) e calcinadas a 400°C por 1 hora.

O espectro Raman das amostras é similar ao obtido por A. Antonakos. *et al*, G.L. Darimont. *et. al.* e R. Cuscó *et. al.* [63,64] contendo os modos do grupo fosfato. O grupo fosfato, em primeira aproximação, apresenta uma simetria tetraédrica T_d com o P^{5+} ocupando o centro do tetraedro e 4 íons de O^{2-} nos vértices. Na teoria de grupos, siste-

mas que apresentam esta simetria (tais como a molécula de CH_4 , os grupos $(\text{SiO}_4)^{4-}$ $(\text{BO}_4)^{5-}$, entre outros) possuem 9 modos normais de vibração agrupados conforme ilustrado na figura 30(a) [65]. Para a grande maioria dos sistemas deste tipo, vale a regra geral $\nu_1 > \nu_3$ e $\nu_2 > \nu_4$ [66].

Na HAP, o tetraedro do $(\text{PO}_4)^{3-}$ é distorcido apresentando as distâncias e ângulos de ligação apresentados na tabela 5. Os valores das distâncias e ângulos foram calculados baseando-se na estrutura cristalina da HAP de acordo com o padrão do banco de dados cristalográficos ICSD 151414.

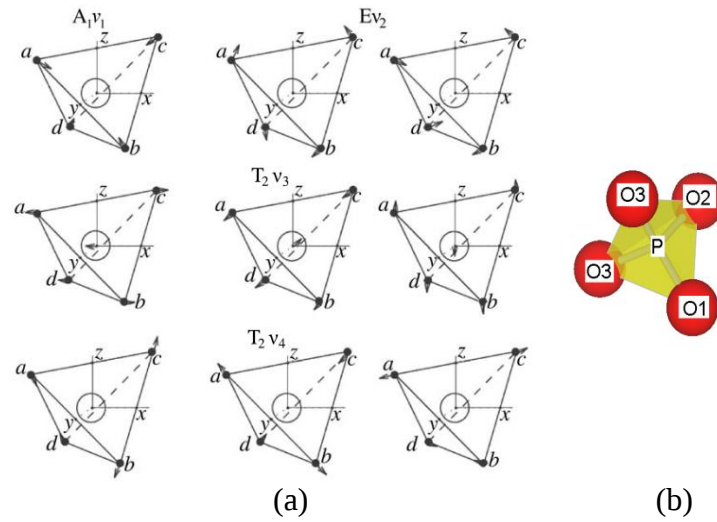


Figura 30: (a) Representação dos 9 modos de vibração do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$, 1 modo A_1 com frequência ν_1 , 2 modos E degenerados com frequência ν_2 , 6 modos T_2 divididos em 2 grupos triplamente degenerados, um com frequências ν_3 e ν_4 [60]. (b) Tetraedro do grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$ na matriz da HAP.

Tabela 5: Distâncias P-O e ângulos O-P-O no grupo $(\text{PO}_4)^{3-}$, na estrutura da HAP, obtidos com base na estrutura cristalina do padrão ICSD 151414.

Distâncias (Å)	P – O1	1,5515
	P – O2	1,5391
	P – O3	1,5396
Ângulos (graus)	O2-P1-O1	112,5
	O2-P1-O3	107,39
	O3-P1-O3	107,7
	O3-P1-O1	110,83

Na HAP o modo de estiramento simétrico ν_1 do P-O está próximo a 960 cm^{-1} ; o modo de flexão (bending mode) ν_2 O-P-O em 420 cm^{-1} ; o modo de estiramento assimétrico ν_3 P-O está entre 1020 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} ; e os modos de flexão ν_4 O-P-O em dois

picos distintos aparecem próximo a 580 cm^{-1} e 591 cm^{-1} [64,67,68]. O fato de o tetraedro ser ligeiramente distorcido faz com que os modos E se desdobrem em dois e os modos T_2 em três. Este efeito pode ser visto nos espectros de todas as amostras.

Em todos os espectros aparece a banda correspondente ao estiramento simétrico do tetraedro ν_1 e esta se apresenta muito intensa. Essa banda é característica da HAP, o que, juntamente com os resultados de DRX, garante que as amostras formadas são HAP [64,67].

Na amostra seca a 100°C por dois dias (HAP_{100}) aparece uma banda em $986,8\text{ cm}^{-1}$ que pode ser correspondente a um deslocamento na frequência de um dos modos de vibração ν_3 .

A tabela 6 mostra o deslocamento Raman do modo ν_1 das amostras de HAP. É possível verificar que algumas amostras apresentam diferentes frequências Raman.

Tabela 6: deslocamento Raman do modo ν_1 das amostras de HAP em comparação como grau de cristalinidade.

AMOSTRA	DESLOCAMENTO RAMAN ($\pm 0.5\text{cm}^{-1}$)	$X_c(\nu_{112/300})$ Eq. (4.1)	$X_c(B_{002})$ Eq. (4.2)
$\text{HAP}_{\text{AMBIENTE}}$	962	$0,62 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$
HAP_{100}	962,5	$0,75 \pm 0,04$	$0,58 \pm 0,03$
HAP_{200}	962	$0,76 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,03$
HAP_{300}	963	$0,77 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,03$
HAP_{400}	962,5	$0,68 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,02$
HAP_{500}	961,5	$0,72 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,02$
HAP_{600}	961,5	$0,71 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,02$
$\text{HAP}_{400(26h)}$	962	$0,78 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,02$
$\text{HAP}_{400(5DIAS)}$	961,5	$0,70 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,02$

A figura 31 mostra uma ampliação da banda correspondente ao modo vibracional ν_1 das amostras de HAP com tratamentos térmicos de 300°C , 400°C e 500°C e das amostras com diferentes tempos de maturação.

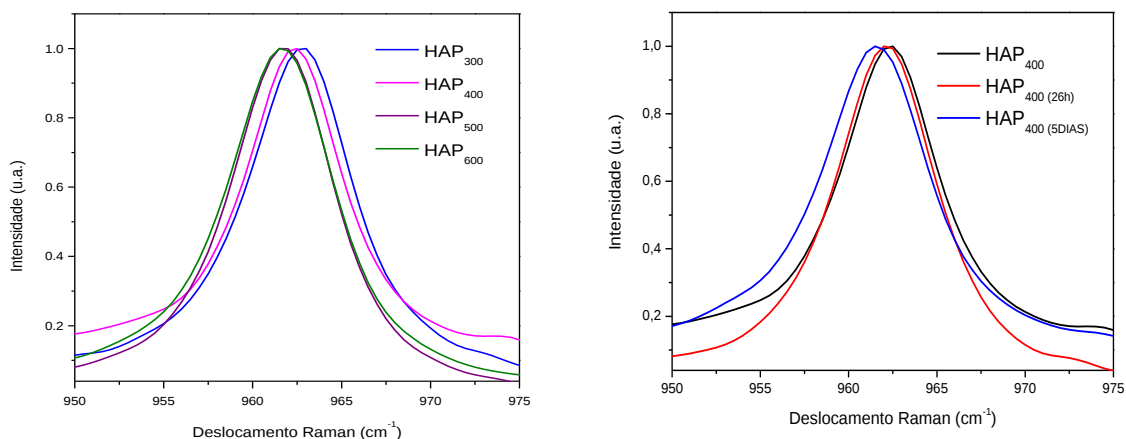


Figura 31: banda do modo ν_1 das amostras de HAP. (a) HAP com diferentes tratamentos térmicos. (b) HAP com diferentes tempos de maturação.

Na figura 31(a) pode-se visualizar que, à medida que a temperatura aumenta, há uma diminuição do valor da frequência do modo ν_1 , ou seja, há um deslocamento para a esquerda das bandas, até a temperatura de 300°C. Sendo este deslocamento mais evidente nas bandas das amostras HAP₅₀₀ e HAP₆₀₀ e estas se apresentam na mesma posição, não havendo deslocamento de uma em relação à outra.

Na figura 31(b) verifica-se que a amostra maturada por 50 horas (HAP₄₀₀) apresenta menor frequência e a maturada por 5 dias (HAP_{400(5 dias)}), maior frequência, sendo que há um deslocamento bem considerável da amostra HAP_{400(5 dias)} em relação às outras.

A largura à meia altura (FWHM) da banda do modo ν_1 foi obtida para todas as amostras e os resultados estão na tabela 7, em comparação com os valores do grau de cristalinidade das amostras. A relação entre o grau de cristalinidade e a posição e largura a meia altura (FWHM) da banda do modo ν_1 pode ser melhor analisada através dos gráficos da figura 32.

Tabela 7: valores de FWHM da banda de Raman e valores de cristalinidade obtidos por DRX.

AMOSTRA	FHWM RAMAN	$X_c(\nu_{112/300})$ Eq. (4.1)	$X_c(B_{002})$ Eq. (4.2)
HAP _{AMBIENTE}	7,3±0,1	0,62±0,02	0,16±0,01
HAP ₁₀₀	6,6±0,1	0,75±0,04	0,58±0,03
HAP ₂₀₀	6,5±0,1	0,76±0,02	0,58±0,03
HAP ₃₀₀	6,9±0,1	0,77±0,01	0,67±0,03
HAP ₄₀₀	6,4±0,1	0,68±0,03	0,41±0,02
HAP ₅₀₀	7,0±0,1	0,72±0,05	0,45±0,02
HAP ₆₀₀	7,2±0,1	0,71±0,04	0,59±0,02
HAP _{400(26HS)}	6,8±0,1	0,78±0,03	0,43±0,02
HAP _{400(5DIAS)}	7,0±0,1	0,70±0,06	0,38±0,02

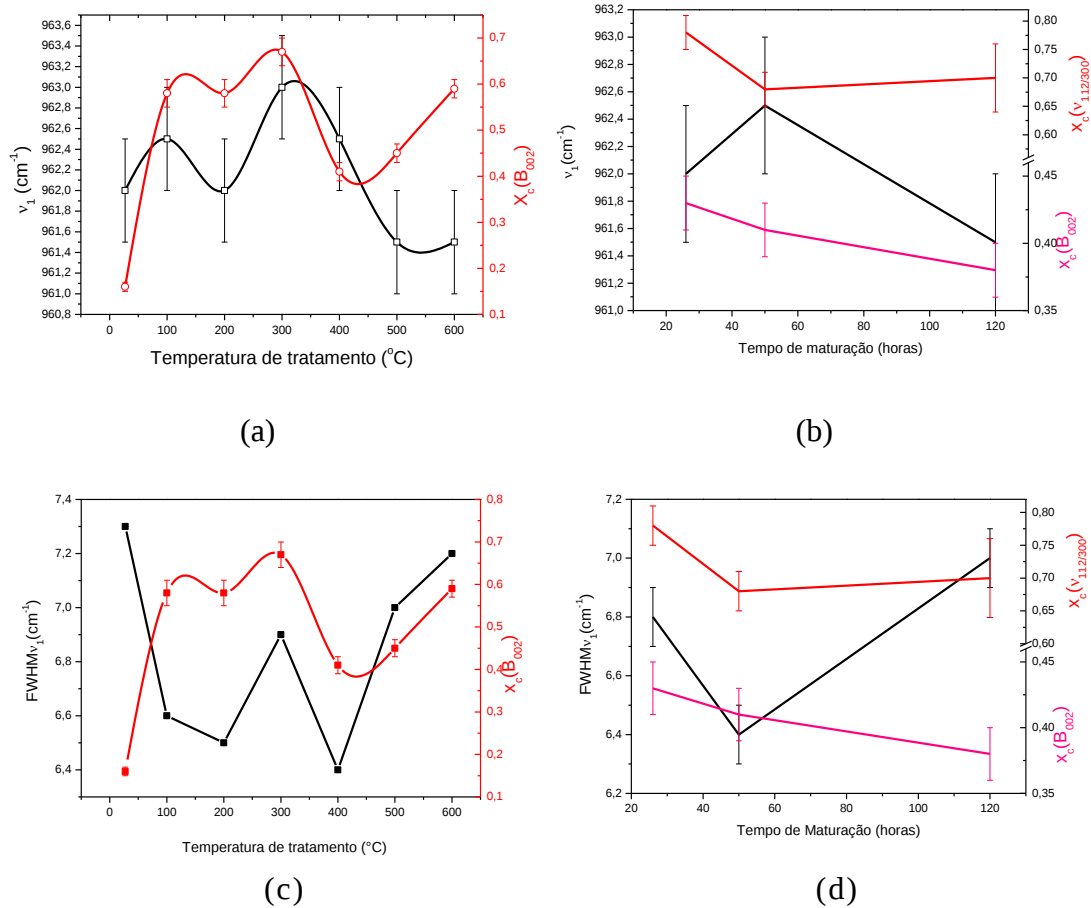


Figura 32: Posição espectral do modo ν_1 em função da temperatura de tratamento térmico (a) e do tempo de maturação das amostras (c). Largura a meia altura (FWHM) do modo ν_1 em função da temperatura de tratamento térmico (b) e do tempo de maturação das amostras (d).

A relação da posição do pico Raman do modo de estiramento simétrico do grupo fosfato em função da temperatura de tratamento térmico segue de uma maneira geral o comportamento do grau de cristalinidade, ou seja, quanto maior o X_c , maior a frequência do modo. Já o FWHM, segue em linha geral o comportamento inverso. As amostras de maior cristalinidade têm menor valor de FWHM. Este resultado pode ser interpretado como uma manifestação do ordenamento da rede da HAP à medida que o grau de cristalinidade aumenta. Quanto mais organizado o ambiente ao redor do grupo fosfato, menor a dispersão da frequência do modo de estiramento simétrico e, portanto menor o FWHM. Já o aumento da frequência do modo Raman, mesmo pequeno, é uma evidência do enrijecimento da ligação P-O, com consequente aumento da constante de força, que pode ser explicado tanto pela diminuição do volume livre disponível para o grupo fosfato vibrar quanto pelo surgimento ou complementação de ligações deste grupo com o restante da estrutura cristalina da HAP. O aumento de cristalinidade pode ser tanto devido ao maior grau de organização e de empacotamento da estrutura hexagonal da HAP, quanto à redução de fase amorfa ou a aumento no tamanho das partículas já que para partículas menores uma menor quantidade de grupos fosfatos estaria próximo da superfície das partículas e, portanto uma maior fração estaria no volume das partículas em uma vizinhança organizada. Analisando os tamanhos de cristalitos obtidos por DRX, não é possível afirmar com certeza se o efeito de empacotamento é o que domina já que as amostras com parâmetros de rede mais próximos do valor do padrão do banco de dados cristalográficos são as amostras tratadas a 300 e 600°C. Já os tamanhos de cristalitos determinados por DRX também não permitem conclusões definitivas. Aparentemente tanto a amostra HAP₃₀₀ quanto a amostra HAP₆₀₀ tem tamanhos ligeiramente maiores.

Tanto a posição quanto o FWHM do modo ν_1 apresenta uma dependência direta com o grau de cristalinidade $X_c(\nu_{112/300})$ mas uma dependência não tão clara quando se considera o grau de cristalinidade $X_c(B_{002})$ em função do tempo de maturação. A principal diferença entre as duas formas de avaliar X_c é o efeito marcante da dimensão nanométrica dos cristalitos no primeiro. Este efeito corrobora com o que foi discutido no parágrafo anterior e reforça a combinação dos efeitos de grau de cristalinidade real e tamanho de cristalito no ordenamento dos modos Raman do grupo fosfato da HAP. Não é possível afirmar ainda que um destes efeitos é mais decisivo do que o outro na definição do espectro Raman de uma amostra de HAP.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi usada com o intuito de verificar a superfície e morfologia das amostras. A figura 33 exibe a imagem de MEV da amostra de hidroxiapatita seca à temperatura ambiente. A figura 33 (a) mostra dois aglomerados de partícula de aproximadamente 2 μm de tamanho de forma arredondada. Em (b) é mostrado um dos aglomerados da figura anterior em maior aumento. Em (c) e (d), aglomerado de partículas de aproximadamente 1 μm .

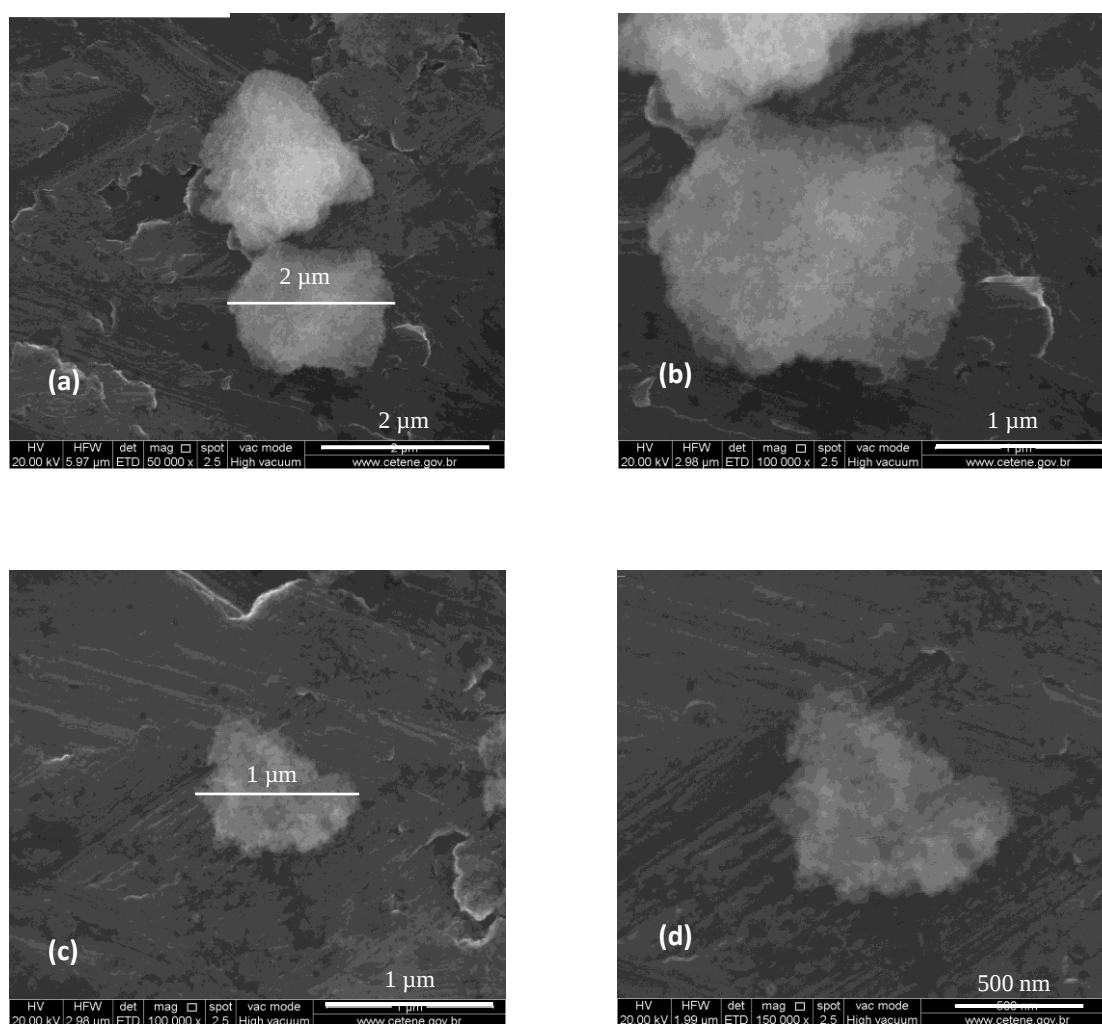


Figura 33: MEV da amostra de HAP maturada por 50hs e seca a temperatura ambiente (HAPAMBIENTE). (a) aglomerados de partícula de 2 μm de tamanho de forma arredondada, (b) ampliação da imagem anterior, (c) e (d), aglomerado de partículas de aproximadamente 1 μm .

Na figura 34 estão ilustradas as amostras de HAP seca a 100°C por dois dias. Em (a) verifica-se a formação de placas de HAP com comprimentos em torno de 10 μm ; em (b) ampliação da figura anterior para uma escala de 1 μm , mostrando uma placa de HAP compacta, de baixa porosidade, com aproximadamente 500 nm de espessura; em (c) pode-se observar que as placas são formadas pela junção de pequenos aglomerados arredondados de partícula; e em (d) tem-se um aglomerado arredondado, com diâmetro maior de aproximadamente 700nm, mostrando que além das placas grandes, há também pequenos aglomerados isolados.

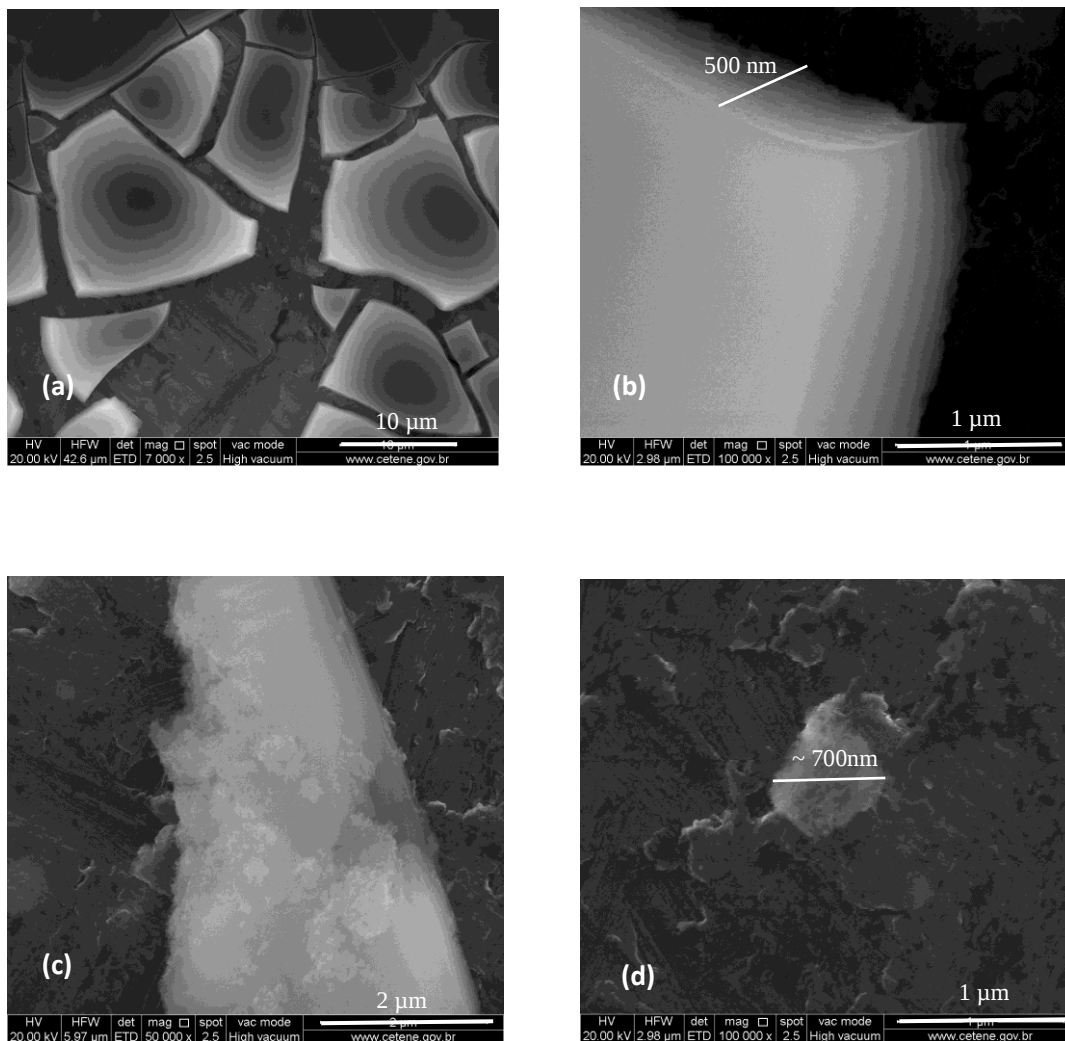


Figura 34: MEV da amostra de HAP maturada por 50hs e seca a 100°C/2dias (HAP₁₀₀). (a) placas de HAP com comprimentos em torno de 10 μm ; (b) placa de HAP compacta, de baixa porosidade, com aproximadamente 500 nm de espessura; em (c) placa com pequenos aglomerados arredondados de partícula; e (d) aglomerado arredondado, com diâmetro menor que 1 μm .

Na figura 35 têm-se imagens das amostras de hidroxiapatita tratada a 600° C por 1 hora (HAP₆₀₀). Na figura 35 (a) é observado um aglomerado isolado de formato arredondado e tamanho menor que 1µm. Em (b), aglomerado com diâmetro menor com aproximadamente 3µm , e em (c) aproximação da figura anterior, mostrando que o aglomerado apresenta porosidade e é formado por partículas menores de forma não muito bem definida.

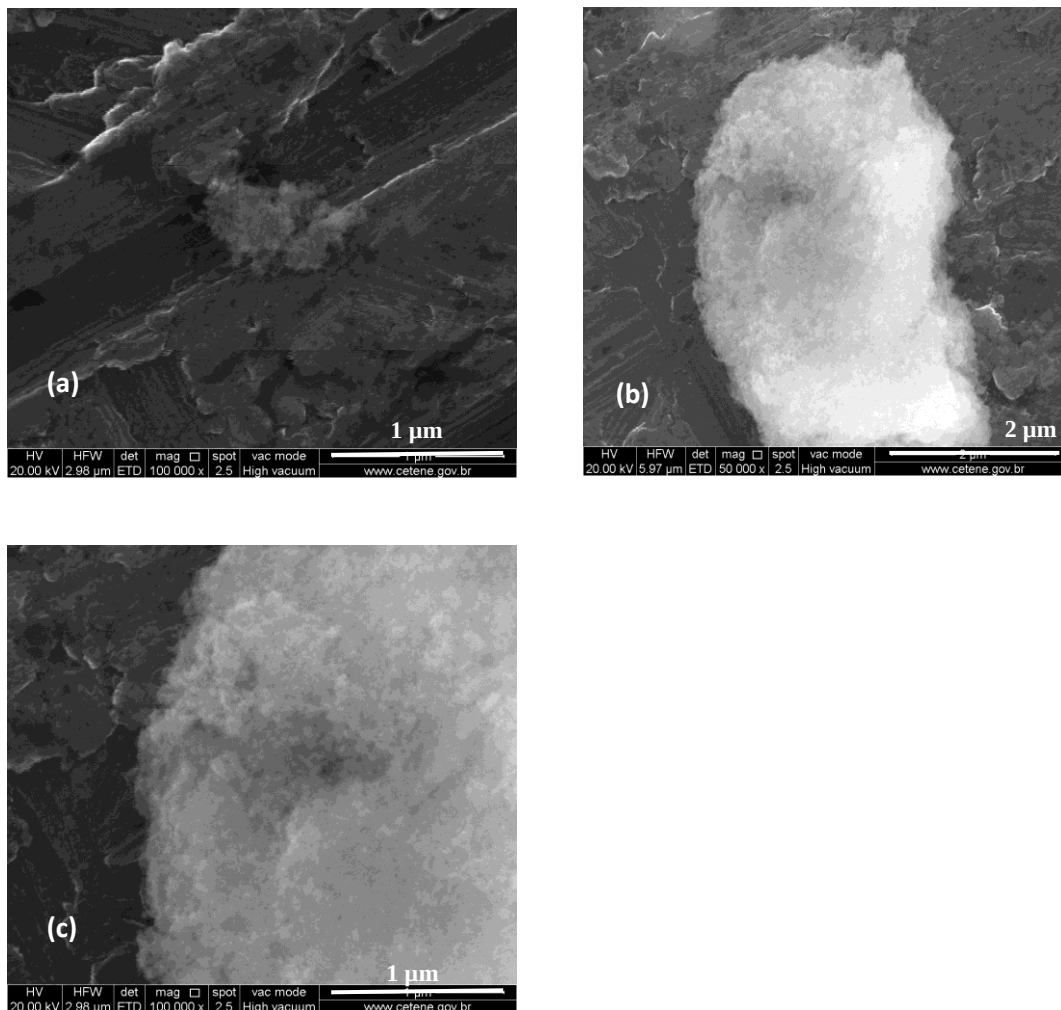


Figura 35: MEV da amostra de HAP maturada por 50hs e tratada a 600°C/1h (HAP600) Em (a) aglomerado isolado esférico menor que 1 µm. Em (b), aglomerado com diâmetro maior que 5 µm, e em (c) aproximação da figura anterior.

4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As micrografias das microscopias eletrônicas de transmissão foram obtidas com o intuito de investigar a estrutura, a morfologia e os tamanhos de partículas das amostras de HAP pura [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] produzidas com diferentes tempos de maturação e diferentes tratamentos térmicos. Através dessas imagens foi possível conhecer a forma das partículas e estimar o tamanho das mesmas.

A figura 33 ilustra as partículas de HAP maturadas por 50 horas e seca a temperatura ambiente ($\text{HAP}_{\text{AMBIENTE}}$). A figura 36 (a) revela um aglomerado de partículas de hidroxiapatita em escala manométrica com 20nm a 80nm de comprimento, com morfologia diversificada, sendo que a maior parte encontra-se de forma arredondada. Em (b) é apresentada outra região do mesmo aglomerado e em (c) apresenta uma imagem de uma partícula razoavelmente bem definida apresentando forma hexagonal de dimensão maior igual a $(47,7 \pm 0,2) \text{ nm}$.

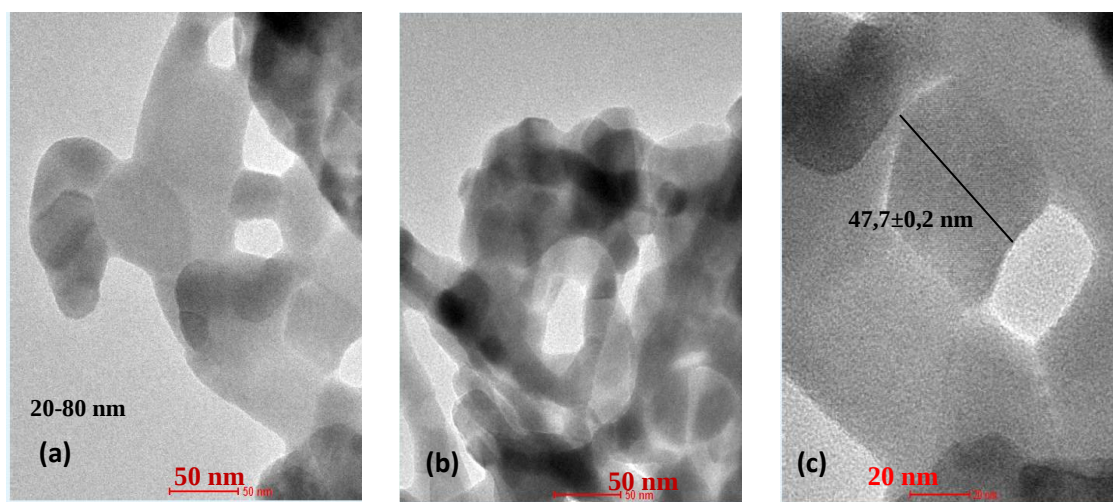


Figura 36: MET da HAP maturada por 50hs e seca a temperatura ambiente (HAP_0); (a) partículas aglomeradas, (b) partículas sobrepostas, (c) partícula com forma hexagonal.

A figura 37 ilustra uma imagem de microscopia de alta resolução da mesma região da figura 36(c). Nota-se a existência de algumas regiões monocristalinas realçando que a amostra mesmo sem sofrer tratamento térmico apresenta cristalitos muito bem

definidos. As regiões da imagem que apresentam planos cristalinos bem definidos foram analisadas através da transformada de Fourier (FFT) feitas usando o software ES Vision, o que permitiu obter as distâncias interplanares de cada uma das partículas. As distâncias interplanares obtidas podem ser diretamente comparadas com as distâncias interplanares da estrutura hexagonal da hidroxiapatita (ICSD 151414). As seguintes distâncias interplanares obtidas 5,16 Å, 2,60 Å e 4,07 Å correspondem ao espaçamento dos planos d_{101} , d_{202} e d_{200} , respectivamente. Os valores obtidos através do padrão da HAP obtido no banco de dados ICSD 151414 são 5,25Å (d_{101}), 2,62Å (d_{202}) e 4,07Å(d_{200}).

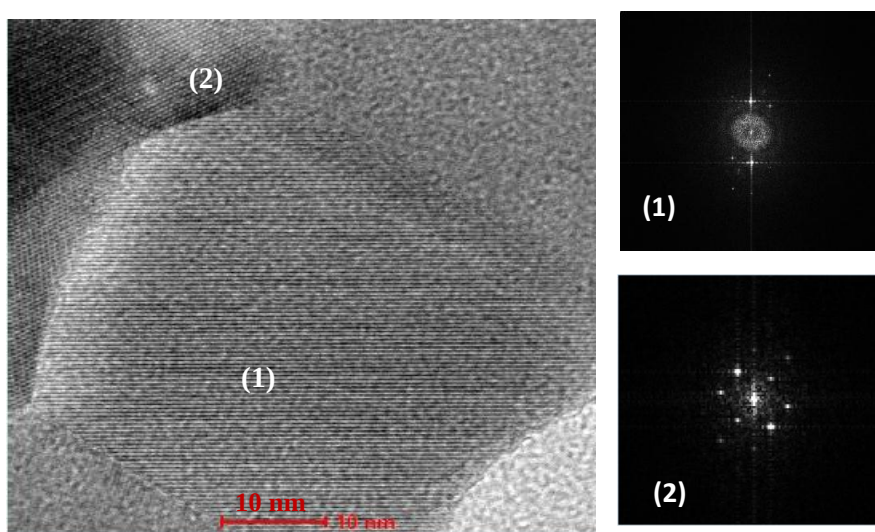


Figura 37: MET de alta resolução da HAPAMBIENTE. As regiões marcadas na figura da esquerda foram analisadas por transformada de Fourier e os resultados estão na figura da direita.

A figura 38 mostra uma micrografia de alta resolução da amostra de HAP tratada a 100°C por 2 dias (HAP₁₀₀). Pode-se observar que a amostra é formada de aglomerados de partícula de morfologia arredondada, e que os aglomerados possuem um tamanho em torno de 20 nm. Através da análise de FFT foram obtidas as distâncias interplanares 2,79 Å, que pode corresponder tanto às famílias de planos {121} como {211} que apresentam distâncias interplanares de 2,79Å ou à família de planos {112} que tem 2,77 Å de distância interplanar. A distância interplanar de 2,72 Å se relaciona à família de planos {300} da HAP.

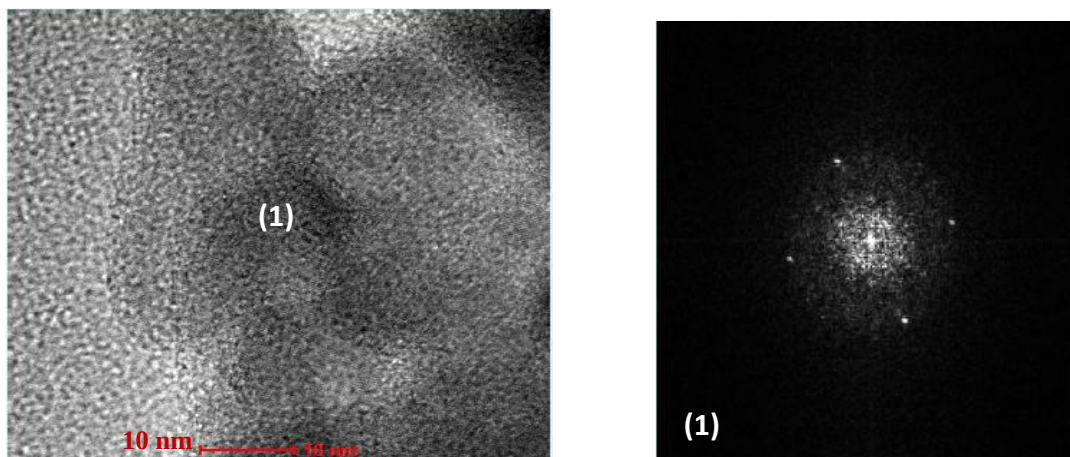


Figura 38: MET de alta resolução da HAP100. A região marcada na figura da esquerda foi analisada por transformada de Fourier e os resultados estão na figura da direita.

Na figura 39, é ilustrada uma partícula na forma de bastão da amostra HAP₄₀₀ (26HS) com aproximadamente 51nm x 20nm de tamanho e orientação perpendicular ao plano {121} ou {221} da HAP.

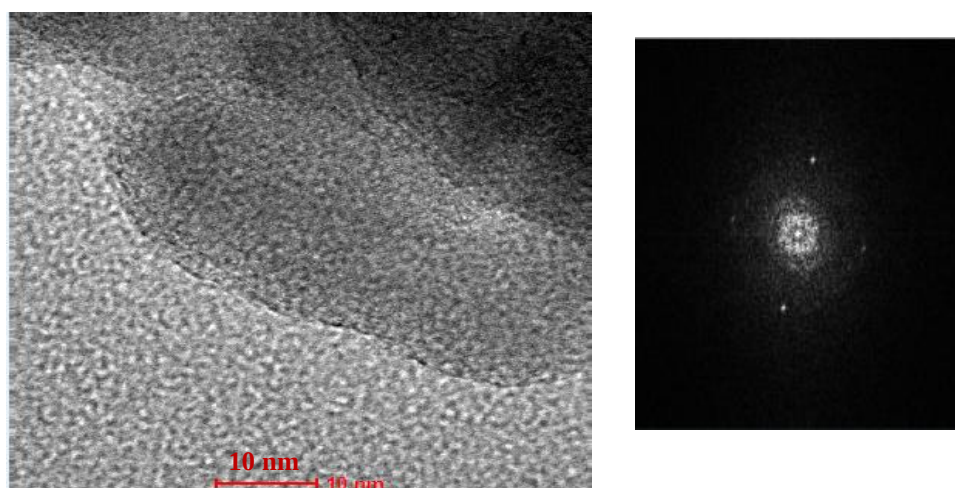


Figura 39: MET de alta resolução da amostra HAP400 (26 horas). A região marcada na figura da esquerda foi analisada por transformada de Fourier e os resultados estão na figura da direita.

A figura 40 mostra as amostras de HAP maturadas por 50h e tratadas a 400°C/1h. O tamanho médio dos aglomerados é em torno de 50nm x 20nm. As figuras

(a) e (b) mostram um aglomerado de partículas sobrepostas em forma de bastões, já a figura (c) mostra uma micrografia de alta resolução e a transformada de Fourier correspondente aos planos $\{300\}$ e $\{121\}$ ou $\{112\}$.

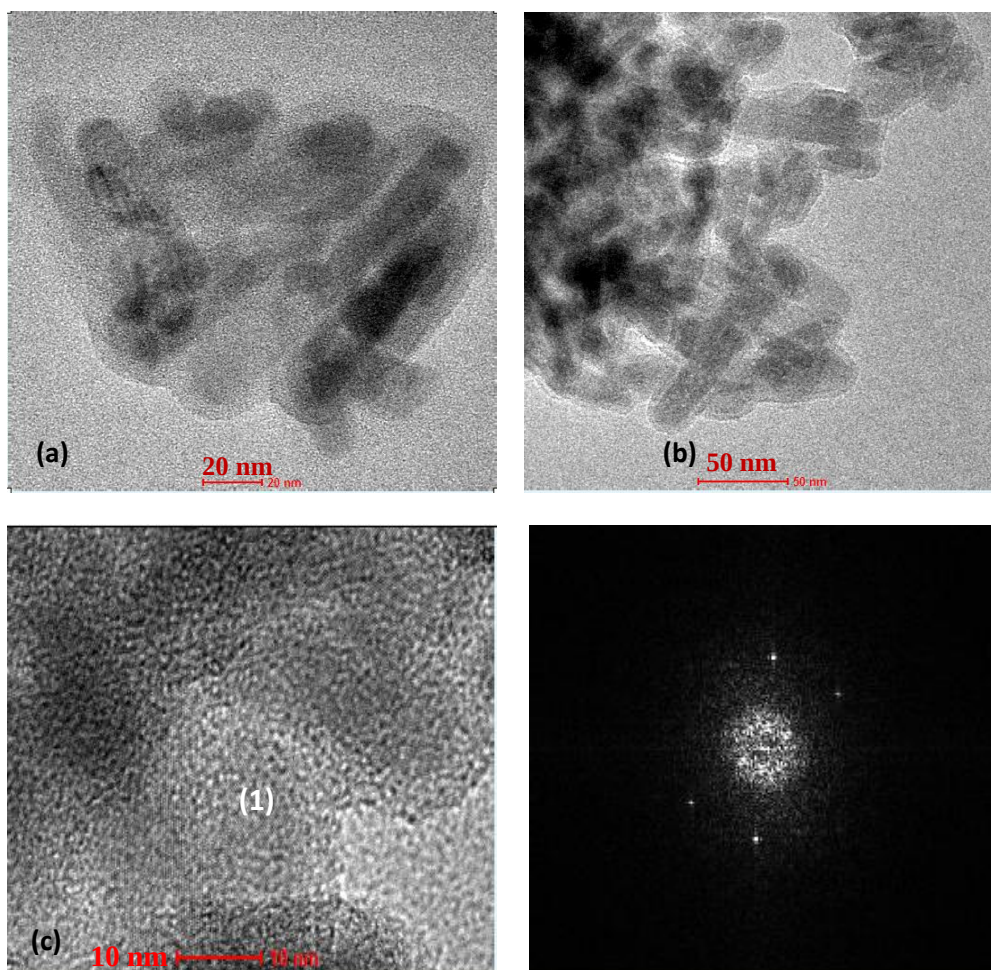


Figura 40: MET da HAP maturada por 50hs e calcinada a 400°C/1h (HAP400 (50hs)); (a) e (b) partículas aglomeradas e sobrepostas, (c) MET de alta resolução (a região marcada foi analisada por transformada de Fourier (figura da direita)).

Na tabela 8 estão todos os valores das distâncias interplanares obtidas para as amostras analisadas por MET com as respectivas famílias de planos correspondentes.

Tabela 8: distâncias interplanares e família de planos das amostras de HAP

AMOSTRA	DISTÂNCIAS INTERPLANARES		ERRO (%)	FAMÍLIA DE PLANOS
	$d_{\text{teórico}}(\text{\AA})$	$d_{\text{medido}}(\text{\AA})$		
HAP _{AMBIENTE}	5.25	5.16±0.13	-1.7	{101}
	2.62	2.60±0.06	-1.0	{202}
	4.07	4.07±0.01	0	{200}
HAP ₁₀₀	2.77-2.81	2.79±0.05	±0.7	{112} / {121}
	2.71	2.72±0.02	0.4	{300}
HAP ₄₀₀ (26HS)	2.81	2.82±0.02	1.1	{121} / {211}
HAP ₄₀₀ (50HS)	2.71	2.74±0.04	1.1	{300}
	2.77	2.79±0.01	0.7	{112} / {121}

Através das micrografias verifica-se que as amostras com diferentes tempos de maturação apresentaram o mesmo tamanho (em torno de 50nm x 20nm), e mesma morfologia, em forma de bastão, estando próximo dos resultados de tamanho de cristalito calculados por Scherrer e W-H.

As amostras com diferentes tratamentos térmicos apresentaram variação de morfologia e de tamanho. Esses valores contrariam os resultados obtidos por Scherrer e W-H e podem ser explicados pelo fato de que para análise de microscopia é utilizada uma porção muito pequena da amostra, não significando que haja variação no tamanho médio das partículas. As imagens de microscopia também mostram tamanhos maiores que os estimados por Scherrer e W-H, o que era esperado, visto que em microscopia é medido o tamanho da partícula e o cálculo por Scherrer e W-H resulta em uma estimativa do tamanho de cristalito (uma partícula pode ser formada por mais de um cristalito).

4.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada com o propósito de estimar os tamanhos de partícula das amostras com diferentes tratamentos térmicos e diferentes tempos de maturação, a partir de uma suspensão. Conforme discutido no capítulo 3- Materiais e Métodos, o EDL mede o volume hidrodinâmico da partícula e a partir desta informação estima o tamanho hidrodinâmico da partícula. Isso significa que os valores de volume e tamanho determinados representam a partícula e a porção do fluido no qual as partículas estão suspensas que é arrastado junto com as partículas. A técnica admite que porções muito pequenas do fluido são carregados junto com as partículas e que portanto a adsorção das moléculas do fluido na superfície das mesmas é pequena.

Os gráficos de EDL das amostras foram expressos em duas grandezas distintas, intensidade de espalhamento e número de partículas que espalham a luz em função do tamanho. Como nanopartículas com dimensões maiores espalham mais a luz do laser, mesmo que estejam em pequenas quantidades, essas são as responsáveis pela reprodução do gráfico de intensidade por tamanho, mesmo que elas se encontrem em pequena quantidade na amostra. Já no gráfico de número por tamanho, o que se observa é uma real distribuição de tamanho, visto que o que vai importar é a quantidade de partículas de um mesmo tamanho em uma determinada amostra. A figura 40 ilustra os gráficos de EDL das amostras de HAP com diferentes tratamentos térmicos.

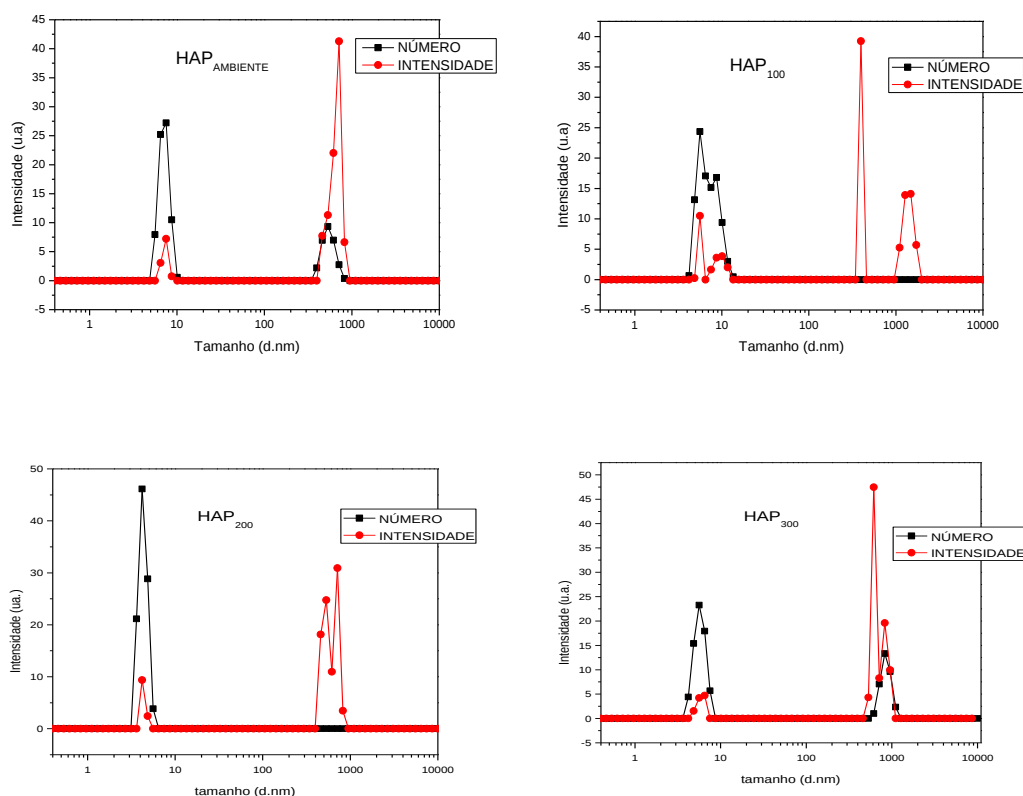
Três regiões de tamanhos podem ser claramente vistas em todas as medidas da figura 41, a primeira entre 4 e 10 nm, a segunda na região de 70 a 200nm e a terceira na região de 400 a 1300nm. A última região representa os agregados que são visíveis nas imagens tanto de MEV quanto de MET. A 1ª região, representa as partículas de menores dimensões e podem representar partículas com um único cristalito. Já a região intermediária representa pequenos aglomerados e/ou partículas contendo, provavelmente, de um a alguns cristalitos.

No caso específico da amostra HAP₄₀₀, a combinação dos resultados de MET (ver figura 40) e de EDL permite conjecturar que os picos observados nas curvas de EDL em ~78nm (± 10 nm) podem ser devido as partículas de formato alongado que se difundem na suspensão na direção de perpendicular ao seu maior diâmetro. Já o pico em cerca de 190nm pode ser devido à difusão das mesmas partículas executando movimen-

tos de rotação provocando um arraste de fluido maior e, portanto um volume hidrodinâmico aparente maior. Outra possibilidade é que aglomerados com forma de bastões, como os apresentados na figura 36 sejam os responsáveis por este pico.

Na figura 42, estão as curvas de EDL de número e intensidade de espalhamento por tamanho das amostras que sofreram diferentes tratamentos térmicos. As mesmas regiões de tamanho existentes nas amostras da figura 41 podem ser identificadas aqui.

Os resultados de intensidade EDL estão de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura, visto que os valores de intensidade das amostras apresentaram-se em torno de 500 nm, comprovando o que a MEV já havia mostrado, que houve a formação de aglomerados de partículas. Os resultados dos gráficos de número confirmam que não há variação significativa nos tamanhos das partículas, como mostra os gráficos de DRX, as medidas de Raman e a estimativa por Scherrer e Williamson-Hall.



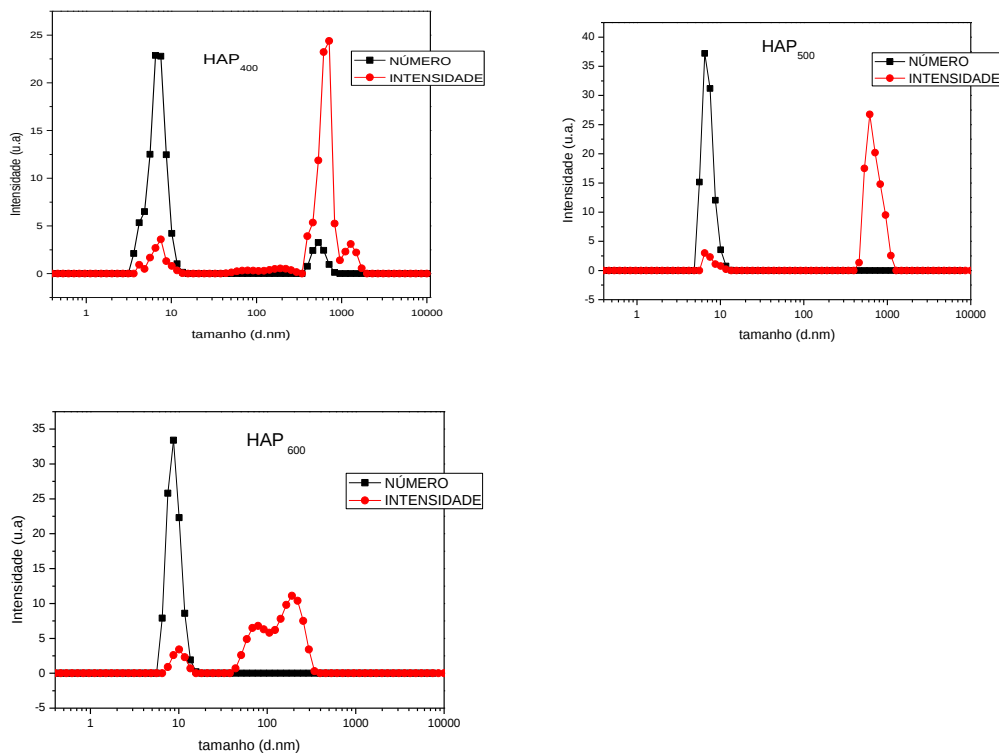


Figura 41: Gráfico de intensidade e do número de partículas obtidos das medidas de EDL em função do tamanho das nanopartículas de HAP das amostras maturadas por 50 horas e tratadas a diferentes temperaturas.

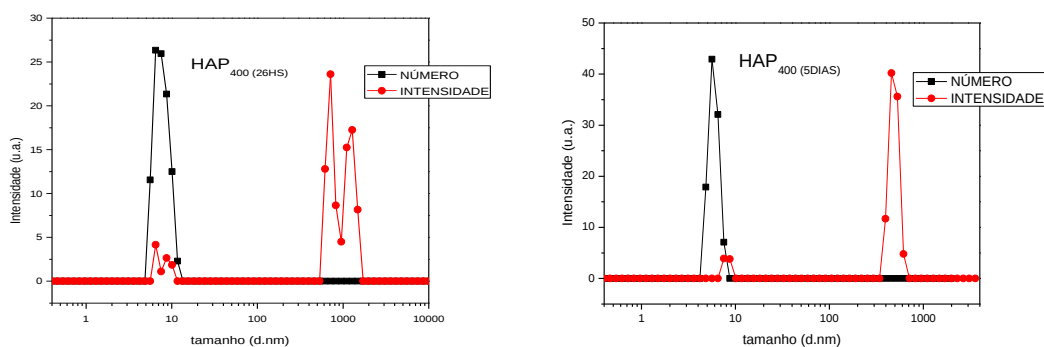


Figura 42: Gráficos da distribuição da intensidade e do número de partículas obtidos das medidas de EDL em função do tamanho das nanopartículas de HAP das amostras tratadas a 400 °C e maturadas por 26 horas e 5 dias.

As partículas com dimensões da ordem de 10 nm podem ser vistas nas imagens de alta resolução de MET das amostras HAP₁₀₀ e HAP₄₀₀. Além disso, estas imagens

indicam partículas de formato mais próximo do arredondado e formadas por um único cristalito. A combinação de todos estes resultados permite interpretar a grande dispersão de valores encontrados na determinação dos tamanhos usando a difratometria de Raios X e os métodos de Scherrer e W-H. No caso das amostras HAP₄₀₀ a grande variação de tamanho é real e percebe-se tanto partículas alongadas com dimensões de dezenas de nm quanto partículas arredondadas com ~10nm. Assim é correta a informação contida na tabela 3. Já para amostra HAP100, os resultados de EDL e MET indicam partículas aproximadamente esféricas formando aglomerados de diferentes tamanhos. Assim pode-se adotar para o K o valor de 0,89 e os tamanhos médios de partícula determinados pela difração de raios X ficam em torno de 14-15nm e este valor deve ser devido a uma distribuição bimodal dando origem aos dois picos observados em ~6 e ~9nm das medidas de EDL.

Por último, pode-se tentar correlacionar a posição dos primeiros picos das medidas de EDL das amostras tratadas termicamente com o grau de cristalinidade X_c (B_{002}). O resultado é apresentado na figura 43. Aparentemente existe uma correlação inversa entre a cristalinidade da amostra e o tamanho das menores partículas obtidas, até a temperatura de tratamento térmico de 400°C. Ou seja, nesta faixa de temperaturas, o aumento da cristalinidade está associado à diminuição do tamanho das menores partículas presentes na amostra. Uma possível interpretação é que à medida que a temperatura aumenta, material das partículas menores são transferidos para partículas maiores de forma que aquelas formadas durante a fase de maturação e secagem da amostra diminuem de tamanho à custa do crescimento de outras partículas. Este processo pode produzir partículas amorfas devido à transferência de material para outras partículas, reduzindo, portanto o grau de cristalinidade da amostra. Considerando as imagens de MET, pode-se concluir ainda que as partículas inicialmente arredondadas crescem na forma de bastões alongados formando partículas maiores, que dão origem aos picos de EDL acima de 50nm. Acima de 400°C aparentemente o mecanismo muda e todas as partículas crescem através de processos do tipo coalescência o que desloca os picos para tamanhos maiores e aumenta o seu grau de cristalinidade novamente.

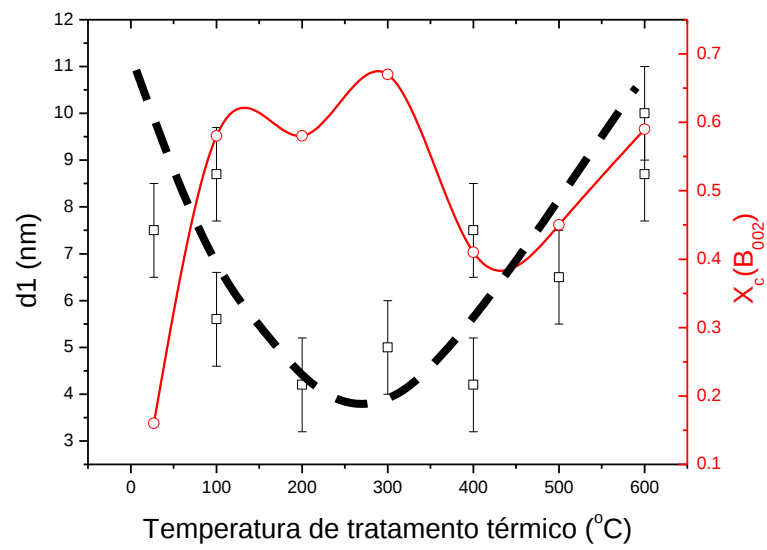


Figura 43: Correlação entre o tamanho das menores partículas, determinadas pela posição dos picos nos gráficos de EDL, com o grau de cristalinidade, em função da temperatura de tratamento térmico das amostras.

5. CONCLUSÕES

O processo de produção via úmida de hidroxiapatita (HAP) por precipitação controlada mostrou-se uma metodologia simples e eficiente, sendo capaz de produzir nanocristais de HAP pura.

Através do estudo realizado utilizando as técnicas de difratometria de raios X, espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e espalhamento dinâmico de luz, foi possível uma análise dos efeitos de diferentes tempos de maturação e diferentes tratamentos térmicos nas características estruturais e morfológicas da HAP.

As análises de difratometria de raios X confirmam a formação de uma única fase cristalina da HAP hexagonal em todas as amostras, inclusive na amostra que foi apenas maturada e seca a temperatura ambiente, mostrando que modificações no tempo de maturação e na temperatura de tratamento térmico, dentro dos intervalos estudados, não são os fatores determinantes na formação da fase cristalina da HAP e nem produzem fases cristalinas adicionais. Da difratometria de raios X também foi possível concluir que as amostras apresentam parâmetros estruturais que concordam com o padrão do banco de dados cristalográficos ICSD 151414 com diferença de no máximo $\pm 0.3\%$ em relação aos parâmetros de rede do padrão.

Nas estimativas de tamanho de cristalitos realizadas tanto pelo método de Scherrer como pelo de Williamson-Hall (W-H) foi verificado que não houve variação significativa do tamanho de cristalito para amostras tratadas a diferentes temperaturas e diferentes maturações, sendo que o tamanho de todas as amostras ficou entre 10 e 20nm, pelo método de Scherrer e entre 20 e 30nm pelo de W-H. Esta diferença entre os dois métodos já era esperada já que no método de Scherrer o alargamento devido à deformação induzida nos cristalitos não é levado em conta. As variações de tamanho de cristalito entre as diferentes amostras estão dentro da precisão dos dois métodos. A amostra somente maturada a temperatura ambiente pode ser considerado como única exceção, com um tamanho de cristalito entre 8 a 10nm.

Uma constatação paralela, não conectada diretamente aos objetivos iniciais do trabalho é que a determinação do tamanho de cristalito usando o alargamento dos picos do difratograma de raios X por qualquer um dos dois métodos contém muitos aspectos que podem ser fontes de imprecisões e que podem conduzir a erros razoavelmente grandes e estimativas irreais de tamanho. Os principais aspectos que devem ser considerados são: i- influência do alargamento devido ao processo de medida, do tipo de equipamento, da geometria da medida, também chamado de alargamento instrumental; ii- natureza do próprio difratograma de raios X e existência de picos isolados o suficiente para uma correta avaliação do alargamento; iii- limitações dos próprios métodos de avaliação do tamanho e um certo grau de arbitrariedade na escolha do parâmetro de forma K. Todos estes aspectos demonstram que apesar dos métodos baseados no difratogramaserem largamente usado e razoavelmente fácil de usar, ele deve necessariamente ser acompanhado de outros métodos de determinação de tamanhos de cristalitos/partículas.

Os resultados de difração de raios X também permitiriam estimar o grau de cristalinidade das amostras, e isto foi feito, por dois métodos diferentes, um através da FWHM do pico (002) (Método 1) e outro pelo vale entre os picos (112) e (300) (método 2). Os resultados indicaram que não há uma relação do aumento da cristalinidade com o aumento da temperatura de tratamento térmico, no intervalo de temperaturas considerado, indicando que nem sempre é verdadeira a hipótese de que aumento de temperaturas significa aumento de grau de cristalinidade. Esta afirmação, no entanto, é encontrada com frequência na literatura sem evidências diretas. Aparentemente existe uma confusão de que a melhor definição dos picos num difratograma de raios X é uma indicação de que a amostra é mais cristalina. Esta é inclusive o ponto de partida do método 2 para a HAP. No entanto, isso nem sempre é verdade, como demonstrado neste trabalho, principalmente quando se considera amostras na escala nanométrica e nestes casos métodos de avaliação do grau de cristalinidade como o método 2 para a HAP se mostram melhores. Já na análise de tempo de maturação, pelo método 2 foi verificado uma diminuição da cristalinidade com o aumento do tempo de maturação, o que não foi verificado pelo método 1.

As análises de grau de cristalinidade (X_c) feitas pelos dois métodos propostos por Landi, $X_c(v_{112/300})$ e $X_c(B_{002})$ mostram que há uma diferença bastante significativa entre os valores absolutos obtidos pelos dois métodos. Pode-se verificar que não existe

um comportamento linear entre o grau de cristalinidade e a temperatura de tratamento térmico, e que, apesar dos valores absolutos de X_c obtidos pelos dois métodos serem muito diferentes, o comportamento obtido pelos dois métodos é basicamente o mesmo. Observa-se também que, pelo método X_c (B_{002}) um aumento do tempo de maturação resultou em uma diminuição do grau de cristalinidade e pelo método X_c ($\nu_{112/300}$) não existe essa relação, sendo que a amostra maturada por 50h foi a que apresentou maior grau de cristalinidade.

As análises de espectroscopia Raman das amostras mostram os modos de estiramento do grupo PO_4^{3-} , sendo que o modo ν_1 apresenta em grande intensidade em torno de 962 cm^{-1} , sendo característica da HAP. Para a faixa de temperatura de 300°C a 600°C , há um deslocamento para menores frequências das bandas ν_1 , havendo um deslocamento maior nas bandas das amostras HAP₅₀₀ e HAP₆₀₀ e estas se apresentam na mesma posição, ou seja, não há deslocamento de uma banda em relação à outra. Nas amostras com diferentes tempos de maturação, verificou-se que a amostra maturada por 50h (HAP₄₀₀) apresenta menor frequência e a maturada por 5 dias (HAP_{400(5 dias)}), maior frequência. A relação da posição do pico Raman do modo de estiramento simétrico do grupo fosfato em função da temperatura de tratamento térmico segue de uma maneira geral o comportamento do grau de cristalinidade, ou seja, quanto maior o X_c , maior a frequência do modo. Já o FWHM, segue em linha geral o comportamento inverso. As amostras de maior cristalinidade têm menor valor de FWHM.

As análises morfológicas feitas através da microscopia eletrônica de transmissão das amostras revelam a existência de partículas nanométricas formando aglomerados. As amostras tratadas por diferentes temperaturas apresentaram diferentes morfologias e diferentes tamanhos, isso não foi observado para as amostras com diferentes tempos de maturação, onde não houve variação nem no tamanho, nem na morfologia. Nas imagens de alta resolução de todas as amostras nota-se a existência de algumas regiões monocristalinas realçando que a amostra mesmo sem sofrer tratamento térmico apresenta cristalitos muito bem definidos. Na maioria das imagens de alta resolução, cada partícula observada era composta por um único cristalito. Mas isso não descarta a possibilidade de existir partículas com mais de um cristalito.

As análises de microscopia eletrônica de varredura confirmam os resultados obtidos por MET, em que se observa a formação de aglomerados. A amostra maturada a

temperatura ambiente forma aglomerados arredondados. Já na amostra seca a 100°C ocorre a formação de placas densas, com comprimentos em torno de 10 μm e na amostra tratada a 600°C ocorre a formação de um aglomerados com porosidade.

Outra estimativa do tamanho de partículas foi feita através do espalhamento dinâmico de luz (EDL). Os resultados dos gráficos de número confirmam que não há variação significativa nos tamanhos das partículas, como mostra os gráficos de DRX, as medidas de Raman e a estimativa por Scherrer e Williamson-Hall. Já os resultados de intensidade EDL estão de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de varredura, visto que os valores de intensidade das amostras apresentaram-se em torno de 500 nm, comprovando a formação de aglomerados, identificados também no MEV.

Com a junção de todos os nossos resultados, sugerimos um modelo de cinética de formação da hidroxiapatita em função da temperatura. Onde observamos as seguintes etapas:

- 1º) da temperatura ambiente até 400°C: ocorre diminuição do tamanho das menores partículas e aumento da cristalinidade;
- 2º) de 400°C a 600°C: todas as partículas crescem através de processos do tipo coalescência, o que desloca os picos para tamanhos maiores e aumenta o grau de cristalinidade novamente.

Por fim, foi verificado que os resultados obtidos pelas diferentes técnicas de caracterização das amostras corroboram, visto que os resultados de estimativa de tamanho de cristalito por Scherrer e Williamson-Hall e os gráficos de Raman assim como os resultados de MET e as estimativas de tamanho de partícula realizadas pelo espalhamento dinâmico de luz comprovaram a formação de partículas nanométricas e que não houve alteração significativa de tamanho nas amostras tratadas a diferentes temperaturas e maturadas por diferentes tempos, como mostrado na tabela 9. Os resultados de MEV e intensidade por espalhamento dinâmico de luz mostram que essas nanopartículas formam aglomerados de partículas.

Tabela 9: valores das estimativas de tamanho de cristalito e partícula das amostras de HAP pelas diferentes técnicas de caracterização: DRX, MET e EDL

AMOSTRAS	Tamanho de cristalitos e de partículas (nm)			
	DRX		MET	EDL
	SCHERRER	W-H		
HAP _{AMBIENTE}	8	18	20-80	Entre 4 e 10 nm
HAP ₁₀₀	13	15	~20	
HAP ₂₀₀	13,9-21,6	23,4-36,5		
HAP ₃₀₀	14,5-22,6	21,1-33,0		
HAP ₄₀₀	12,1-20,2	13,8-21,6	~50	
HAP ₅₀₀	12,0-18,8	17,7-27,6		
HAP ₆₀₀	11,2-17,5	21,2-33,1		
HAP _{400(26HS)}	12,3-19,3	18,9-29,5	~51	
HAP _{400(5DIAS)}	13,0-20,3	20,6-32,1		

6. PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

- Refazer as medidas de difratometria de Raios X das amostras em modo steps-cann, que oferece uma melhor resolução no difratograma e uma melhor relação sinal ruído.
- Entender o estudo do comportamento do tamanho e da morfologia das HAP em função do tempo de maturação tanto para valores menores do que 24 horas, quanto para maiores do que 5 dias, e da temperatura para valores maiores do que 600°C.
- Realizar estudo de Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, para verificar se houve alguma alteração nos modos vibracionais do grupo CO_3 das amostras.
- Produzir biocerâmicas de hidroxiapatita com diferentes porosidades.
- Avaliar in vitro as condições de aplicabilidade das biocerâmicas produzidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DAVIES, J. E. **The bone material interface**. University of Toronto Press., 1990.
- [2] AFSHER., A. *et al.* “Some important factores in the Wet Precipitation Process of Hydroxiapatite.” **Materials and Design**, v.24, p. 197-202, 2003.
- [3] SANOSH K.P., CHU M.C., BALAKRISHNAN A., *et al.* “Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition.” **Current Applied Physics**, v.9, p. 1459-1462, 2009.
- [4] WANG P., LI C, GONG H., *et al.* “Effect of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process.” **Powder Thecnology** 203, p.315-321, 2010.
- [5] PANG X.Y., BAO X. “Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles.” **Journal of the European Ceramic Society**, v.23, p.1697-1704, 2003.
- [6] WANG W.J., LAI C, WEI K., *et al.* “Influence of temperature, ripening time, and cosurfactant on solvothermal synthesis of calcium phosphate nanobelts.” **Materials Latters**, v.59, p.1098-1104, 2005.
- [7] KIM H.M. “Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy.” **Curr.Opin.Solid State Mater.Sci.** v.7, p.289–299, 2003.
- [8] WANG M., JOSEPH R., BONFIELD W. “Hydroxyapatite-poliethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology.” **B iomaterials**, v.19, p. 2357-2366, 1998.
- [9] FRATZL P., GUPTA H.S., PASCHALIS E.P., *et al.* “Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone.” **J. Mater. Chem.** V. 14, p.2115–2123, 2004.

- [10] LAQUERRIERE P., GRANDJEAN-LAQUERRIER A., JALLOT E., *et al.* “Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro.” **Biomaterials**, V. 24, p.2739–2747, 2003.
- [11] FATHI, M.H., HANIFI A., MORTAZAVI V. “Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder.” **Journal and Materials Processing Tecnology**, v.202, p.536-542, 2008.
- [12] JUAN, Y.H., HON H.M. “Effect of calcination on sintering of Hydroxyapatite.” **Biomaterials**, v.17, p.2059-2064, 1996.
- [13] WILLIAMS, D.F. **Definitions in biocompatibility**. Amsterdam: CRC Press, v.1, 1987.
- [14] WILLIAMS DF. “On the nature of biomaterials.” **Biomaterials**, v.30, p.5897–5909, 2009.
- [15] BEST S.M., PORTER A.E., THIAN E.S., *et al.* “Bioceramics: past, present and for the future.” **J Eur Ceram Soc**, vol. 28, p. 1319–1327, 2008.
- [16] JANDT KD. “Evolutions, revolutions and trends in biomaterials science – a perspective.” **AdvEngMater**, vol. 9, p. 1035–1050, 2007.
- [17] SOARES, G. A., “Biomateriais.” **Fórum de Biotecnologia Biomateriais**, Rio de Janeiro, 2005.
- [18] ROZIAK, J.M., JANIK, I., KADLUBOWSKI, S., *et al.* **Radiation formation of hydrogels for biomedical applications**, 1999. Disponível em: http://mitr.p.lodz.pl/biomat/report/1_radiation_hydrogels.html. Acesso em: 02 de dezembro 2010.
- [19] SANTOS, L.A. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica**. Tese (Doutorado em materiais e processos de fabricação) – UNICAMP, Campinas, 2002.

- [20] MUSTER D. **Biomateriaux et biomatériels en chirurgie osseuse et dentaire (2^a partie).** *Encyclopédie Médico-Chirurgicale – Stomatologie*. Paris: Editions Techniques, v.22, p.4-15, 1993.
- [21] MELLONIG J.T., NEVINS M., SANCHEZ R. "Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and a bone replacement graft." *Int J Periodontics Restorative Dent*. V.18, p.129-137, 1998.
- [22] MELLONIG J.T., NEVINS M., SANCHEZ R. "Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part I. Material alone." *Int J Periodontics Restorative Dent*, v.18, p. 139-149, 1998.
- [23] TORMALA P., POHJONEN T., ROKKANEN P. "Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications." *Proc Inst Mech Eng [H]*, v.212, p.101-111, 1998.
- [24] PARK, J., LAKES, R.S. **Biomaterial: An Introduction**, 3^{ed.}, Springer, 1998.
- [25] ALBBE, F. H. "Studies in bone growth triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis." *Annals of Surgery*. V. 71, p.32-36, 1920.
- [26] LEVITT, G. E. "Forming methods for apatite prosthesis." *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 3, n. 4, p.683-685, 1969.
- [27] MONROE, E. A.; VOTAVA, W., BASS, D. B., *et al.* "New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants." *Journal of Dental Research*, vol. 50, n. 4, p. 860-862, 1971.
- [28] DAVIES, J. E. **The bone material interface**. University of Toronto Press., 1990.
- [29] KAWASHI, E.Y. **Fosfatos de Cálcio: Porosidade, Cristalinidade, Potencial de Interface e Comportamento in Vivo**. 1997. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, 1997.
- [30] GAUTHIER O., BOULER J.M., WEISS P., *et al.* "Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes." *J Biomed Mater Res*, v.47, p. 28-35, 1999.

- [31] HING K.A., BEST S.M., BONFIELD W. "Characterization of porous hydroxyapatite." **J Mater Sci Mater Med**, v.10, p.135-145, 1999.
- [32] CAROTENUTO G., SPAGNUOLO G., AMBROSIO L., *et al.* "Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications." **J Mater Sci Mater Med**, v.10, p.671-676, 1999.
- [33] DOROZHKIN, S. V. "Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates." **Acta Biomaterials**, vol. 6 , issue 3, p. 715-734, 2010.
- [34] BROWN, P.W., CONSTANTZ B. **Hydroxiapatite and related materials**, 1^a edição, New Work, Boca Raton CRC Press, p.3-80, 1994
- [35] BROWN, P.W. "Hydration behavior of calcium phosphates is analogous toSj hydration behavior of calcium silicates." **Cement and Concrete Research**, v. 29, n.8, p. 1167-1171, 1999.
- [36] ELLIOT, C. "Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry 18." **Elsevier Science**, 1994.
- [37] HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to Bioceramics**. T ed., Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.
- [38] LEGEROS R.Z. "Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine." **Monographs in Oral Science**, v. 15, Switzerland: Karger, 1991.
- [39] BOW S.J., LIOU C.S., CHEN Y.S. "Structural characterization of room-temperature synthesized nano-sized β -tricalcium phosphate." **Biomaterials**, v. 25, p. 3155-3161, 2004.
- [40] DOURADO, E.R. **Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio**. Dissertação de Mestrado, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 2008.
- [41] PARRIS, G. E., ARMOR J.N. "Catalytic cracking of organic amides: I. Production of N-vinylformamide." **J. Appl. Catal.**, v.78, n 1, p.45-64, 1991.

- [42] RODRIGUEZ, L. M., VALLETI-REGI, M. "Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites." **Matter.Chem.**, v. 12, p. 2460-2465, 2000.
- [43] AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Japonnese Association of Apatite Science, 1991.
- [44] ROSSI, A. M.; TERRA, J., MAVROPOULOS, E., *et al.* "A ciência e tecnologia das biocerâmicas." **Revista do CBPF**. Disponível em: [http://www.cbpf.br/RevistaCBPF/pdf/Bio Mat.pdf](http://www.cbpf.br/RevistaCBPF/pdf/Bio%20Mat.pdf). Acesso: novembro, 2010.
- [45] LIMA, T. A. R. M., **Propriedades estruturais e ópticas de nanomateriais biocompatíveis voltados para aplicação em filtros solares**. Dissertação de Mestrado, DFI/UFS, 2010.
- [46] ANDRADE, A.V.C., DA SILVA, J.C.Z., PAIVA-SANTOS, C.O., *et al.* **Ceramic Engineering and Science Proceedings**, ICSD 151414, v.25, p. 639-645, 2004.
- [47] - ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates**. Amsterdam, Ed. Elsevier Sci, 1994.
- [48] - FLEET, M.E., LIU, X. "Local structure of channel ions in carbonate apatite." **Biomaterials**, Vol. 26, pp.7548-7554, 2005.
- [49] - MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro, 1999.
- [50] EUROPEAN COMMISSION, Scientific Committees on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). **Opinion on the scientific aspects of the existing and proposed definitions relating to products of nanoscience and nanotechnologies**. Berlin: Springer;2007.
- [51] KARCH J., BIRINGER R., GLEITER H. "Ceramics ductile at low temperature." **Nature**, 330, p.556–558, 1987.

- [52] DE SOUZA, J.C.P., **Estudo e caracterização de pós nanoestruturados de fosfatos de cálcio e nanocompósitos de fosfatos de cálcio/ Al_2O_3 - α sol-gel para aplicações biomédicas**. Dissertação de Mestrado, UDESC, 2009.
- [53] CALLISTER, Jr., WILLIAM D. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução**. 5ª edição, Itceditora, 2002.
- [54] WERNER K., Y G.N., **PowderCell 2.3, delFederal Institute for Materials Research and Testing BAM**, Berlin. Disponível em <http://www.ccp.14.ac.uk/tutorial/powdercell/index.htm>. Acesso em outubro, 2010.
- [55] CULLITY, D.B. **Elements of X-Ray Diffraction**. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Reading, Massachusetts, 1953.
- [56] VENKATESWARLU K., CHANDRABOSE A., RAMESHBABU N. “X-ray peak broadening studies of nanocrystalline hydroxyapatite by Williamson-Hall analysis.” **Physica B: Physics of Condensed Matter**, 405, p. 4256-4261, 2010.
- [57] **Capítulo 1: Fundamentos de espectroscopia Raman**. Disponível em www.tdr.cesca.es/TESIS_UPC/.../TDX.../03Rpp03de11.pdf, Acesso em 12 de dezembro de 2010.
- [58] PECORA R. **Dynamic Light Scattering: Application of photo correlation spectroscopy**. Plenum Press, 1985.
- [59] ENGLITZ, B. “Measuring particle-size from intensity spectrum of scattered light.” **Biophysical Measurement**, vol. 173, Spring, 2002.
- [60] WANG, Z.L. **Elastic and Inelastic scattering in the Electron Diffraction and Imaging**. New York, Plenum Pub, Chapters 2 and 3, 1995.
- [61] MOBASHERPOUR, I., HESHAJIN S. M., KAZEMZADEH A., *et al.* “Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method.” **Journal of Alloys and Compounds**, 430, p.330-333, 2007.

- [57] LANDI, E., TAMPIERI A., CELOTTI G., *et al.* “Densification behavior and mechanisms of synthetic hydroxiapatites.” **Journal of the European Society**, v.20, p. 2377-2387, 2000.
- [58] ANTONAKOS, A., LIAROKAPIS, E., LEVENTOURI, T. “Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites.” **Biomaterials**, v.28, p. 3043-3054, 2007.
- [59] CUSCÓ, R., GUITIÁN, F., DE AZA, S., *et al.* “Diferentiation between Hydroxiapatite and β -Tricalcium Phosphate by Means of μ -Raman Spectroscopy.” **Journal of the European Society**, v.18, p. 1301-1305, 1998.
- [60] DRESSELHAUS M., DRESSELHAUS S.G., JORIO A. **Group theory: application to the physics of condensed matter.** [Disponível em http://books.google.com.br/books?id=sKaH8vrfmnQC&pg=PA168&pg=PA168&dq=Td+tetrahedral+vibrational+modes&source=bl&ots=M2_v4BWbCG&sig=jyzHjH8tHdiWXS2FpQL-Yu0R168&hl=pt-BR&ei=TS08TdeKAoH6lwe3943JBg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=10&ved=0CHIQ6AEwCTgU#v=onepage&q=Td%20tetrahedral%20vibrational%20modes&f=false. Acesso em 03 de janeiro, 2011.
- [61] NAKAMOTO K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Theory...** [Disponível em http://books.google.com.br/books?id=9t3h8pVgnyQC&pg=PA192&pg=PA192&dq=Td+tetrahedral+vibrational+modes&source=bl&ots=pPLBSEQK_y&sig=VBKb0p_vKOe4M2MF_MvkaYll7a0&hl=pt-BR&ei=TS08TdeKAoH6lwe3943JBg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CC0Q6AEwAjgU#v=onepage&q=Td%20tetrahedral%20vibrational%20modes&f=false. Acesso em 03 de janeiro, 2011.
- [62] DEPAULA, S.M., HUILA, M.F.G., ARAKI, K., *et al.* “Confocal Raman and electronic microscopy studies on the topotactic conversion on calcium carbonate from Pomacea lineate shells into hydroxyapatite bioceramic materials in phosphate media.” **Micron**, v.41, p.983-989, 2010.
- [63] KONTOYANNIS, C.G., BOUROPOULOS C.N., KOUTSOUKOS, G.P. “Raman spectroscopy: A tool for the quantitative analysis of mineral components of solid mixtures. The case of calcium oxalate monohydrate and hydroxyapatite.” **Vibrational Spectroscopy**, v.15, p. 53-60, 1997.