



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO
MESO E MACROPOROSOS PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DE FÁRMACOS**

por:

THIAGO AUGUSTUS REMACRE MUNARETO LIMA

Fevereiro/2015

**Universidade Federal de Sergipe
Cidade Universitária Prof. José Alísio Campos
São Cristóvão, SE, Brasil**

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO MESO E
MACROPOROSOS PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACOS

THIAGO AUGUSTUS REMACRE MUNARETO LIMA

Tese de Doutorado apresentada ao Núcleo de
Pós-graduação em Física da Universidade
Federal de Sergipe para obtenção do título de
Doutor em Física

Orientador: Dr. Mário Ernesto Giroldo Valerio

São Cristóvão

2015

“Realize o obvio, pense no improvável e conquiste o impossível”

Provérbio Chinês

*Dedico aos meus pais, Ribeiro e Clair, que
sempre acreditaram no meu potencial.
À minha irmã, Ticiane,
que sempre me incentivou.
Em especial à minha amada esposa
Débora Júlia Munareto pelo amor e
Companheirismo dedicado durante
esta etapa da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por estar sempre junto a mim e me conceder bênçãos tão maravilhosas na minha vida.

À minha família e meus avós pelo apoio, companheirismo e carinho que sempre me dedicaram. À minha irmã e aos meus pais que fizeram esta conquista possível, com todo carinho e participação ativa durante mais esta etapa na minha vida.

Em especial a minha amada esposa e companheira para a vida, Débora Júlia Munareto, pelo apoio incondicional, me apoiando e incentivando durante toda minha jornada no doutorado, como também pela paciência e compreensão nos momentos ausentes para realização do projeto de pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Ernesto Giroldo Valerio, pela orientação participativa e competente, a amizade recíproca e paciência prestada durante a realização do doutorado, como também por ter favorecido o aprimoramento da minha carreira científica .

A todos os professores da Pós-Graduação em Física, pela disponibilidade em esclarecer as dúvidas e pela amizade formada durante a realização do projeto de pesquisa da tese.

Aos grandes amigos do mestrado em Física, grandes parceiros em vários momentos, em especial aos companheiros de sala :Carlos Gustavo e Márcio Fabrício e amigos de longa data como Rubens, Maria, Suellen, Verônica, Carol, Paulo Jorge, Marcos Vinícius, Adriano, Janaína, Cícero e a todos do DFI-UFS pela convivência e verdadeira amizade nestes anos. Aos secretários e técnicos, Cochiran, Adriana, Márcio, Cláudia, André e Álvaro pela auxílio e atenção.

À Nataly Silva Brito, aluna de orientação científica pela seriedade e dedicação demonstrada nos experimentos realizados durante a execução do projeto de pesquisa.

À Cintia Teles aluna da Dra. Cristina Kurachi do Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos pelo apoio e suporte no laboratório para testes de citotoxicidade, a professora Eliana Midori do departamento de química da UFS com apoio aos experimentos de infravermelho.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Sarmiento, do núcleo de química do campus Itabaiana-UFS e Prof. Dr. José Fernando Rey da Universidade Federal do ABC disponibilizando o suporte necessário para obtenção dos dados de SAXS, e ao Cientista Dr. Jan Ilavsky e Dr. Joshua Hammons na realização e discussão dos experimentos de USAXS sem os quais este trabalho não alcançaria seus objetivos iniciais.

A equipe de pesquisadores e técnicos das linhas de luz SAXS-1/2, XAFS-2, SXS e de microscopia do LMNano do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron-LNS pela cordial convivência e ao todo suporte durante a realização dos experimentos.

Agradecimentos especiais a Universidade Federal de Sergipe-UFS, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron-LNS, ao Laboratório Nacional Brasileiro de Nanotecnologia-LMNano e Centro Multiusuário de Nanotecnologia da UFS, ao Advanced Photon Source - Argonne National Laboratory com auxílio financeiro do U. S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences/ National Science Foundation/Department of Energy, FAPITEC e CAPES pelo apoio fundamental à realização de pesquisa. Ao INCT-INAMI e CNPQ pelo auxílio financeiro de bolsa de doutorado com o processo No. 149437/2010-2 e CNPEM pelo auxílio financeiro e hospedagem durante experimentos realizados no LMNano e LNLS.

Obrigado a todos aqueles, inclusive não citados, que contribuiriam para a realização desta tese.

RESUMO

O presente estudo tem como foco a caracterização dos fosfatos de cálcio, em especial a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e β -tricálcio fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), com hierarquia de poros obtidos através de um novo processo de síntese usando precursores biocompatíveis. Em estruturas inorgânicas, a IUPAC- *International Union of Pure and Applied Chemistry* classifica os poros em termos dos diâmetros em mesoporos ($2 \text{ nm} < \varnothing < 50 \text{ nm}$) e macroporos ($\varnothing > 50 \text{ nm}$). Os objetivos propostos na tese envolvem dois aspectos, o primeiro relacionado com o desenvolvimento de um molde orgânico constituído por dois compostos: surfactante Brometo de Cetiltrimetilamônio (C_{16}TAB) e amido de milho gelatinizado para formação de estruturas com hierarquia de porosidade de meso e macroporos. O segundo aspecto é em relação a produção de hidroxiapatita dopada com Eu^{3+} para uso em sistemas porosos de liberação de fármacos dotados de sonda luminescente. Para tanto, foram preparadas amostras de hidroxiapatitas e β -tricálcio fosfato dopadas com 6 mol% de Eu^{3+} sintetizadas na presença do C_{16}TAB e/ou amido de milho. Foram empregadas as seguintes técnicas de caracterização: a difração de raios X (XRD), estrutura fina de absorção de raios X (XAFS), microscopia eletrônica de varredura (SEM), espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) e a ultra baixos ângulos (USAXS), espectroscopia de fotoluminescência e testes de citotoxicidade. Dos resultados de XRD foi constatado que a ordem de gotejamento das soluções de partida e o tipo de molde orgânico empregado promove variações nas dimensões dos cristalitos dos fosfatos de cálcio e surgimento de fases $\beta\text{-Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$, $\alpha\text{-Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$ e fosfatos de cálcio carbonatados junto com a fase cristalina do $\beta\text{-TCP}$. Na investigação por XAFS foi avaliado a simetria local de incorporação do Eu^{3+} na estrutura da hidroxiapatita. Os resultados revelam que a incorporação de Eu^{3+} se dá em maior escala em sítios de Ca(1) do que no de Ca(2). Os resultados de fotoluminescência também revelaram que a simetria do íon Eu^{3+} é afetada pela ordem de gotejamento das soluções de partida e pela presença do C_{16}TAB no meio reativo. Em relação a formação de arranjos com hierarquia de porosidade os resultados de SAXS/USAXS e SEM indicaram que o molde constituído por C_{16}TAB não formaram poros, enquanto que as amostras com molde da combinação entre amido de milho e C_{16}TAB apresentaram estruturas de meso e macroporos. Testes de citotoxicidade *in vitro* revelaram que os sistemas de fosfatos de cálcio porosos desenvolvidos não são tóxicos.

Palavras-Chave: Fosfatos de Cálcio. Porosidade. Amido. Európio (III).

ABSTRACT

The main purpose of the present study were to produce and characterize calcium phosphates, specially hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) and β -tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), with hierarchical pore arrangement obtained through a new synthesis process using just biocompatible precursors. IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry classifies the pores in terms of the cavities diameters in mesopores ($2 \text{ nm} < \phi < 50 \text{ nm}$) and macropores ($\phi > 50 \text{ nm}$). The main objectives were twofold. The first was the template development using a surfactant, cetyltrimethyl ammonium bromide (C_{16}TAB), and gelatinized corn starch to obtain a hierarchical arrangement of pores form meso to macropores. The second aspect was the production of hydroxyapatite doped with Eu^{3+} for drug delivery systems equipped with luminescent probes. For this purpose, pure samples and calcium phosphate-doped samples with 6 mol% of Eu^{3+} were produced with C_{16}TAB and / or corn starch. The following experimental characterization techniques were employed: X-ray diffraction (XRD), X-ray absorption fine structure (XAFS), scanning electron microscopy (SEM), Small angle X-ray scattering (SAXS) and the Ultralow angles X-ray scattering (USAXS), photoluminescence and cytotoxicity test. XRD revealed that the solutions drip order and the type of organic template promotes variations in the crystallites dimensions and induces the appearance of β - $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$, α - $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$ and carbonated calcium phosphate phases with of the main β -TCP phase. XAFS technique showed that the Eu^{3+} incorporation occurred preferentially in the Ca(1) sites of HAP. The luminescence results also revealed that the symmetry of the Eu^{3+} ion is affected by solutions drip order and the presence of C_{16}TAB solution in the reactive medium. The hierarchical arrangement of pores was evaluated by SAXS / USAXS and SEM analysis. The results indicated that only C_{16}TAB was not able to induce proses, whereas the samples produced with combination of corn starch and C_{16}TAB presented meso and macropores structures. In vitro cytotoxicity tests revealed excellent biocompatibility of our calcium phosphate porous systems.

Keywords: Calcium Phosphate. Porosity. Starch. Europium (III).

PRODUÇÃO CIENTÍFICA REALIZADAS AO PERÍODO DE DOUTORADO

- 1- Lima, T.A.R.M.; Brito, N.S.; Peixoto, J.A.; Valerio, M.E.G. **The incorporation of chromium (III) into hydroxyapatite crystals.** Materials Letters, v.140, p.187-191,2014. doi:10.1016/j.matlet.2014.11.023
- 2- Nunes, R.S. ; VALERIO, Mário Ernesto Giroldo ; LIMA, T. A. R. M ; Lima, A.D. ; Naiane Nascimento ; Anamélia . **Sistema lipídico nanoparticulado contendo nanopartículas de fosfatos de cálcio com superfície funcionalizada com ação fotoprotetora, processo para sua preparação e composição contendo o mesmo.** Depósito de Patente INPI 36110000125. 2011, Brasil.
- 3- Thiago A.R.M. Lima; Jan Ilavsky; Joshua Hammons; Victor H.V. Sarmiento; José. F.Q. Rey ; Mário E.G. Valerio. **3D-Hierarchical porosity and structure properties of europium-doped hydroxyapatite.** Microporous and Mesoporous Materials, 2015. (Submetido com revisão)
- 4- Thiago A.R.M. Lima; Alyne, D. Lima; Rogéria, S. Nunes; Mário E.G. Valerio. **The structural and optics properties of zinc incorporation into hydroxyapatite.** 2014. (Em preparação)

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I – Introdução e Objetivos</i>	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Ojetivos	10
1.2 Organização da Tese	10
<i>CAPÍTULO II - Revisão Bibliográfica</i>	12
2.1 Os Fosfatos de Cálcio.....	13
2.2 A Hidroxiapatita.....	13
2.3 O β -Tricálcio Fosfato	15
2.4 Meso e Macroestrutura em sistemas biocompatíveis.....	16
2.5 O Európio (Eu) como sonda luminescente.....	18
2.6 O Amido.....	20
2.7 O C ₁₆ TAB.....	21
<i>CAPÍTULO III -Materiais e Metodologias</i>	22
3.1 Detalhes dos métodos de preparação das amostras	23
3.1.1 Detalhes dos Lotes de Amostras produzidas.....	23
3.2 Técnicas experimentais de caracaterização	28
3.2.1 Difratometria de Raios X (XRD).....	28
3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	33
3.2.3 Espectroscopia de Estrutura Fina de Absorção de Raios X (XAFS)	34
3.2.4 Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS).....	44
3.2.5 Fotoluminescência.....	50
3.2.6 Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	53
3.2.7 Teste de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	54
<i>CAPÍTULO IV –Resultados e Discussão</i>	56
4.1.1 Difratometria de raios X do Molde Combinado de Amido-CTAB.....	57
4.1.2. Difratometria de raios X das hidroxiapatitas via molde de CTAB.....	59

4.1.3 Difractometria de raios X e FT-IR das hidroxiapatitas com Amido e Amido-CTAB.....	63
4.1.4 Difractometria de raios X do β -TCP produzidas com Amido-CTAB e somente CTAB.....	67
4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	69
4.3 Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS) e Ultra Baixos Ângulos (USAXS)	82
4.4 Espectroscopia de Estrutura Fina de Absorção de Raios X (XAFS).....	97
4.5 Espectroscopia de Fotoluminescência do Európio na Hidroxiapatita.....	113
4.6 Resultados de Citotoxicidade das amostras.....	118
CONCLUSÕES.....	121
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
APÊNDICES	133

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 2.1 - Compostos de Fosfatos de Cálcio considerados neste estudo.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 2.2 - Métodos relevantes na literatura para produção de poros em fosfatos de cálcio.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabela 3.1 - Descrição das amostras preparadas para estudo da Tese em relação a ordem de precipitação das soluções iônicas, concentração de dopante e tipo de molde orgânico empregado.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 3.2 - As bandas de excitação e linhas de luminescência dos centros luminescentes em minerais. Atenção especial para os íons de Európio. Adaptado de [50].</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 4.1- Tamanho médio dos cristalitos das amostras preparadas com C₁₆TAB em diferentes concentrações, considerando K= 0,94.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 4.2- Tamanho médio dos cristalitos das amostras com o molde combinado de Amido e C₁₆TAB considerando K= 0,94.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 4.3- Resultados dos ajustes de EXAFS na borda k do P para as primeiras esferas de coordenação. NC- número de coordenação dos primeiros vizinhos; R(Å) a distância média entre P e átomos vizinhos, $\Delta\sigma^2$ fator de Debye Waller atrelado a desordem local próximo ao átomo alvo e o coeficiente de qualidade de ajuste χ^2_{red}.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 4.4 - Número de esferas de coordenação para distâncias dos sítios Ca(1), Ca(2) e P na hidroxiapatita baseados na estrutura do modelo de Andrade e colaboradores, 2004 [44].....</i>	<i>107</i>
<i>Tabela 4.5 - Resultados dos ajustes de EXAFS na borda L₃-Eu para os modelos Eu_{Ca(1)} e Eu_{Ca(2)} com O₁ⁿ. Onde NC- número de coordenação dos primeiros vizinhos; R(Å) a distância média entre Eu - átomos vizinhos, $\Delta\sigma^2$ fator de Debye Waller vinculado a desordem local e χ^2_{red}.....</i>	<i>108</i>
<i>Tabela 4.6 - Resultados dos ajustes de EXAFS na borda L₃-Eu para Eu_{Ca(1)} e Eu_{Ca(2)} com O₁ⁿ.....</i>	<i>112</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1- Célula unitária da HAP com vista na direção [001], mostrando a posição espacial dos poliedros do sítio de Ca(1) em vermelho, os poliedros do sítio Ca (2) em azul, os fósforos em amarelo e oxigênios em cinza</i>	14
<i>Figura 2. 2 - Colunas A e B da estrutura do β-TCP com vista ao longo da direção [001]</i>	15
<i>Figura 2.3- Representação esquemática da formação de blocos monocristalinos para obtenção de mesocristais e arquitetura com porosidade bem definida. Adaptado de [41]</i>	16
<i>Figura 2.4- Representação esquemática dos níveis de energia do Eu^{3+}. Adaptado de [50].</i>	19
<i>Figura 2.5 - Em (A) estrutura química da amilose e (B) estrutura química ramificada da amilopectina . Adaptado de [52] e [53].</i>	20
<i>Figura 2.6 - Microscopia eletrônica de varredura de grãos de amido de milho, mostrando a morfologia cúbica dos microgrãos de amido de milho [54]</i>	21
<i>Figura 2.7- Estrutura química do C16TAB. Fonte: [55]</i>	21
<i>Figura 3.1 - Representação esquemática da reflexão para uma particular família de planos, separados por uma distância d. A diferença do caminho é $2d \sin\theta$. Adaptado de [58].</i>	28
<i>Figura 3.2- Representação do modelo de Scherrer para cálculo de tamanho de cristalitos</i>	29
<i>Figura 3.3- Representação esquemática do feixe dos tamanhos de partículas no difratograma e do modelo de Scherrer para o cálculo do tamanho de partícula</i>	30
<i>Figura 3.4- Representação da esfera de Ewald para representar a condição de difração. Sendo 2θ o ângulo formado entre o vetor S ou S_0 e os planos (h,k,l) que geram difração no cristal</i>	32
<i>Figura 3.5- Representação esquemática dos componentes do microscópio eletrônico de varredura [59].</i>	34
<i>Figura 3.6- Mecanismos envolvidos na interação da radiação X com a amostra. Adaptado de [63]</i> .	38
<i>Figura 3.7- Representação do espectro de absorção de raios X (borda K do Cr) da amostra K_2CrO_4 e os mecanismos físicos envolvidos no espectro de absorção de raios X com a definição da região de XANES e EXAFS. Em (a) pico de pré-borda causado por transições de orbitais não ocupados; (b) picos de espalhamento múltiplos; (c) região de espalhamento único com oscilações no espectro de absorção (d) causada por interferência destrutivas e (e) interferência construtiva entre as ondas do fóton elétron ejetado e retroespalhados. Adaptado de [63]</i>	39
<i>Figura 3.8- Layout da linha de luz XAFS-2 em operação do LNLS. Em (1) dipolo e front end; (2) fendas pré espelho; (3) espelho; (4) monocromador; (5) fendas; (6) espelho toroidal revestido; (7) obturador do feixe e (8) bancada experimental. Adaptado de [66].</i>	42
<i>Figura 3.9 - Visão da linha de SXS. (1) dipolo; (2) front end; (3) espelho focalizador; (4) monocromador e (5) bancada experimental. Adaptado de [67].</i>	43
<i>Figura 3.10 - Representação de espalhamento de dois pontos</i>	45
<i>Figura 3.11 - Espectro de luminescência dos centros de Eu^{3+} em posições de sítios de Ca em apatitas minerais sedimentares formadas em ambientes marítimos em temperatura ambiente após tratamento térmico a 800°C. Adaptado de [50].</i>	52

- Figura 4.1- Em (a) estão os difratogramas da amostra de filme de amido+C₁₆TAB e as amostras de 4 g de Amido seco a 100°C e HAP+Amido (4g) -Seco a 100°C compradas com o padrão de referência da Hidroxiapatita indicado por (*). Em (b) está representado o DRX em 2θ (0° - 30°) adaptado da referência [53] para diferentes polimorfos cristalinos de amido, tipo A, tipo B e Vh.....58
- Figura 4.2- Difratogramas obtidos em sequência com mesmas condições experimental das amostras de hidroxiapatita produzidas em soluções com diferentes concentrações de C₁₆TAB. Em (a) estão representadas as amostras obtidas com gotejamento da solução fonte de Ca²⁺ na solução fonte de fosfato e em (b) estão as amostras com gotejamento da solução de PO₄³⁻ na solução de cálcio.60
- Figura 4.3- Comparação entre os difratogramas obtidos das amostras de hidroxiapatitas produzidas com adição de C₁₆TAB e a rota de síntese da amostra controle HAP-C e padrão ICSD-151414.....63
- Figura 4.4 - Difratogramas das amostras puras e dopadas com Eu³⁺ produzidas em solução com Amido-CTAB comparadas com a amostra controle HAP-C.....64
- Figura 4.5 - -- Espectros de FT-IR das amostras de hidroxiapatita produzidas em solução com Amido-CTAB e calcinadas a 450°C/4h e amostras do controle HAP-C e Amido-CTAB seco.....67
- Figura 4.6 - Padrões de DRX das amostras de β-tricálcio fosfato produzidas em meio de Amido-CTAB e somente CTAB comparadas com o DRX da amostra controle de β-TCP-C e padrão de difração de Dickens (1974).68
- Figura 4.7- Microscopias eletrônica de varredura das partículas da amostra controle HAP-C com forte agregação e morfologias de esferóides distorcidos com partículas ~30 a 50 nm.....70
- Figura 4.8 - Em (a) microscopia da amostra HAP-P30CTAB em 60.000 X em (b) HAP-P120CTAB a 50.000 X; já em (c) 40.000X e (d) 200.000X de magnificação das partículas das amostras de HAP-P30CTAB:6%Eu³⁺.....71
- Figura 4.9- Em (a) e (b) microscopia das amostra HAP-Ca30CTAB e HAP-Ca120CTAB com aumento de 60.000 X; já em (c) 50.000X e (d) 100.000X de magnificação das partículas de HAP-Ca30CTAB:6%Eu³⁺.....72
- Figura 4.10- Imagens de microscopia eletrônica de varredura em diferentes aumentos 10.000X e 4.000X e da amostra Amido-CTAB Seco a 100°C e recoberto por ouro (Au).....73
- Figura 4.11- Representação esquemática do Amido-CTAB após intumescimento e gelatinização dos grãos de amido de milho.....74
- Figura 4.12 - Imagens da amostra HAP-ACPO com canais de macroporos de diferentes tamanhos em ordem crescente de magnificação 2.000X, 5.000X e 25.000X .Em (d) é observado uma estrutura de superfície lisa na superfície semelhante a lamelas de amido observada em figura 4.10 que geram os canais de macroporos.....75
- Figura 4.13- Em (a) e (b) detalhes dos macroporos da HAP-ACCA com magnificação de 3.500 X e 30.000X. Em (c) ampliação de 70.000X dos macroporos com interface definida76
- Figura 4.14 - Imagens de microscopia com diferentes magnificações de regiões da amostra HAP-Amido 4g. Em especial (c) e (e) imagens de maior magnificação mostram a formação de um arranjo poroso com alto grau de ordenamento e uma rede com vasta distribuição de macroporos e mesoporos orientados em três dimensões.....77
- Figura 4.15- Imagens da amostra β-TCP-ACCA em ordem crescente de magnificação, em (a) é percebido a existência de um canal de poro com \varnothing de 1,2 μm, já em (c) e (d) com maior magnificação é percebido a distribuição espacial de macroporos em duas dimensões entre os mesocristais de β-TC.....79

- Figura 4.16- Imagens da amostra β -TCP-ACPO em ordem crescente de aumento 15.000X, 45.000X, 50.000X e 140.000X referentes aos detalhes da hierarquia e ordenação da porosidade.....79
- Figura 4.17- Imagens em diferentes regiões da amostra controle β -TCP-C com diferentes ampliações. Em (b) ampliação da área representada em (a) com partículas achatadas em camadas conectados por poros, em (c) e (d) poros distorcidos e partículas orientadas aleatórias, já em (f) está a representação de um poro bem definido com \approx 110 nm formado pela conexão de partículas nanométricas.....80
- Figura 4.18- Imagens em 43X e 150X do arranjo poroso de escala micrométrica da amostra β -TCP-Amido 4 g. Em (b) está representado a região de ampliação indicada em (a).....82
- Figura 4.19 - Curvas experimentais correspondentes a região de Guinier $q < 0,02$ (Å^{-1}), em (a) amostras medidas em suspensão de água destilada em 1:20 e (b) amostras concentradas em pó.....83
- Figura 4.20- Gráfico de Kratky para resultados expressados em $I(q) \cdot q^2$ vs q que possibilita a estimativa da Porod invariante "Q" com o cálculo das áreas sob as curvas para regiões de baixos q85
- Figura 4.21 - Curvas experimentais de intensidade de espalhamento em $\log I(q) \times \log(q)$ e melhor ajuste (linha preta) em sistema concentrado para os pós das amostras de diferentes natureza: HAP-C (a); HAP-P120CTAB (b); HAP-P120CTAB:Eu³⁺ (c); HAP-Ca120CTAB (d); HAP-Ca120CTAB:Eu³⁺ (e). Representação da distribuição de tamanhos em termos de volumes $D(r)v$88
- Figura 4.22- Padrão de espalhamento para estruturas lamelares do molde Amido-CTAB.....90
- Figura 4.23- Padrão de espalhamento de USAXS para amostras de hidroxiapatita preparadas com Amido e Amido-CTAB.....91
- Figura 4.24- Curva de ajuste de multinível (linha vermelha) para os dados experimentais em (a) HAP-ACCA, (b) HAP-ACPO e em (c) HAP-Amido 4g.....93
- Figura 4.25- Distribuição dos tamanhos de poros em relação ao volume para razão de aspecto $AR=0,8$ das amostras de hidroxiapatitas porosas.....94
- Figura 4.26- Em (a) são exibidas os espectros para região de XANES próximo a borda de absorção L_3 do Európio para diferentes amostras em comparação com o composto de Eu_2O_3 . Em (b) a primeira derivada do espectro de XANES.....97
- Figura 4.27- Transformada de Fourier na borda L_3 do Eu para sinais de EXAFS das amostras dopadas com Eu e composto de referência Eu_2O_398
- Figura 4.28 - Comparação entre o espectro XANES na região da borda K do Ca para diferentes amostras de hidroxiapatita.....99
- Figura 4.29- Transformada de Fourier na borda k do P para sinais de EXAFS das amostras de hidroxiapatita sem dopante.....99
- Figura 4.30 - Em (a) transformada de Fourier (pontos) e melhor ajuste no espaço-r (linhas sólidas) para as amostras de hidroxiapatitas, (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k^2 (pontos) e melhor ajuste (linhas sólidas).101
- Figura 4.31- Esquema de interação entre sítios de PO_4^{3-} e Ca^{2+} com micelas de C_{16}TAB 103
- Figura 4.32- Comparação entre os diferentes modelos de incorporação de Eu^{3+} na hidroxiapatita com os dados experimentais de EXAFS para amostra HAP-C:Eu. Em (a) Oscilações de EXAFS usando o peso k^2 e (b) corresponde a transformada de Fourier. Os círculos sólidos representam os pontos experimentais. Modelos envolvendo o Eu^{3+} no sítio de Ca(1) estão nos gráficos inferiores enquanto que modelo para Eu^{3+} em Ca(2) estão nos gráficos superiores.....105

- Figura 4.33- Em (a) representação da estrutura da hidroxiapatita construída usando código Vesta [95] baseada na estrutura de Andrade e colaboradores, 2004 [44], em (b) projeção no plano ab. Grupos de fosfatos são mostrados em amarelo. Em (c) poliedros de sítio do Ca(2) e em (d) sítios de Ca(2).106*
- Figura 4.34- Em (a) a transformada de Fourier (pontos pretos) e melhor ajuste no espaço-r (linhas sólidas) para hidroxiapatitas preparadas com C₁₆TAB nos Eu_{Ca(1)} e Eu_{Ca(2)} com O''_i. (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k² (pontos pretos) e melhor ajuste (linhas sólidas). Não foi aplicada a correção de fase na transformada de Fourier.....109*
- Figura 4.35 - Em (a) a transformada de Fourier (pontos pretos) e melhor ajuste no espaço-r (linhas sólidas) para hidroxiapatitas preparadas com C₁₆TAB para e Eu_{Ca(2)} com O'_{OH}. (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k² (pontos pretos) e melhor ajuste (linhas sólidas). A transformada de Fourier não teve a correção de fase.....111*
- Figura 4.36- Em (a) transformada de Fourier (pontos pretos) e melhor ajuste no espaço-r (linhas) para amostras HAP-ACCA e HAP-ACPO dopadas com 6mol% de Eu e preparadas com Amido-CTAB para incorporação em Eu_{Ca(1)} e Eu_{Ca(2)} com O''_i. (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k² (pontos pretos) e melhor ajuste (linhas). Não foi aplicada a correção de fase na transformada de Fourier.....112*
- Figura 4.37 - Espectros de excitação (a) e emissão (b) das hidroxiapatitas para concentrações de 6mol% e 3mol% de Eu³⁺115*
- Figura 4.38- Espectros de excitação (a) e emissão (b) das hidroxiapatitas preparadas com molde para porosidade de Amido-CTAB e dopadas com 6mol% de Eu³⁺117*
- Figura 4.39- Gráficos de viabilidade celular indicando a porcentagem de sobrevivência celular em função da concentração de amostra em pó.119*

CAPÍTULO I – Introdução e Objetivos



1 INTRODUÇÃO

Os estudos de biomateriais sintéticos aplicados a sistemas biológicos trazem inúmeros benefícios para a prevenção e tratamento de doenças, sobretudo aumentando a qualidade de vida da população. As biocerâmicas constituintes de fosfatos de cálcio se destacam por: (i) excelente biocompatibilidade; (ii) não apresentar toxicidade local ou sistêmica; (iii) natureza biodegradável em pH fisiológico; (iv) facilidade em adsorver íons e moléculas. Todas essas características combinadas demonstram a potencialidade de aplicações dos fosfatos de cálcio em diversos sistemas desenvolvidos para fins terapêuticos na medicina^[1].

Os estudos sobre as biocerâmicas com base nos fosfatos de cálcio têm produzido avanços tecnológicos significativos, em especial no que tange à liberação controlada de fármacos no tratamento não invasivo de diversos tipos de câncer e infecções^[2;3;4;5]. Um sistema eficiente para essa finalidade precisa ser dotado de poros, com diâmetros bem definidos que sejam capazes de transportar, sem afetar atividade biológica da substância terapêutica, e realizar a liberação *in situ* sobre o tecido alvo a ser tratado com taxas conhecidas^[6].

As primeiras estruturas de aluminossilicatos utilizadas possuíam arranjo poroso com alto grau de ordenamento de longo alcance no arcabouço tridimensional (3D), e poros com distribuição estreita de diâmetros da ordem de ~ 1 nm a 2 nm^[7]. Esse sistema foi classificado como microporoso pela União Internacional e Química Pura e Aplicada (IUPAC)^[8]. Posteriormente a barreira dos microporos foi ultrapassada com o desenvolvimento e classificação de estruturas inorgânicas dotadas de mesoporos (2 nm < \emptyset < 50 nm) e macroporos (\emptyset > 50 nm). Vale a pena ressaltar que a IUPAC somente atribui o termo "ordenado" para estruturas inorgânicas meso e microporosas se os poros forem acessíveis para o transporte de moléculas e interconectados com ordenamento espacial em duas ou em três dimensões^[9].

Os métodos de obtenção de sistemas porosos obtidos através de aluminossilicatos (MCM-41 e SBA-15) já estão bem difundidos e estabelecidos^[10;11]. Na última década, trabalhos científicos começaram a relatar o desenvolvimento de novos tipos de substratos com fosfatos de cálcio dotados de porosidade aleatória ou ordenada^[12;13;14;15;16] para o uso como veículo de liberação gradual, *in situ*, de moléculas de substâncias terapêuticas: anticancerígenas, antibacterianas e anti-inflamatórias^[17;6;2;18].

Neste sentido, tem crescido a cada ano o número de estudos que relatam a estratégia de métodos de processamento dos moldes inorgânicos e/ou orgânicos para a obtenção de estruturas porosas de fosfatos de cálcio. Entre os tipos de moldes destacam-se: moldes de surfactantes^[19;20;21;22]; moldes de blocos de polímeros^[15;23;24]; moldes inorgânicos de silicatos^[25;26;27] e carbonatos^[29]. Alguns métodos mais sofisticados de moldes combinados, usam a combinação de dois ou três moldes com diferentes características para se obter um único molde unificado e consolidado^[3;29;30]. Os resultados destes estudos foram pertinentes para obter diferentes porosidades. Apesar de serem bastantes eficientes na obtenção de meso e macroporos, os métodos citados têm usado moldes orgânicos de polímeros sintéticos com alto custo comercial ou moldes inorgânicos de silicatos, que implicam na formação de fases adicionais de sílica em estruturas porosas de fosfatos de cálcio.

A rota de obtenção dos fosfatos de cálcio meso-macroporos em desenvolvimento nesta tese não possui estas limitações, já que a peculiaridade da rota proposta está na utilização de moldes orgânicos naturais. Neste intuito, utilizamos a gelatinização do amido como precursor de macroporos aliado a pequenas quantidades de surfactantes catiônicos como delienador de mesoporos, para obter uma estrutura de poros interconectada com meso e macroporos que favorece o transporte de massa no material. O amido é um material abundante de baixo custo comercial, excelente biodegradação e biocompatibilidade com o organismo humano^[31]. Apesar dos estudos que relacionam o amido como precursor de macroporos em sistemas inorgânicos^[32;33] são encontradas limitações nestes estudos sobre o emprego do amido como delineador de porosidade em fosfatos de cálcio. Essas limitações estão atreladas ao fato dos grãos de amido interagirem somente com as partículas cristalinas de fosfatos de cálcio previamente formadas^[34;35;36;37], ou seja o amido é adicionado a rota de síntese somente após a formação de pó com cristais de fosfato de cálcio.

Nestes trabalhos da literatura^[34;35;36;37], a adesão do amido com os fosfatos de cálcio se dá através de um pré-tratamento térmico da mistura resultante do pó com cristais de fosfato de cálcio e amido. Os grãos de amido são derretidos formando uma goma aderente e posteriormente toda a mistura é calcinada a temperaturas necessárias para degradação da parte orgânica e obtenção da porosidade desordenada. Este método é conhecido como consolidação do amido^[34]. O interesse em estudar os fosfatos de cálcio, em especial o β -Tricálcio fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e a Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é devido à aplicação destas biocerâmicas como estruturas biocompatíveis de meso e macroporosos ideais para o tema de estudo proposto.

As pesquisas em biomateriais estão centralizadas no aprimoramento de estruturas porosas tridimensionais (3D) tipo *scaffolds*, microestruturas de poros de dimensões micrométricas formados por nanopartículas^[40] de β -tricálcio fosfato e/ou hidroxiapatita. E a estes tipos de fosfato de cálcio apresentarem boa solubilidade, biodegradação e bioreabsorção no organismo humano ^[38;39]. Nos últimos anos os carreadores de fármacos desenvolvidos são dotados de sonda luminescente para indicação da liberação *in situ*. A inclusão de uma sonda luminescente como o íon terra rara Eu^{3+} em sistemas carreadores de fármaco tem a finalidade em usar a luminescência como um indicador da liberação e carreamento de determinado fármaco até o local desejado de tratamento. Por esta razão, o β -tricálcio fosfato e a hidroxiapatita dotados de meso-macroporos com sonda luminescente de íon TR^{3+} para carreamento de fármacos de administração epidérmica serão os dois fosfatos de cálcio objeto de estudo desta tese.

1.1 Objetivos

A presente tese almeja propor modelos que relacionam o emprego do íon terra rara Európio (Eu^{3+}) como sonda luminescente e estabelecer metodologias para o desenvolvimento de fosfatos de cálcio meso-macroporos para liberação gradual de fármacos.

(i) Desenvolver rota de síntese inédita e caracterizar um molde orgânico da combinação formada entre a gelatinização do amido de milho (molde dos macroporos) e surfactantes catiônico de Brometo de cetiltrimetilamônio- C_{16}TAB (molde de mesoporos) para criar um arranjo com hierarquia de porosidade (meso-macroporos) nos fosfatos de cálcio de interesse;

(ii) Investigar as propriedades superficiais da matriz porosa, morfologia e tamanho dos poros e partículas, orientação e disposição espacial dos poros para definição do grau de ordenamento espacial da porosidade e sua reprodutibilidade, bem como analisar a eficiência dos moldes orgânicos empregados para obtenção da hierarquia de porosidade;

(iii) Realizar um estudo estrutural visando entender os mecanismos envolvidos na incorporação e luminescência provenientes da dopagem por íons terra raras (TR) trivalentes, como o Eu^{3+} , na fase meso-macroporosa cristalina da Hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10-x}\text{TR}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$.

(iv) Avaliar a citotoxicidade da matriz porosa de fosfatos de cálcio em meio de cultura de células saudáveis.

1.2 Organização da Tese

Para um melhor entendimento do leitor, a tese está organizada em quatro partes além das considerações finais dos estudos realizados e referência bibliográfica das literaturas consultadas. O segundo capítulo apresenta uma revisão bibliográfica que sucinta sobre as fases minerais dos fosfatos de cálcio, em especial a hidroxiapatita e o β -tricálcio fosfato, bem como, os diversos métodos já desenvolvidos para produção de poros em fosfatos de cálcio. São apresentados também as propriedades do Eu^{3+} em sistemas luminescentes e uma breve descrição das propriedades físicas e químicas do amido de milho e surfactante C_{16}TAB utilizados no estudo.

O terceiro capítulo descreve as metodologias empregadas para preparação de amostras de hidroxiapatita e o β -tricálcio fosfato, como também é apresentada detalhes das técnicas empregadas na caracterização e no estudos das propriedades físicas das amostras analisadas.

O quarto capítulo está destinado a apresentação dos principais resultados da caracterização das amostras produzidas. Neste capítulo também é realizado uma discussão dos resultados relevantes das propriedades observadas no material objeto de estudo e avaliação de modelos que expliquem o comportamento observado. Por fim, serão apresentadas as considerações finais dos resultados obtidos com proposta de trabalhos futuros e as referências das consultas bibliográficas que serviram como base para os estudos desenvolvidos na tese. As discussões complementares ao texto da tese estão apresentadas nos apêndices. Como convenção, será utilizada as siglas em inglês para designar as técnicas de caracterização utilizadas.

CAPÍTULO II - Revisão Bibliográfica



2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo apresentaremos algumas informações já relatadas na literatura que são pertinentes ao tema desta tese. Primeiramente, introduziremos aspectos gerais sobre a composição e estrutura dos fosfatos de cálcio analisados. Posteriormente, abordaremos informações sobre estruturas porosas dos fosfatos de cálcio.

2.1 Os Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio são compostos com ótima biocompatibilidade com organismo humano. Esta característica marcante é devida à família dos fosfatos de cálcio abrigar através de processos de biomineralização, formação de materiais inorgânicos *in vivo*, alguns compostos que são encontrados na fase mineral do osso humano e esmalte dentário com diferentes razões entre cálcio e fosfato [40]. Por esta razão, os fosfatos de cálcio são usados como reparadores ósseos desde 1890 [38,40]. Na tabela 2.1 são apresentadas algumas estruturas de fosfatos de cálcio a serem abordadas nas sessões seguintes desta tese.

Tabela 2.1 - Compostos de Fosfatos de Cálcio considerados neste estudo.

Compostos	Razão Molar	Fórmula Química
Pirofosfato de cálcio desidratado	Ca/P=1	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7\text{2H}_2\text{O}$
Fosfato Octacálcio-OCP	Ca/P=1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{5H}_2\text{O}$
Fosfato Tricálcio na fase β -TCP	Ca/P =1,5	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Fosfato Tricálcio na fase α -TCP	Ca/P=1,5	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Apatita com deficiência de cálcio	$1,5 < \text{Ca/P} < 1,67$	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$
Hidroxiapatita estequiométrica- HAP	Ca/P=1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$

2.2 A Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um dos principais fosfatos de cálcio. Ela é constituída por Cálcio (Ca^{2+}), grupo fosfato (PO_4^{3-}) e Hidroxila (OH^-). A hidroxiapatita estequiométrica (Ca/P=1,67) possui fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Nos sistemas biológicos a sua composição química

varia conforme a natureza da ocorrência do tecido de sustentação ou com mecanismos biológicos de calcificação empregados^[40;42]. Neste caso, é possível o surgimento de canais de substituições iônicas em sítios de cálcio, do grupo fosfato e hidroxila promovendo alterações significativas da razão molar estequiométrica e, assim, beneficiando o surgimento da fase de apatita deficiente em cálcio ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$)^[43].

A HAP possui simetria hexagonal (grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$) com parâmetros de rede $a=b=9,398 \text{ \AA}$ e $c=6,867 \text{ \AA}$ e densidade $3,15 \text{ g/cm}^3$ ^[44]. Devido à ordenação da simetria dos sítios cálcio podemos representar a estrutura da hidroxiapatita como sendo: $4\text{Ca}(1)^{2+} 6\text{Ca}(2)^{2+} [\text{P O}(1) \text{O}(2) 2\text{O}(3)]_6^{3-} (\text{O}(4) \text{H})_2^-$; em que quatro cálcios ocupam o sítio de Ca(1) e seis o sítio de Ca(2). Os dois sítios de cálcio tem a seguinte simetria: i) o sítio Ca(2) possui simetria C_s com seis vizinhos formando um poliedros distorcido de quarto oxigênios: 1 O(4), 1 O(2), 2 O(3) mais próximos e outros 2 O(3) mais afastados; ii) os sítios de Ca(1) com simetria C_3 estão ligados a dois grupos de oxigênios: 3 O(1) e 3 O(2) formando um paralelepípedo de base triangular orientados ao longo do eixo c conforme a Figura 2.1. O sítio de Ca(2) possui simetria mais desordenada que o sítio de C(1).

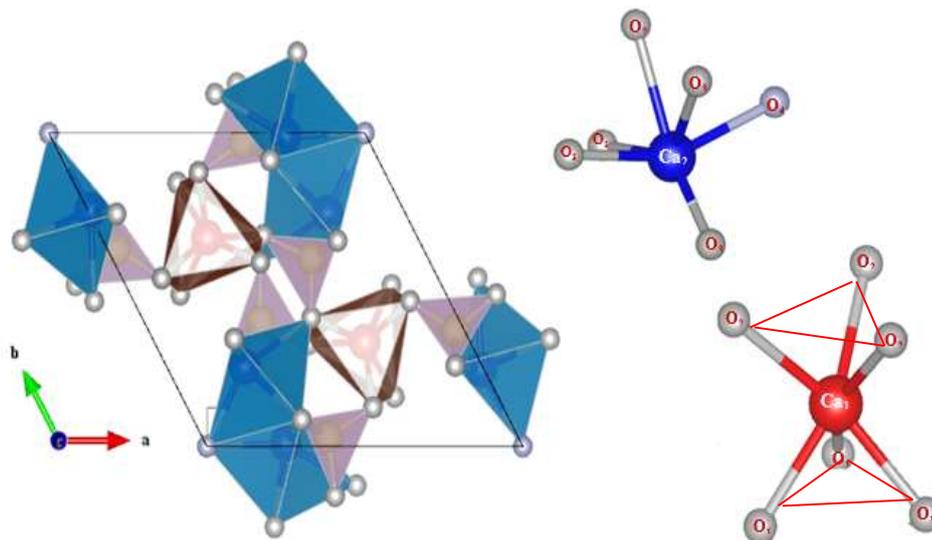


Figura 2.1- Célula unitária da HAP com vista na direção $[001]$, mostrando a posição espacial dos poliedros do sítio de Ca(1) em vermelho, os poliedros do sítio Ca(2) em azul, os fósforos em amarelo, sendo em roxo oxigênio da hidroxila do sítio Ca(2) e os demais oxigênios em cinza.

2.3 O β -Tricálcio Fosfato

O β -tricálcio fosfato $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - é usualmente obtido através do aquecimento a 700 - 800°C das apatitas deficientes de cálcio $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})_2$. Ele sobressai por apresentar grande taxa de reabsorção, *in vivo*, e solubilidade em pH fisiológico duas vezes maior que a hidroxiapatita [45:40]. O β -tricálcio fosfato pode apresentar dois outros polimorfos em altas temperaturas: α -TCP, estável entre 1120 °C - 1430 °C, com estrutura monoclínica de grupo espacial $P2_1/a$ e a fase α' -TCP formada em ~ 1430 °C [46].

A estrutura cristalográfica do β -tricálcio fosfato foi observada primeiramente por Gopal e Calvo em 1972 no mineral Whitlockite $(\text{Ca}_9(\text{MgFe})(\text{PO}_4)_6\text{PO}_3\text{OH})$ [47], posteriormente estudada em detalhes por Dickens e colaboradores em 1974 [48] e, mais recentemente, pelo grupo de Yashima, 2003 [45]. O β -tricálcio fosfato possui matriz cristalina romboédrica que pertence ao grupo espacial $R3c$ com célula unitária composta por 21 estruturas de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sendo delimitada pelos parâmetros de rede $a=b= 10,439$ Å e $c= 37,375$ Å e densidade 3,07g/cm³ [48]. Conforme a figura 2.2 em sua estrutura é observada cinco sítios de cálcio (Ca(1); Ca(2); Ca(3); Ca(4) e Ca(5)) com três sítios de fósforos (P(1); P(2) e P(3)) não equivalentes que combinados formam duas colunas A e B paralelas ao eixo c . A coluna A é composta por 3 P(1); 2 Ca(4); 2 Ca(5)), já a coluna B é constituída por 2 P(2); 2 P(3); 2 Ca(1); 2 Ca(2); 2 Ca(3). Sendo que na coluna A o sítio de Ca(4) possui fator de ocupação igual a 1/2.

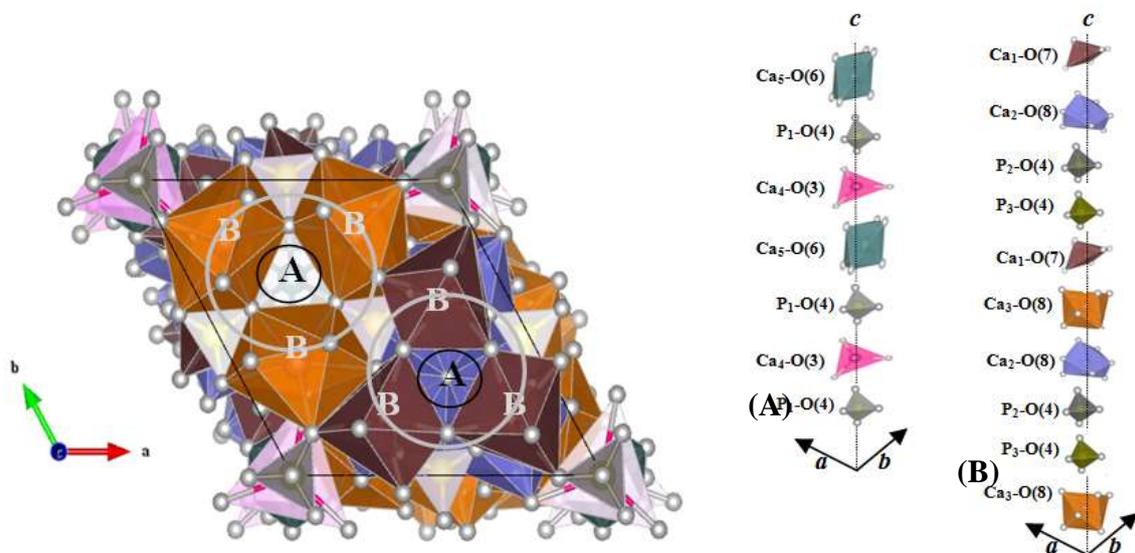


Figura 2. 2 - Colunas A e B da estrutura do β -TCP com vista ao longo da direção [001].

2.4 Meso e Macroestrutura em sistemas biocompatíveis.

Os avanços da nanotecnologia tornaram possíveis os estudos de mesocristais. Os mesocristais são definidos como uma nova classe de materiais sólidos, que podem ser considerados como conjuntos de nanocristais cristalograficamente orientados majoritariamente em uma única direção de plano cristalino^[41]. Mesocristais possuem cristalinidade elevada e a formarem estruturas com porosidade ordenada. Uma das formas de se obter estruturas de mesocristais é usando moldes com cadeias de polímeros e/ou moléculas de surfactantes. A camada de polímero e/ou surfactante que envolve as unidades básicas, normalmente nanopartículas monocristalinas, impede a coalescência das mesmas e promove a formação de blocos monocristalinos de dimensões meso/macrométricas que dão origem aos mesocristais. Em termos termodinâmicos a tendência é haver a coalescência dos nanocristais com a diminuição da área superficial e, conseqüentemente, este processo diminui a energia total do sólido. Assim, uma das funções do revestimento polimérico é manter o sistema em um mínimo local de energia preservando as estruturas e conexões existentes nos mesocristais^[41]. Com o uso de moldes com moléculas ou cadeias de polímeros de tamanho adequado durante a formação de mesocristais, é possível obter estruturas interconectadas em escala de tamanhos variáveis que podem ser chamadas de microporos, mesoporos ou macroporos dependendo dos diâmetros dos poros dos interstícios de conexão. Entretanto, esta mesma metodologia com algumas adaptações pode ser empregada para sistemas policristalinos dotados de agregados de unidades básicas espacialmente ordenadas. Na figura 2.3 está representado o processo de formação de mesocristais de fosfatos de cálcio com início na nucleação de grupos fosfato $(\text{PO})_4^{3-}$ e íons Ca^{2+} orientada por moléculas de surfactante e posterior revestimento das unidades básicas cristalinas por um molde polimérico.

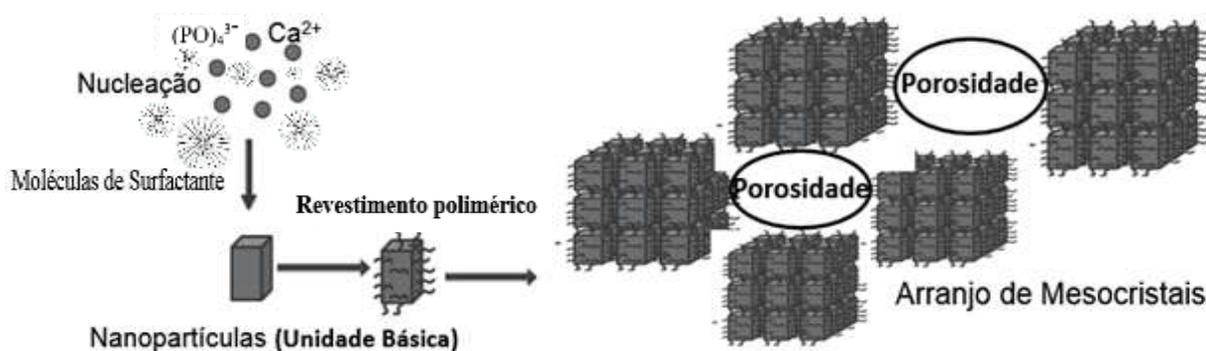


Figura 2.3 – Representação esquemática da formação de blocos monocristalinos para obtenção de mesocristais e arquitetura com porosidade bem definida. Adaptado de [41].

Na tabela 2.2 são apresentados os resultados da literatura relacionados à produção de meso e macroporos de fosfatos de cálcio com diferentes moldes orgânicos e inorgânicos.

Tabela 2.2 - Métodos relevantes na literatura para produção de poros em fosfatos de cálcio.

Processos/ Métodos	Descrição/ Referência
a) Revestimento por moldes inorgânicos de aluminosilicatos.	Camadas de sílica porosa (MCM-41 e SBA-15) atuam como moldes da mesoestrutura na mineralização dos fosfatos de cálcio [25;26;27].
b) Surfactantes Catiônicos	Utilização de surfactantes catiônicos (C ₁₆ TAB) como direcionares da mesofase através da formação de micelas com 2 nm a 10 nm de diâmetro para atuarem como molde [19;20;21;22].
c) Polímeros e Blocos de Co-Polímeros (Combinação linear de distintos blocos de monômeros)	Blocos de polímeros (Pluronic F127;KLE) e cadeias poliméricas únicas (PMMA, PS) são utilizados na rota de síntese de fosfatos de cálcio por co-precipitação em solução [15;23;24].
d) Moldes combinados	Combinação de dois a três moldes com estruturas de diferente natureza e tamanho. Polímeros em Blocos + Esferas de PMMA ou PS + surfactantes catiônicos (C ₁₆ TAB) [3;29;30].
e) Consolidação do Amido	Mistura dos Pós de fosfatos de cálcio - com área superficial previamente determinada - com suspensão de grãos de amido de batata funcionalizados. A suspensão é aquecida até 80°C para intumescimento dos grãos de amido (gelatinização) e início do processo de consolidação entre o amido e partículas de fosfatos de cálcio [34;35;36;37].

As biocerâmicas são usadas em tratamentos clínicos há muitos anos. O emprego de porosidade nas biocerâmicas ainda é relativamente nova. Esta nova propriedade potencializa e expande o uso das biocerâmicas em tratamentos de traumas, enxertos regenerativos ou inflamações. Neste sentido, pode-se considerar diferentes gerações de biocerâmicas porosas. Na primeira geração de biocerâmicas porosas o emprego de materiais bio-inertes foi favorecido, independente de suas aplicações e interações *in vivo*. Já na segunda geração o objetivo foi desenvolver arquiteturas com bioatividade com o corpo humano, ou seja, sistemas sintéticos que possam estimular/simular respostas *in vivo* no organismo hospedeiro para, por exemplo, favorecer o crescimento ósseo [42] para reparação de fraturas ósseas reposição óssea. Na segunda geração também se enquadra os compostos que sejam reabsorvíveis, ou seja, estruturas que dissolvam em contato com fluido biológico e que os produtos gerados sejam absorvidos ou secretados pelo organismo [42]. Nessa geração, compostos de fosfatos de cálcio porosos foram largamente utilizados.

A terceira geração nasceu da necessidade em desenvolver arquiteturas biocompatíveis de poros bem definidos (uniporosidade) na escala macrométrica ($\emptyset \sim 100\mu\text{m}$) devido às peculiaridades fisiológicas no uso desta arquitetura como sustentação temporária (*scaffolds*) em

engenharia de regeneração de tecidos moles [42]. A desvantagem dos produtos desta geração é a não diversificação dos diâmetros dos poros, e assim, uma menor potencialidade de transportar fármacos com tamanhos de moléculas diferentes. Enquanto que na quarta geração são desenvolvidos métodos para obter uma distribuição hierárquica da porosidade como, por exemplo, estruturas micro-meso-macroporosas em um único produto, e assim, garantir uma melhor capacidade de carreador de fármaco. Uma vez que produtos biocompatíveis de arquitetura com diferentes graus de diâmetros de porosidades transportam mais massa e diferentes tamanhos de moléculas, podendo transportar com facilidade dois ou mais fármacos de diferentes pesos atômicos, e assim aumentando a eficácia do tratamento com tempos maiores de liberação devido a diferença na velocidade de difusão entre poros de diâmetros distintos.

A utilização de cadeias de amido de milho em conjunto com surfactante (C₁₆TAB) torna possível obter a porosidade com diferentes tamanhos de poros e que possam ser utilizados para selecionar a adsorção e liberação de fármacos com diferentes pesos atômicos. As estratégias de processamento de diferentes tamanhos de poros são: i) o surfactante C₁₆TAB forma micelas que orientem a nucleação dos fosfatos de cálcio, e assim, têm-se um molde de mesoporos ($\emptyset < 50\text{nm}$); ii) as longas cadeias de amido ocupam os interstícios do meio reativo envolvendo as partículas de fosfato de cálcio. É proposto que as cadeias de amido formem vazios ordenados e macrométricos ($\emptyset > 50\text{nm}$) após a extração por tratamento térmico. Sendo assim, com o desenvolvimento dessa tese será proposto a quinta geração de biocerâmicas porosas. Esta geração é caracterizada pela integração entre sistemas com hierarquia de porosidade ordenada mais sondas luminescentes de íons terras raras (TR) para indicar a liberação de fármaco *in situ*.

2.5 O Európio (Eu) como sonda luminescente.

Os íons terras raras foram descobertos por Johann Gadolin em 1794, que conseguiu obter uma óxido (terra) de um mineral de cor escura, posteriormente batizado de Gadolinita. Este “terra” foi chamado de Ítria por Gadolin [49]. Um dos íons terras raras de grande aplicação tecnológica como marcador ou sonda luminescente é o Európio (Eu, Z=63). Ele vêm sendo estudado para fabricação de plásticos, cerâmicas, vidros fluorescentes, etc...O európio foi descoberto inicialmente por Boisbaudran em 1890, observando transições eletrônicas que não pertencia ao composto de samário e gadolínio analisado. Mas somente em 1901, analisando amostras de samário contaminadas com um elemento desconhecido o químico Demarçay batizou este elemento desconhecido de európio em homenagem a Europa [50].

O íon de európio tri valente, Eu^{3+} , destaca-se entre os íons terras raras por sua fotoluminescência intensa com emissão na região do visível. A emissão luminescente ocorre como resultado da transição eletrônica radiativa na qual o elétron passa de um estado com energia mais alta para um estado de energia mais baixa, sendo a diferença de energia liberada na forma de fótons. A fotoluminescência do európio correspondente às transições internas 4f-4f. Em geral, essas transições são proibidas pela regra de seleção de Laporte onde não há transição de estados de mesma paridade, sendo assim as transições ópticas caracterizadas por tempo de vida de micro a milisegundos [51]. Quando este íon é introduzido em uma matriz cristalina, em solução, em complexos ou numa matriz vítrea, o efeito Stark com o deslocamento e/ou desdobramento de linhas espectrais do átomo ou moléculas devido ao campo cristalino mistura os estados 4f tornando as transições eletrônicas intraconfiguracional bem intensas. O fato da camada 4f ser interna e blindada pelos estados preenchidos 5s e 5p faz com que a posição espectral das transições eletrônicas seja pouco sensível a vizinhança química, o que produz uma assinatura bem característica a este íon terra rara. No entanto o ambiente no qual está o íon pode suprimir sua emissão (*quenching*) como por exemplo ambientes de fônons de alta frequência que são característicos de meios aquosos e orgânicos com longas cadeias carboxílicas.

Uma característica marcante do íon európio é que tanto as bandas de absorções ou excitação quanto as bandas de emissão acontecem nos mesmos comprimentos de onda e a largura das bandas é estreita, se comparada com outros cromóforos como por exemplo os metais de transição da 1ª linha da tabela periódica. Todas estas características fazem deste íon terra rara (TR) um bom candidato como sonda luminescente integrado a sistemas orgânicos e inorgânicos para formação de compostos com diferentes aplicações tecnológicas, inclusive na área médica. Na figura 2.4 está apresentado os níveis de energia do íon Eu^{3+} .

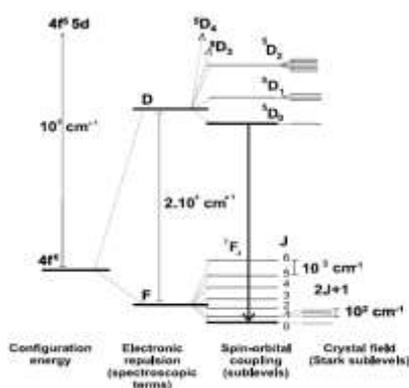


Figura 2. 4 – Representação esquemática dos níveis de energia do Eu^{3+} . Adaptado de [50].

2.6 O Amido.

O amido natural ($C_6H_{10}O_5$)_n é uma fonte de carboidratos na dieta humana e, por isso, é um biopolímero abundante e totalmente biodegradável. Em sua estrutura são encontrados duas unidades distintas de homopolímeros de α -D-glicose: a amilose e amilopectina. Amilose é um polímero linear com as unidades de α -D-glicose unidas por ligação glicosídicas α -D- (1,4). Amilopectina são macromoléculas (ver figura 2.3) formadas por ligações lineares do tipo α -D (1,4) conectadas por ligações glicosídicas do tipo α -D-(1,6) nos pontos de ramificação. Nesses pontos de ramificação são formadas estruturas do tipo A, B e Vh que dependem da orientação e extensão das cadeias, como também da fonte natural de amido [52;53].

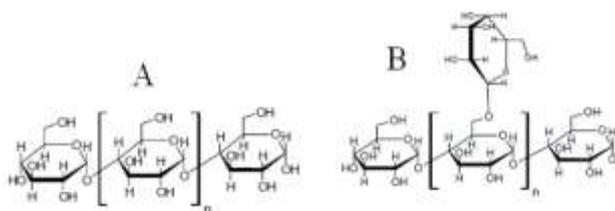


Figura 2.5- Em (A) estrutura química da amilose e (B) estrutura química ramificada da amilopectina . Adaptado de [52] e [53] .

O amido de milho utilizado nesta tese da Corn Products do Brasil-amisol/3408 contém cerca de 28% de amilose e 72% de amilopectina [51]. Os grânulos de amido de milho são insolúveis a temperaturas abaixo de 50°C [36]. A solubilidade em água é alcançada pelo aquecimento acima da temperatura crítica ~ 74°C. Nessa temperatura os grânulos absorvem água e com a forte relaxação da cadeia há quebra segmentada dos grânulos de amido e liberação de amilose e amilopectina no meio. Esse processo pode ser dividido em três partes distintas: (1) Intumescimento com aumento de várias ordens de grandeza do volume dos grãos devido à absorção de água das vizinhanças do grão; (2) Gelatinização, as cadeias de amilose e amilopectina se encontram em um estado de dispersão amorfa com moléculas de água ocupando os interstícios das unidades de α -D-glicose o que promove aumento na viscosidade e densidade do meio; (3) Retrogradação, fase na qual a estrutura do amido tende a voltar ao estado de agregado devido a re-associação das cadeias de amilose e amilopectina após a gelatinização cessar com a diminuição da temperatura. Esse último processo promove mais pontos de ramificação das cadeias o que cria um precipitado insolúvel formado por regiões lamelares com aglomerados de polimorfos cristalinos do tipo A, B e Vh [52;53].

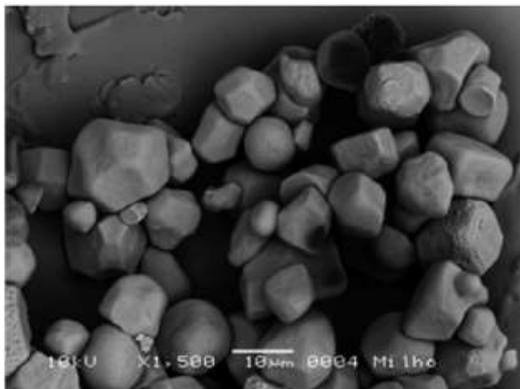


Figura 2.6- Microscopia eletrônica de varredura de grãos de amido de milho, mostrando a morfologia cúbica dos microgrãos de amido de milho [54].

O amido de milho natural foi escolhido neste trabalho por apresentar maior teor de amilose (28%) dentre as outras fontes naturais de amido, já que maiores teores de amilose favorece o processo de gelatinização do amido a ocorrer próximo a temperatura ambiente [36].

2.7 O Surfactante C₁₆TAB.

O surfactante C₁₆TAB é um sal quaternário de amônio (R₁₆N⁺X⁻, X= Br⁻) catiônico que atua como agente ativo de superfície na interface entre fase líquida e gasosa. O C₁₆TAB possui estrutura química conforme a figura 2.4 e arranjo molecular fracamente ligado ao brometo (Br⁻), um contra-íon para contrabalançar a carga positiva do surfactante. O surfactante, de maneira geral, tende a se organizar na superfície da solução aquosa com o grupo hidrofóbico, cadeia com 16 carbonos, voltado para o interior e hidrofílico, grupo catiônico C₄H₁₂-N⁺, voltado para o solvente. Na estrutura afipática do C₁₆TAB, estrutura composta por grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, as moléculas de surfactante se auto-organizam no interior do solvente formando micelas de diâmetros de 2 nm a 10 nm [55]. Estas micelas são agregados moleculares na forma de esferoides que se formam após a solução atingir a concentração micelar crítica (CMC), limiar entre solubilidade de monômeros e formação da agregação e orientação de micelas. O CMC do C₁₆TAB é 0,80-1,0 mM/dm³ a 25°C [56].

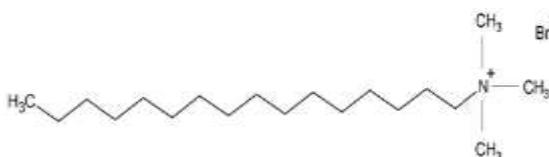


Figura 2.7- Estrutura química do C₁₆TAB. Fonte: [55].

CAPÍTULO III - Materiais e Metodologias

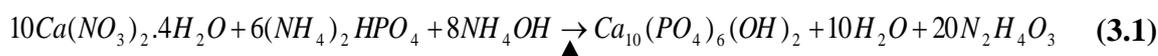


3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

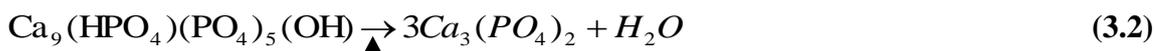
Nesta tese a metodologia de preparação das amostras difere dos estudos da literatura, principalmente devido à proposta de associação dos moldes de compostos orgânicos com a metodologia de co-precipitação para mineralização dos cristais de fosfatos de cálcio investigados. A nucleação e crescimento dos cristais de fosfatos de cálcio ocorrem em meio as soluções dos moldes desenvolvidos. Portanto nesta seção será abordado as metodologias e materiais utilizados para a preparação das amostras a serem investigadas.

Os fosfatos de cálcio foram sintetizados por co-precipitação em via úmida inicia através do gotejamento do reagente fonte de íons Ca^{2+} , nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich -99,98% de pureza), em uma solução fonte de íons fosfato (PO_4^{3-}) de fosfato de amônio dibásico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (VTEC 99,98% de pureza) mantida sob agitação de 10.000 rpm ou vice-versa formando uma suspensão de precipitação esbranquiçada e opaca. Sendo que, os resultados apresentados neste trabalho serão de dois fosfatos de cálcio, Hidroxiapatita e β -TCP, obtidos pelas reações de co-precipitação:

- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (Hidroxiapatita) com Ca/P =1,67 dos reagentes de partida e pH 10,4:



- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -tricálcio fosfato) com Ca/P =1,5 dos reagentes de partida e pH 10,8:



3.1.1 Detalhes dos Lotes de Amostras produzidas

Lote 1 - Amostras Controle

Amostra de hidroxiapatita produzida apenas pela reação 3.1 a 74°C com solução fonte de Ca^{2+} gotejadas sobre PO_4^{3-} foram denominadas de HAP-C. Enquanto as amostras denominadas de β -TCP-C foram amostras produzidas de β -tricálcio fosfato pela reação 3.2 aquecida a 74°C sem adição de moldes orgânicos seguindo a ordem de precipitação de solução de Ca^{2+} sobre solução de PO_4^{3-} . Após a síntese, as amostras HAP-C e β -TCP-C foram maturadas por 120 horas em temperatura ambiente para estabilização dos precipitados. Em

seguida, foram secas a 100°/48 horas e para consolidação da fase cristalinas as amostras foram submetidas a tratamento térmico em atmosfera aberta em forno tipo mufla, EDG 1800, a 450°C/4h para a amostra HAP-C e 800°C/5h para β -TCP-C. A rampa de aquecimento foi de 2°/minuto.

Lote 2 - Amostras de Fosfatos de Cálcio com C₁₆TAB

Foram dissolvidos 30mM ou 120mM de surfactante C₁₆TAB (Sigma Aldrich- H6269) em 100ml de água destilada. Esta solução foi mantida sob agitação a 10.000 rpm a 74°C por 30 minutos com pH de 10,4. Para a amostra HAP-Ca30CTAB a solução de 0,1M de PO₄³⁻ foi gotejada sobre a mistura da solução aquecida a 74°C de 0,167M de solução fonte de Ca²⁺ e 30 mM C₁₆TAB. Na amostra HAP-P30CTAB foi realizado o processo de precipitação inverso da amostra anterior, foi gotejado 0,167M de Ca²⁺ na solução a 74°C de 0,1M de solução fonte de PO₄³⁻ com 30mM de C₁₆TAB. Estas amostras foram preparadas com pH 10,4. Para amostras contendo 120mM de C₁₆TAB, HAP-Ca120CTAB e HAP-P120CTAB, o procedimento de síntese foi o mesmo adotada em amostras com concentrações de 30 mM.

Lote 3 - Amostras de Hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato com 4g de Amido e C₁₆TAB

- Preparação do molde combinado de Amido-CTAB

Foram produzidas amostras utilizando duas soluções de partida com estruturas orgânicas distintas. (i) Solução de 100 ml de água destilada somente com 120 mM de C₁₆TAB a 74°C ; (ii) suspensão de 4g de amido de milho comercial (Corn Products do Brasil-amisol/3408) em 100 ml de água destilada e gelatinizada a 74°C sem agitação. Posteriormente, estas duas soluções (i) e (ii) foram misturadas a 74°C e mantidas sob agitação de 10.000 rpm para formar o molde de combinado orgânico com (120mM) C₁₆TAB e (4 g) amido de milho gelatinizado. Este molde foi chamado de Molde Combinado de Amido-CTAB. O molde combinado foi formado em solução com pH de 7,0.

- Amostras de Hidroxiapatita + Molde de Amido-CTAB

A solução resultante do molde de combinado orgânico foi empregada na rota coprecipitação para formar partículas de hidroxiapatita. Para sintetizar a amostra HAP-ACPO, foi gotejado 0,167M de Ca^{2+} sobre solução aquecida a 74°C de 0,1M de solução fonte de PO_4^{3-} + molde combinado de Amido-CTAB. A amostra intitulada de HAP-ACCA possui rota de síntese semelhante a amostra anterior, a única diferença é a alteração da ordem de gotejamento das soluções: 0,1M de PO_4^{3-} gotejada em solução aquecida a 74°C de 0,167M de solução fonte Ca^{2+} misturada com o molde Amido-CTAB. Estas amostras foram preparadas com pH 10,4.

- Amostras de β -tricálcio fosfato + Molde de Amido-CTAB

Na síntese da amostra β -TCP-ACCA, foi gotejado 0,1M de solução fonte de PO_4^{3-} sobre uma solução aquecida a 74°C de 0,15M de solução fonte Ca^{2+} (para formação de $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})_2$) e solução do molde Amido-CTAB. A amostra β -TCP-ACPO tem ordem de precipitação dos íons PO_4^{3-} e Ca^{2+} inversa a ordem apresentada para produzir a amostra β -TCP-ACCA. Estas duas amostras foram produzidas em solução com pH de 10,8 e tiverem os mesmos processos e parâmetros de maturação e tratamento térmico aplicado a amostra controle β -TCP-C descrita na metodologia do Lote 1. A etapa de tratamento térmico tem a finalidade da extração do molde orgânico e consolidação das fases cristalina.

Lote 4 - Amostras de Hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato com 4g Amido

Amostra HAP-Amido 4 g e β -TCP-Amido 4 g foram produzidas em condições semelhante as amostras controle do lote 1, solução a 74°C e pH de 10,4 para HAP e 10,8 para β -TCP, a única diferença está na adição de 4 g de amido de milho comercial (Corn Products do Brasil-amisol/3408) na solução de reação por coprecipitação.

Lote 5 - Amostras de Hidroxiapatita dopadas com 3mol% e 6mol% de Eu^{3+}

As amostras de hidroxiapatita foram produzidas seguindo a metodologia de coprecipitação da reação 3.1. Sendo que, as hidroxiapatitas dopadas com Eu^{3+} ($\text{Ca}_{9,4}\text{Eu}_{0,6}(\text{PO}_4)$) foram obtidas adicionando $\text{Eu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich- pureza 99,99 % de pureza) na

solução fonte de íons de cálcio. O cálculo para dopagem de 3mol% e 6mol% de Eu^{3+} partiu da razão molar $\left(\frac{\text{Eu}}{\text{Eu}+\text{Ca}}\right)$, onde a molaridade da solução Ca + Eu é sempre igual a 0,167 mol/l. As amostras dopadas sem adição de moldes orgânicos foram denominadas de HAP-C:3% Eu^{3+} e HAP-C:6% Eu^{3+} para 3mol% e 6mol% de Eu, respectivamente, sendo preparadas em solução a 74°C e pH 10,4.

As amostras dopadas com európio formadas na presença do molde Combinado de Amido-CTAB seguiram a metodologia descrita para o lote 3, sendo chamadas de HAP-ACPO:3% Eu^{3+} e HAP-ACCA:3% Eu^{3+} para dopagem de 3mol% de Eu e HAP-ACPO:6% Eu^{3+} e HAP-ACCA:6% Eu^{3+} para dopagem de 6mol% de Eu. As diferenças entre elas está na ordem de gotejamento das soluções de partida. As amostras com termo: ACPO tem ordem de gotejamento $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$ igual a amostra controle, já as amostras com indicação ACCA tem ordem de gotejamento inversa, $\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$.

Lote 6 - Amostras do molde Amido-CTAB Seco

Foi produzida uma amostra somente da parte orgânica consolidado do molde Combinado de Amido-CTAB. A solução obtida da combinação de 120mM de C_{16}TAB e 4 g de amido de milho a 74°C foi seca em estufa a 100° por 48 h para promover a consolidação de uma estrutura orgânica em um corpo opaco e rígido. Essa amostra será chamada de molde Amido-CTAB Seco.

Também foi produzida a amostra HAP+Amido-CTAB Seco, em que 0,167M de Ca^{2+} foi gotejado sobre 0,1M de PO_4^{3-} , como na amostra controle, e solução do molde combinado de Amido-CTAB a 74°C. Após a reação de precipitação cessar a solução esbranquiçada obtida foi maturada por 120 horas e seca em estufa a 100° por 48 h para formar um sólido de partículas de hidroxiapatita e matéria orgânica.

Lote 7 - Amostras de Filme de Amido gelatinizado + C_{16}TAB

A amostra Filme de Amido gelatinizado + C_{16}TAB foi obtida a partir de uma alíquota da superfície da solução do molde Amido-CTAB durante a fase de gelatinização do amido em ~74°C. Essa alíquota de solução foi maturada por 48h e seca a 30°C para formar por sedimentação um filme rígido e transparente.

Para melhor compreensão dos procedimentos de preparação das amostras e diferenciar as variações dos lotes de amostras preparadas é proposto a leitura da tabela 3.1 que resume as condições de preparação das amostras produzidas e analisadas no Capítulo IV- Resultado de Discussões desta Tese.

Tabela 3.1 – Descrição das amostras preparadas para estudo da Tese em relação a ordem de precipitação das soluções iônicas, concentração de dopante e tipo de molde orgânico empregado.

Amostras Calcinadas	Ordem de Precipitação das Soluções	Dopante	Tipo de Molde Orgânico
HAP-C	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	-----
β -TCP-C	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	-----
HAP-Ca30CTAB	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$	-----	30 mM de C ₁₆ TAB
HAP-P30CTAB	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	30 mM de C ₁₆ TAB
HAP-Ca120CTAB	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$	-----	120 mM de C ₁₆ TAB
HAP-P120CTAB	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	120 mM de C ₁₆ TAB
HAP-ACPO	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
HAP-ACCA	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$	-----	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
β -TCP-ACPO	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
β -TCP-ACCA	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$	-----	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
HAP-Amido 4 g	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	4 g de Amido
β -TCP-Amido 4 g	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	4 g de Amido
HAP-C 3%Eu	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	3% de Eu	-----
HAP-C 6%Eu	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	6% de Eu	-----
HAP-P30CTAB:6%Eu ³⁺	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	6% de Eu	30 mM de C ₁₆ TAB
HAP-Ca30CTAB:6%Eu ³⁺	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$	6% de Eu	30 mM de C ₁₆ TAB
HAP-ACPO:6%Eu ³⁺	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	6% de Eu	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
HAP-ACCA:6%Eu ³⁺	$\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$	6% de Eu	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
Amido-CTAB Seco	-----	-----	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
HAP+Amido-CTAB Seco	$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$	-----	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB
Filme de Amido gelatinizado + C ₁₆ TAB	-----	-----	4 g de Amido +120 mM de C ₁₆ TAB

3.2 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE CARACTERIZAÇÃO

A seguir será apresentada as técnicas empregadas nas caracterização física das amostras sintetizadas para os estudos desta Tese, bem como, a fundamentação teórica das técnicas e procedimentos de preparação das amostras para realização das medidas e análises.

3.2.1 Difratomia de Raios X (XRD)

A difratometria de raios X é uma das técnicas mais empregadas para analisar a estrutura e identificar as fases dos diferentes materiais existentes na natureza. Os raios X são radiações eletromagnéticas com grande abrangência do espectro eletromagnético, de 10 nm a 4×10^{-3} [57]. Os raios X são gerados quando partículas de alta energia cinética é desacelerada em um alvo. Um método usual de produção de raios X é quando um elétron de alta energia colida com um alvo metálico (ânodo). Este elétron é produzido no cátodo em um tubo catódico que compõe o equipamento de raios X. O espectro de radiação gerado por tubos catódicos de raios X não é monocromático. O espectro pode apresentar radiação característica do material que constitui o ânodo (radiações $K\alpha$, $K\beta$, etc..) e radiação de frenamento do elétron, *bremstrahlung*. Em 1913 Bragg demonstrou de forma simples como um feixe é difratado por um cristal. Nos materiais cristalinos, cada plano de átomos paralelos hkl se comporta como um espelho semi-transparente, refletindo parte dos raios e transmitindo a outra parte. Quando as reflexões provenientes de planos paralelos produzem interferência construtiva, dão origem aos picos no padrão de difração (ver Figura 3.1). A condição para interferência construtiva é dada pela lei de Bragg [58] da equação 3.1.

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

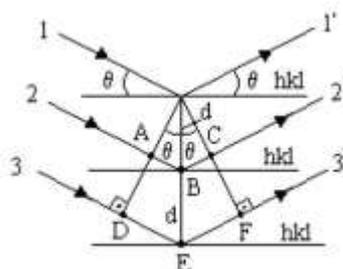


Figura 3.1 – Representação esquemática da reflexão para uma particular família de planos, separados por uma distância d . A diferença do caminho é $2d \sin \theta$. Adaptado de [58].

Além de identificação de fases cristalinas a difratometria de raios X também é usada pra estimar os tamanhos e morfologia das unidades cristalinas, cristalitos, formadores das partículas que compõem um material cristalino. O modelo de Scherrer é utilizado para estimar tamanhos de cristalitos através da largura a meia altura (FWHM- *Full Width at Half Maximum*) de difratogramas obtidos pela reflexão de raios X por planos cristalinos distantes entre si por algumas unidades de Angstrom (Å). A seguir deduziremos em detalhes a equação para o modelo de Scherrer.

Na figura 3.2 os raios incidentes A,D,M irão formar um ângulo θ_B com relação aos planos de difração, no entanto os raios incidentes B e C irão formar os ângulos θ_1 e θ_2 . O raio refletido D' que foi espalhado pelos átomos do primeiro plano da rede abaixo da superfície que corresponde a um comprimento de onda em fase com os raios A' e M' espalhados pelo i-ésimo plano de átomos a baixo da superfície. Nestas condições o último plano corresponde a i comprimentos de onda em fase com A'. Com essas condições consideradas temos que o tamanho do cristalito, D , será o produto do número de planos (i) pelas distância interatômicas (d).

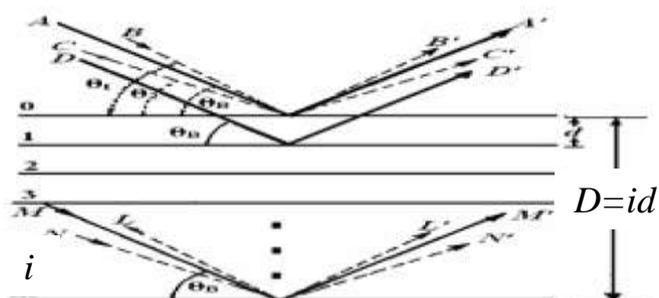


Figura 3.2 – Representação do modelo de Scherrer para cálculo de tamanho de cristalitos. Adaptado de [57].

Na figura acima é perceptível que os raios X incidentes que produzem ângulos ligeiramente diferentes de θ_B , produzem interferência destrutiva incompleta. O raio B', por exemplo, produz um ângulo θ_1 suavemente maior do que θ_B em que o raio L' do i-ésimo plano abaixo da superfície seja $i+1$ comprimentos de onda em fase com o raio B' da superfície plana. Isto significa que no meio do caminho no cristal existe um plano com conjuntos de átomos espalhando raios-X que é a metade do comprimento de onda da fase com raio B' dos átomos do plano da superfície.

Esses raios se cancelam entre si e a intensidade do feixe difratado no ângulo $2\theta_1$ é zero. Ele é também zero num ângulo $2\theta_2$ em que θ_2 é tal que o raio N' do i -ésimo plano a baixo da superfície onde $i-1$ é o comprimento de onda da fase com raio C' da superfície plana. Essas considerações definem os dois ângulos limites: $2\theta_1$ e $2\theta_2$ em que a intensidade difratada deve ser zero nesses dois pontos, sendo que a intensidade difratada em ângulos próximos a $2\theta_B$, mas não tão maior que $2\theta_1$ ou tão menor que $2\theta_2$, não são zero mas possui um valor intermediário entre zero e o máximo de intensidade do feixe difratado no ângulo $2\theta_B$ conforme mostrado na figura 3.2 e pelas equações de contorno a baixo.

$$\theta_B \rightarrow \Delta = n\lambda \quad (3.2)$$

$$\theta_1 \rightarrow \Delta = \frac{2i+1}{2} \cdot \lambda \quad (3.3)$$

$$\theta_2 \rightarrow \Delta = \frac{2i-1}{2} \cdot \lambda \quad (3.4)$$

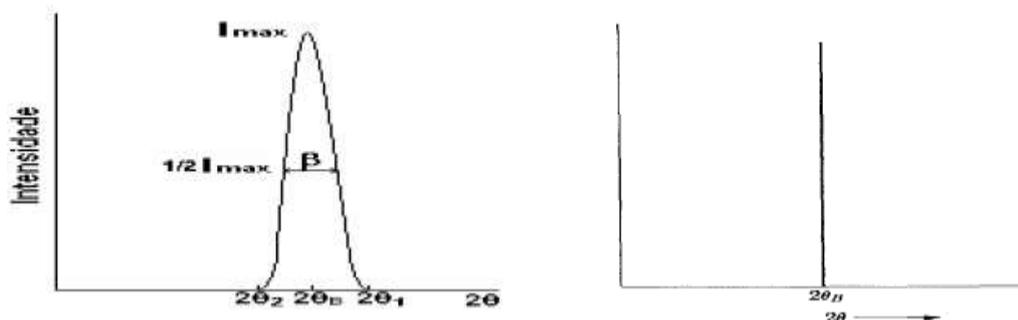


Figura 3.3 – Representação esquemática do efeito dos tamanhos de partículas no difratograma e do modelo de Scherrer para o cálculo do tamanho de partícula. Adaptado de [57].

Nos estudos de Scherrer foi levado em consideração que o perfil do pico de difração da figura 3.3 era uma distribuição Gaussiana e que os cristais eram cúbicos, muito pequenos e de tamanho uniforme. Neste sentido, para desenvolver o modelo de Scherrer temos que a largura a meia altura β , em radianos, é a metade da diferença dos dois ângulos extremos nos quais a intensidade de difração é zero devido a interferência destrutiva.

$$\beta = \frac{1}{2} (2\theta_1 - 2\theta_2) = (\theta_1 - \theta_2). \quad (3.5)$$

Da equação de Bragg: $n\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\theta$ dada pela equação 3.1 aplicada a esses dois ângulos θ_1 e θ_2 temos com a combinação das equações 3.3 e 3.4 as seguintes expressões adaptadas da referência [57] :

$$(I) \quad 2t \operatorname{sen} \theta_1 = (i + 1) \lambda$$

$$(II) \quad 2t \operatorname{sen} \theta_2 = (i - 1) \lambda$$

$$\text{Logo, } 2t(\operatorname{sen} \theta_1 - \operatorname{sen} \theta_2) = \lambda.1 \quad (3.6)$$

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

$$\text{Então: } 2t \left[\cos \left(\frac{\theta_1 + \theta_2}{2} \right) \operatorname{sen} \left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \right) \right] = \lambda.1 \quad (3.7)$$

Por aproximação, temos que : $\theta_1 + \theta_2 = 2 \theta_B$, e como $\left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \right)$ é bastante pequeno, podemos escrever: $\operatorname{sen} \left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \right) \cong \left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \right)$

Portanto, temos a relação: $2t \left(\frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \right) \cos \theta_B \cong \lambda.1$

Sendo $\beta = \theta_1 - \theta_2$, a equação de Scherrer assume a seguinte equação ^[57]:

$$D = \frac{k \lambda}{\beta \cos \theta_B} \quad (3.8)$$

A esfera de Ewald possibilita uma abordagem na qual é possível correlacionar a difração de um feixe de raios X gerada pelo cristal no espaço real e recíproco. Vetor da rede recíproca \mathbf{H} é uma combinação de três vetores de base, a^* , b^* e c^* com os índices de Miller (h,k,l) que referem-se aos planos da estrutura cristalina. Logo, esse vetor pode ser expresso da seguinte forma: $\mathbf{H} = a^*h + b^*k + c^*l$. O módulo do vetor \mathbf{H} é igual ao recíproco da distância interplanar: $H = 1/d(h,k,l)$ onde $d(h,k,l)$ é a distância interplanar de (h,k,l) ^[59].

Para representar graficamente (ver figura 3.4) a relação de Ewald utilizada para explicar a difração de raios X é conveniente definir o vetor unitário \mathbf{S}_0 de módulo $1/\lambda$ como um vetor paralelo ao feixe incidente e \mathbf{S} um vetor unitário gerado pelo feixe difratado de módulo $1/\lambda$. Uma esfera de raio $1/\lambda$ (esfera de Ewald) é desenhada em torno do ponto C. Ao incidir um feixe de raio X, com um dado comprimento de onda λ , a região onde o vetor \mathbf{S}_0 cruza a esfera, após ter passado pelo cristal, é denominada de origem da rede recíproca. Se houver difração gerada pelo cristal devido a distribuição dos planos cristalinos (h,k,l) , o vetor \mathbf{S} tocará a esfera de Ewald originando um segundo ponto, $\mathbf{P}(h,k,l)$ na superfície da esfera. O vetor que une os vetores \mathbf{S}_0 e \mathbf{S} quando estes interceptam a esfera é definido como vetor da rede recíproca. Logo, para haver difração é necessário que pelo menos dois vetores toquem a esfera, ou seja, a difração ocorre quando a esfera de Ewald toca um ponto na rede recíproca ^[57].

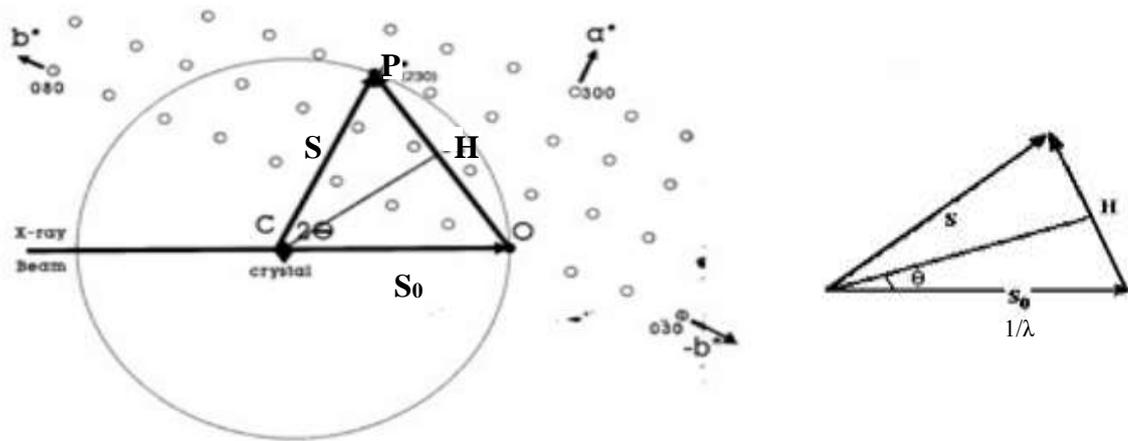


Figura 3.4 - Representação da esfera de Ewald para representar a condição de difração. Sendo 2θ o ângulo formado entre o vetor S ou S_0 e os planos (h,k,l) que geram difração no cristal.

Raios X que interceptam o cristal irão produzir pontos de difração, também chamado de reflexões, formando uma distribuição (esfera de Ewald) ao redor do cristal. Cada ponto de difração corresponde a um único plano (h,k,l) . A constante K da fórmula de Scherrer (Equação 3.8) é uma constante que depende da forma da região onde o vetor difratado S do feixe de raios X toca a esfera após ter passado pelo cristal. Como a distribuição dos pontos de difração ou das reflexões dependem da morfologia e simetria do cristal e das famílias dos planos (h,k,l) que constitui o cristal. Os valores adotados de k também são estimados com base nesses parâmetros. De modo geral, para reflexões simétricas k assume valor igual a 1 (um) e para as reflexões assimétricas, k assume valores diferentes que 1 (um).

O pico de difração da figura 3.3 pode ser afetado pelas condições experimentais de medida, fator instrumental. Esse fator instrumental contribui para o alargamento a meia altura do pico de difração e é chamado de $\beta_{\text{instrumental}}$ e depende das condições de medida do XRD. Logo, para deconvoluir o valor experimental $\beta_{\text{experimental}}$ da parcela do $\beta_{\text{instrumental}}$ aplicamos a aproximação de Gauss:

$$\beta = (\beta_{\text{experimental}}^2 - \beta_{\text{instrumental}}^2)^{1/2}$$

Em nosso estudo, para determinar o $\beta_{\text{instrumental}}$ foi obtido um difratograma, antes das medidas de XRD das nossas amostras, de um padrão microcristalino da amostra de LaB_6 (hexaborreto de Lantânio) cujo o tamanho de partículas $\sim 9\mu\text{m}$ são grandes o suficiente para eliminar as microdeformações que podem afetar a estimativa do alargamento instrumental.

Para investigação das amostras por difratometria de raios X foi utilizado dois difratômetros de raio X instalados no Departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe. O primeiro da marca Rigaku Ultima+RINT 2000/PC, os parâmetros de operação do equipamento foram: tubo de raios X com uma tensão 40kV , corrente de 40mA (com potência 1.6 kW) com radiação $K\alpha_1$ e $K\alpha_2$ do Cu ($\lambda= 1,5405 \text{ \AA}$ e $1,5444 \text{ \AA}$); o intervalo angular 2θ de medida foi de 10° a 70° , em modo de varredura contínua de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ com fenda de 10 mm . O segundo da marca Bruker modelo D8 Advance com parâmetros de tubo de raios X com uma tensão 40kV, corrente de 40mA e com contribuições da radiação $K\alpha_1$ e $K\alpha_2$ do Cu, sendo o intervalo angular 2θ de medida foi de 10° a 70° em modo de varredura contínua de $2^\circ/\text{min}$, passo de $0,02^\circ$ e com fenda de 1 mm.

Foi utilizado amostras em forma de pó, que foram previamente peneiradas com uma peneira de 100 mesh e dispostas uniformemente sobre uma lâmina de vidro para medida. Para as análises foi utilizado como padrão de referência da hidroxiapatita hexagonal a ficha ICSD-15-1414 de Andrade e colaboradores (2004) [44] e a ficha ICSD-6191 do padrão de β -tricálcio fosfato de estrutura romboédrica de Dickens e colaboradores (1974) [48]. Ambos padrões de referência forma obtidos no banco de dados ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database, Germany*) acessado via Portal da Pesquisa assinada pela CAPES.

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A microscopia é uma ferramenta versátil para análises de sistemas sólidos micro e nanoestruturados. Um Microscópio Eletrônico de Varredura dotado de canhão de elétrons por emissão de campo (*Field Emission Gun - Scanning electron microscopy SEM-FEG*) permite resolução pontual de 1 nm. Sendo portanto, um equipamento de investigação fundamental para o desenvolvimento desta tese, já que permite a visualização do arranjo meso e macroporosos combinado às informações da morfologia, superfície e análises de constituição química das partículas analisadas [59]. O primeiro microscópio eletrônico de varredura nasceu de uma adaptação. Em 1938 von Ardenne adaptando bobinas de varredura ao microscópio eletrônico de transmissão. Como se tratava de um microscópio de transmissão as amostras tinham que ser muito finas e o tempo para obter uma imagem era de cerca de 20 min. O aumento máximo conseguido foi de 8 000x e resolução aproximada de 50 nm [59]. Hoje em dia os microscópios

de varredura por emissão de campo podem chegar facilmente a resoluções da ordem de 1 nm. Basicamente o microscópio de varredura consiste de uma coluna ótica-eletrônica, unidade de varredura, câmara de amostra, sistema de detectores, e sistema de visualização e processamento de imagem conforme a figura 3.5.

O canhão de elétrons por emissão de campo é usado para produzir um feixe elétrons com energia para ser captados pelos detectores. Esse feixe é demagnificado, redução do diâmetro, por várias lentes eletromagnéticas com a finalidade de produzir um feixe coerente e focado em uma determinada região da amostra. A maioria dos equipamentos de microscopia eletrônica de varredura é capaz de produzir um feixe de elétrons da ordem de 10 nm ao atingir a amostra com quantidade de elétrons suficiente para formar a imagem com boa resolução. A fonte de emissão eletrostática (*Field Emission Electro Gun*) é normalmente um monocristal de tungstênio com um ponta fina, cerca de 100 nm ou menos, o que gera um campo elétrico alto e tem-se uma grande emissão de elétrons com uma elevada densidade de corrente e elevado brilho.

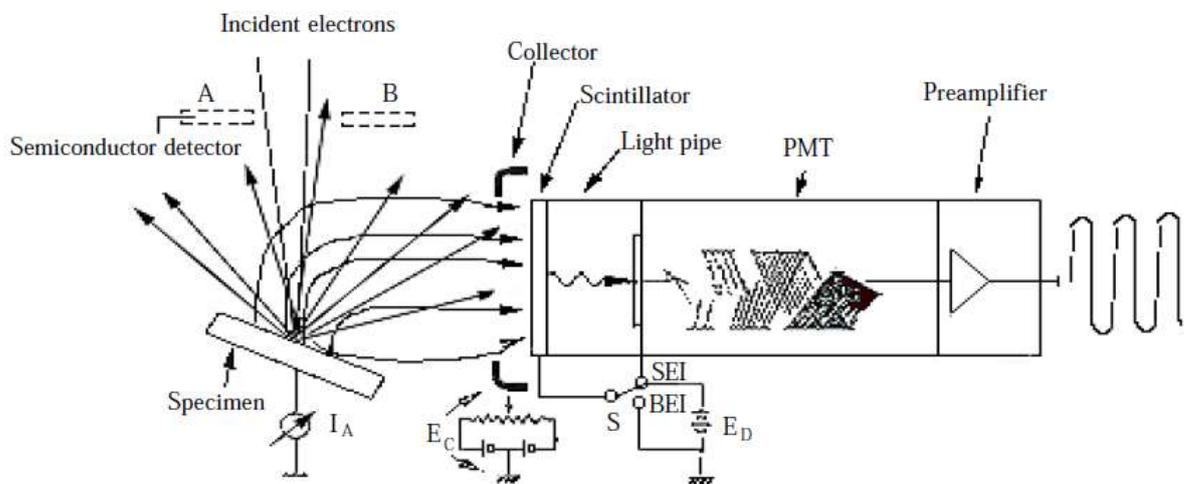


Figura 3.5 - Representação esquemática dos componentes de detecção do microscópio eletrônico de varredura [59].

Basicamente, o processo de formação de imagem em SEM provém da interação do feixe de elétron, elétrons primários, com a amostra analisada. A interações feixe-amostra podem revelar informações importantes sobre a natureza da amostra, composição, topografia, textura e outras propriedades. Estas interações podem ser resultantes das colisões do feixe de elétrons primários e superfície da amostra resultando no surgimento de elétrons retroespalhados

(Backscatterd electrons – BSE), elétrons secundários (SE) (Secondary electrons – SE), raio x característico e elétrons Auger. Os elétrons secundários (SE) são elétrons que são ejetados de átomos da amostras devido as interações inelásticas dos elétrons energéticos do feixe de elétrons primários. Normalmente são considerados elétrons secundários os elétrons emitidos da amostra com energia inferior a 50 eV. Os elétrons secundários são selecionados dos demais elétrons com base na energia cinética. Uma das principais características do elétron secundário (SE) é a baixa profundidade de escape, próximas a superfície. Logo o sinal destes elétrons possui maior resolução espacial que os elétrons retroespalhados, que são bem mais energéticos e reativos com as camadas mais profundas da amostra. Somente os elétrons secundários (SE) que são gerados bem próximos a superfície contribuem de forma expressiva para a formação sinal e maior resolução da imagem, já que o sinal provêm de uma área de seção transversal próxima do diâmetro do feixe demagnificado pelas lentes^[59].

As imagens apresentadas neste estudo são provenientes dos sinais gerados por elétrons secundários (SE) e obtidas no microscópio SEM-FEG da ©JEOL modelo JSM 6330F do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do CNPEM, durante o projeto de pesquisa com número #13187 e com o microscópio JEOL JSM-7500F instalado no Centro de Multiusuários de Nanotecnologia da UFS (CMNano-UFS) durante o projeto de pesquisa número #0007/2013 operado no modo *gentle-beam*.

As condições usadas para obtenção das imagens foram sempre utilizando uma tensão de emissão fixa de 1- 5keV com corrente de filamento de 5-8 μ A e distância de trabalho entre 2 mm a 4,1 mm. As amostras em forma de pó foram polvilhadas sobre substrato de carbono com aplicação de uma fina camada de fita ou tinta de carbono. Para melhorar o contraste e diminuir o carregamento superficial da amostra, suavizar a barreira potencial superficial (função trabalho), foi aplicado um filme de baixa espessura de carbono sob as amostras antes de analisá-las nos microscópios.

3.2.3 Espectroscopia de Estrutura Fina de Absorção de Raios X (XAFS)

A espectroscopia de absorção de raios-X (XAS) é conhecida desde 1920 quando os físicos Fricke e Hertz realizaram os primeiros estudos do XAS. Em 1970 Sayers, Stern e Lytle formularam as teorias atuais desta técnica^[60]. Até a década de 80, a utilização de XAS era

restrita pela escassez de fontes de radiação contínua. Entretanto, com o surgimento de novos laboratórios de radiação síncrotron com anéis de armazenamento de elétrons de alta energia ($E > 1 \text{ GeV}$) a técnica de XAS foi aprimorada e atualmente a espectroscopia de absorção de raios-X é frequentemente utilizada em diversas áreas da química, física e ciência dos materiais. A difração de raios X, embora sendo uma técnica bastante poderosa para o estudo da ordem a longas distâncias em um sistema cristalino, é ineficaz como estudo da ordem local ao nível atômico. Portanto, para um estudo estrutural da ordem local, faz necessário o emprego da técnica XAFS (*X-Ray Absorption Fine Structure*), sendo esta técnica de espectroscopia apropriada para a extração de informações químicas e do número de coordenação atômica.

A técnica de absorção de raios X de estrutura fina (XAFS) refere-se a interação dos raios X com um átomo alvo nas intermediações das energias de ligação dos níveis internos desse átomo. Medidas de XAFS são realizadas usando uma fonte de raios X com intensidade e energia ajustáveis obtidas com a radiação síncrotron. Para produção de radiação síncrotron, partículas (elétrons ou pósitrons) são inicialmente acelerados dentro de um acelerador linear ou em círculo e são posteriormente injetados em um anel de armazenamento. Este anel é mantido em ultra-alto-vácuo com partículas nas velocidades relativísticas são defletidas da trajetória retilínea por campos magnéticos de ímãs de dipolos.

Ao ser defletido o feixe de elétrons produz radiação eletromagnética, chamada de radiação de dipolo, em um largo espectro indo desde do infravermelho até raios X duros. A radiação síncrotron é emitida no interior dos dipolos, na direção tangencial a trajetória dos elétrons acelerados. Os dispositivos Wigglers e onduladores produzem radiação síncrotron pela interação do feixe de elétrons com uma sequência de dipolos magnéticos em paralelo, arranjado com polaridades alternadas entre si, e que ficam distribuídos ao longo das seções retas do anel de armazenamento ^[61]. No Brasil o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), localizado no campus Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) na cidade de Campinas, São Paulo, disponibiliza a única fonte de luz síncrotron para usuários da América Latina.

Quando os raios X sintonizados em uma determinada energia incidem na amostra, a radiação interage com os elétrons do átomo alvo. Esta radiação será espalhada por estes elétrons ou absorvida excitando os elétrons do átomo alvo. Um feixe monocromático de intensidade I_0 atravessando uma amostra com espessura x será atenuado por um coeficiente linear de absorção μ conforme a equação 3.9 ^[61,62].

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (3.9)$$

Quando ocorre a absorção do fóton de raios X, esse processo promove a liberação de elétrons dos orbitais atômicos mais internos, por exemplo, 1s. Esse nível pode ser preenchido por elétrons de orbitais mais externos com emissão de raios X característicos dando origem a fluorescência de raios X, que é uma das formas de se detectar a absorção de raios X em uma amostra. Este foi o modo de operação escolhido para as medidas apresentadas nesta Tese. Além da fluorescência de raios X a absorção do feixe incidente pode gerar elétrons Auger.

Dependendo da faixa de sintonização da energia do feixe de radiação síncrotron, em certas energias a absorção pode aumentar de forma abrupta, originando a chamada borda de absorção de raios X que é característica de cada átomo. Esta borda surge quando a energia do fóton incidente é capaz de causar uma excitação no elétron de camadas internas (K, L, M, etc...) de um átomo absorvedor para um estado do *contínuum*, gerando efeito fotoelétrico

Há dois mecanismos para o decaimento energético do átomo após o estado excitado, provocado pela absorção de raios X; a fluorescência de raios X é o primeiro mecanismo, no qual um elétron proveniente de uma camada interna de maior energia preenche uma vacância em uma camada mais interna, com emissão de fóton de raio X. A radiação emitida é característica do átomo e podem ser utilizada para quantificar e identificar os átomos de um arranjo estrutural ^[61].

O outro processo proveniente do decaimento energético é o Efeito Auger, no qual um elétron migra de uma camada mais externa para outra camada mais interna, esta diferença de energia entre camadas é transferida para um outro elétron que possui energia suficiente para sair para o *contínuum*, este elétron é chamado de elétron Auger. A figura 3.6 ilustra os mecanismos da interação dos raios X com a amostra.

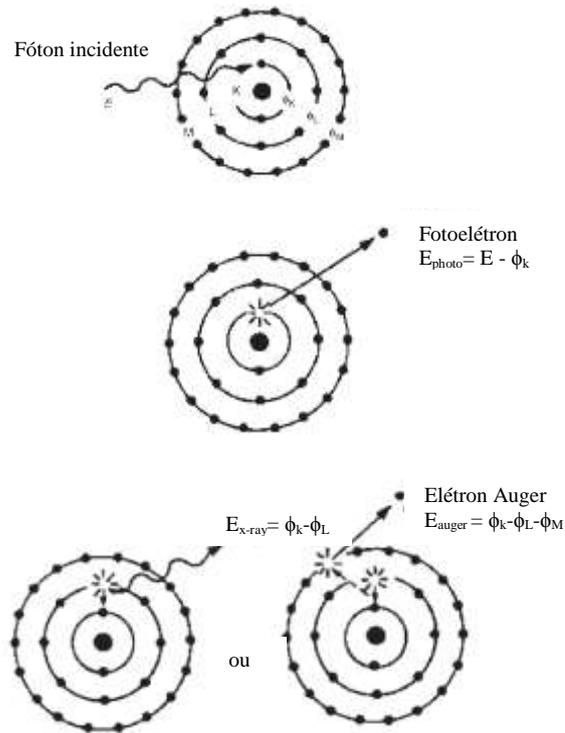


Figura 3.6 - Mecanismos envolvidos na interação da radiação X com a amostra. Adaptado de [63] .

Existe três subdivisões principais do espectro de XAS , são elas:

-Região de pré-borda, refere-se às transições eletrônicas com absorção de energias menores que a energia de ligação dos átomos. Estas transições ocorrem apenas quando o átomo absorvedor possui estados desocupados ou parcialmente desocupados.

- Borda de absorção, região responsável pelo aumento abrupto e intenso da absorção de radiação quando a energia absorvida é suficiente para arrancar elétrons do átomo absorvedor, ocorrendo assim, transição para o *contínuum* e o excesso de energia é fornecida ao fotoelétron na forma de energia cinética.

-Região de pós-borda, é a parte do espectro compreendida até 50 eV após a borda de absorção do material, esta região é chamada de XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) e a região entre 50 eV a 1000 eV após a borda de absorção é chamada de região EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*)

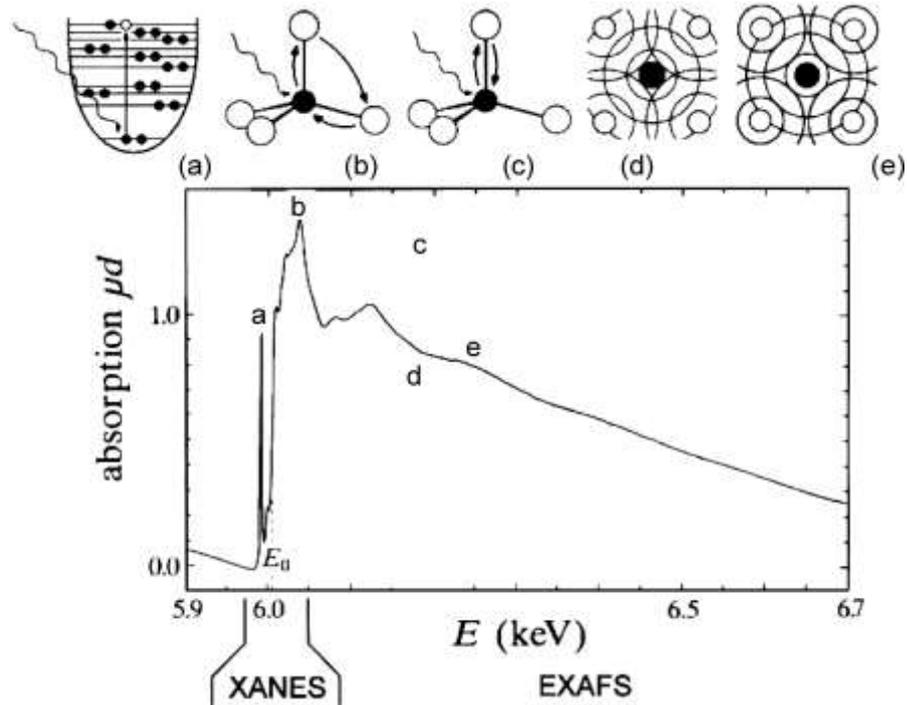


Figura 3.7 - Representação do espectro de absorção de raios X (borda K do Cr) da amostra K_2CrO_4 e os mecanismos físicos envolvidos no espectro de absorção de raios X com a definição da região de XANES e EXAFS. Em (a) pico de pré-borda causado por transições de orbitais não ocupados; (b) picos de espalhamento múltiplos; (c) região de espalhamento único com oscilações no espectro de absorção (d) causada por interferência destrutiva e (e) interferência construtiva entre as ondas do fóton elétron ejetado e retroespalhados. Adaptado de [63].

A região de XANES é caracterizada por variações estreitas e intensas da absorção de raios X. O espectro XANES engloba a região na qual o comprimento de onda do fotoelétron é da ordem de distâncias interatômicas, conseqüentemente, o seu caminho médio é longo o suficiente para que possam ocorrer espalhamentos múltiplos antes que ele retorne ao átomo central. Devido ao espectro XANES envolver espalhamentos múltiplos, interação de muitos corpos, distorção da função de onda do estado excitado pelo campo Colombiano e transições para níveis desocupados, ele é rico em informações cristalográficas e químicas do átomo absorvedor que não são acessíveis a região de EXAFS, como estado de oxidação, densidade de estados desocupados e estrutura cristalina em que está inserido o átomo absorvedor. Já no EXAFS, como o processo principal é o espalhamento envolvendo dois elementos (um absorvedor e um retro-espalhador), o espectro de EXAFS não contém informações sobre a interação de três ou mais átomos, por exemplo, que daria informações sobre ângulos entre ligações [61].

A região do espectro compreendida pelo EXAFS apresenta oscilações mais suaves na absorção de raios X. O processo físico que envolve as oscilações de absorção na região de EXAFS é a interferência entre onda emitida pelo átomo emissor e a onda retro-espalhada pelo átomo vizinho. Se o átomo absorvedor não possui nenhum vizinho suficientemente próximo (estado gasoso, por exemplo), o espectro de absorção terá um aumento significativo na borda de absorção e acima desta uma queda suave sem apresentar nenhuma oscilação.

Para sistemas sólidos ou líquidos, após a borda de absorção são observadas oscilações no coeficiente de absorção $\mu(E)$, sendo estas oscilações provenientes da interferência entre a função de onda do fotoelétron e o do elétron devido ao retroespalhamento da onda do fotoelétron pelos átomos vizinhos ao absorvedor, como ilustrado pela figura 3.7. Sendo que a absorção é proporcional a amplitude da onda associada ao fotoelétron na origem ^[64].

Para um átomo isolado teremos uma curva de $\mu(E)$ que apresenta um aumento bastante grande quando a energia do feixe incidente se aproxima das energias de ligação dos elétrons nos diferentes orbitais e que é proporcional a probabilidade de transição entre estados quânticos. Essa probabilidade é regada pela regra de ouro de Fermi. A probabilidade de transição depende da disponibilidade de estados para o fotoelétron, conforme descrito na equação 3.10. Em que $\langle i |$ representa o estado inicial dos elétrons que descreve os orbitais mais internos, H' é a Hamiltoniana que descreve a interação entre o campo magnético da radiação incidente e os elétrons (dentro da aproximação de dipolo elétrico) e $|f\rangle$ representa o estado final do fotoelétron.

$$\mu(E) \propto |\langle i | H' | f \rangle|^2 \quad (3.10)$$

Em moléculas ou sólidos o fotoelétron se propaga como uma onda esférica e é espalhada pelos átomos vizinhos, e portanto, o estado final $|f\rangle$ tem que considerar a superposição da contribuição da função de onda do fotoelétron emitido pelo átomo central e a contribuição dos fotoelétrons retroespalhados pelos átomos vizinhos. A diferença de fase entre as partes emitidas e espalhadas da função de onda do fotoelétron promove a modulação em termos de energia do coeficiente de absorção $\mu(E)$ e, assim, as oscilações de EXAFS são formadas ^[61,64].

Como o espectro do EXAFS envolve um átomo absorvedor e outro retroespalhados, uma contribuição significativa para a função de onda do estado final nas proximidades do átomo absorvedor é proveniente da trajetória na qual o elétron é espalhado somente uma única vez antes de retornar ao átomo absorvedor, fenômeno característico do espalhamento simples.

Devido a estas características o espectro de EXAFS é rico de informações a respeito da distância e do número de vizinhos do átomo/íon absorvedor.

As oscilações na região de EXAFS são descritas pela equação 3.11 onde $\mu(E)$ é o coeficiente de absorção medido, $\mu_o(E)$ é o valor que representa a absorção de um átomo isolado e $\Delta\mu_o$ é o salto no coeficiente de absorção.

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_o(E)}{\Delta\mu_o} \quad (3.11)$$

Como as oscilações dependem da natureza ondulatória dos fotoelétrons gerados, é conveniente usarmos o número de onda (k) para representarmos os resultados em função do sinal oscilatório de $\chi(k)$. Sendo que $k = \sqrt{\frac{2m_e(E-E_0)}{\hbar^2}}$, e E a energia do fóton absorvido e E_0 a energia de ligação do elétron que foi excitado. Nas análises apresentadas nesta tese o sinal de $\chi(k)$ será multiplicado por um peso de k^2 para amplificar as oscilações intermediárias de EXAFS. O modelo teórico que descreve o comportamento das oscilações de EXAFS $\chi(k)$ em função do vetor de onda k dos fotoelétrons é construído a partir de algumas considerações: (i) o "livre caminho médio", ou distância que o fotoelétron percorre durante seu tempo de vida entre o átomo de origem e os átomos retroespalhadores, (ii) que os fotoelétrons são retroespalhados da mesma forma por grupos de átomos em distâncias determinadas, chamadas esferas de coordenação, e (iii) que ao ser retroespalhados, a onda relativa a este fotoelétron apresentará uma diferença de fase igual para todos os átomos nesta esfera de coordenação que só dependerá das distância percorrida pelo fotoelétron. Usando estas considerações, é possível escrever para o sinal de EXAFS [61,64].

$$\chi(k) = S_0^2 \sum_i \left(\frac{N_i}{kR_i^2} \right) e^{(-2k^2/\sigma^2_i)} e^{(-2R_i/\lambda)} f_i(k) (\sin 2kR_i + \phi_i(k)) \quad (3.12)$$

Em que $\chi(k)$ é o coeficiente de absorção normalizado; i são índices que representam cada esfera de coordenação de vizinhos, N_i número de átomos vizinhos na i -ésima esfera de coordenação, S_0^2 é o fator de redução de amplitude devido a relaxação dos demais elétrons do átomo absorvedor, $F_i(k)$ é amplitude de retroespalhamento dos átomos vizinhos, a componente $\phi_i(k)$ é a defasagem total devida a i -ésima esfera de coordenação, λ é o livre caminho do fotoelétron, R_i é a distância entre o átomo absorvedor e o vizinho i , o termo σ_i^2 é o fator de Debye-Waller que representa a desordem na distância R_i da esfera de coordenação i . Neste último fator, além da desordem térmica local que faz os átomos vizinhos vibrarem em torno de

uma posição de equilíbrio, é incluído também a desordem estrutural, que representa as variações de distância ao átomo absorvedor a cada uma das esferas de coordenação. Esse fator equivale ao desvio quadrático das posições primárias dos N_i átomos vizinhos e fornece informações sobre o grau de desordem das esferas de coordenação próximas ao átomo central.

Assim, a partir do espectro de EXAFS não é possível diferenciar, por exemplo, um arranjo atômico tetraédrico de um quadrado plano, no entanto o número de vizinhos tem uma grande influência no sinal de EXAFS. Já na região de XANES onde ocorre o aumento abrupto da absorção de fótons de raios X, chamada de “linha branca”, contém informações valiosas sobre a simetria e valência(s) do átomo absorvedor.

Em relação aos equipamentos e aparatos experimentais que constitui a linha XAFS-2 do LNLS tem-se as seguintes considerações. A radiação desta linha provém da deflexão do feixe de elétrons de um dos dipolos instalados dentro do anel de armazenamento. O feixe atravessa o conjunto de fendas guarda que tem o objetivo de impedir a passagem de feixe espalhado para a unidade de medida. O sistema opera em alto vácuo (10^{-8} Pa) isolado por uma janela de Berílio da pressão de ultra-alto-vácuo (10^{-11} Pa) do anel e pressão atmosférica por um janela de Kapton, na bancada de experimento [65]. Toda a sequência de aparatos e equipamentos estão representados no *layout* linear da linha XAFS-2 da figura 3.8.

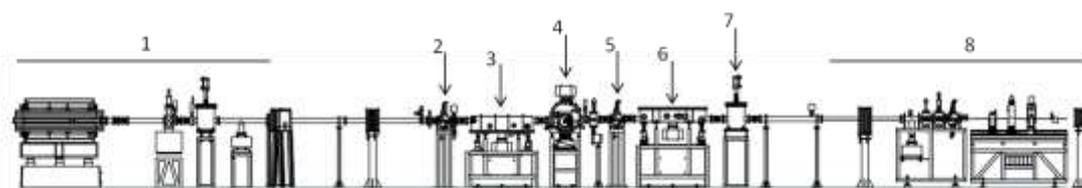


Figura 3.8 - *Layout* da linha de luz XAFS-2 em operação do LNLS. Em (1) dipolo e front end; (2) fendas pré espelho; (3) espelho; (4) monocromador; (5) fendas; (6) espelho toroidal revestido; (7) obturador do feixe e (8) bancada experimental. Adaptado de [66].

Para o estudo desta tese também foi empregado medidas de SXS (*Soft X-ray Spectroscopy*) usando raios X “moles” (< 5 keV) para investigar elementos com borda de absorção mais baixas energia como o Silício, Magnésio, Fósforo e Cálcio com energia de borda K ~ 1.839 eV, 1.303 eV, 2.145 eV e 4.038 eV, respectivamente. A borda K de absorção do Cálcio está próximo ao limite de medida, 5.500 eV, da linha de luz SXS do LNLS. A linha permite a realização de experimentos espectroscópicos de fotoabsorção e de fotoemissão de camada interna tais como XPS XANES, difração de elétrons de baixa energia (LEED) e espectroscopia de elétrons Auger (AES).

A seguir na figura 3.9 é apresentada uma representação esquemática da linha de luz SXS em operação no LNLS.

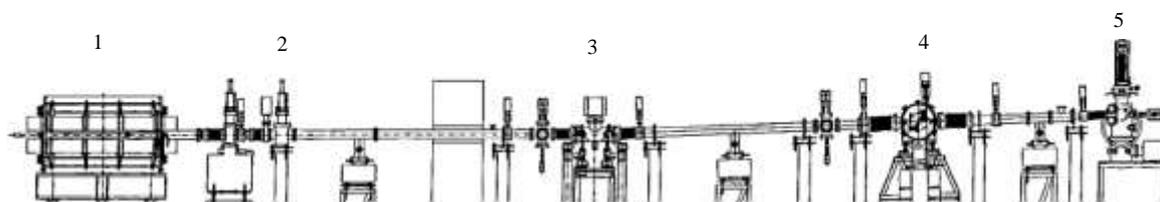


Figura 3.9 – Visão da linha de SXS. (1) dipolo; (2) front end; (3) espelho focalizador; (4) monocromador e (5) bancada experimental. Adaptado de [67].

Motivado pela necessidade do estudo estrutural e da ordem local do Eu^{3+} na matriz hospedeira dos fosfatos de cálcio para correlação com a luminescência e demonstrar a possibilidade e introduzir uma sonda fluorescente de Európio em arranjos porosos biocompatíveis as absorções de raios X foram obtidos no LNLS em medidas realizadas na linha de luz de espectroscopia de estrutura fina de absorção de raios X (XAFS2), sob número de proposta #14456. As medidas aconteceram em torno da borda de absorção L_3 do Eu^{3+} , em aproximadamente 6.977 eV, operando no modo de fluorescência. Um detector de Ge de 15 elementos foi usado para medir a fluorescência de raios X das amostras, sintonizando a janela em energia do detector nas linhas $L_{\alpha 1}$ e $L_{\alpha 2}$ do Eu.

Para melhor entendimento da sensibilidade dos sítios de Cálcio (Ca^{2+}) e sítios de fosfato (PO_4^{3-}) com o ambiente de nucleação aletrado pelo molde combinado de Amido+ surfactante C_{16}TAB foram realizadas as medidas de XANES/EXAFS nas bordas k do Fósforo (~2,145 eV) e do Cálcio (~4.038 eV) na linha de luz SXS do LNLS. As medidas aconteceram sob o regime detecção da produção total de elétrons (TEY), utilizando-se o monocromador com o par de cristal InSb (111) para medidas na borda k do Fósforo e Si (111) para medidas na borda k de absorção do Cálcio. As medidas foram feitas em modo fluorescência e para isso utilizou-se uma pequena quantidade de amostras em pó. O pó foi acomodado sobre os portas amostras e compactadas com isopropanol. Para interpretação dos dados, primeiramente tratamos os dados no *software* Athena para subtração do *background* e extração das oscilações de EXAFS, e no segundo momento no *software* Artemis foram propostos modelos que forma ajustados aos dados experimentais. Esses softwares compõem o pacote IFEFFIT versão 8 [68].

3.2.4 Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS)

O modelo físico que descreve a técnica de SAXS (*Small angle X-ray scattering*) está fundamentada nas leis de espalhamento e fenômenos de interferência, os quais são estreitamente correlacionados com a heterogeneidade eletrônica da amostra irradiada. Em SAXS os elétrons da nuvem eletrônica da amostra são considerados fontes espalhadoras de raios X. Por este motivo esta técnica é sensível a contraste de densidade eletrônica $\Delta\rho(r)$ de interface entre as partícula e o meio de dispersão. O processo de espalhamento pode ser descrito com os elétrons em ressonância com a frequência dos raios X incidentes. Neste caso, o campo elétrico da onda eletromagnética incidente faz oscilar os elétrons das partículas. Um elétron da nuvem eletrônica oscilando representa um dipolo clássico (carga em movimento acelerado) que espalha ondas secundárias em todas as direções, e esse processo é chamado espalhamento Thomson sendo representado pela equação 3.13 da intensidade espalhada.

$$I_e(\theta) = I_p \cdot 7,90 \cdot 10^{-26} \left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{2a^2} \right) \quad (3.13)$$

Em que I_p é a intensidade primária, a é a distância entre do centro espalhador e detector e o valor numérico $7,90 \times 10^{-26}$ é proveniente da razão carga e massa clássica do elétron (e^2/mc^2). As ondas secundárias geradas pelos espalhamento dos elétrons da nuvem eletrônica sofrem fenômenos de interferência construtiva e destrutiva dependendo do ângulo de espalhamento. O máximo de espalhamento irá acontecer para $2\theta=0^\circ$ em que todas as ondas espalhadas estarão exatamente em fase. Nesse caso os ângulos pequenos favorecem espalhamento elástico ao invés do inelástico ^[69:70].

O processo de espalhamento é descrito em termos da rede recíproca. Imaginamos um centro espalhador com diâmetro D seja iluminada por raios de uma fonte monocromática de ondas planas com vetor de onda: $k_0=2\pi/\lambda$. As ondas serão espalhadas na forma de ondas esféricas por todos os elétrons do centro espalhador e essas ondas espalhadas irão sofrer interferência uma das outras, fornecendo uma função de intensidade de espalhamento que decresce com o aumento do ângulo de espalhamento. A intensidade de espalhamento será máxima na direção do feixe incidente (ângulo de espalhamento igual a zero, $2\theta=0^\circ$). Esta intensidade em ângulos próximo a zero é proporcional ao número de elétrons nos centros espalhadores. É conveniente expressar as ondas espalhadas pela forma complexa $e^{i\phi}$. A fase ϕ é $2\pi/\lambda$ vezes a diferença entre o ponto da origem do espalhamento e algum ponto arbitrário. Logo, o termo ϕ de um conjunto de ondas espalhadas de comprimento de onda λ se torna mais

relevante com o aumento do ângulo de espalhamento 2θ . Em baixos ângulos de espalhamento apenas os espalhamentos elásticos (sem transferência de energia) formam ondas coerentes. Os espalhamentos incoerentes (Compton) são desfavorecidos em baixos ângulos, segundo a equação 3.14 a baixo:

$$\lambda = \frac{\hbar}{m_e c} (1 - \cos\theta) + \lambda_0 \quad ; \theta \rightarrow 0, \lambda \cong \lambda_0 \quad (3.14)$$

Assumindo espalhamento elástico com ondas coerentes, as ondas esféricas espalhadas possuem modulo de vetor de onda $k_1=|k_1|$ igual a k_0 . O cálculo da fase φ é ilustrado pela figura 3.10, onde \mathbf{s} e \mathbf{s}_0 são vetores unitários na direção do espalhamento e do feixe incidente, respectivamente. O vetor \mathbf{r} descreve a diferença de caminho óptico entre um ponto \mathbf{P} e a origem do sistema.

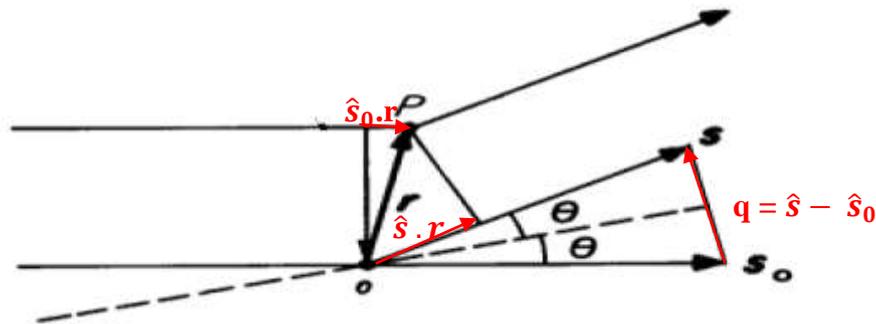


Figura 3.10 - Representação de espalhamento de dois pontos.

Aplicando a relação vetorial e trigonométricas na ilustração da figura 3.10, observamos que o vetor de espalhamento \mathbf{q} possui a mesma direção de $\hat{\mathbf{s}} - \hat{\mathbf{s}}_0$, sendo que esse último possui magnitude igual a $2 \cdot \text{sen}\theta$. Também podemos encontrar a relação:

$$\varphi = - (2\pi/\lambda) \cdot \mathbf{r} \cdot (\hat{\mathbf{s}} - \hat{\mathbf{s}}_0) \cdot \text{O vetor } \mathbf{q} \text{ é definido como sendo: } \mathbf{q} = (2\pi/\lambda) \cdot (\hat{\mathbf{s}} - \hat{\mathbf{s}}_0)$$

Logo, temos a relação $\mathbf{q} = (4\pi/\lambda) \cdot \text{sen } \theta$ e $\varphi = - \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}$. A intensidade de espalhamento $\mathbf{I}(\mathbf{q})$ é dada pela a raiz quadrada da amplitude resultante da soma de todas as amplitudes das ondas coerentes espalhadas. As amplitudes das ondas espalhadas são de mesma magnitude mas diferem em termos da fase, que depende da disposição dos elétrons no espaço. A amplitude da onda espalhada pode ser representada pelo termo $e^{i\varphi}$ onde podemos representar também por: $e^{i \cdot \mathbf{q} \cdot \mathbf{r}}$ que é o fator fase. Mas considerando um número enorme de elétrons dos centros espalhadores e de fato um único elétron na posição \mathbf{r} não pode ser exatamente localizado, é conveniente representar esse sistema em termos da densidade eletrônica $p(r)$. Em que $p(r)$ é

uma função radial de distribuição da densidade eletrônica dos centros espalhadores na posição \mathbf{r} . Com esta consideração podemos expressar a amplitude total $\mathbf{A}(\mathbf{q})$ das ondas espalhadas na direção de um vetor \mathbf{q} pela equação:

$$A(q) = \int_0^{\infty} p(r) \cdot e^{-iq \cdot r} dr \quad (3.15)$$

Logo, a amplitude total de espalhamento $\mathbf{A}(\mathbf{q})$ na direção do vetor \mathbf{q} é representada como sendo a Transformada de Fourier da função $p(r)$. Em que $p(r)$ é a função radial de distribuição da densidade eletrônica dos centros espalhadores na posição \mathbf{r} . Esta grandeza define o número de elétrons por unidade de volume (cm^3). A melhor maneira de se obter a intensidade de espalhamento $\mathbf{I}(\mathbf{q})$ é pela relação do complexo conjugado, onde a amplitude \mathbf{A} é multiplicada pelo seu complexo conjugado \mathbf{A}^* . Logo temos:

$$I(q) = A \cdot A^* = \iint_0^{\infty} p(r_1) p(r_2) \cdot e^{-iq \cdot (r_1 - r_2)} dr_1 dr_2 \quad (3.16)$$

Esta equação também representa uma integral de Fourier, envolvendo a distância relativa $(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)$ para todos os pares de pontos de espalhamento, os elétrons dos centros espalhadores. É conveniente representar a dupla integração na equação 3.16 através de dois passos: o primeiro é juntar todos os pares com distâncias relativas iguais e, então, integrar todas as distâncias relativas incluindo o fator fase e considerando que $\mathbf{r} = (\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)$:

$$\tilde{p}^2(r) = \iint_0^{\infty} p(r_1) p(r_2) dr_1 dr_2 \quad (3.17)$$

A função resultante é uma função de Patterson largamente usada em cristalografia, e possui as seguintes propriedades: cada par de elétron com uma distância relativa \mathbf{r} pode ser representado por um ponto em um espaço fictício, espaço-C. A densidade de pares de elétrons com separação \mathbf{r} é dado por $\tilde{p}^2(r)$. O segundo passo para calcular a intensidade espalhada $\mathbf{I}(\mathbf{q})$ consiste na integração em todo o espaço-C.

$$I(q) = \int_0^{\infty} \tilde{p}^2(r) \cdot e^{-i \cdot q \cdot r} dr \quad (3.18)$$

Esta equação também representa uma transformada de Fourier. A intensidade de distribuição em \mathbf{q} no espaço recíproco é determinada pela estrutura eletrônica do centro espalhador (partícula) e pode ser expressa por $\tilde{p}^2(r)$. Convencionalmente, podemos obter de 3.18 a transformada de Fourier inversa:

$$\tilde{p}^2(r) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \int_0^\infty I(q) \cdot e^{i.q.r} dr \quad (3.19)$$

Das equações 3.18 e 3.19 podemos tirar algumas conclusões gerais. Há uma reciprocidade entre o espaço real e o espaço recíproco. Eles são apenas conectados pela fase $\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}$, o resultado de conexão será o mesmo quando \mathbf{r} é incrementado e \mathbf{q} é diminuído pelo mesmo fator aplicado ao sistema. Então, centros espalhadores grandes irão fornecer padrões de espalhamentos a baixo ângulos.

Assumindo as duas restrições: (1) o sistema é isotrópico, ou seja, o sistema não possui propriedades físicas que variam de acordo com a direção ou tempo, como sistemas de partículas em rotação; (2) o sistema possui uma longa ordem, isto significa que não há correlação em termos de densidade eletrônica entre dois pontos suficientemente separados. De acordo com a restrição (1) a distribuição $\tilde{p}^2(r)$ depende apenas da magnitude de \mathbf{r} (a distância relativa de pares de elétrons) o que não acontece para $p(r)$ que depende do produto entre \mathbf{r}^2 e $\tilde{p}^2(r)$. Neste caso, o fator fase $e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}}$ pode ser substituído pela sua média de todas as direções \mathbf{r} . Esta propriedade é expressada pela fórmula fundamental de Debye (1915):

$$\langle e^{-iqr} \rangle = \frac{\text{sen } qr}{qr} \quad (3.20)$$

Logo, a equação 3.18 é reduzida por:

$$I(q) = \int_0^\infty 4\pi \cdot r^2 \tilde{p}^2(r) \cdot \frac{\text{sen } qr}{qr} dr \quad (3.21)$$

Também podemos ter que a função radial de distribuição da densidade eletrônica seja definida agora por:

$$I(q) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \cdot \frac{\text{sen } qr}{qr} dr \quad (3.22)$$

Com a transformada de Fourier da equação 3.22, temos:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty qr I(q) \text{sen}(qr) dq \quad (3.23)$$

De acordo com a restrição (2), para grandes \mathbf{r} a função de densidade eletrônica se tornará independente e, assim, poderá ser substituída por um valor médio: $\bar{\rho}$. A função de auto-correlação definida por 3.17 precisa assumir o valor da constante $\bar{\rho}^2$, enquanto que o valor inicial $\bar{\rho}^2(0)$ é $\bar{\rho}^2$. A estrutura dos centros espalhadores é representada por uma região finita onde $V\bar{\rho}^2$ representa termo final da densidade média. Com estes conceitos, a função de correlação $\gamma(r)$ de Debye e Bueche representa a flutuação da densidade eletrônica média $\bar{\rho}$ em um sistema com elétrons a uma distância \mathbf{r} , e assim, essa função de correlação é introduzida no nosso problema pela subtração do termo constante de longa distância $V\bar{\rho}^2$ com o termo inicial $\bar{\rho}^2$ da função de densidade de pares de elétrons ($\tilde{\rho}^2(r)$). Logo temos que a flutuação média da densidade eletrônica pode ser representada por:

$$V\gamma(r) = V\bar{\rho}^2 - \bar{\rho}^2 \text{ e que } \rho(r) = r^2 \cdot V\gamma(r) \quad (3.24)$$

Substituindo 3.24 em 3.22 temos:

$$I(q) = 4\pi V \int_0^\infty r^2 \gamma(r) \cdot \frac{\text{sen } qr}{qr} dr \quad (3.25)$$

Está é a formula mais geral para sistemas de espalhamento obtidos pela restrição (1) e (2). $\gamma(r)$ é obtido pela transformada de Fourier inversa de 3.25.

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \cdot \frac{\text{sen } qr}{qr} dq \quad (3.26)$$

A equação 3.25 e 3.26 assume uma forma simples considerando $\mathbf{q}=\mathbf{0}$ e $\mathbf{r}=\mathbf{0}$ e o fator fase $e^{-i\cdot\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}}$ assume um valor unitário. Exatamente em $\mathbf{q}=\mathbf{0}$ todas as ondas espalhadas pelos centros espalhadores estarão em fase.

Logo, podemos reescrever as equações 3.25 e 3.26 nas formas:

$$I(0) = 4\pi V \int_0^\infty r^2 \gamma(r) \cdot dr \quad (3.27)$$

$$V\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \cdot dq \quad (3.28)$$

A equação 3.27 pode ser interpretada no sentido de que cada elétron de um certo volume V irradiado de centros espalhadores atuam de forma coerente apenas com sua região de vizinhança, $\mathbf{r} \rightarrow 0$. A equação 3.28 mostra que para sistemas com grandes centros espalhadores a integral da intensidade do espaço recíproco é unicamente relacionada com a flutuação média

da densidade eletrônica em um certo volume V , sendo independente de características espaciais da morfologia dos centros espalhadores. Se, por exemplo, partes dos centros espalhadores são deslocados ou deformados, o padrão de espalhamento gerado será alterado devido a quantidade de elétrons da estrutura, entretanto a integral da equação 3.28 permanecerá invariante a respeito de tais mudanças na estrutura [69;70].

$$Q = \int_0^{\infty} q^2 I(q) \cdot dq \quad (3.29)$$

Para um sistema formado por partículas de geometria única em suspensão no solvente, que constitui na prática um modelo de espalhamento válido para sistemas diluídos de N centros espalhadores, os quais são suficientemente isolados sem interação entre eles. Temos que a expressão que define o rendimento do espalhamento a baixos ângulos ($q \rightarrow 0$) será:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \left(\frac{\int p(r) \cdot r^2 dv}{\int p(r) dv} \right) \quad (3.30)$$

O segundo termo da equação 3.30 representa o raio de giro (R_g) que pode representar as dimensões de centros espalhadores dispersos em um meio.

A técnica de SAXS foi útil para obter informações sobre a morfologias e distribuição de tamanho das partículas dos fosfatos de cálcio de interesse. Os resultados das propostas de pesquisa SAXS-#19954 e #10971 foram obtidos utilizando radiação síncrotron na linha de luz SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron- LNLS em Campinas, SP. Os dados de espalhamento foram adquiridos num detector bidimensional Pilatus 300K no qual os dados de saída são curvas de espalhamento de $I(q)$ vs q . De modo geral, $I(q)$ é a integral radial do sinal de intensidade de espalhamento média em todas as direções. A grandeza q (nm^{-1}) representa o módulo do vetor de onda de espalhamento em função de θ que representa a metade do ângulo de espalhamento e λ comprimento de onda do feixe incidente. Logo, temos: $q = 4\pi \cdot \text{sen}\theta/\lambda$. Utilizamos amostras em forma de pó, submetidas a um feixe incidente de $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$ com fluxo de 10^{14} fótons/s e vetores de onda na faixa $0,05 \leq q \leq 1,3 \text{ nm}^{-1}$.

Por sua vez a técnica de USAXS (Ultra small angle X-ray scattering) foi empregada para investigação da fase porosa das amostras. A técnica de USAXS possibilita uma aplicação da região de investigação obtida em SAXS na linha SAXS 1 do LNLS. Em resultados USAXS é comum investigar regiões com $q \leq 0,05 \text{ nm}^{-1}$ que representam sistemas com estruturas maiores

que 120 nm, isso fazendo uma boa aproximação da lei de Bragg para primeira aproximação ($d = 2\pi/q$). Como as amostras desenvolvidas podem ter macroporos superiores a 120 nm que estão fora dos parâmetros de medidas para SAXS a técnica de USAXS foi utilizada para medir o espalhamento destas estruturas e compreender melhor o grau de ordenação entre elas. As medidas de USAXS aconteceram em cooperação com o grupo do Dr. Jan Ilavsky do *Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Chicago, USA* com amostras na forma de pó e feixe incidente de $\lambda = 0,72932 \text{ \AA}$ [71]. O pacote do código livre IRENA para SAXS e INDRA para dados de USAXS [72] foram empregados para análise das curvas de espalhamento.

3.2.5 Fotoluminescência

A luminescência é uma propriedade de emissão de luz dos materiais. Sendo gerada quando um determinado centro luminescente constituinte do material absorve energia suficiente para que os elétrons sejam promovidos aos estados desocupados em níveis eletrônicos de energia mais elevados. Quando há a promoção destes elétrons têm-se a formação do estado excitado do centro luminescente, por exemplo Eu^{3+} . Após a excitação, os núcleos atômicos do centro luminescente ajustam suas posições para uma nova situação de excitação e então as distâncias inter-atômicas são rearranjadas para se igualarem as distâncias de equilíbrio promovida pelo estado excitado. Este processo é chamado de relaxação. Durante a relaxação usualmente não há emissão. Após a relaxação o sistema pode retornar ao estado fundamental através de processos de decaimento radiativos. De modo geral, a emissão ocorre em energia mais baixa do que a absorção devido aos processos de relaxação. A emissão de energia em forma de luz dentro do espectro eletromagnético pode abranger desde a região do ultravioleta ao infravermelho [50]. Entretanto, nem todo material apresenta luminescência. A razão disto é que a emissão radiativa tem um processo competidor chamado de retorno não radiativo ao estado fundamental. Neste processo a energia do estado excitado é usado para excitar os estados vibracionais existentes no material, e assim, há liberação de energia térmica e supressão da emissão eletromagnética.

Por sua vez, a presença de defeitos como dopantes faz com que níveis eletrônicos sejam gerados na região do *band gap*, distância entre o topo da banda de valência e a base da banda de condução, criando novos canais para a relaxação do sistema [49]. Neste caso, a luminescência passa a ser determinada pela probabilidade relativa das transições permitidas pelas regras de seleção espectroscópicas, que são as regras de spin e a regra de Laporte.

A regra de spin corresponde a transições eletrônicas que ocorrem com momento angular de spin total conservado. Já a regra de Laporte, postula que uma transição eletrônica por dipolo elétrico é permitida apenas entre estados com paridades diferentes, e por exemplo, a transição 5d–4f do Eu^{2+} . Logo as transições entre estados de uma mesma camada, como por exemplo f – f e d – d são proibidas pelas regras de Laporte. Os processos de emissão e absorção que seguem as regras de seleção possuem geralmente tempos de decaimento radiativo da ordem de nanosegundos [49,50]. As bandas de excitação e linhas de luminescência de alguns íons terra rara trivalentes em diferentes matrizes minerais com diversos centros luminescente estão apresentadas na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – As bandas de excitação e linhas de luminescência dos centros luminescentes em minerais. Atenção especial para os íons de Európio. Adaptado de [50].

	Transição eletrônica	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	$\lambda_{\text{luminescência}}$ (nm)
Pr^{3+}	$^3H_4 - ^1S_0$	280	480, 610, 650, IR
	$^3H_4 - ^1I_1$	460	
	$^3H_4 - ^1I_0$	490	
Nd^{3+}	$^4I_{9/2} - ^4G_{7/2-5/2}$	580	880, 1,060, 1,340
	$^4I_{9/2} - ^2D_{7/2}$	320	380, 417
	$^4I_{9/2} - ^2P_{1/2}$	380	535, 600, 670
Sm^{3+}	Charge transfer	230	540, 600, 675
	$^6H_{5/2} - ^6P_{5/2}$	407	
Sm^{2+}	4f–5d	450, 580	650, 690, 700, 730, 780, 810
Eu^{3+}	Charge transfer	220	590, 610, 650, 700
	$^7F_0 - ^5H_3$	325	
	$^7F_0 - ^5D_2$	532	
Eu^{2+}	4f ⁷ –4f ⁶ 5d	250, 310	380–450
Tb^{3+}	$^7F_6 - ^5D_3$	280	380, 417, 440, 550

As estruturas de apatita mineral, $\text{C}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{O}, \text{OH})$, encontradas na natureza podem ser fluorescentes. Na natureza íons terra raras trivalentes (TR^{3+}) podem substituir os sítios de cálcio presentes na apatita tornando um centro luminescente em um ambiente cristalino. Os processos de luminescência na apatita tem sido o objeto de inúmeras investigações e estudos, dentre eles se destaca os vários estudos feitos pelo grupo Michael Gaft et al (2005) [50].

Na figura 3.11 é apresentado o espectro luminescente que permite detectar a emissão de centros luminescentes, como o Eu^{3+} , em amostras de apatita sedimentar obtida nos estudos de [50].

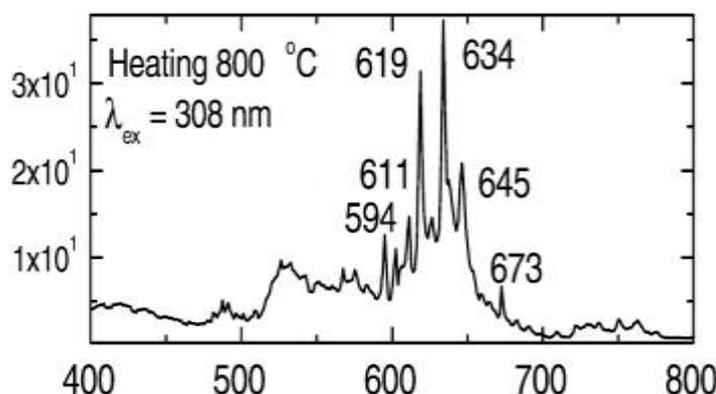


Figura 3.11 - Espectro de luminescência dos centros de Eu^{3+} em posições de sítios de Ca em apatitas minerais sedimentares formadas em ambientes marítimos em temperatura ambiente após tratamento térmico a 800°C . Adaptado de [50].

As linhas 594, 619, 626, 634 e 645 nm do espectro da figura 3.11 estão ligadas a presença de íons terra raras trivalentes, entretanto estas linhas não são observadas em amostras a temperatura ambiente mas somente em amostras tratadas a 800° [50]. Em especial as linhas em 634 e 645 nm são caracterizadas por transições de tempo de decaimento de 0,5 ms e a linha 619 nm representa transições com tempo de decaimento de 0,1 ms. A forma de como as linhas de luminescência são estreitas na figura 3.11 e o longo tempo de decaimento são as assinaturas de que a luminescência é devido as transições f-f de íon trivalente terra rara. É sabido que a luminescência de íons terra raras trivalentes é mais intensa quando o sítio tem baixa simetria e a proibição por paridade de estados é parcialmente diminuída [49,50]. Na apatita existem dois sítios de Cálcio com simetrias diferentes, o sítio de Ca(2) tem menor simetria que o sítio de Ca(1), e por isto o íon terra rara em sítio de Ca(2) apresenta menor transições eletrônicas de paridade proibida que o sítio de Ca(1). Com o aumento da temperatura há uma diminuição da simetria da rede cristalina e isto pode explicar a grande intensidade da luminescência de íons terra raras em apatitas tratadas termicamente a altas temperaturas, e também, devido à baixa simetria a luminescência tem um tempo de decaimento relativo curto.

Logo a intensidade e perfil de emissão luminescente em apatitas é sensível aos dois sítios de Cálcio propícios a incorporação do íon terra rara. Por este motivo, a técnica de fotoluminescência foi escolhida para corroborar e complementar as análises da absorção de raios X de estrutura fina (XAFS) da simetria de incorporação de íons de Európio em fosfatos de cálcio, especialmente a hidroxiapatita. A potencialidade da aplicação do Európio como sonda luminescente em estruturas porosas de fosfatos de cálcio para sistemas de liberação gradual de fármacos está estritamente relacionada a intensidade e perfil do espectro luminescente desse íon. Neste trabalho, as medidas de fotoluminescência foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro ISS PC, com a fonte de excitação formada por uma lâmpada de Xenônio de 300W e um monocromador de resolução de 1 nm a 2 nm. Para o registro da emissão foi utilizado um espectrômetro HR 2000 da Ocean Optics. Foi utilizado o porta amostra de sólido para amostras em pó. O pó foi polvilhado uniformemente sob uma fita adesiva de carbono e fixado a uma haste no porta amostra para sólidos. Primeiramente foi conhecido determinado o comprimento de onda de excitação para a maior intensidade do espectro absorção das amostras. Então, este comprimento de onda foi mantido fixo ao registrar a varredura do espectro de emissão. Os espectros de emissões das amostras sólidas foram obtidos com medidas no intervalo de 550 nm a 705 nm com passo de 0,5 nm e comprimento de onda de excitação próximo a 393 nm.

3.2.6 Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O princípio de uso dessa técnica se deve ao fato de que as posições dos átomos na cadeia molecular de uma molécula não estão fixas, mas variam continuamente devido à grande quantidade de diferentes tipos de vibração (modo vibracional da molécula). Estes estados vibracionais podem ser excitados a estados de energia vibracionais de maior energia através da absorção da energia de radiação na região do espectro infravermelho. A condição para que haja absorção da radiação infravermelha é que a radiação eletromagnética incidente tenha uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois modos vibracionais de um sistema analisado [73]. Se neste sistema há átomos livres para se movimentarem nas três dimensões, o sistema terá graus de liberdade e esses graus de liberdade serão correspondentes aos diferentes modos vibracionais da molécula.

A importância em se aplicar esta técnica em materiais como os fosfatos de cálcio deve-se ao fato de identificar os grupos funcionais através da comparação dos modos vibracionais identificados em amostras com materiais padrão existentes na literatura. Através desta técnica pode-se, por exemplo, diferenciar a substituição dos grupos OH^- e $(\text{PO}_4)^{-3}$ pelos grupos $(\text{CO}_3)^{-2}$ através da presença das bandas de absorção características destes grupos funcionais [74]. No entanto o intuito de aplicar a técnica de Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier é identificar de modo seguro a remanescência, após tratamentos térmicos, das frações orgânicas do Amido e/ou C_{16}TAB empregados como moldes de poros na rota de síntese dos fosfatos de cálcio objeto de estudo nesta Tese.

Para este estudo foram confeccionadas pastilhas de cada tipo de pó cerâmico. Desta forma, 5 mg de pó de cada amostra foram misturados com 100 mg de KBr e prensados em prensa mecânica. As amostras foram submetidas a análise por aparelho de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) modelo Perkin Elmer FT-IR System Spectrum do departamento de química da UFS, com varredura no modo transmissão no intervalo de 4000 cm^{-1} a 450 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} e 100 scans por medida.

3.2.7 Teste de Citotoxicidade *in vitro*

Visando avaliar a biocompatibilidade dos sistemas de fosfatos de cálcio desenvolvidos para atuarem como carreadores de fármacos de ação epidérmica em humanos, foram realizados testes de citotoxicidade em cultura celular para identificar a potencialidade destes sistemas em produzir efeitos letais em células biológicas saudáveis. Os experimentos de citotoxicidade foram realizados com auxílio da aluna de doutorado Cintia Teles orientada pela Dra. Cristina Kurachi do Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos-SP.

Foi utilizada uma linhagem celular de fibroblasto de pele humana (HFF-1). As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e mantidas em estufa a 37°C , sob atmosfera umidificada a 5% de CO_2 . Para o experimento, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, na quantidade de 10^4 células/poço, e incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) e os diferentes pós dos fosfatos de cálcio em meio DMEM sem fenol foi adicionado às células nas concentrações de 0 (controle), 1, 5 e $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ e incubados por 30 minutos.

Depois, as células foram novamente lavadas com PBS e o meio foi trocado para DMEM suplementado. As placas foram incubadas por 24 horas para o estabelecimento do dano. Após esse período, foi feito o teste de viabilidade celular por 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT).

A técnica de MTT é um teste quantitativo empregado para avaliar a interrupção de uma função biológica crítica para a sobrevivência da célula, a atividade mitocondrial. O MTT é um sal solúvel em água que apresenta uma coloração amarelada. Mitocôndrias de células vivas convertem o MTT em formazan, um sal de coloração roxa. Células mortas não causam esta mudança. Assim, o teste fornece uma medida da função mitocondrial que pode ser identificada por absorção óptica em espectrofotômetro e sua absorbância é proporcional à concentração do formazan convertido no interior das células. Logo pode-se estimar a quantidade de células viáveis presentes na amostra ^[75].

Para a realização do teste de viabilidade, as células foram lavadas com PBS e a solução contendo 10% de MTT (Sigma-Aldrich) em meio sem fenol foi adicionada às células, deixando-as incubadas por um período de 3 horas para a conversão dos sais. Após esse período uma solução de isopropanol com 0,04M de HCL foi adicionada para solubilizar o sal de formazana e sua absorbância (570 nm) foi então medida em um espectrofotômetro. Para evitar contaminação, os materiais de fosfato de cálcio foram previamente autoclavados a 121°C por 30 minutos. Todos os testes foram feitos em triplicata. O resultado da porcentagem de viabilidade celular foi obtido seguindo a fórmula:

$$\left(\frac{\text{Absorbância das células avaliadas}}{\text{Absorbância das células do controle}} \right) \times 100$$

CAPÍTULO IV – Resultados e Discussão



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção, serão apresentados e discutidos os resultados experimentais na seguinte sequência: (i) análise de síntese e caracterização das estruturas porosas de fosfatos de cálcio por meio de moldes orgânicos empregados; (ii) caracterização estrutural e aspectos da morfológicos das partículas de fosfatos de cálcio dopados com Európio; (iii) a possibilidade de dopagem de sonda fluorescente de Európio em estruturas de hidroxiapatita porosas; (iv) testes de biocompatibilidade para vinculação das estruturas desenvolvidas em produtos destinados a aplicação cutânea. A luz dos resultados, hipóteses serão lançadas sobre modelos e mecanismos que explicam o comportamento das biocerâmicas de fosfatos de cálcio avaliadas.

4.1.1 Difractometria de raios X do Molde Combinado de Amido-CTAB

Para iniciar o estudo da hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato obtidos via moldes orgânicos desenvolvidos utilizamos medidas difração de raios X para: (i) avaliar fases cristalinas das amostras, (ii) estudar modificações estruturais provenientes da interação entre os fosfatos de cálcio com os moldes, (iii) avaliar qualitativamente via método de Scherrer as tendências de tamanhos dos cristalitos das amostras. Destacamos que as medidas de XRD foram realizadas em sequência (único turno) com as mesmas condições experimentais. A literatura descreve as estruturas cristalinas de três polimorfos de amido, chamadas de tipo A, tipo B e Vh formados após a retrogradação das cadeias do amido [53].

A análise qualitativa dos difratogramas da figura 4.1 (a) revelou que a amostra do filme obtido após gelatinização do amido de milho combinado com C₁₆TAB apresenta fase amorfa. Resultado semelhante foi reportado somente para o gel de amido em [35]. Entretanto, o Amido-CTAB seco a 100°C por 48 horas tende a apresentar um grau de ordenação cristalina com presença de picos estreitos na região de $15^\circ < 2\theta < 28^\circ$. Levando em consideração o difratogramas da figura 4.1 (b) apresentados nos estudos de Buleon, 1998 [53] observa-se que em relação as estruturas dos tipos A e B do amido não é claro as suas presenças na amostra de Amido-CTAB seco, devido ao polimorfo tipo A possuir um pico relativamente intenso em $\sim 2\theta = 14,5^\circ$ e do tipo B apresenta um pico característico em $2\theta = 4^\circ$ que não foi compreendido na região de medida adotada de $10^\circ < 2\theta < 70^\circ$ para as amostras desse estudo.

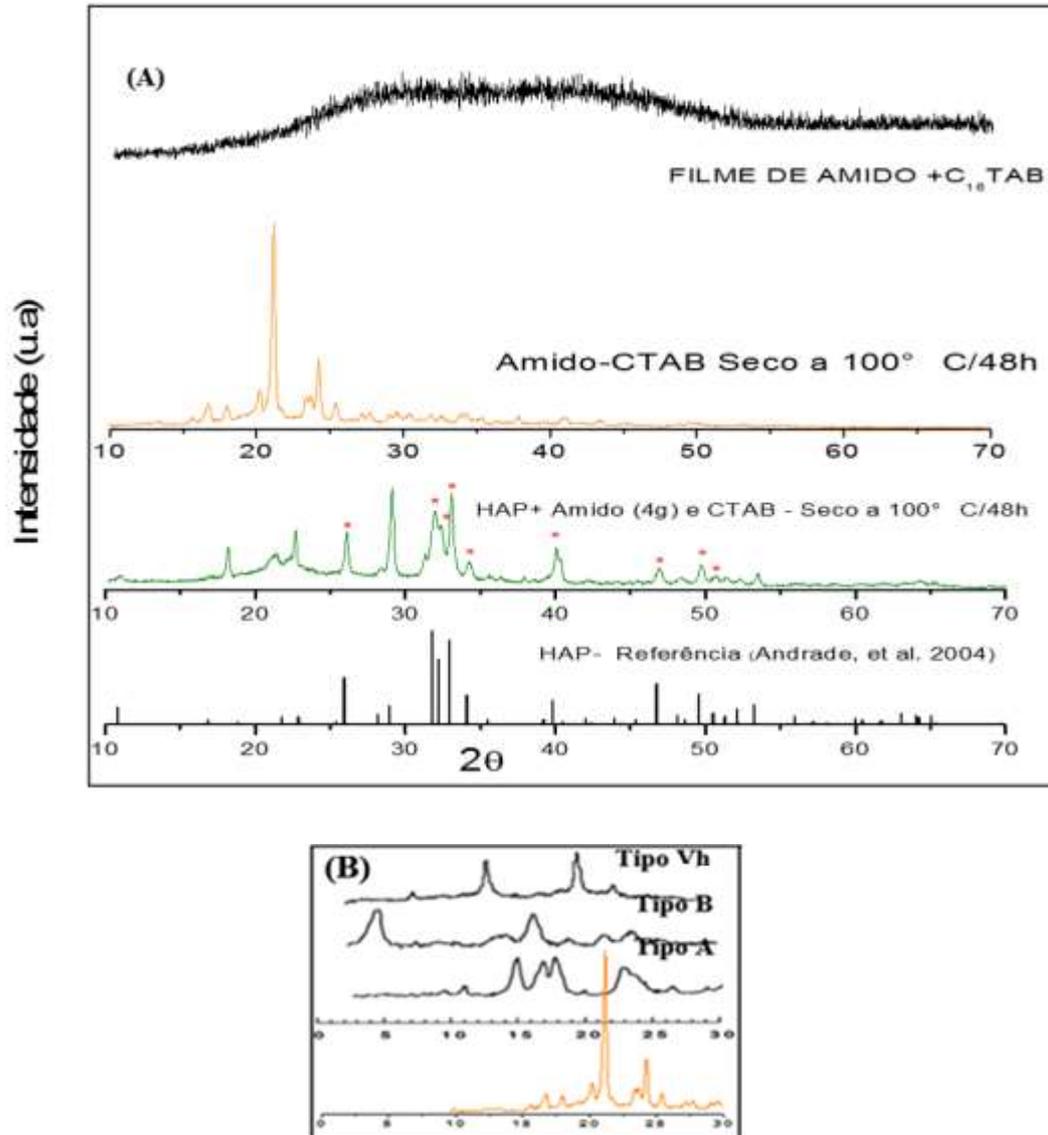


Figura 4.1 - Em (a) estão os difratogramas da amostra de filme de amido+ $C_{16}TAB$ e as amostras de 4 g de Amido seco a $100^{\circ}C$ e HAP mais Amido (4g) -Seco a $100^{\circ}C$ compradas com o padrão de referência da Hidroxiapatita indicado por (*). Em (b) está representado o DRX em 2θ (0° - 30°) adaptado da referência [53] para diferentes polimorfos cristalinos de amido, tipo A, tipo B e Vh.

Outro fato relevante é que no difratogramas da amostra Amido-CTAB o padrão de difração possui poucas semelhanças com os apresentados nos difratogramas dos três polimorfos característico do amido. Isto pode ser uma evidência que o $C_{16}TAB$ interagiu com o amido durante a fase de gelatinização e/ou retrogradação formando um composto orgânico que precisa ser investigado em estudos futuros. Entretanto, o foco dessa tese não é avaliar as estruturas cristalinas dos moldes orgânicos empregados, e sim a eficiência destes moldes na produção de poros em fosfatos de cálcio de interesse, a hidroxiapatita e o β -tricálcio fosfato.

Ainda em relação a figura 4.1 (a), o difratograma de raios X da amostra de HAP+Amido-CTAB seco a 100° apresentou reflexões provenientes das distâncias interplanares dos planos cristalinos pertencentes a família {002} em $2\theta \sim 26^\circ$ e {211} em $2\theta \sim 32^\circ$, {112} em $2\theta = 32,3^\circ$ e {300} em $2\theta = 33^\circ$. Esse resultado revela que os cristais dessa amostras apresentam estrutura hexagonal semelhante ao padrão de difração da hidroxiapatita. Também foi notado nessa amostra não calcinada, somente seca a temperatura de 100° por 48 h, há um aumento significativo da reflexão de raios X em $\sim 2\theta = 33^\circ$ e em $2\theta = 39,9^\circ$ referente as distâncias interplanares dos planos cristalinos da família {300} e {310}. Esse aumento na intensidade das reflexões {300} e {310} em relação aos demais picos do padrão de difração da hidroxiapatita de estrutura hexagonal^[44] pode ser proveniente de um certo grau de orientação de crescimento preferencial dos cristalitos para esses planos. Observação semelhante foi realizada pelo grupo de Moghimian, 2011^[76] que estudou hidroxiapatitas não calcinadas mas produzidas em reações de co-precipitação com temperaturas de soluções superiores a 25°C.

4.1.2. Difractometria de raios X das hidroxiapatitas via molde de CTAB.

Os difratogramas das hidroxiapatitas das amostras produzidas em solução com surfactante C₁₆TAB estão representados na figura 4.2 em comparação com o padrão de XRD da HAp e com a amostra controle. Nesses difratogramas fica claro que após calcinação a 450°/4h a amostra controle, HAP-C, apresentou uma única fase e estrutura da hidroxiapatita hexagonal^[44]. Portanto, o padrão de difração da figura 4.2 confirma que a metodologia aplicada foi eficiente para produzir cristais de hidroxiapatita.

Em relação aos difratogramas da figura 4.2, podemos afirmar que nas amostras produzidas em solução com diferentes concentrações de 30 mM e 120 mM do surfactante C₁₆TAB e submetidas a calcinação de 450°C/4h não foi observado fases adicionais a hidroxiapatita hexagonal. É notado também que a amostra controle apresenta picos mais largos que as demais amostras e isto pode indicar cristalitos menores. Basta observar o perfil do pico das reflexões oriundas da família {002} em $2\theta = 26^\circ$, que é um pico de XRD isolado dos demais, da amostra controle em relação aos picos na mesma posição 2θ das demais amostras.

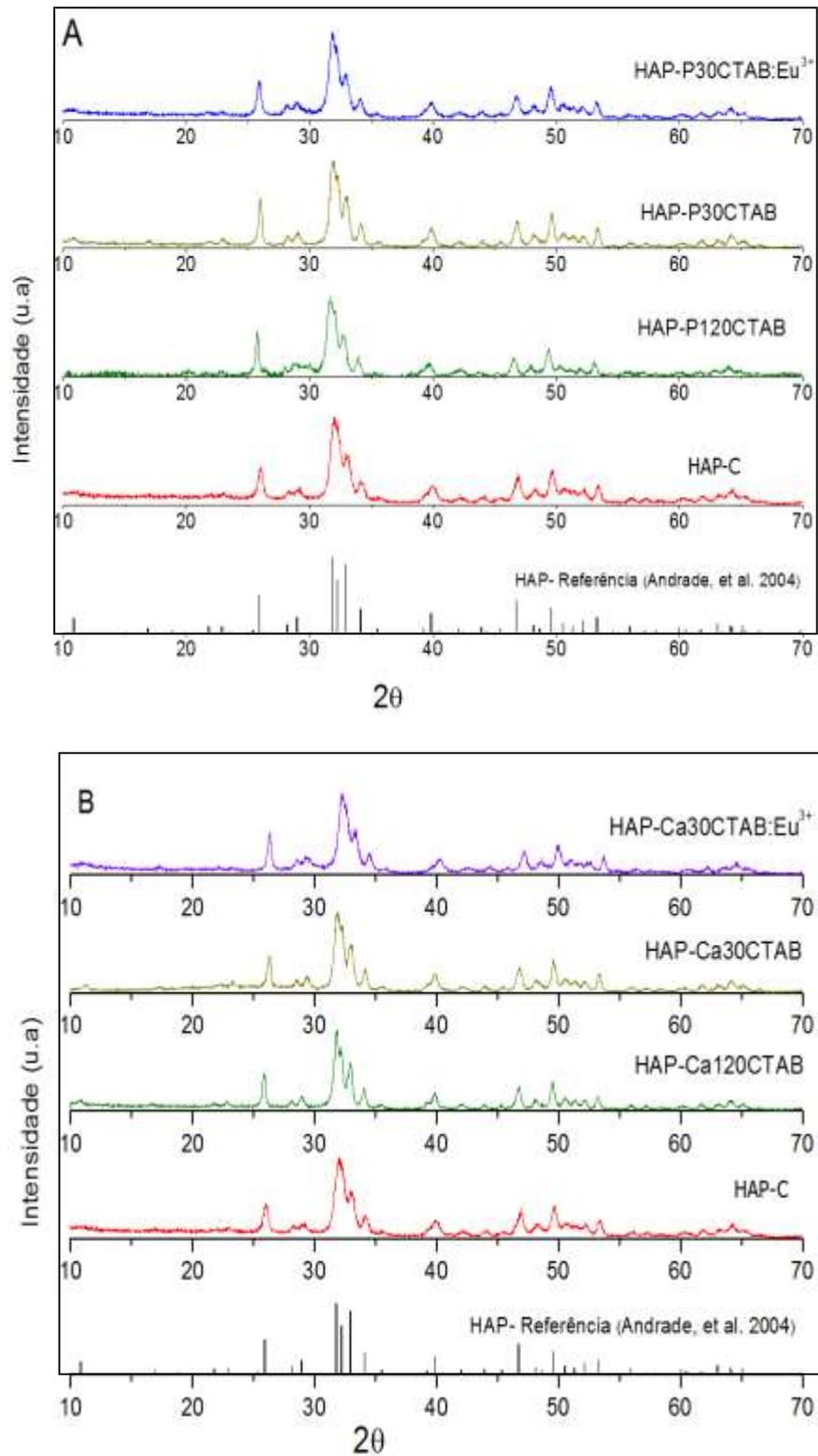


Figura 4.2- Difratoogramas obtidos em sequência com mesmas condições experimental das amostras de hidroxiapatita produzidas em soluções com diferentes concentrações de C_{16}TAB . Em (a) estão representadas as amostras obtidas com gotejamento da solução fonte de Ca^{2+} na solução fonte de fosfato e em (b) estão as amostras com gotejamento da solução de PO_4^{3-} na solução de cálcio.

Para melhor fundamentar essa discussão, utilizaremos o modelo de Scherrer da equação 4.1 para estimar e acompanhar os tamanhos médios dos cristalitos nas amostras investigadas. Esse modelo leva em consideração a largura à meia altura (FWHM) dos principais picos de difração (β), em radianos, o comprimento de onda dos raios X incidente (λ), o ângulo de Bragg (θ_β) dos principais picos isolados do difratograma e a constante K , conforme discussão previamente detalhada no Capítulo três desta Tese.

Nas estimativas das distribuições de tamanho de cristalitos foi considerado o valor de 0,94 para a constante K de Scherrer, uma vez que estima-se que as amostras podem ser constituídas por cristais que apresentem uma ou duas dimensões distorcidas pelo processo de tratamento térmico aplicado e que o padrão de difração apresente picos com distribuição gaussiana [77:78].

$$D = \frac{k \lambda}{\beta \cos \theta_\beta} \quad (4.1)$$

Para efeito desse estudo foi feito algumas ponderações nas estimativa de análise da tendência de tamanhos de cristalitos: (i) foi descontado a parcela do alargamento instrumental (β_{inst}) obtidas de uma amostra padrão e microcristalina de LaB_6 submetida nas mesmas condições experimentais de medida de XRD das nossas amostras, (ii) as medidas das amostras foram realizadas em sequência em mesmo turno e nas mesmas condições experimentais.

Também, vale a pena ressaltar que os valores da tabela 4.1 calculados para o valor definido da constante K não devem ser encarados como tamanhos absolutos dos cristalitos por dois motivos principais: i)- a microdeformação não foi considerada e ela pode também provocar alargamento dos picos do difratograma de raios X, e ii)- a forma dos cristalitos e a distribuição de tamanhos ainda não é conhecida, e portanto, não é possível saber com precisão qual valor K deve ser adotado na estimativa por Scherrer. No entanto, os valores das tabelas podem ser usados para indicar uma tendência geral do tamanho de cristalitos para efeitos comparativos entre as amostras e melhor embasar a discussão dos resultados.

Tabela 4.1 - Tamanho médio dos cristalitos das amostras preparadas com C₁₆TAB em diferentes concentrações, considerando $K=0,94$.

Amostra	{002} (26°)	{202} (34,2°)	{203} (46,8°)	Tamanho médio (desvio da média)
HAP-C	11,12	8,48	10,73	10,1 (1,2)
HAP-Ca30CTAB	18,16	16,10	11,65	15,3 (2,8)
HAP-Ca30CTAB:6%EU	17,3	23,36	17,66	19,4 (3,6)
HAP-Ca120CTAB	13,84	13,13	11,63	12,8 (1,2)
HAP-P30CTAB	13,84	11,65	10,47	11,9 (1,7)
HAP-P120CTAB	11,56	12,30	10,46	11,4 (1,9)
HAP-P30CTAB:6%Eu	10,36	14,00	10,35	11,5 (2,1)

Conforme os tamanhos médios dos cristalitos estimados por Scherrer expostos na tabela 4.1 observa-se que a amostra HAP-C após calcinação a 450°/4h apresenta os menores tamanhos relativos de cristalitos, enquanto que as amostras HAP-Ca30CTAB e HAP-Ca120CTAB produzidas pelo gotejamento de PO₄³⁻ sobre soluções fontes de íons Ca²⁺ e C₁₆TAB apresentaram na figura 4.2 (b) picos de difração mais estreitos à meia altura que são indícios de maiores tamanhos relativo de cristalitos dentre as amostras analisadas. Este mesmo efeito não é observado para amostras HAP-P30CTAB e HAP-P120CTAB com mesma ordem de gotejamento da amostra controle HAP-C. Neste caso, os tamanhos são todos parecidos com o da amostra controle, dentro das incertezas experimentais. Este resultado pode ser um indício do efeito da ordem de gotejamento sob o tamanho das partículas.

Em relação as amostras dopadas com 6 mol% de Eu³⁺ (vide figura 4.2 (a) e (b)) os tamanhos médios dos cristalitos são muito próximos aos estimados na amostra HAP-C, se considerado as incertezas. Nessa concentração de dopante não foi observado a formação de fases cristalinas adicionais, o que indica a dissolução do Eu(III) na rede hospedeira das hidroxiapatitas.

Na figura 4.3 está representado os difratogramas da figura 4.2 (b) ampliado para região 24°<2θ<52° onde é percebido o deslocamento relativo de picos para ângulos maiores das amostras HAP-Ca30:Eu³⁺ e HAP-Ca30CTAB em relação as amostras HAP-C e padrão de referência de Andrade e colabores, 2004^[44] constante na ficha ICSD-151414. Esse deslocamento de alguns picos para ângulos maiores pode significar variações nas distâncias interplanares em uma das direções de planos cristalinos e tamanho final de cristalitos. Apesar das sessões seguintes desta tese discutir os resultados da análise da estrutura local dos sítios de

Cálcio, Fosfato e Európio, este último para amostras dopadas, existentes na hidroxiapatita com $C_{16}TAB$, é importante para estudos futuros realizar uma investigação por refinamento Rietveld e obter a correlação entre as variações das distâncias interplanares com o cálculo dos parâmetros de cela unitária das amostras apresentadas na figura 4.3 preparadas com 30 mM de $C_{16}TAB$.

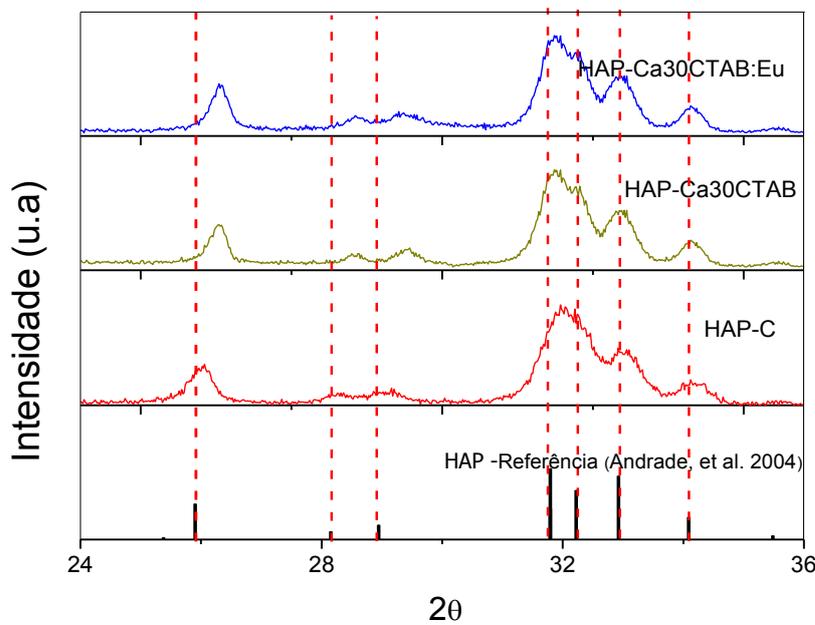


Figura 4.3 – Comparação entre os difratogramas obtidos das amostras de hidroxiapatitas produzidas com adição de $C_{16}TAB$ e a rota de síntese da amostra controle HAP-C e padrão ICSD-151414.

4.1.3 Difractometria de raios X e FT-IR das hidroxiapatitas com Amido e Amido-CTAB

Os padrões de difração das amostras de hidroxiapatitas produzidas em solução com Amido (4g) e Amido (4g) - $C_{16}TAB$ estão representados na figura 4.4. Uma avaliação da tabela 4.2 que representa os tamanhos médios estimados pela equação 4.1 de Scherrer revela que: (i) os tamanhos médios relativos dos cristalitos da amostra HAP-Amido 4g são bastantes semelhantes a amostra HAP-C. Nesse caso não foi perceptível fases adicionais ao padrão de referência da hidroxiapatita hexagonal, isto pode demonstrar que o arcabouço orgânico formado da combinação entre Amido e 120mM $C_{16}TAB$ não alterou a estrutura da hidroxiapatita; (ii) a amostra HAP-ACCA apresenta formação de cristalitos maiores do que os da amostra HAP-ACPO que apresentou estimativa de tamanho de cristalitos próxima a amostra HAP-Amido 4g.

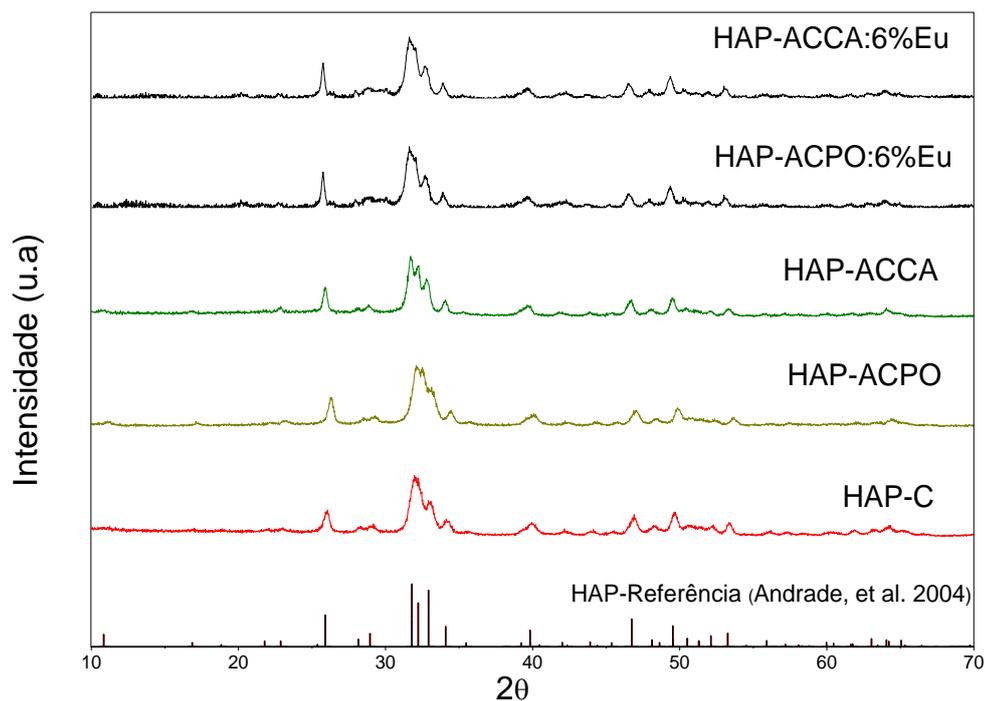


Figura 4.4 - Difratomogramas das amostras puras e dopadas com Eu^{3+} produzidas em solução com Amido-CTAB comparadas com a amostra controle HAP-C.

Realizando uma comparação entre os tamanhos médios relativos dos cristalitos entre a amostra HAP-ACCA com a amostra HAP-Amido 4g, que diferem entre si apenas na adição de 120 mM de C_{16}TAB e inversão da ordem de gotejamento durante a reação de co-precipitação, fica claro, mais uma vez, que a presença do C_{16}TAB e a ordem de gotejamento de Ca^{2+} na solução fonte de PO_4^{3-} pode ter contribuído com o aumento das dimensões relativas dos cristalitos de hidroxiapatita na amostra HAP-ACCA.

Tabela 4.2- Tamanho médio dos cristalitos das amostras com o molde combinado de Amido e C_{16}TAB considerando $K=0,94$.

Amostra	{002} (26°)	{202} (34,2°)	{203} (46,8°)	Tamanho médio (desvio da média)
HAP-C	11,12	8,48	10,73	10,1 (1,2)
HAP-Amido 4 g	9,70	12,86	11,46	11,3 (2,1)
HAP-ACCA	17,38	22,16	14,86	18,1 (4,2)
HAP-ACPO	10,20	10,89	9,92	10,3 (0,4)
HAP-ACCA:6%EU	17,10	22,86	14,20	18,0 (4,1)
HAP-ACPO:6%EU	10,60	10,25	9,62	10,1 (0,5)

Na ordem de gotejamento inversa de íons $(\text{PO})_4^{3-}$ sob solução fonte de íons Ca^{2+} junto com C_{16}TAB ($\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{CTAB}$) é proposto que o C_{16}TAB interagisse menos com íons $(\text{PO})_4^{3-}$ do que nas amostras produzidas pela ordem de gotejamento usual: gotejamento de solução fonte de íons Ca^{2+} sob uma solução resultante da mistura prévia durante 20 minutos entre $(\text{PO})_4^{3-}$ e C_{16}TAB a 74°C . Neste sentido, para a rota de gotejamento inversa a interação PO_4^{3-} e C_{16}TAB não seria favorecida por uma etapa de mistura antes da reação de co-precipitação e a expectativa seria de observar resultados de cristallitos próximos a amostra controle sem C_{16}TAB . Entretanto, os resultados em termos de tamanhos de cristallitos foram bem diferentes entre as amostras.

Uma possível hipótese é: o $(\text{PO})_4^{3-}$ quando gotejado sob C_{16}TAB e Ca^{2+} pode conectar-se mutuamente com o C_{16}TAB e Ca^{2+} . Os espaços físicos ocupados pelas micelas de C_{16}TAB de 2 nm a 10 nm de diâmetros ^[55] ancoradas a alguns sítios de $(\text{PO})_4^{3-}$ durante a nucleação da hidroxiapatita podem favorecer o surgimento de espaços entre as unidades primitivas de hidroxiapatita. Durante os tratamentos térmicos subsequentes o C_{16}TAB é extraído e vazios aleatórios são formados, isto pode beneficiar energeticamente o crescimento dos cristallitos de fosfatos de cálcio. Complementado a análise da tendência de tamanho de cristallito para amostras produzidas com Amido-CTAB, as amostras dopadas com 6 mol% de Eu^{3+} apresentaram mesma tendência de tamanho de cristallito que as amostras puras. Amostra HAP-ACCA: 6% Eu^{3+} apresentou o maior tamanho de cristallito dentre as amostras dopadas.

O espectro de FT-IR das amostras não dopadas, HAP-ACCA e HAP-ACPO, e controle HAP-C estão representadas na figura 4.5. A análise dos espectros de infravermelho das amostras de hidroxiapatita confirma a presença do sítio de fosfato PO_4^{3-} pela assinatura dos: (i) modos de estiramento assimétrico ν_3 do P-O em 1092 e 1030 cm^{-1} e do modo de estiramento simétrico ν_1 em 960 cm^{-1} ; (ii) modos do grupo O-P-O observados em 602 , 563 cm^{-1} (deformação angular assimétrica ν_4) e 475 cm^{-1} (deformação angular simétrica ν_2). As bandas típicas da água adsorvida estão presentes em 1642 cm^{-1} e nas proximidades de 3440 cm^{-1} . Uma indicação da presença de impurezas de carbonatos CO_3^{2-} são os picos de 876 cm^{-1} (ν_2), 1413 cm^{-1} e 1451 cm^{-1} (ν_3), que são de intensidade bem reduzida, sugerindo amostras com hidroxiapatitas levemente carbonatadas ^[79].

A incorporação de grupos carbonatos na hidroxiapatita é bem conhecida e é favorecida pelo método de produção de co-precipitação das soluções de íons base ^[80]. Neste processo grupos carbonato podem ser incorporação a HAP advindos do ácido carbônico (H_2CO_3)

formado naturalmente na interação da água da solução com o CO_2 da atmosfera. O CO_2 da atmosfera pode ser incorporado a qualquer solução aquosa através da reação com o grupo OH^- livres da solução formando ácido carbônico H_2CO_3 , posteriormente este ácido possui a capacidade de dissociação em meio aquoso liberando o grupo carbonato na solução onde acontece a formação da fase cristalina da hidroxiapatita.

Apesar da identificação dos modos vibracionais dos grupos de carbonatos e fosfatos serem relevantes para o melhor entendimento da formação da rede cristalina da hidroxiapatita, o foco da análise por FT-IR é identificar a presença de estruturas orgânicas do molde combinado de Amido-CTAB nas amostras de hidroxiapatita após tratamento térmico. Neste sentido foi acrescentado na figura 4.5 o espectro da amostra Amido-CTAB seco para identificação dos modos vibracionais da cadeia orgânica e complementar os resultados das análises de XRD das amostras preparadas com Amido-CTAB. A caracterização dos modos vibracionais será feita com base na estrutura de amido, já que ela é bem mais densa que a estrutura do C_{16}TAB .

O amido possui estrutura em cadeia $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ com pontos de ramificação por ligações glicosídicas do tipo $\alpha\text{-D-(1,6)}$. No espectro de FT-IR da figura 4.5 da amostra Amido-CTAB fica evidente a deformação de CH_2 em 2920 e 2850 cm^{-1} que está compreendido na região característica do estiramento dos modos C-H em 2800-3000 cm^{-1} presentes no amido conforme descrito na literatura [81,82]. A intensidade relativa destes modos vibracionais dependem da relação entre amilose e amilopectina. Quanto maior a quantidade de amilose maior a intensidade das bandas na região 2800-3000 cm^{-1} . Dentre os amidos naturais, o amido de milho é o que apresenta maior quantidade de amilose e esta assinatura pode servir para definir se o molde combinado de Amido-CTAB é sacrificado ou não após o processo de tratamento térmico submetido nas amostras. O estiramento do modo O-H do amido está representado na região de 3000 a 3600 cm^{-1} e também em 1644 cm^{-1} , esse último é relacionado com a presença de água adsorvida em regiões amorfas do amido [81]. Como os espectro de FT-IR das amostras de HAP-ACCA e HAP-ACPO da figura 4.5 não apresentam bandas de modos vibracionais na região de 2800-3000 cm^{-1} , isto é um indício de que o molde combinado Amido-CTAB é sacrificado durante o tratamento térmico necessário para formação da fase cristalina da hidroxiapatita. Este resultado de FT-IR combina bem com os resultados de XRD previamente discutidos, onde já não indicam a presença dos moldes orgânicos após o processo de calcinação das amostras. A presença dos modos da ligação C-O-H em 1094 cm^{-1} e C-C em 1163 cm^{-1} do amido nas amostras HAP-ACCA e HAP-ACPO não puderam ser identificados devido à alta intensidade do estiramento P-O em 1092 e 1030 cm^{-1} proveniente da rede da hidroxiapatita.

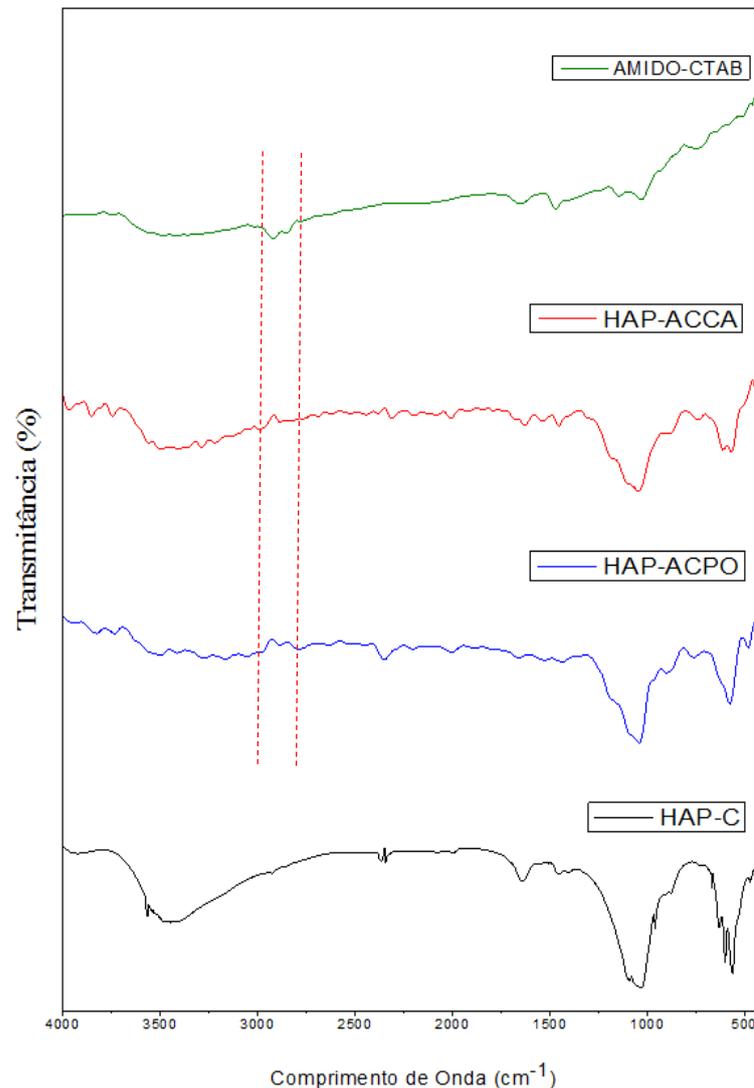


Figura 4.5 – Espectros de FT-IR das amostras de hidroxiapatita produzidas em solução com Amido-CTAB e calcinadas a 450°C/4h e amostras do controle HAP-C e Amido-CTAB seco.

4.1.4 Difractometria de raios X do β -TCP produzidas com Amido-CTAB e somente CTAB

O padrão de DRX da amostra β -TCP controle está representado na figura 4.6. Esta amostra apresenta fase única com estrutura cristalina romboédrica semelhante ao padrão de Dickens e colaboradores (1974)^[48] adotado para β -tricálcio fosfato. Este padrão de difração confirma que a metodologia de síntese empregada foi eficiente para obter na amostra controle uma estrutura cristalina de β -tricálcio fosfato sem contaminação da fase precursora de hidroxiapatita deficiente em cálcio.

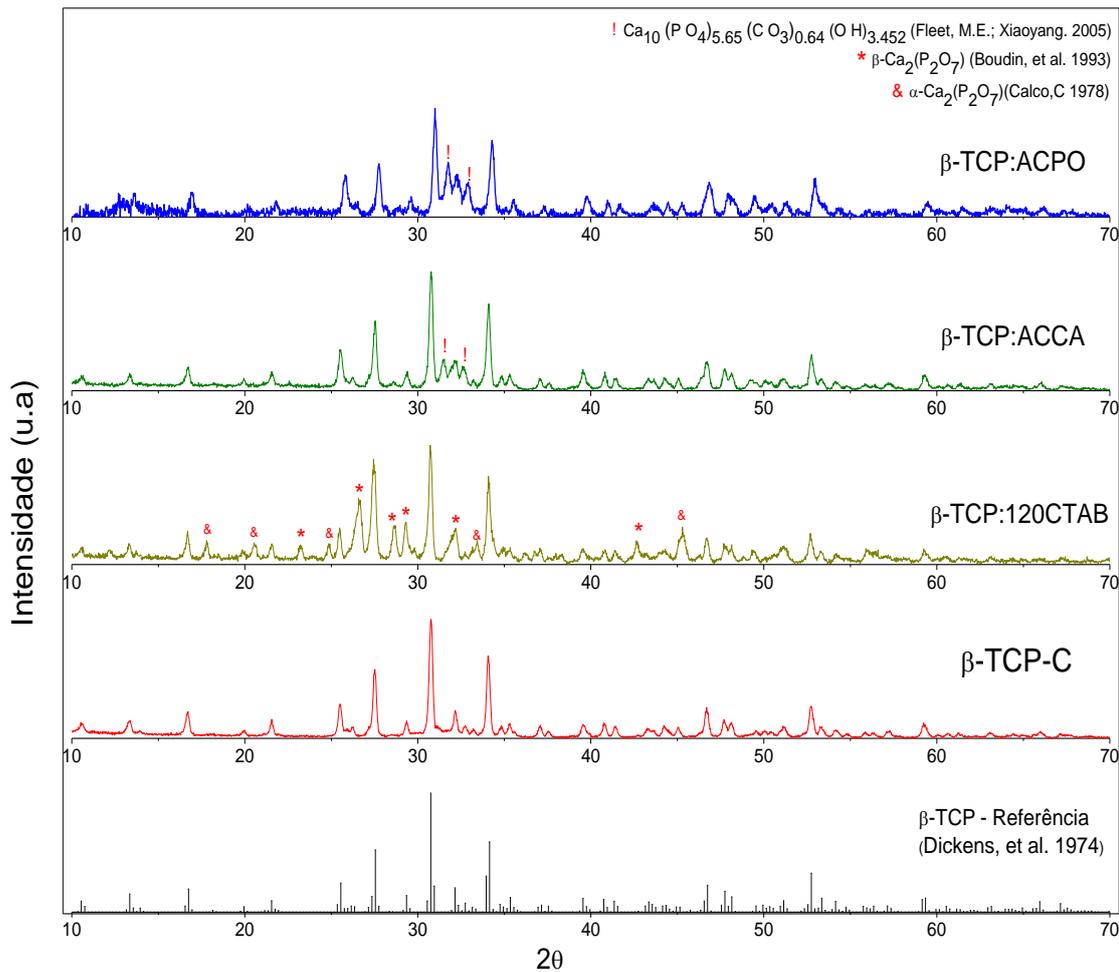


Figura 4.6- Padrões de DRX das amostras de β -tricálcio fosfato produzidas em meio de Amido-CTAB e somente CTAB comparadas com o DRX da amostra controle de β -TCP-C e padrão de difração de Dickens (1974).

Na amostra β -TCP:120CTAB produzida em com solução de 120mM de $C_{16}TAB$ foram observadas fases de pirofosfatos de cálcio (β - $Ca_2(P_2O_7)$ [83] e α - $Ca_2(P_2O_7)$ [84]) junto com a fase de interesse. A hipótese é que essas fases podem ser provenientes da segregação de grupos de íons PO_4^{3-} com as micelas de $C_{16}TAB$ que não participam da formação de β -tricálcio fosfato. Logo, a razão Ca/P de 1,5 para o β -tricálcio fosfato fica comprometida o que não é de interesse para este estudo, já que queremos produzir apenas fase única de β -tricálcio fosfato. O sistema formado por PO_4^{3-} - $C_{16}TAB$ é instável e o $C_{16}TAB$ é extraído com aumento progressivo da temperatura de calcinação. O íon fosfato perde um oxigênio através da reação $2PO_4^{3-} \rightarrow (P_2O_7)^{4-} + O_2$ promovendo a formação de $P_2O_7^{4-}$, e sua inserção na rede cristalina pode formar β - $Ca_2(P_2O_7)$ próximo a $800^\circ C$ [85].

Ainda, é observado no difratograma da amostra β -TCP:120CTAB a presença de picos relacionados a fase adicional de pirofosfato α - $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$ que é somente obtida em elevadas temperaturas de calcinação a cima de 1250°C [85]. Entretanto neste estudo todas as amostras de β -TCP forma submetidas a temperatura de calcinação máxima de 800°C .

A origem desta fase não pode ser entendida completamente e futuramente novos estudos devem ser feitos para investigar o motivo da estabilização do pirofosfato α - $\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$ em temperatura tão baixa. No entanto, é importante lembrar que não é parte do trabalho produzir esta fase, apesar desta fase possuir baixa razão $\text{Ca}/\text{P}=1$ o que facilita a degradação da rede cristalina em meio de fluido biológico [1][42].

Já as amostras β -TCP:ACCA e β -TCP:ACPO produzidas em soluções com Amido-CTAB apresentaram fase adicional de hidroxiapatita carbonatada que pode ser atribuída a incorporação de grupos carbonatos CO_3^{2-} por dois mecanismos: (i) dissociação de H_2CO_3 em meio reativo formado naturalmente na interação de OH^- livres na solução com o CO_2 da atmosfera e (ii) grupos carbonatos provenientes da decomposição da matriz orgânica do molde de combinado Amido-CTAB com a elevação da temperatura de calcinação para 800°C . Os fosfatos de cálcio que possuem na sua estrutura impurezas como grupos carbonatados apresentam maior velocidade de degradação em fluido biológico, fato desejável nesse estudo [42].

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As observações de imagens de SEM-FEG, via sinais dos elétrons secundários gerados próximo a superfície das amostras, trazem a possibilidade de um estudo com boa resolução pontual da formação de poros em escala meso e macro, como também conhecimento da morfologia e tamanho das nanopartículas das amostras de fosfatos de cálcio. A figura 4.7 (a) representa a magnificação de 65.000 X enquanto que (b) representa uma magnificação de 160.000 X das partículas contidas na amostra de HAP-C obtida após calcinação a $450^\circ\text{C}/4\text{h}$.

É possível constatar que a rota de co-precipitação beneficia a forte aglomeração de partículas o que afeta a morfologia final das partículas. Entretanto é possível notar nas figuras 4.7 que as partículas assumem nestas condições de precipitação uma morfologia de esferoides distorcidos com dimensões radiais da ordem de ~ 30 a 50 nm.

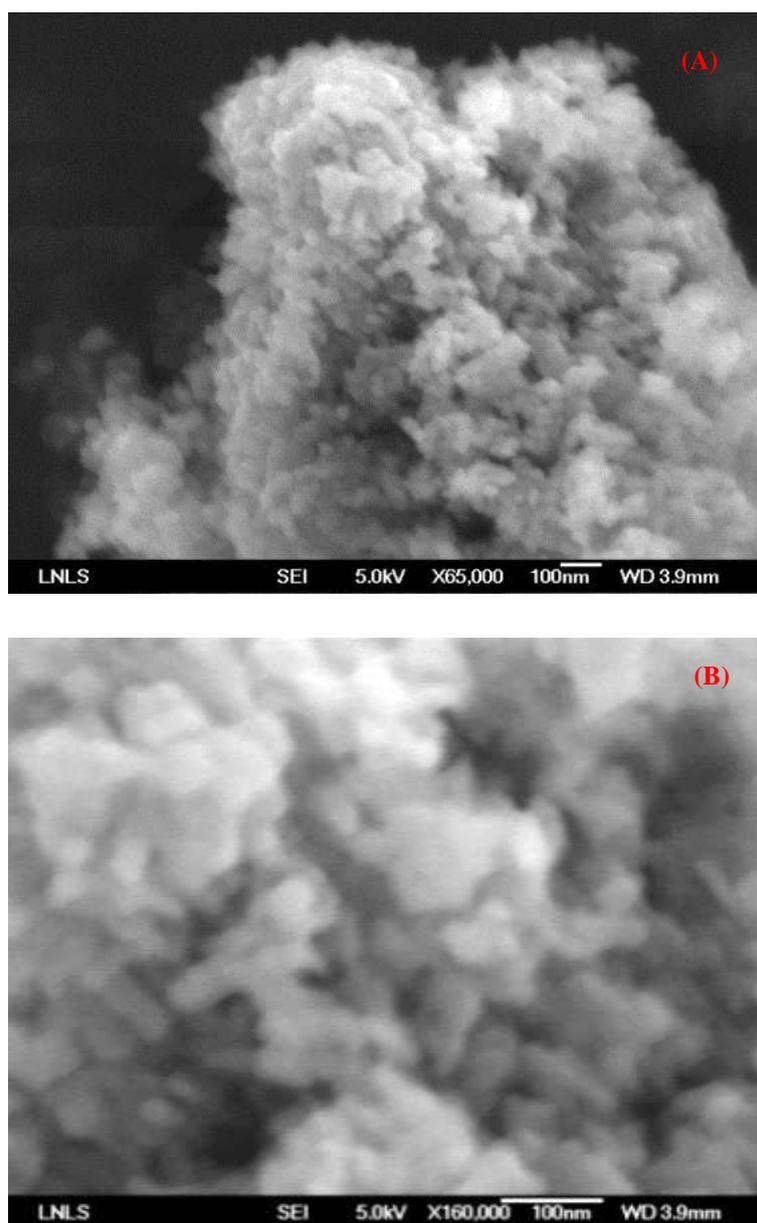


Figura 4.7 - Microscopias eletrônica de varredura das partículas da amostra controle HAP-C com forte agregação e morfologias de esferoides distorcidos com partículas ~30 a 50 nm.

As imagens de SEM das amostras de hidroxiapatitas produzidas na presença do molde de C₁₆TAB estão dispostas nas figuras 4.8 e 4.9. Nestas microscopias com diferentes magnificações mostra que o C₁₆TAB promove um crescimento longitudinal das partículas presentes da amostra controle HAP-C (ver figura 4.7), uma vez que as partículas formadas assemelham-se a bastões.

A literatura propõe [55] que as micelas de C₁₆TAB submetidas a interação com PO₄³⁻ formem uma estrutura orientada de núcleo esferoide longitudinal preenchido em suas paredes por sítios de PO₄³⁻ e posteriormente recobertos com Ca²⁺. Neste caso o C₁₆TAB molda o crescimento das partículas de hidroxiapatita. As partículas destas amostras apresentam comprimento longitudinal de 380 nm a 45 nm. Entretanto, nas microscopias dessas amostras não foram observados locais com poros ou arranjo com distribuição ordenada de porosidade. Por análise da microscopias da figura 4.8 e 4.9 é possível constatar que as partículas estão aglomeradas de forma aleatória

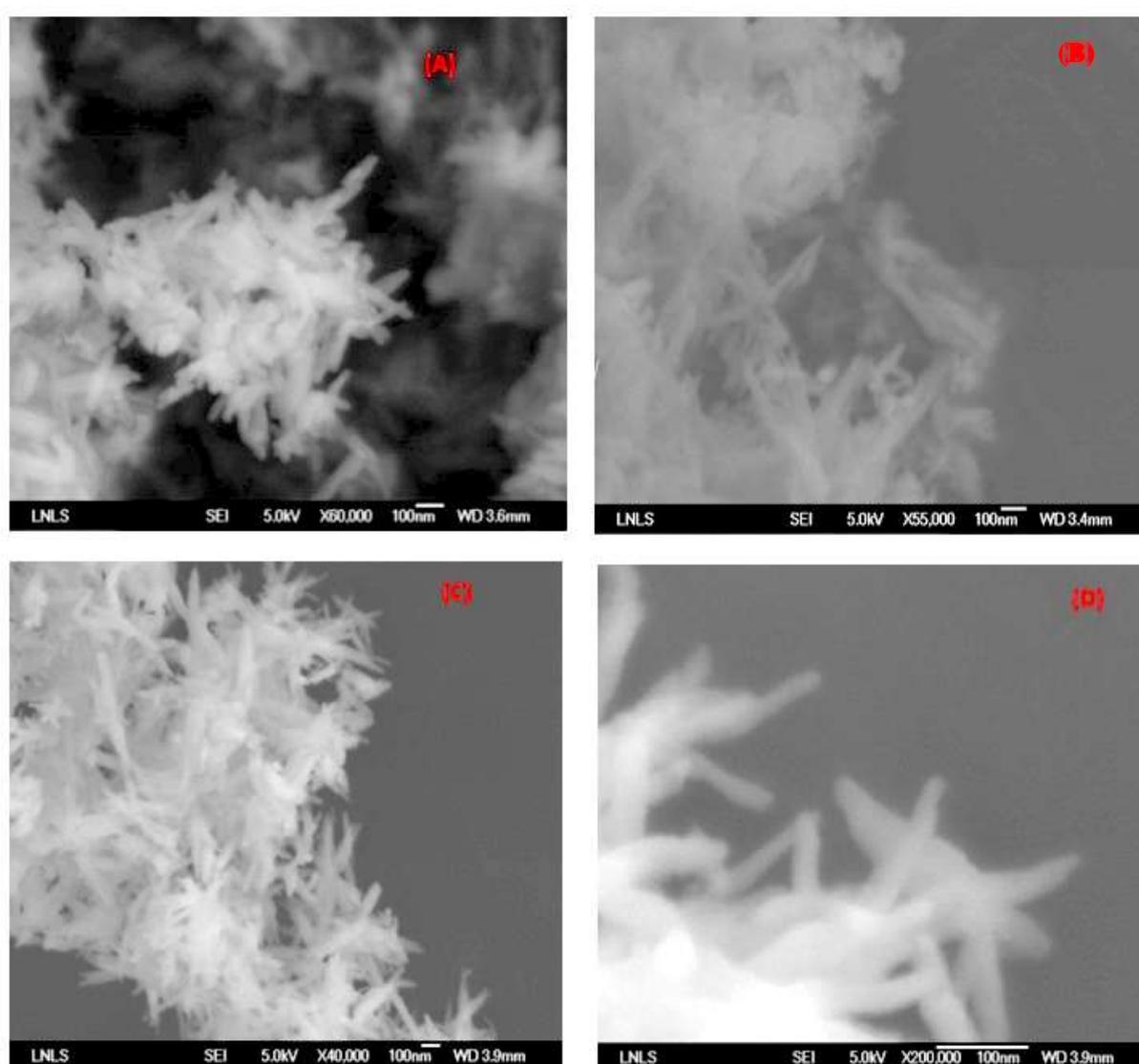


Figura 4.8- Em (a) microscopia da amostra HAP-P30CTAB em 60.000 X em (b) HAP-P120CTAB a 50.000 X; já em (c) 40.000X e (d) 200.000X de magnificação das partículas das amostras de HAP-P30CTAB:6%Eu³⁺.

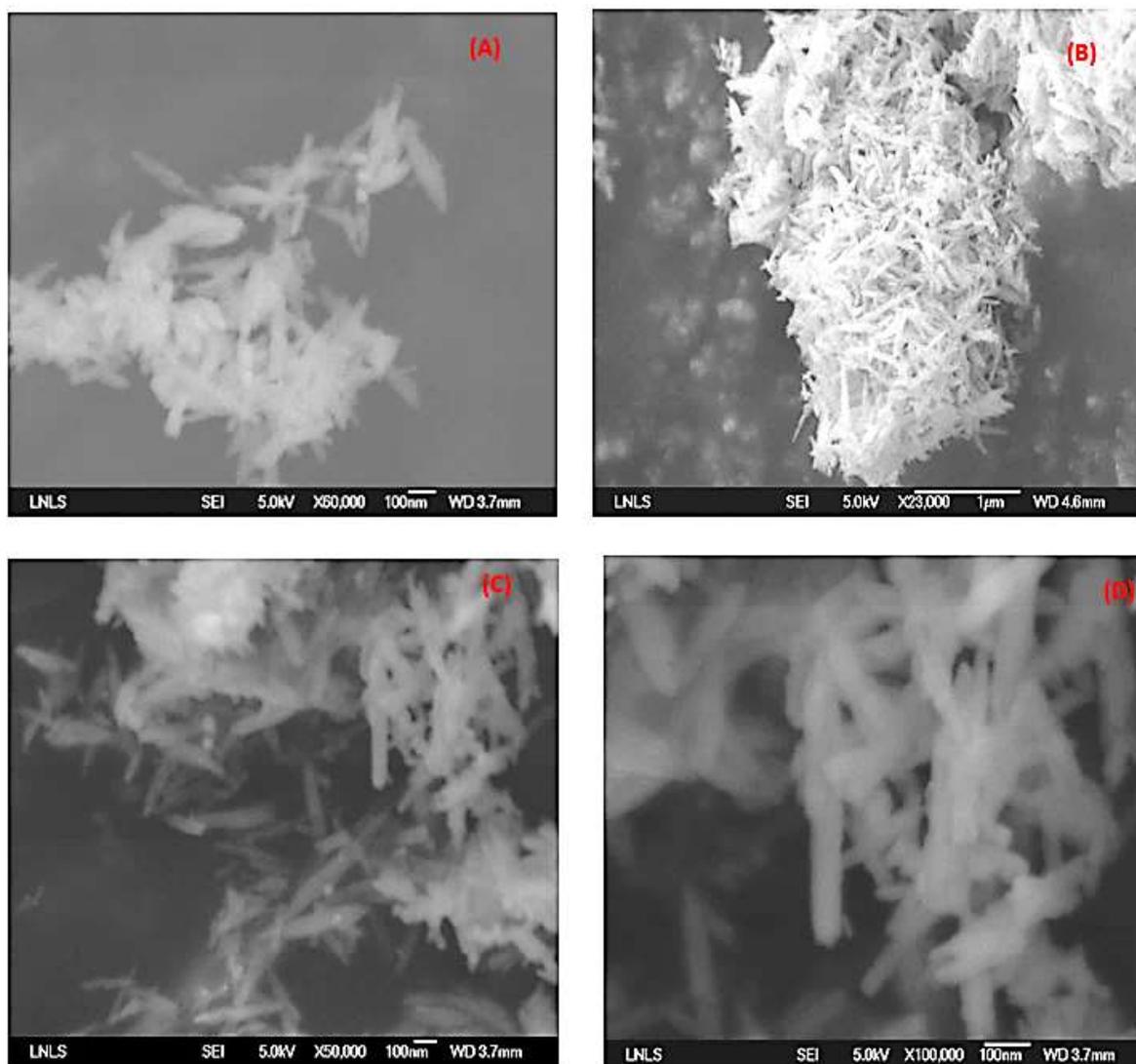


Figura 4.9- Em (a) e (b) microscopia das amostras HAP-Ca30CTAB e HAP-Ca120CTAB com aumento de 60.000 X; já em (c) 50.000X e (d) 100.000X de magnificação das partículas de HAP-Ca30CTAB:6%Eu³⁺.

É percebido com as imagens das figuras 4.8 (c) e 4.9 (c) que a dopagem com 6mol% de európio(III) não altera a morfologia de bastão das amostras produzidas na presença do C₁₆TAB. Apesar das amostras produzidas em solução com o surfactante não apresentarem locais com distribuição de poros após calcinação a 450°C/4h, destacamos que em SEM-FEG as regiões de análises são delimitadas pela ponta de prova do feixe de elétrons incidentes. Logo, é necessário de medidas mais amplas dessas amostras por SAXS para analisar o sistema como um todo. Conforme discutido no capítulo 2 e 3 desta tese, também foi proposto um segundo molde para formar poros em fosfatos de cálcio. Este segundo molde provém da combinação entre C₁₆TAB e amido de milho.

Para estudos de microscopia as amostras produzidas deste molde foram secas a $100^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. As microscopias dessas amostras foram obtidas no microscópio de varredura de baixo vácuo (SEM-LV) ©JEOL-6510 LV do Centro Multiusuário de Nanotecnologia - CMNano - UFS após a deposição de Au. A figura 4.10 mostra em diferentes aumentos a disposição lamelar das longas cadeias com $2\mu\text{m}$ a $4\mu\text{m}$ de espessura do material orgânico consolidado.

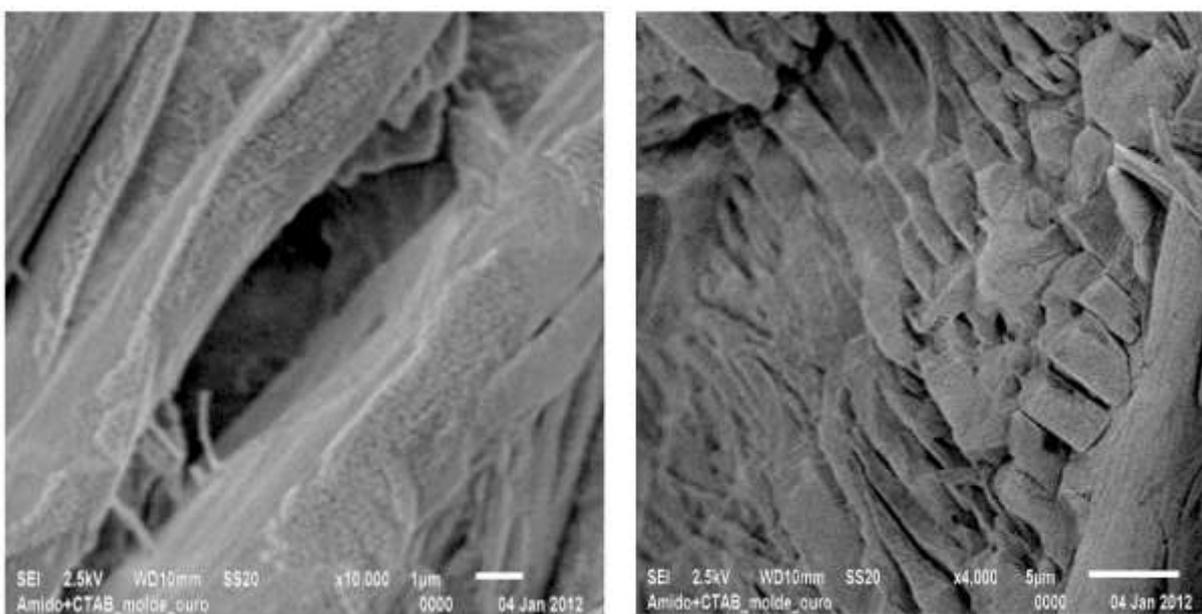


Figura 4.10- Imagens de microscopia eletrônica de varredura em diferentes aumentos 10.000X e 4.000X e da amostra Amido-CTAB Seco a 100°C e recoberto por ouro (Au).

A distribuição lamelar promovida pela sedimentação das cadeias de amilose e amilopectina forma interstícios propícios a serem ocupados por solução de reação contendo micelas do surfactante (C_{16}TAB), conforme especulado no esquema da figura 4.11. Estes interstícios podem confinar moléculas de CO_3^{2-} liberadas pela dissociação de H_2CO_3 em meio reativo. Logo, os interstícios interlamelares das microscopias apresentadas na figura 4.11 aliado a forma estrutural de cadeias orgânicas do molde Amido-CTAB sustentam a hipótese do mecanismo de incorporação de CO_3^{2-} previamente discutido na sessão dos resultados de XRD das amostra $\beta\text{-TCP: ACCA}$ e $\beta\text{-TCP: ACPO}$. A figura 4.11 ainda retrata, de forma esquemática, a estratégia de formação de hierarquia de porosidade que estabelece a formação conjunta de meso e macroporos nos fosfatos de cálcio.

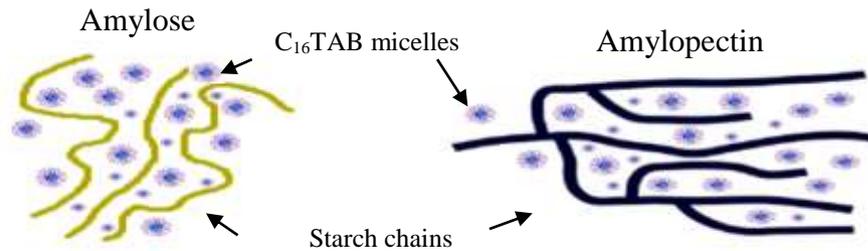
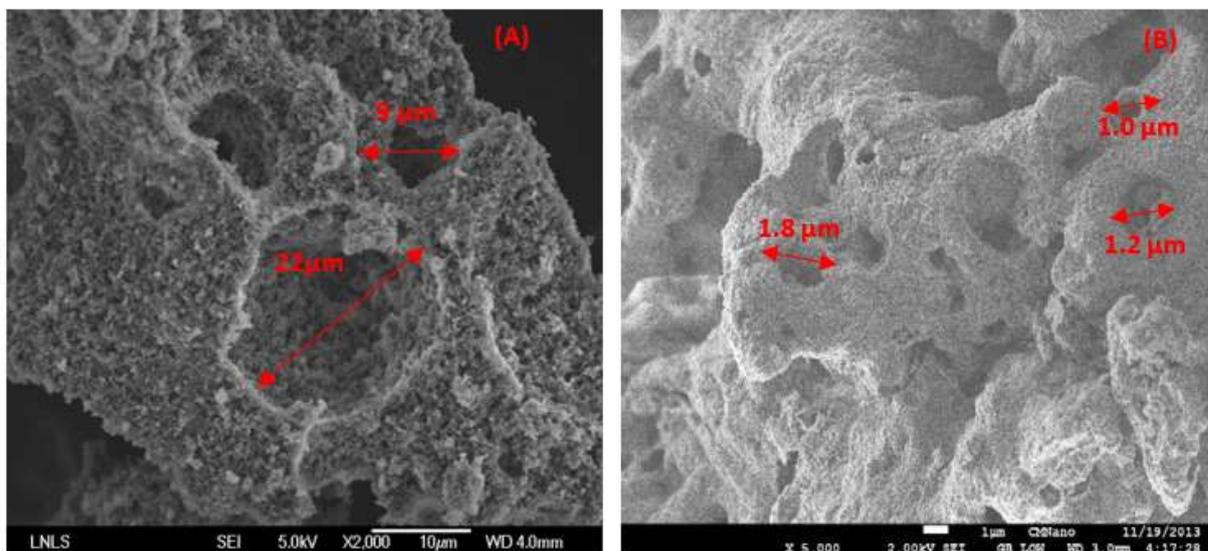


Figura 4.11- Representação esquemática do Amido-CTAB após intumescimento e gelatinização dos grãos de amido de milho.

As figuras 4.12 e 4.13 mostram as microscopias em diferentes ampliações das amostras de HAP- ACPO e HAP- ACCA, respectivamente. Já a figura 4.14 apresenta as imagens da amostra HAP-Amido 4g. Foi alcançado a formação de poros com o molde do combinado de Amido-CTAB e ainda foi obtida a desejada periodicidade do arranjo poros em três dimensões na hidroxiapatita. É revelado nas figuras 4.12 – 4.14 os efeitos das cadeias de amido após o processo de gelatinização e tratamentos térmicos. Essas cadeias promovem o surgimento arranjos conectados por macroporos após um tratamento térmico de 450°C/4h das amostras.

É proposto que o emaranhado biopolimérico formado pela segmentação das cadeias do amido durante a gelatinização restringe os espaços na solução de reação promovendo um grau de ordenação entre as partículas e favorece um ambiente de orientação promovendo a conexão de poros com diferentes diâmetros. Logo, as cadeias de amido intensifica a formação e manutenção da distribuição de porosidade mesmo após calcinação a 450°/4h.



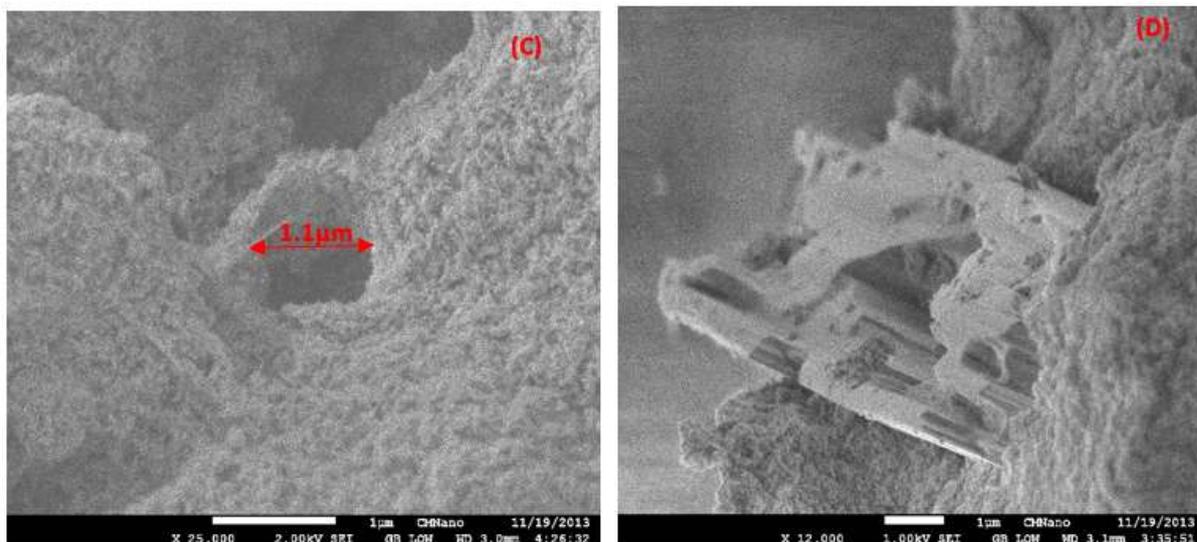


Figura 4.12 - Imagens da amostra HAP-ACPO com canais de macroporos de diferentes tamanhos em ordem crescente de magnificação 2.000X, 5.000X e 25.000X. Em (d) é observado uma estrutura de superfície lisa na superfície semelhante a lamelas de amido observada em figura 4.10 que geram os canais de macroporos.

Uma conexão bem definida entre os canais de poros favorece a manutenção de todo o arranjo poroso, bem como, a incorporação e liberação de fármaco. Esta definição é nítida figura 4.13 (c) da amostra HAP- ACCA onde observa-se uma interface bem delimitada entre os macroporos de \varnothing 230-380 nm e as partículas. As estruturas que orientou o crescimento das partículas em torno dos macroporos são as lamelas de amido observadas nas microscopias da figura 4.10. Estrutura semelhante também foi detectada na superfície da amostra HAP-ACPO conforme figura 4.12 (d). Esta microscopia mostra que ainda podem ocorrer resquícios de amido mesmo após o processo de calcinação das amostras em temperatura de 450°C/4h.

A presença de amido na microscopia 4.12 (d) poderá ser melhor investigado com análise química por EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva) que será feito em estudos futuros. Entretanto a hipótese de permanência de cadeias de amido após tratamento térmico não foi sustentada por resultados XRD e FT-IR dessa amostra. Conforme a figura 4.14 (a) da amostra HAP-Amido 4g, produzida sem adição de C₁₆TAB, somente as cadeias de amido segmentadas na gelatinização já são suficientes para estruturar um molde de macroporos com diâmetros de \sim 1 μ m a 200 nm na hidroxiapatita.

A sequência da figura 4.14 (b), (c), (d) e (e) revela a formação de uma região com poros espacialmente ordenados em três dimensões. Nestas microscopias é observado a existência de estruturas com diferentes dimensões de poros, $\approx 2\mu\text{m}$ a 40nm , o que provoca uma porosidade hierárquica com macro ($\varnothing > 50\text{ nm}$) e mesoporos ($2\text{ nm} < \varnothing < 50\text{ nm}$). Portanto, os estudos de SEM indica que a hierarquia de porosidade também é alcançada com adição do amido na rota de co-precipitação da hidroxiapatita. Esse resultado sugere a grande potencialidade do emprego do amido de milho em desenvolver sistemas porosos com hierarquia de porosidade. Entretanto com estes resultados de microscopia eletrônica de varredura não se pode afirmar que o ordenamento dos poros é reproduzido a grande alcance ou se limita a uma pequena região da amostra. Para responder a essa questão, medidas de espalhamentos de raios X a baixos ângulos (SAXS) são analisados na seção seguinte00.

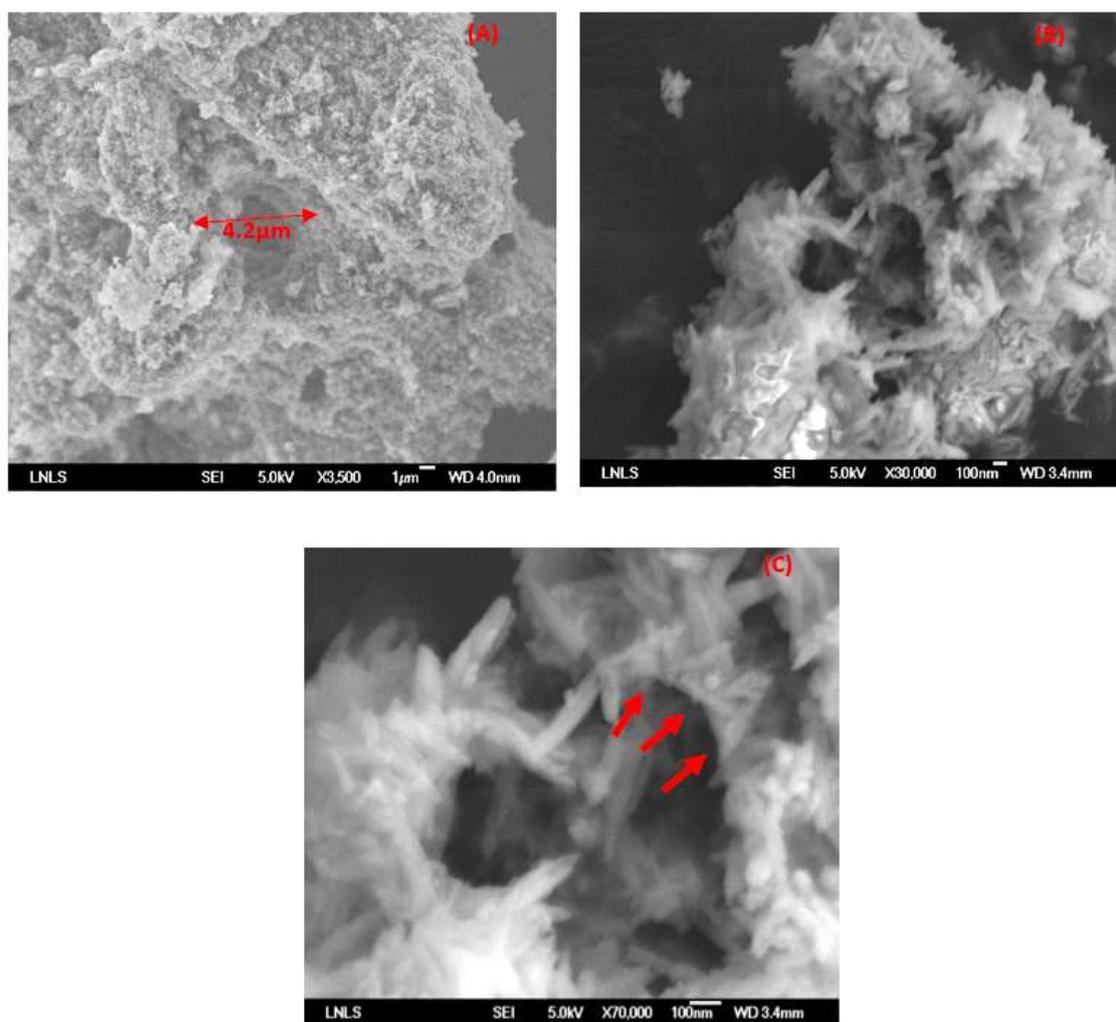


Figura 4.13 - Em (a) e (b) detalhes dos macroporos da HAP-ACCA com magnificação de 3.500 X e 30.000X. Em (c) ampliação de 70.000X dos macroporos com interface definida.

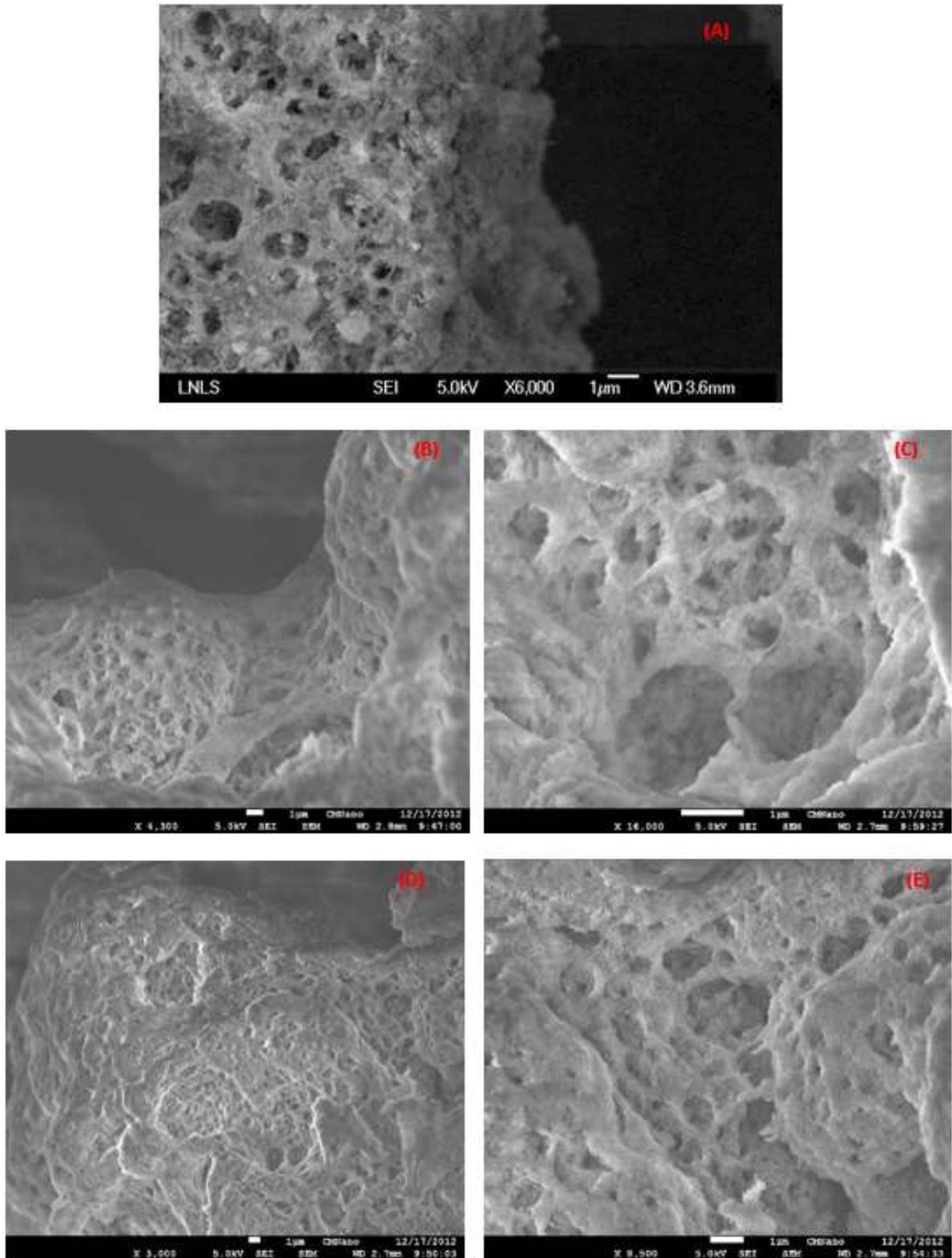
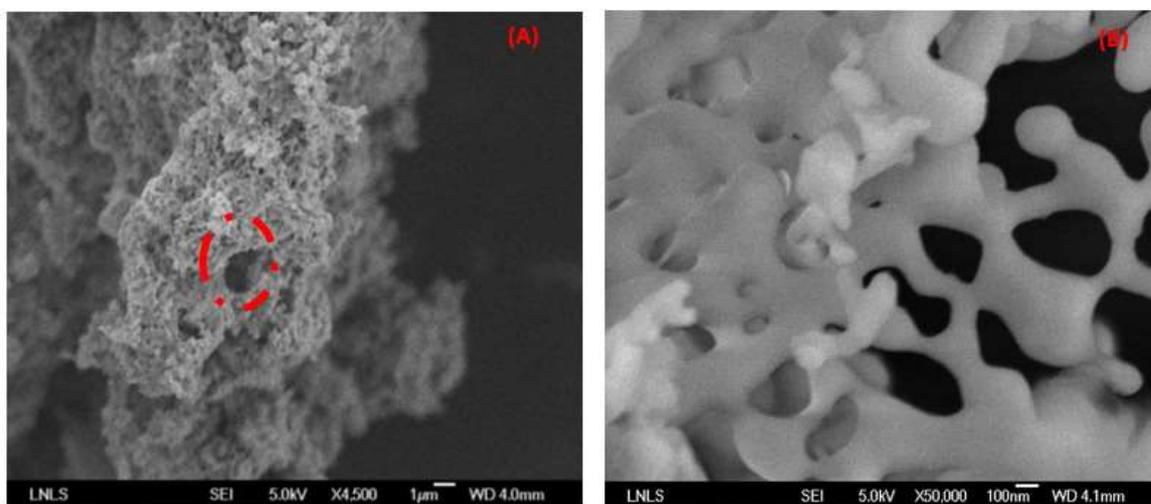


Figura 4.14 – Imagens de microscopia com diferentes ampliações de regiões da amostra HAP-Amido 4g. Em especial (c) e (e) imagens de maior ampliação mostram a formação de um arranjo poroso com alto grau de ordenamento dos poros e uma rede com vasta distribuição de macroporos e mesoporos orientados em três dimensões.

O β -tricálcio fosfato com hierarquia de porosidade também é objeto de estudo desta Tese. As imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras produzidas com molde Amido-CTAB estão apresentadas na figura 4.15 para amostra β -TCP-ACCA e figura 4.16 para amostra β -TCP-ACPO. Por sua vez, as amostras produzidas sem nenhum tipo de molde orgânico de Amido-CTAB ou C_{16} TAB estão representadas nas microscopias da figura 4.17. Analisando as microscopias das figuras 4.15 e 4.16 é possível constatar, em primeiro momento, a potencialidade do molde Amido-CTAB na formação de hierarquia de porosidade com macro e mesoporos de diâmetros entre 1,2 μ m a 35 nm. Entretanto quando é analisado as imagens das amostras produzidas sem molde orgânico do β -TCP-C amostra controle na figura 4.17, também é notável a mesma correlação espacial e existência de poros entre as partículas observada nas microscopias das amostras produzidas com Amido-CTAB. Ou seja, não é conclusivo como nas amostras de hidroxiapatita o papel do molde orgânico de Amido-CTAB para formar porosidade em amostras de β -TCP.

Apesar da imagem 4. 15 (a) apresentar um canal de macroporos da ordem de $\sim 2 \mu$ m e a figura 4.15 (b), (c) e (d) e 4.16 (b) e (d) mostra partículas conectadas por macroporos de 50 nm a 280 nm o fato é que, aparentemente, as amostras de β -TCP com e sem molde orgânico apresentam uma distribuição de porosidade formada pela simples correlação espacial das partículas promovida pela coalescência desordenada. Isto leva a crer que o emprego do Amido-CTAB como molde de macroporos em β -TCP não é tão eficiente quanto foi para amostras de hidroxiapatitas calcinadas a $450^\circ\text{C}/4\text{h}$. Tanto as amostras produzidas com ou sem molde Amido-CTAB apresentam poros.



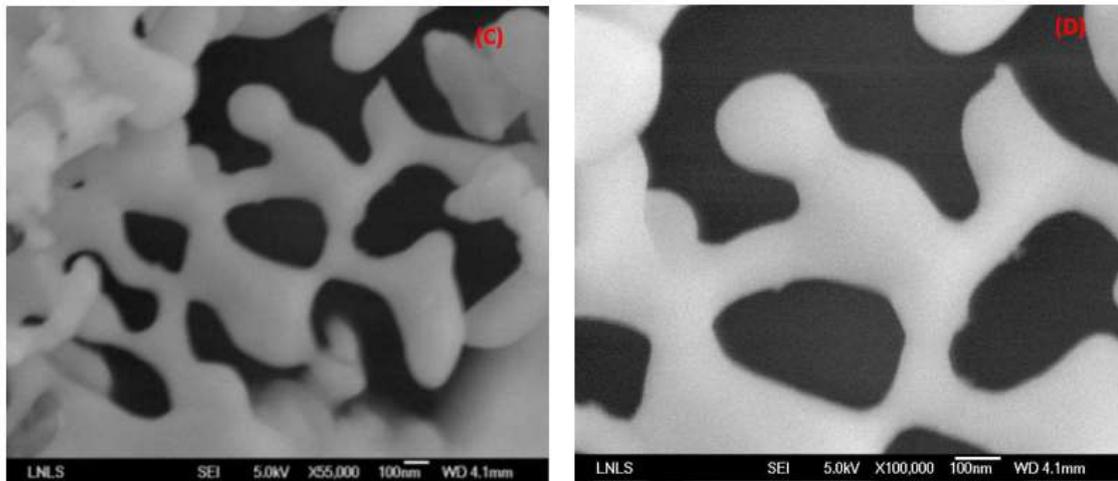


Figura 4.15 - Imagens da amostra β -TCP-ACCA em ordem crescente de magnificação, em (a) é percebido a existência de um canal de poro com \varnothing de 1,2 μ m, já em (c) e (d) com maior magnificação é percebido a distribuição espacial de macroporos em duas dimensões entre as partículas de β -TCP.

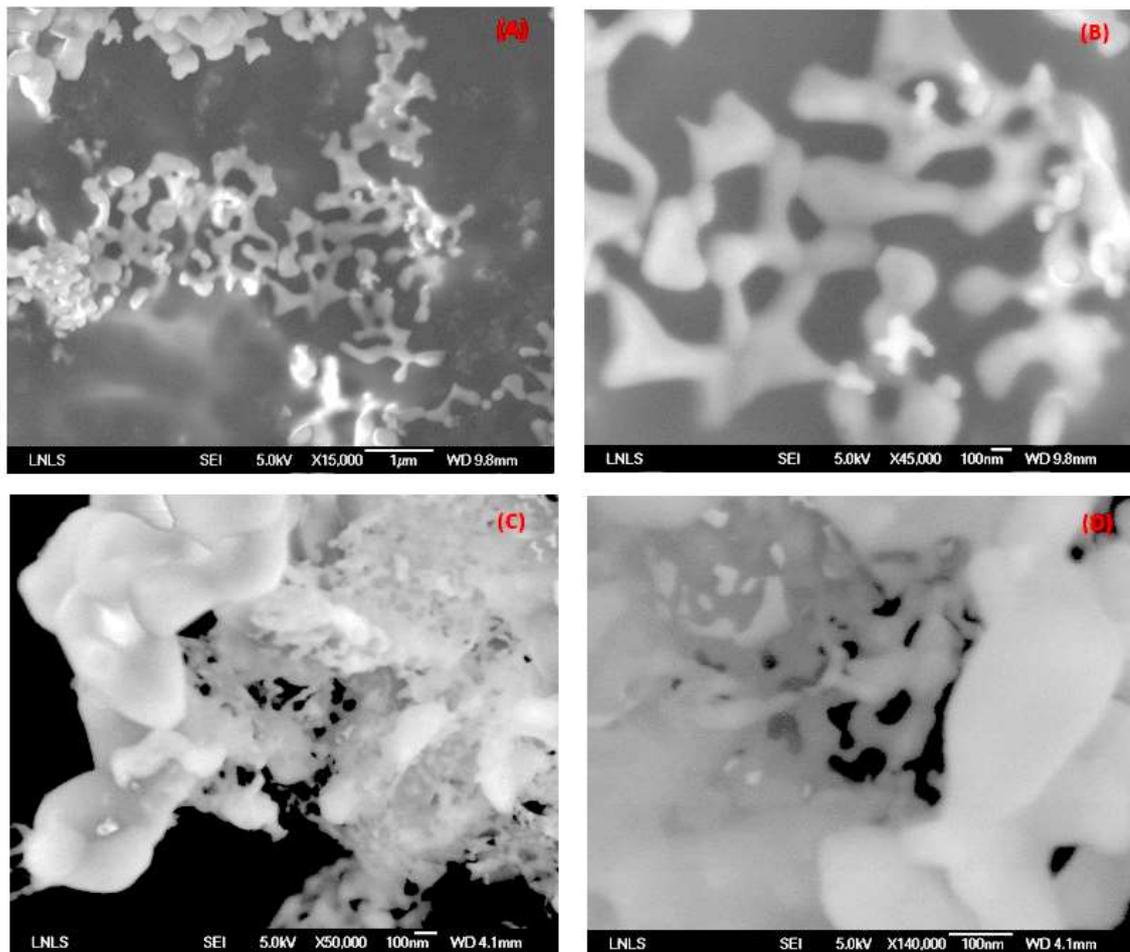


Figura 4.16 - Imagens da amostra β -TCP-ACPO em ordem crescente de aumento 15.000X, 45.000X, 50.000X e 140.000X referentes aos detalhes da hierarquia e ordenação da porosidade.

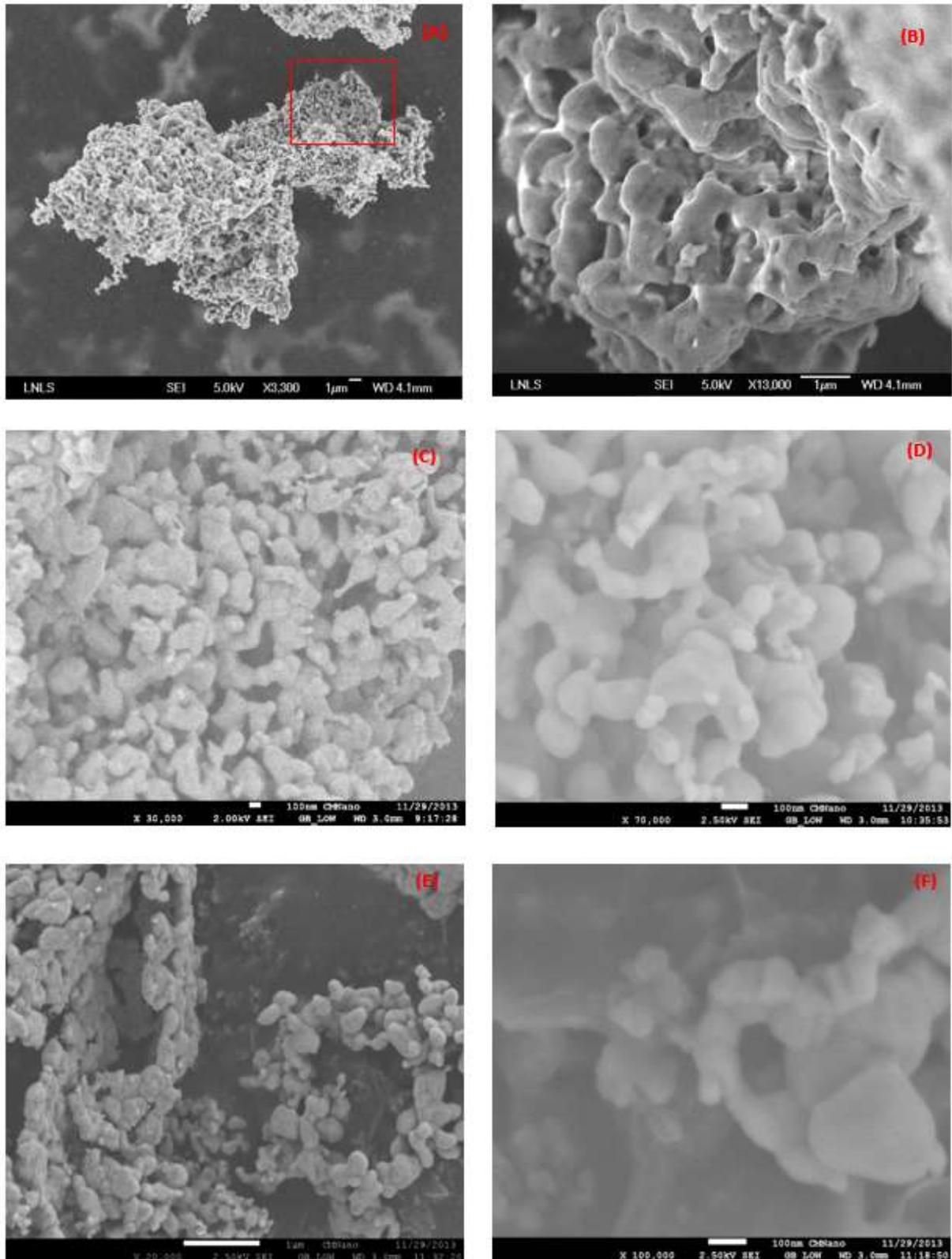


Figura 4.17 - Imagens em diferentes regiões da amostra controle β -TCP-C com diferentes magnificações. Em (b) ampliação da área representada em (a) com partículas achatadas em camadas conectados por poros, em (c) e (d) poros distorcidos e partículas orientadas aleatórias, já em (f) está a representação de um poro bem definido com ≈ 110 nm formado pela conexão de partículas nanométricas.

A grande diferença entre as mostras de hidroxiapatita e as de β -TCP é a diferença de 350°C na etapa de calcinação. Isto pode fazer toda a diferença no papel do amido em delinear os poros no β -TCP. A literatura reporta [86] que o amido de milho começa a perder água em ~ 70°C e o início da degradação do amido de milho ocorre quando a temperatura aplicada excede 300 °C [87]. Logo, a alta temperatura de calcinação das amostras em 800°C inviabiliza a capacidade do amido de milho de intensificar a porosidade em fosfatos de cálcio a temperaturas tão elevadas.

Se o amido de milho começa a despolimerização quando a temperatura aplicada excede 300° ainda teremos um intervalo de 500° para alcançar a temperatura necessário para obter a fase cristalina do β -TCP. Neste intervalo a grande maioria dos poros formados podem entrar em colapso ou serem distorcidos pela coalescência desordenada das partículas, e isto coloca as amostras produzidas com molde Amido-CTAB no mesmo patamar das amostras produzidas sem adição deste molde orgânico. A diferença de 500°C existentes entre o início do processo de degradação do amido e a temperatura de calcinação do β -TCP potencializa a carbonização das cadeias orgânicas do amido de milho o que favorece o surgimento de fases adicionais de hidroxiapatitas carbonatadas no XRD das amostras de β -TCP.

Entretanto para resultados mais conclusivos é necessário em estudos futuros uma análise por adsorção de nitrogênio da área superficial específica obtidas por BET (Brunauer Emmet e Teller) e conhecer o volume ocupado pela porosidade tanto da amostra controle, β -TCP-C, quanto das amostras produzidas com molde orgânico, β -TCP-ACCA e β -TCP-ACPO.

Fato interessante acontece com a microscopia da amostra β -TCP-Amido 4 g representada na figura 4.18. Esta amostra produzida somente com 4g de amido apresentou poros em dimensões muito maiores que apresentadas nas imagens das amostras anteriores de β -TCP. Neste caso, a vinculação somente do amido na solução de co-precipitação do β -TCP favorece o crescimento de poros. Para esta amostra os poros só foram visualizados em microscopias de baixa magnificação 43X e 150X. Em altas magnificações o padrão de porosidade encontrada é a mesma das figuras 4.17 para amostra de β -TCP-C controle. A figura 4.18 (b) mostra um aglomerado de partícula distorcida formando uma estrutura de elevada porosidade na escala micrométrica. Esta estrutura pode ser empregada como *scaffolds*, grandes microestruturas porosas compostas por nanopartículas, e aplicado na medicina para vinculação de culturas de células aplicadas na regeneração óssea ou crescimento de tecido como já reportado por [38;39].

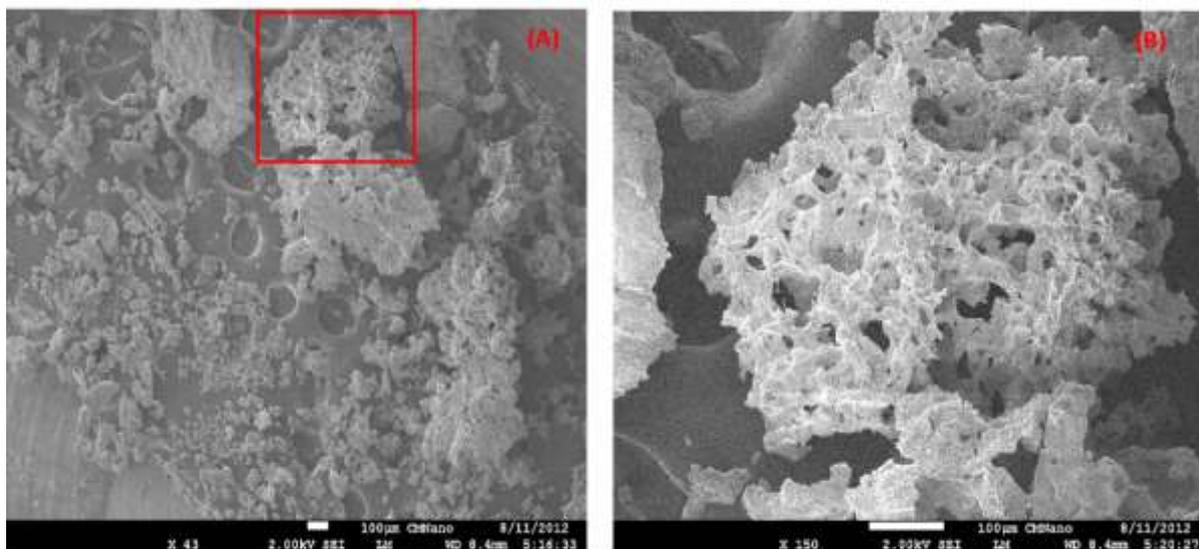


Figura 4.18- Imagens em 43X e 150X do arranjo poroso de escala micrométrica da amostra β -TCP-Amido 4 g. Em (b) está representado a região de ampliação indicada em (a).

4.3 Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos (SAXS) e Ultra Baixos Ângulos (USAXS)

Os resultados de espalhamento a baixos ângulos de raios X estão divididos em três partes. A primeira parte está relacionada com a discussão sobre a relação da dopagem com Európio e crescimento dos centros espalhadores. A segunda está focada na discussão da viabilidade do $C_{16}TAB$ para obtenção de porosidade e a terceira parte dedicada aos resultados de USAXS visa avaliar o grau de ordenamento, e distribuição da porosidade das amostras produzidas com Amido-CTAB.

Os compostos inorgânicos polidispersos apresentam limitações a técnica de SAXS, tais como a necessidade de uniformidade de formas e tamanhos, interfaces bem definidas, individualidade espacial e ausência de interferência entre partículas. Apesar dessas limitações, foi empregado SAXS para complementar os resultados SEM-FEG e detectar nas amostras de hidroxiapatita produzidas com molde de 120mM de $C_{16}TAB$: (i) a formação de mesoporos com ordenamento de longo alcance; (ii) a morfologia e distribuição de tamanho das partículas para amostras em pó (sistema concentrado) e sistema bifásico com partículas em suspensão em água destilada na proporção amostra em pó/ solvente de 1:20.

Para sistemas concentrados ou com grau de aglomeração de partículas a intensidade de espalhamento $I(q)$ depende das contribuições do fator forma $P(q)$ e da estrutura $S(q)$ criada pela correlação espacial das partículas. Para sistemas muito pouco concentrados têm-se $S(q) = 1$. Na figura 4.19 (a) está representado o gráfico $\ln I(q) \times q^2$ para $q < 0,02$ (\AA^{-1}) das amostras dopadas com Eu^{3+} e produzidas com C_{16}TAB suspensas em água na proporção 1:20. Já a figura 4.19 (b) representa as medidas de sistema concentrado, amostras na forma de pó. A região de baixos q ($q \rightarrow 0$) é regrada pela aproximação de Guinier ^[69;70].

$$I(q) = I(0)e^{-(q^2 R_g^2)/3} \quad (4.2)$$

Na equação 4.2 R_g é o raio de giro do centro espalhador em relação ao centro de gravidade da distribuição eletrônica. A apresentação do perfil da não linearidade nas curvas de SAXS para baixos q da figura 4.19 (a) e (b), é devido a existência de polidispersividade do sistema em dois fatores: (i) aglomeração e (ii) dispersão dos tamanhos dos centros espalhadores. Este resultado está de acordo com as observações anteriores feitas na seção de SEM-FEG, onde já era notado a forte aglomeração de partículas gerada pela rota de co-precipitação escolhida para produzir fosfatos de cálcio.

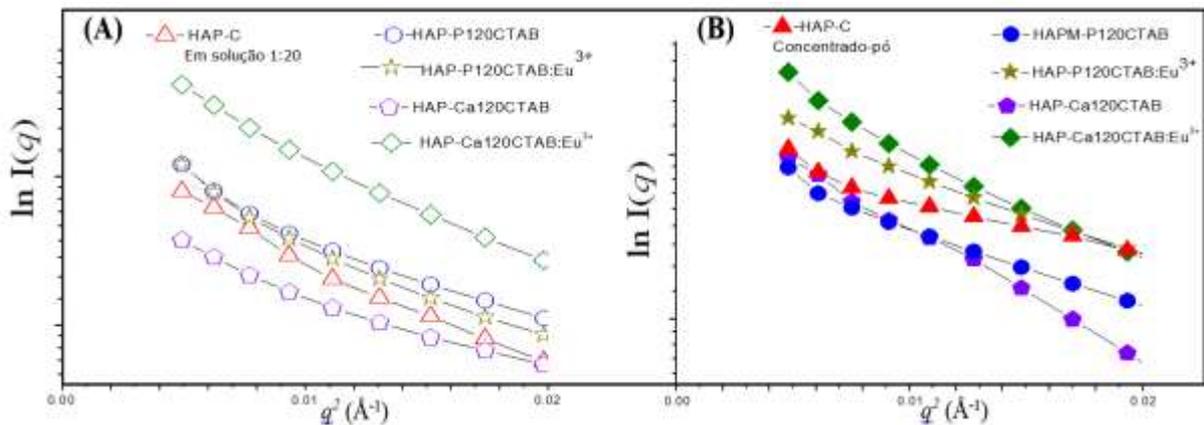


Figura 4.19 - Curvas experimentais correspondentes a região de Guinier $q < 0,02$ (\AA^{-1}), em (a) amostras medidas em suspensão de água destilada em 1:20 e (b) amostras concentradas em pó.

Na aproximação de Guinier (1939) ^[69;70] o R_g calculado leva em conta a média de todos os tamanhos de centros espalhadores com densidade eletrônica e essa aproximação é sensível a proximidade entre os centros espalhadores. Logo, as análises em sistemas concentrados fornece uma informação restritiva em relação aos tamanhos de centros espalhadores.

Devido a aglomeração, ocorre interações entre partículas promovendo interferência das ondas secundárias espalhadas por unidades individuais que afeta a intensidade de espalhamento total, e assim, dificulta os ajustes na região de baixos q e possíveis estimativas quantitativas do R_g das partículas individuais em sistemas concentrados. Portanto, devido a estas limitações não será discutido resultados quantitativos do R_g em termos de partículas das amostras analisadas.

A inclinação da região de Guinier em $\ln I(q)$ vs q^2 aumenta devido a formação de maiores aglomerados dos centros espalhadores ^[69] já que, graficamente, o R_g é o coeficiente angular da curva $\ln I(q)$ vs q^2 . Para sistema com partículas em suspensão de água destilada na proporção 1:20 a ordem decrescente de inclinação das curvas da figura 4.19 (a) foi: HAP-Ca120CTAB:Eu³⁺ > HAP-P120CTAB:Eu³⁺ = HAP-C > HAP-Ca120CTAB > HAP-P120CTAB.

Assumindo que o sistema concentrado, medidas feitas com amostras na forma de pó, apresente fase bem definida entre partículas e vazio (ar) e que a flutuação média da densidade eletrônica de um certo volume irradiado da amostra seja independente das características espaciais da morfologia dos centros espalhadores contidos neste volume pode-se aplicar o modelo de Porod invariante- "Q" representado pela equação 4.3. Neste modelo é possível estimar a área sob a curva de intensidade de espalhamento para regiões de baixos q . Onde ϕ_p e ϕ_m simbolizam a fração de volume das partículas inorgânicas e das partículas do ar, respectivamente e sendo V o volume irradiado na amostra.

$$Q = \int_0^{\infty} I(q)q^2 dq = 2\pi^2(\rho_p - \rho_m)^2\phi_p\phi_mV \quad (4.3)$$

Para calcular o invariante "Q" e estimar a área sob a curva de intensidade de espalhamento precisa-se representar em gráfico de Kratky^[70] (ver figura 4.20) com eixo-y de $I(q)*q^2$ para os espalhamentos das amostras em pó. Para isto foi feito uma normalização à escala absoluta dos dados de SAXS para amostras em pó usando medidas realizadas para folha de kapton como referência, já que as amostras foram medidas em sequência nas mesmas condições experimentais. As medidas foram executadas na linha de SAXS 1 do LNLS preparada para realizar experimentos em amostras na forma de pó.

Estimando as áreas sob as curvas de espalhamento representadas na figura 4.20 nota-se que as amostras dopadas com Eu^{3+} apresentaram uma tendência a maiores áreas de intensidade de espalhamento seguido da amostra controle HAP-C e demais amostras sem dopagem produzidas com C_{16}TAB . A hipótese do modelo de Porod invariante- "Q" é que o aumento da intensidade de espalhamento está diretamente correlacionado com aumento no contraste de densidade eletrônica $\Delta\rho = \rho_{\text{das partículas}} - \rho_{\text{matriz}}$ e/ou do aumento da fração volumétrica (ϕ_p) dos centros espalhadores.

Não há evidências de que este aumento na intensidade de espalhamento nas amostras dopadas esteja correlacionada com o aumento do contraste de densidade eletrônica devido a formação de agregados localizados de Eu^{3+} , uma vez que, nas medidas de XRD não foi observado fases adicionais a hidroxiapatita.

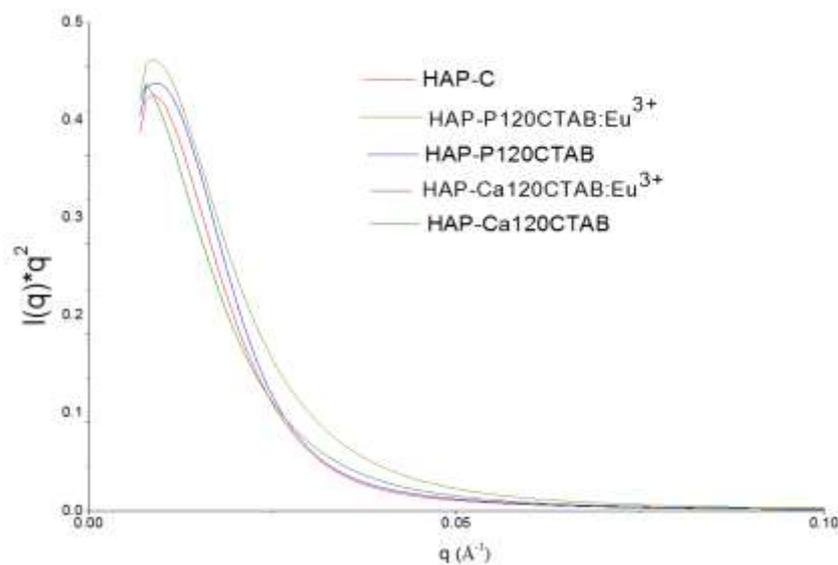


Figura 4.20 – Gráfico de Kratky para resultados expressados em $I(q)*q^2$ vs q que possibilita a estimativa da Porod invariante "Q" com o cálculo das áreas sob as curvas para regiões de baixos q .

Como o material é um pó, mesmo conhecendo a densidade $\sim 3,156 \text{ g/cm}^3$ e a densidade de espalhamento $714 \times 10^{20} \text{ cm}^{-4}$ da hidroxiapatita não é possível conhecer a quantidade de amostra exposta ao feixe de raio X. E isto é um empecilho para quantificar o aumento da fração volumétrica (ϕ_p) dos centros espalhadores para cada amostra. No entanto apesar destas limitações, uma avaliação conjunta dos sistemas concentrados e diluídos da inclinação da região de Guinier (figura 4.19) para $\ln I(q)$ vs q^2 e Porod invariante com gráfico de $I(q)*q^2$ vs q (figura

4.20) trazem resultados semelhantes e indicam que as amostras dopadas com Eu^{3+} apresentam maiores centros espalhadores que as demais. Esses centros espalhadores podem ser formados por aglomerados de diversas partículas e neste caso, há uma indicação relativa de que as amostras dopadas apresentam partículas mais aglomeradas que as amostras não dopadas.

Para a segunda parte da discussão dos resultados de espalhamento a baixo ângulo, o objetivo principal do emprego da técnica de SAXS foi avaliar a existência de picos (q_{max}) de correlação estrutural promovidos por interferências na amplitude de espalhamento de raios X [70] que indicaria a formação de arranjos mesoporos ordenados produzidos unicamente pelo C_{16}TAB em hidroxiapatitas.

A figura 4.21 representa as curvas experimentais de espalhamento e ajustes obtidos para sistemas concentrados na região de medida compreendida entre $0.05 \leq q \leq 1.3 \text{ nm}^{-1}$. Nessas curvas não foi observado nenhum pico (q_{max}) característico que possa representar a correlação espacial entre partículas que poderia ser proveniente da distribuição ordenada de poros ou estrutura semelhante formada. Com o perfil das curvas da figura 4.21 conclui-se que o molde de C_{16}TAB após o tratamento térmico não foi suficiente para formar um sistema com distribuição ordenada de poros de longo alcance. Esse resultado concorda com as observações das microscopias das amostras de hidroxiapatita produzidas com 120 mM de C_{16}TAB que já apontavam para uma distribuição polidispersa com partículas aleatoriamente orientadas. Este fato sustenta a hipótese de que nestas amostras só há um sistema de única fase, partículas de hidroxiapatita.

Com auxílio das observações de SEM-FEG foram adotadas as seguintes considerações para analisar e ajustar os modelos propostos para as medidas de SAXS: (i) as amostras são compostas por sistema isotrópico de partículas, ou seja, não é necessário calcular o espalhamento para cada direção; (ii) as partículas apresentam pouca inhomogeneidade na densidade eletrônica; (iii) as morfologias das partículas podem ser aproximadas por um modelo geométrico na forma de bastonetes alongados; (iv) as partículas estão orientadas ao acaso; (v) a polidispersividade é associada apenas para os tamanhos das partículas e não na morfologia; (vi) não há uma estrutura definida o que significa que o fator de estrutura $S(q)$ pode ser desconsiderado.

Com essas hipóteses pode-se estimar a distribuição de tamanhos das partículas das amostras através da teoria da função de distribuição dos tamanhos $N(r)$ representada pela equação 4.4. Nessa equação $I(q)$ indica a função de espalhamento, $N(r)$ a distribuição de tamanhos, r é a dimensão estimada de cada partícula e $N(r)dr$ está relacionado com a fração de partículas com dimensões entre r e $r+dr$. Também nesta equação têm-se a função geométrica $i_0q(r)$ referente ao espalhamento de uma única partícula na matriz.

Em um sistema com partículas orientadas ao acaso essa função representa a média sobre todas as orientações espaciais normalizada pela intensidade em $q=0$. O fator $m^2(r)=V^2(\rho_p - \rho_m)^2$ está relacionado a probabilidade de espalhamento de cada partícula [70].

$$I(q) = \int_0^{\infty} N(r)m^2(r)i_0q(r)dr \quad (4.4)$$

Usando as curvas de espalhamento das amostras da figura 4.21, foi utilizado método um numérico de máxima entropia aplicado no código IRENA [72] para determinar melhor modelo de $N(r)$ que ajusta as curvas experimentais. Estas curvas estão representadas pelas linhas cheias nos gráficos da figura 4.21.

O método de máxima entropia trata diferente distribuições até atingir um mínimo quadrado desejado com maximização da entropia da distribuição, ou seja detecção da distribuição mais provável [88]. Uma descrição mais detalhada do algoritmos de máxima entropia pode ser encontrado na referência de Potton *et al*, 1988 [89]. Nesse sentido, são adotadas estimativas iniciais da função geométrica $i_0q(r)$ embasadas por observações de morfologia e tamanho das partículas por imagens de SEM-FEG da sessão anterior.

É importante ressaltar que, não será considerado para análise as curvas experimentais do espalhamento das amostra de pó em suspensão de água destilada na proporção de 1:20. Os espalhamentos destas amostras diluídas apresentaram baixa contagem para $q > 0.1$ (\AA^{-1}) no detector bidimensional Pilatus. Na figura 4.21 também está representada a distribuição de tamanhos $N(r)$ em termos da distribuição de volumes $D(r)v$, sendo que $D(r)v = N(r).V(r)$ e $V(r)=\pi.L.C.H$ representa o volume do modelo geométrico. O fator forma $P(q)$ considerado foi de bastonetes alongados delimitado por semieixos: L-largura; C-comprimento e H-altura, esse último foi mantido constante no modelo geométrico.

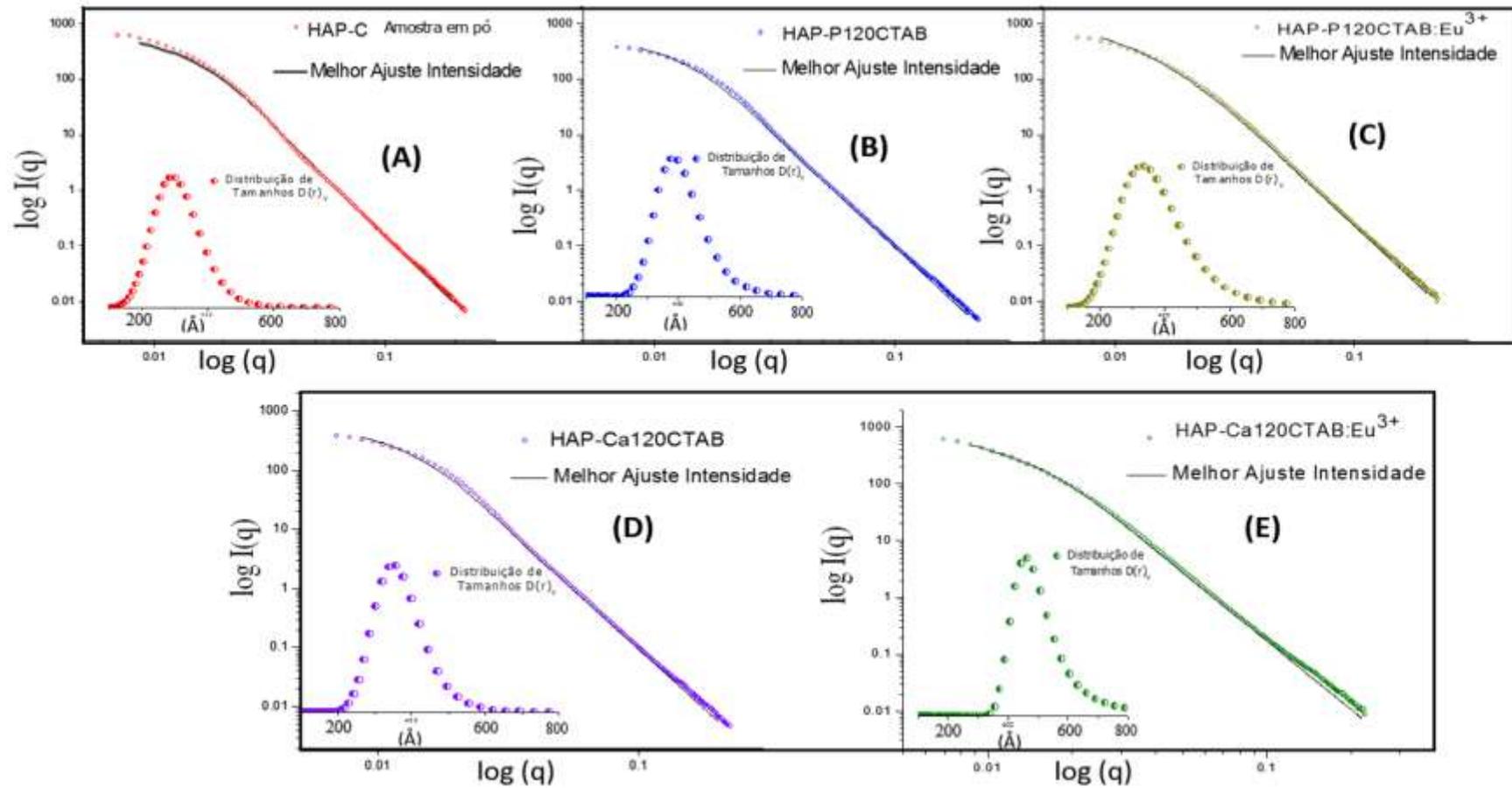


Figura 4.21 - Curvas experimentais de intensidade de espalhamento em $\log I(q) \times \log(q)$ e melhor ajuste (linha preta) em sistema concentrado para os pós das amostras de diferentes natureza: HAP-C (a); HAP-P120CTAB (b); HAP-P120CTAB:Eu³⁺ (c); HAP-Ca120CTAB (d); HAP-Ca120CTAB:Eu³⁺ (e). Representação da distribuição de tamanhos em termos de volumes $D(r)_v$.

Para representar as partículas pelo modelo geométrico de bastonetes alongados assume-se diferentes tamanhos e razões de aspectos entre os semieixos da largura/comprimento. As análises das partículas de hidroxiapatitas por SEM-FEG da seção anterior também foram determinantes para estimar os valores iniciais dos tamanhos e razões de aspectos assumidos por esse modelo na tentativa de representar a morfologia das partículas. Foi adotado diferentes razões de aspectos para as amostras em pó.

Os resultados dos ajustes revelaram que dentre todos os lotes a amostra controle HAP-C apresentou partículas com menor razão de aspecto de 1.6 entre as dimensões. Essa razão de aspecto está condizente com a morfologia de esferoides distorcidos observada por SEM-FEG dessa amostra. Também as partículas da amostra controle apresentaram as menores distribuição de tamanhos em termos de volume ~30 - 40 nm, condizente com as observações de SEM-FEG.

Enquanto que os resultados dos ajustes das partículas das amostras produzidas com C₁₆TAB e dopadas com Eu³⁺, apresentaram maior razão de aspecto da ordem de 6.0, que é típica de partículas cilíndricas bem alongadas [70], este resultado está condizente com as morfologias apresentadas nas imagens de SEM-FEG dessas amostras.

As amostras dopadas com 6mol% de Eu³⁺ também apresentaram as maiores distribuições de tamanhos em termos de volume da ordem de ~30 - 60 nm, em especial a amostra HAP-Ca120CTAB:Eu³⁺, ver figura 4.21 (e), com as maiores distribuições de tamanhos relativos de partículas dentre todas as amostras analisadas por SAXS.

Na figura 4.22 está representado a curva de espalhamento para altos valores do vetor de espalhamento q da amostra do molde de0 combinado orgânico Amido-CTAB seco a 100°/48h. A curva de espalhamento é característica de um sistema de distribuição lamelar [90] confirmada pelos dois picos em $q(1)_{\max} = 2.41 (\text{\AA}^{-1})$ and $q(2)_{\max} = 4.84 (\text{\AA}^{-1})$ com razão de intensidade $\left(\frac{2\pi/q(2)_{\max}}{2\pi/q(1)_{\max}} \sim 2.0\right)$. Estes resultados concordam com as microscopias obtidas para o molde proposto de Amido-CTAB. A distribuição lamelar é obtida pela sedimentação de microcadeias segmentadas de amilose e amilopectina conforme foi discutido na seção de SEM.

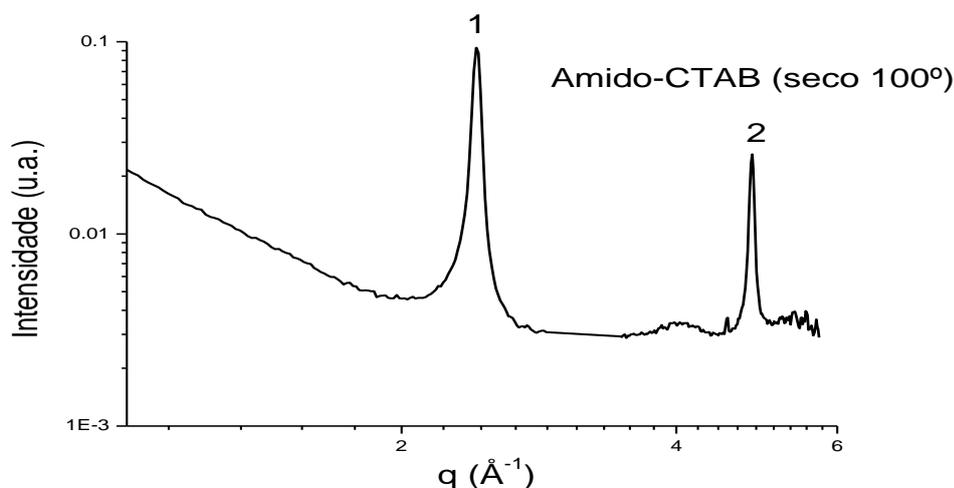


Figura 4.22 – Padrão de espalhamento para estruturas lamelares do molde Amido-CTAB

As microscopias das amostras de hidroxiapatita HAP-ACPO, HAP-ACCA e HAP-Amido 4g produzidas com Amido-CTAB revelaram estruturas porosas de $\sim 1\mu\text{m}$ a 200 nm, dimensões que produziram detalhes nas curvas de espalhamento em ângulos muito abaixo do limite de operação das linhas de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Desta forma, foi necessário realizar experimentos de USAXS para estas amostras. A terceira parte dos resultados de espalhamento a baixos ângulos está relacionada a experimentos de USAXS obtidos em cooperação com o grupo de Jan Ilavsky do Advanced Photon Source. Foram obtidos somente padrões de espalhamento USAXS para amostras de hidroxiapatita produzidas com molde Amido-CTAB e amido 4g.

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura (SEM) sugerem que o molde Amido-CTAB não ajuda a promover porosidade no β -TCP, diferente do que foi observado com as amostras de hidroxiapatitas. Apenas a amostra β -TCP-Amido 4g apresentou porosidade em dimensões micrométricas e muito à cima da escala de macroporos ($\varnothing > 50\text{ nm}$). Entretanto, as grandes dimensões das estruturas $\sim 50\text{-}100\mu\text{m}$ encontradas no β -TCP-Amido 4g estão além do limite de atuação de USAXS ($\sim 6\mu\text{m}$) e as estruturas entre ~ 1 a $5\mu\text{m}$ concorrem diretamente com o espalhamento dos centros espalhadores formados por grandes aglomerados de partículas, com dimensões superiores a $1\mu\text{m}$ conforme observado na seção de SEM. Por este motivo, na figura 4.23 está apenas representado o padrão de espalhamento para ultra baixos ângulos para amostras em pó de HAP-ACPO, HAP-ACCA e HAP-Amido 4g.

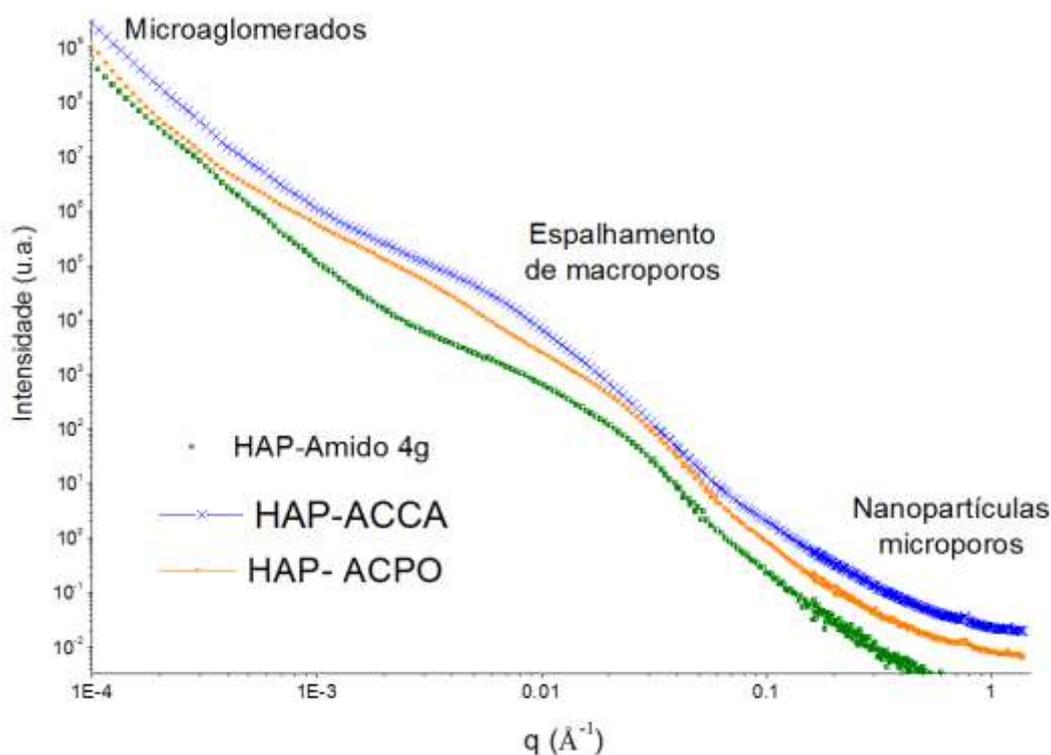


Figura 4.23 – Padrão de espalhamento de USAXS para amostras de hidroxiapatita preparadas com Amido e Amido-CTAB

Baseado nas microscopias eletrônicas de varredura discutidas na sessão anterior a região de interesse para estudo da porosidade em hidroxiapatita está compreendida para o vetor de espalhamento entre $5 \times 10^{-4} \text{ \AA}^{-1} < q < 0.25 \text{ \AA}^{-1}$ que foi estimada usando a regra geral da lei de Bragg com primeira aproximação de condição da interferência construtiva, $d=2\pi/q$, produziria um intervalo nas dimensões de estruturas entre $2,5 \text{ nm} < d < 1,2 \text{ \mu m}$. Já vetores de espalhamento menores que $5 \times 10^{-4} \text{ \AA}^{-1}$ ($1,2 \text{ \mu m}$) podem ser consideradas de aglomerados de partículas.

A análise de distribuição de tamanhos por SAXS e SEM das partículas de hidroxiapatita revelaram que apesar das dimensões das partículas individuais estarem dentro do intervalo $2,5 \text{ nm} < d < 1,2 \text{ \mu m}$, elas estão fortemente aglomeradas ou muito próximas e, assim, espera-se que estas partículas gerem contribuições de espalhamento em regiões de baixos q para amostras produzidas com os moldes de Amido-CTAB e amido 4g. Entretanto é uma dificuldade comum distinguir a contribuição individual de espalhamentos a baixos ângulos dos poros e das partículas, já que temos princípio da Reciprocidade de Babinet em que padrão de difração/espalhamento de um corpo sólido, partícula, é idêntico ao de um poro do mesmo

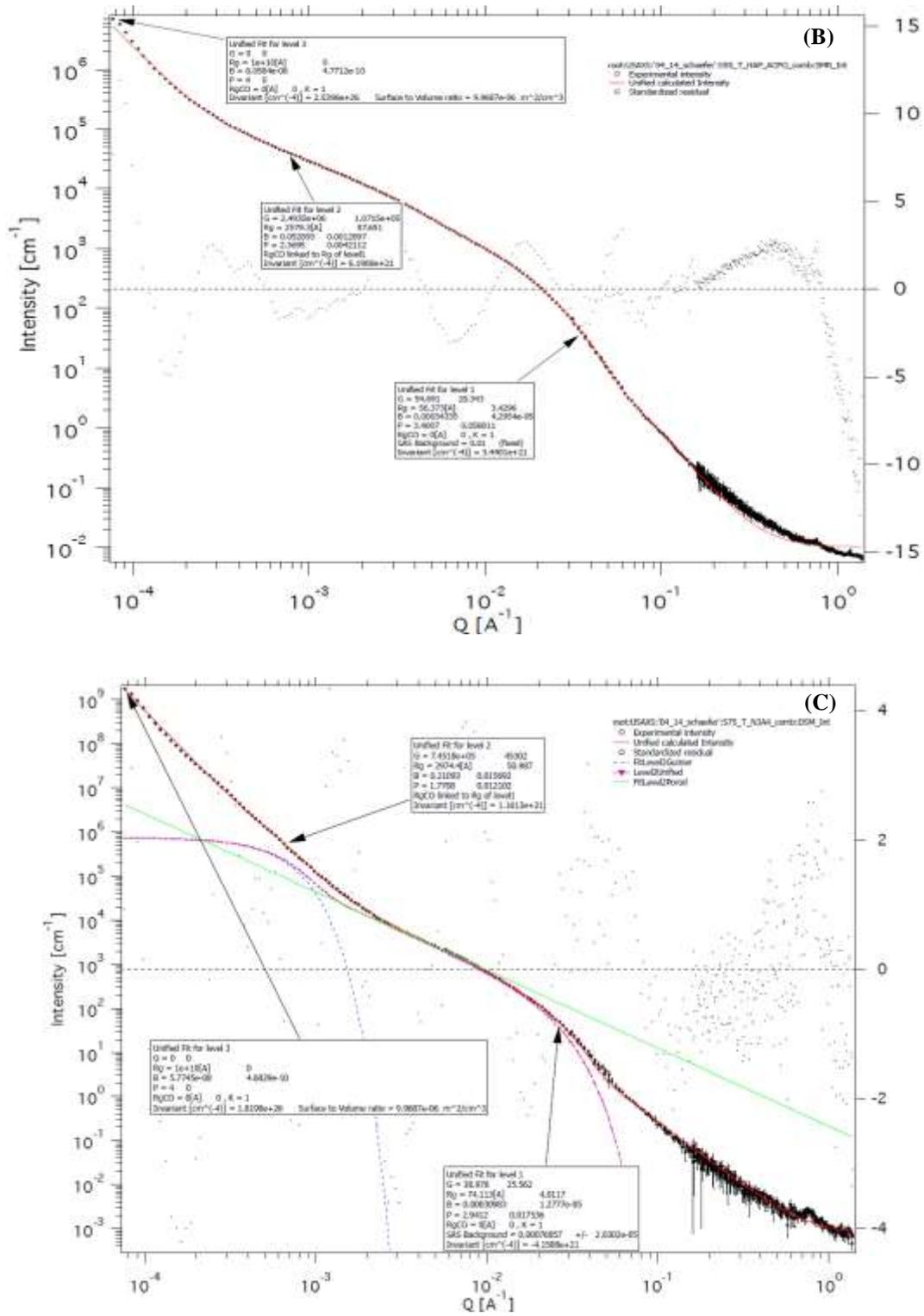


Figura 4.24 – Curva de ajuste de multinível (linha vermelha) para os dados experimentais em (a) HAP-ACCA, (b) HAP-ACPO e em (c) HAP-Amido 4g.,

A distribuição em termos de volumes de poros apresentada na figura 4.25 foi obtida com os ajustes de multinível do modelo para poros em forma de esferoides distorcido na razão de aspecto 0.8 entre as dimensões. Como visto na figura 4.24 o modelo reproduz bem os dados experimentais para vetores de espalhamento entre $5 \times 10^{-4} \text{ \AA}^{-1} < q < 0.25 \text{ \AA}^{-1}$, que com base nas microscopias de SEM-FEG é a região de interesse para analisar a hierarquia de porosidade na hidroxiapatita. É interessante perceber nos espalhamentos experimentais de ultra baixos ângulos da figura 4.23 e nos ajustes da figura 4.24 que o procedimento de preparação das amostras, ordem de gotejamento e a presença de surfactante $C_{16}TAB$ altera o perfil de espalhamento das amostras de hidroxiapatita.

É possível perceber que a amostra HAP-Amido 4g apresenta uma população de poros que espalha a mais altos q se comparada com amostras HAP- ACCA, este fato está relacionada com a dimensão da população de poros encontrados na amostra HAP-Amido 4g que será discutido a seguir.

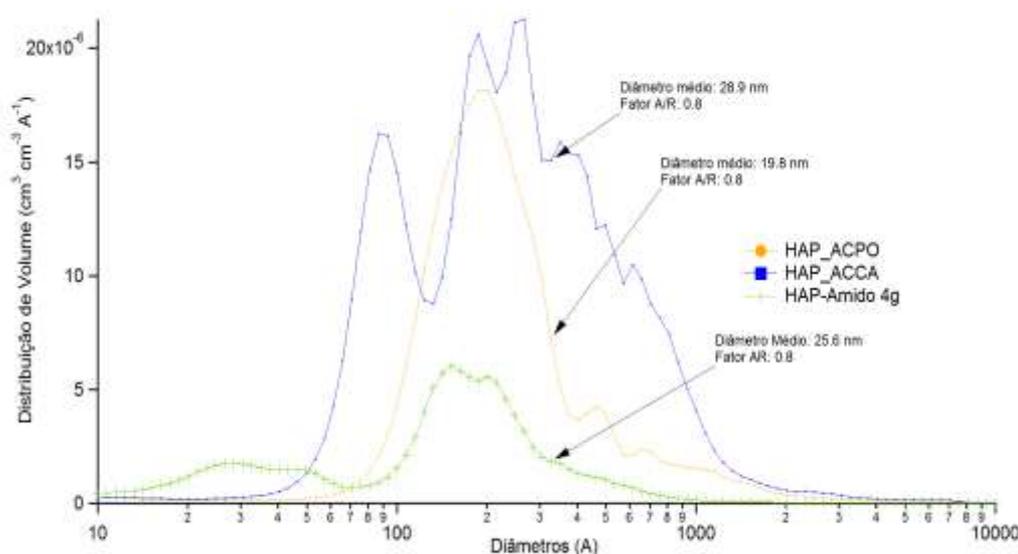


Figura 4.25 – Distribuição dos tamanhos de poros em relação ao volume para razão de aspecto $AR=0,8$ das amostras de hidroxiapatitas porosas.

A figura 4.25 mostra a distribuição de tamanhos de poros das amostras e revela que a amostra HAP-Amido 4g apresenta duas regiões de distribuição de poros, a primeira com uma população de tamanhos menores que 10 nm e outra com tamanho médio de 25,6 nm situada na região de mesoporos ($2 \text{ nm} < \varnothing < 50 \text{ nm}$). Adicionando 120mM de $C_{16}TAB$ a reação de precipitação da amostra HAP- Amido 4g obtêm-se a amostra HAP-ACPO, já que ambas tem

mesma ordem de precipitação de $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$. Entretanto, a amostra HAP-ACPO não apresenta distribuição de porosidade tão diversificada quanto a HAP-Amido 4g. Os poros da amostra HAP-ACPO possui uma distribuição de tamanhos próximos ao valor médio de 19,8 nm e isto implica que o C_{16}TAB promove a diminuição da dispersão de tamanho dos poros, diminuindo o grau de hierarquia de poros do sistema. Quanto maior a diversidade de tamanhos de poros, meso e macroporos, maior será o grau de hierarquia de poros do sistema. Ou seja, a amostra HAP-ACPO apresenta poros com dimensões mais próximas a mesoporos. Estruturas com poros de tamanhos semelhantes são chamados de sistemas com uniporosidade, com única escala de tamanho de poros [27;40].

Uma hipótese é que o efeito do C_{16}TAB parece diminuir a dispersão no tamanho de poros devido ao maior tempo de contato com sítios de PO_4^{3-} durante a fase de mistura antes do gotejamento de Ca^{2+} . Vale a pena lembrar que para amostra HAP-ACPO a suspensão de 120mM de C_{16}TAB e PO_4^{3-} é mantida sob agitação durante 20 minutos antes do gotejamento da solução fonte de íons Ca^{2+} . Estudos futuros para constatação de formação das micelas C_{16}TAB e suas interações com PO_4^{3-} são relevantes para futuras discussões.

Em relação a amostra HAP-ACCA produzida com ordem de gotejamento $\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Ca}^{2+}$ inversa a amostra HAP-ACPO é observado uma distribuição de tamanho de poros mais abrangente dentre as amostras analisadas. Uma população de poros menores que 10 nm e outra bem mais larga com valores entre ~18 nm a 100 nm com valor médio de 28,9 nm. A distribuição de tamanho de poros revela que HAP-ACCA apresenta maior tamanho de poros do que a amostra HAP-ACPO e hierarquia de poros com meso ($\varnothing < 50$ nm) e macroporos ($\varnothing > 50$ nm) que a amostra HAP-ACPO. Este resultado leva a crer que a ordem de gotejamento afeta diretamente a distribuição da porosidade na hidroxiapatita e com isto, pode-se sintonizar o tamanho final dos poros simplesmente alterando a ordem de gotejamento das soluções fontes de PO_4^{3-} e Ca^{2+} . É importante conhecer os aspectos que afetam a formação e tamanho de poros, uma vez que os poros devem ter tamanhos próximos à moléculas de fármaco para o devido transporte, conservação e liberação durante o tratamento.

Se o intuito for obter um sistema de única dimensão de poros, uniporosidade, o mais aconselhado é produzir hidroxiapatitas com Amido-120mM de C_{16}TAB na ordem de gotejamento $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$. Mas se o objetivo é potencializar o transporte de fármacos com

diferentes tamanhos de moléculas ou obter um sistema que possa transportar dois ou três diferentes fármacos de diferentes pesos atômicos é necessário produzir hidroxiapatitas com Amido-120mM de C₁₆TAB na ordem de gotejamento PO₄³⁻ → Ca²⁺. Os dados de USAXS revelam que o C₁₆TAB combinado com a ordem de gotejamento entre solução fonte de Ca²⁺ e solução fonte de PO₄³⁻ contribui diretamente para aumento das dimensões dos poros na hidroxiapatita.

Em relação a discussão do grau de ordenamento dos poros levantada na sessão de SEM-FEG, os ajustes realizados para curvas de USAXS podem revelar a resposta. De fato, o ordenamento observado nas microscopias só é de ordem local e não é reproduzível a longo alcance. Esta evidência é comprovada no ajuste dos modelos às curvas experimentais de USAXS nos quais não houve necessidade de levar em consideração o fator forma S(q). Se há ordenamento de poros, ele só deve ser local e contribui muito pouco para o espalhamento construtivo de USAXS como um todo.

Ainda em relação a existência de estruturas ordenadas nas amostras de hidroxiapatita, analisando cuidadosamente as curvas experimentais da figura 4.23 é percebido alguns fracos picos em 0.76 Å⁻¹ e 1.18 Å⁻¹, usando a lei de Bragg ($d=2\pi/q$) com primeira aproximação, esta região pode corresponder a distâncias de estruturas ordenadas de ~ 8 Å e ~ 5 Å, respectivamente. Entretanto estas distâncias são muito pequenas para estruturas de mesoporos e são próximas a distâncias interplanares $d=3.44$ Å do plano (002) na hidroxiapatita [44]. A teoria de espalhamento usada em espalhamentos a baixos ângulos assume que o comprimento de onda da radiação é muito menor que as dimensões do centro espalhador.

Conseqüentemente, o espalhamento em regiões próximas a $q > 1\text{Å}^{-1}$ não pode ser conectada a estruturas ordenadas provenientes das micelas de C₁₆TAB com diâmetro da ordem de $(2\pi/q)= 6\text{Å}$. Esta dimensão está próxima ao comprimento de onda de raios X (~1 Å) empregado no experimento de USAXS ($\lambda = 0.72932$ Å). Ampliando esta discussão, ainda há o espalhamento incoerente de fundo $\lambda \neq \lambda_0$ que cresce com aumento do ângulo de espalhamento para altos q , ver apêndice A, e afeta a confiabilidade dos dados de USAXS para $q > 1\text{Å}^{-1}$. Portanto, não se pode afirmar que os picos observados para $q > 1\text{Å}^{-1}$ são relacionados com estruturas ordenadas por C₁₆TAB.

4.4 Espectroscopia de Estrutura Fina de Absorção de Raios X (XAFS)

Nessa fase do estudo, os resultados aqui discutidos estão voltados para a hidroxiapatita dopada com 6mol% de európio. Como em sessões anteriores foi discutido que o β -TCP não apresentou porosidade significativa por nenhum dos moldes propostos, a fase β -TCP não será investigada nesta sessão da Tese. Logo, o intuito desta parte do capítulo é investigar a estrutura local e os mecanismos envolvidos na incorporação do európio na rede hospedeira de hidroxiapatita preparada com C₁₆TAB e Amido-CTAB através de XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) e EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*), bem como avaliar por os efeitos do amido e C₁₆TAB sobre os sítios de Cálcio e Fósforo durante a formação da hidroxiapatita. Uma metodologia usual para analisar os espectros de XANES é comparar os dados experimentais com os de compostos conhecidos. Na figura 4.26 (a) estão dispostos os espectros de XANES próximo a borda L₃ do Eu³⁺ e em 4.26 (b) está representado a primeira derivada do espectros de XANES para a amostra controle dopada HAP-C:Eu³⁺ e HAP-Ca30CTAB:Eu³⁺, HAP-P30CTAB:Eu³⁺ comparadas com o composto de referência Eu₂O₃. O európio no Eu₂O₃ apresenta estado trivalente, 3+. Analisando o perfil da linha branca e a posição do máximo da derivada da curva de absorção é possível perceber que todas as amostras estão na mesma energia que Eu₂O₃. Isto revela que o Eu está na valência 3+ nas amostras dopadas.

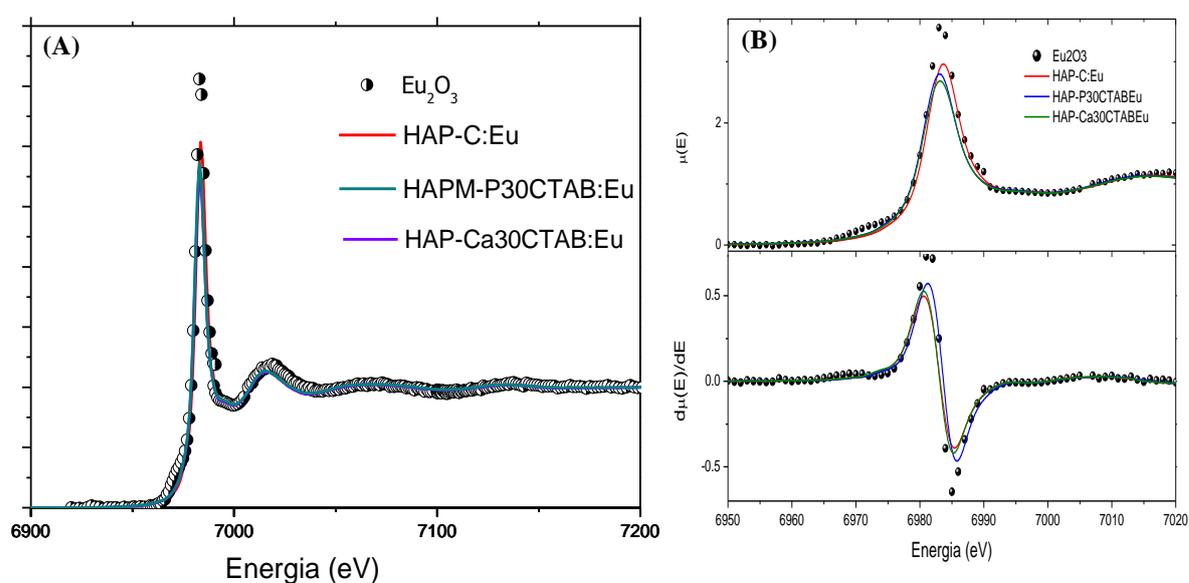


Figura 4.26 – Em (a) são exibidas os espectros para região de XANES próximo a borda de absorção L₃ do Európio para diferentes amostras em comparação com o composto de Eu₂O₃. Em (b) a primeira derivada do espectro de XANES.

A transformada de Fourier (TF) das oscilações de EXAFS ($TF(k^2\chi(k))$) para HAP-C:Eu³⁺ e HAP-Ca30CTAB:Eu³⁺, HAP-P30CTAB:Eu³⁺ está representada na figura 4.27. A escolha do com peso k^2 para representar a transformada de Fourier foi feita para realçar os detalhes das segundas, terceiras e quartas esferas de coordenação próximas ao íon de Eu³⁺ nas amostras. Aplicando uma transformada de Fourier (TF) nas oscilações do espaço k através de $TF(r) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{K_{min}}^{K_{max}} \chi(k)e^{2ikr} dk$ [61] é possível obter um mapa $\chi(r)$ com a distribuição de distâncias no espaço- r dos grupos de átomos próximos, representado as esferas de coordenação, em relação ao átomo alvo absorvedor (Eu). Logo, as posições dos picos em $TF(k^2\chi(k))$ estão relacionadas com as distâncias das esferas de coordenação no espaço- r enquanto que a intensidade e o perfil da curva são relacionados com número de vizinhos e a desordem local de uma particular esfera de coordenação.

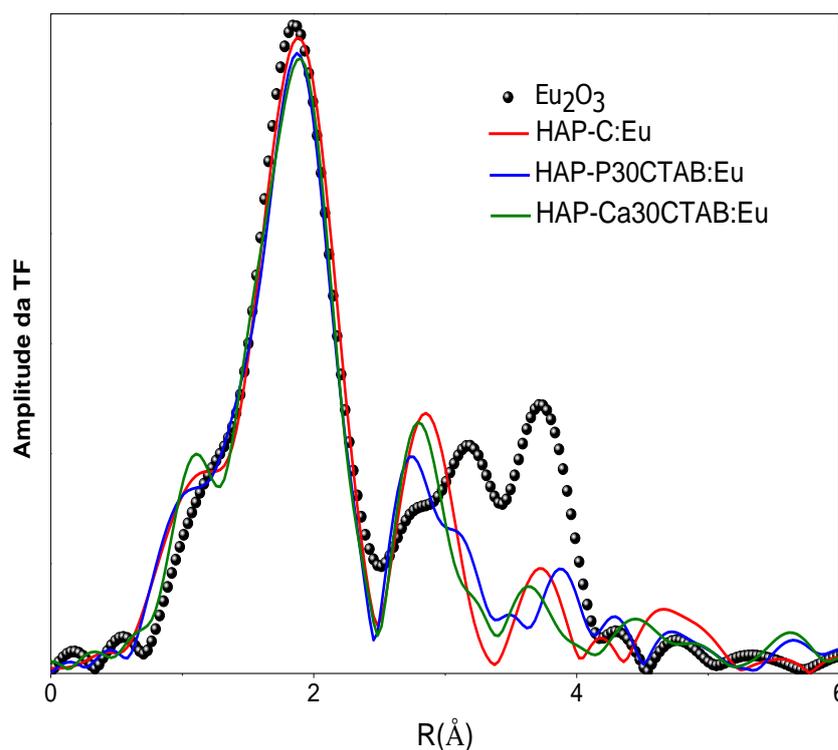


Figura 4.27 – Transformada de Fourier na borda L_3 do Eu para sinais de EXAFS das amostras dopadas com Eu e composto de referência Eu_2O_3 .

A figura 4.27 indica que a intensidade da primeira e segunda esfera de coordenação são afetadas entre as amostras de hidroxiapatitas, onde as duas amostras preparadas com C₁₆TAB possui menor intensidade que a amostra controle HAP-C:Eu. Este efeito pode ser devido a dois possíveis fenômenos: i) redução no número de coordenação médio de Eu³⁺ nas amostras produzidas na presença de C₁₆TAB, que pode ser um indício de Eu³⁺ na superfície devido ao tamanho manométrico das partículas, ou ii) aumento no fator Debye-Waller associado com o aumento da desordem local intrínseca induzidas pelo C₁₆TAB nas interações com sítios de Ca²⁺ e PO₄³⁻ durante a fase de nucleação das hidroxiapatitas.

Para esclarecer melhor este último fenômeno, será feito um parêntese nos resultados das hidroxiapatitas dopadas com Eu³⁺ e iniciada a discussão dos resultados de XANES/EXAFS na borda *k* do Ca e P para amostras produzidas com molde do combinado Amido-CTAB e somente C₁₆TAB. A figura 4.28 representa os espectros de absorção de raios X medidos próximo da borda de absorção *k* do Ca (4.038 eV) para amostras: HAP+Amido-CTAB Seco, HAP-C, HAP-P120CTAB, e HAP-ACPO.

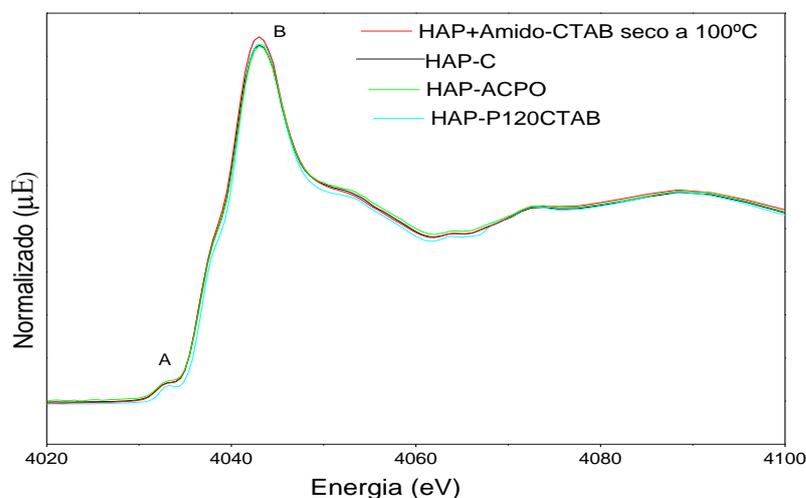


Figura 4.28 – Comparação entre o espectro XANES na região da borda *K* do Ca para diferentes amostras de hidroxiapatita .

Na figura 4.28 transições indicadas por A em ~ 4.033 (eV) antes da borda de absorção podem ser atribuídos a transição 1s→3d do íon Ca³⁺ que é uma transição proibida de dipolo elétrico, já que $\Delta l = 2$, as transições permitidas por esta regra originam fótons provenientes da transição entre estados com $\Delta l = \pm 1$. Entretanto essa transição é resultado de uma mistura entre estados *d* desocupados com estados finais *p* característicos, segundo estudos de Liu e

colaboradores,2004 [93]. O pico em B, pico principal, está associado a transição por dipolo elétrico permitida de $1s \rightarrow 4p$ [93]. Os espectros foram normalizados em função do coeficiente de absorção, ver procedimentos para análise das curvas experimentais no apêndice B, sendo possível perceber que pelo perfil do pico B para amostra HAP+Amido-CTAB apresentou maior coeficiente de absorção que as outras amostras de hidroxiapatita.

O surfactante $C_{16}TAB$ possui carga unitária positiva, sendo suscetível a interação com os sítios de PO_4^{3-} durante a fase de nucleação dos cristais de hidroxiapatita, e assim, delineando o seu crescimento. Como visto na sessão de SEM-FEG o Amido confina o crescimento dos cristais de hidroxiapatita em interstícios lamelares, e portanto, também pode afetar a simetria em volta de PO_4^{3-} . Para melhor entender os efeitos do $C_{16}TAB$ e amido sob o grupo PO_4^{3-} , na figura 4.29 têm-se a transformada de Fourier com peso- k^2 para o sinal das oscilações de EXAFS das amostras: HAP+Amido-CTAB Seco, HAP-C, HAP-P120CTAB, e HAP-ACPO excitadas por raios X moles próximo a borda de absorção k do P (~ 2.145 eV).

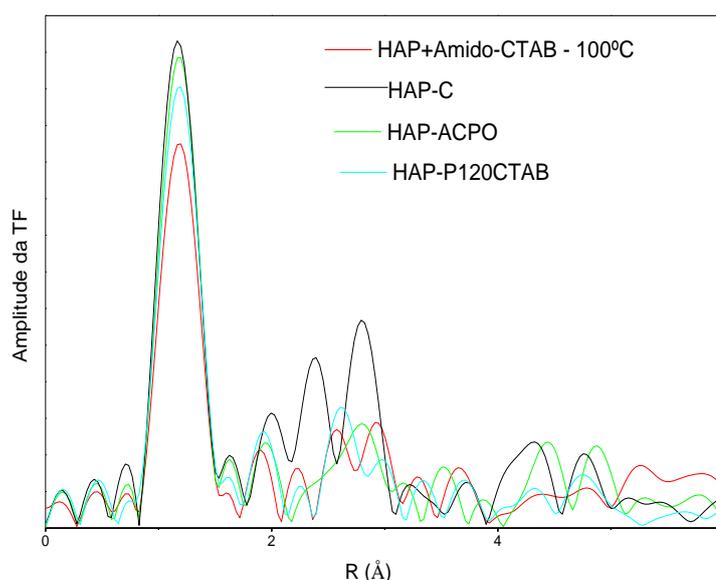


Figura 4.29- Transformada de Fourier na borda k do P para sinais de EXAFS das amostras de hidroxiapatita sem dopante.

A variação na amplitude transformada de Fourier entre as amostras indica mudanças estruturais nas primeiras esferas de coordenação do sítio PO_4^{3-} . A figura 4.29 revela que a amostra apenas seca possui a menor amplitude da transformada de Fourier seguido pela amostra produzida com 120mM de $C_{16}TAB$, a HAP-P120CTAB. Vale a pena ressaltar que, os resultados de XRD já previam a formação de hidroxiapatita em temperaturas de 100° .

Para melhor elucidar as mudanças estruturais ocorridas envolta do átomo P, foi obtida uma estrutura simulada baseada em Andrade e colaboradores, 2004 [44] tendo o P como átomo alvo para conhecer a simetria e desordem estrutural das primeiras esferas de coordenação dos dados experimentais.

A figura 4.30 (a) e (b) mostram os ajustes sob as curvas experimentais para a transformada de Fourier no espaço- r e oscilações de EXAFS no espaço- k . Os resultados das distâncias para as primeiras esferas de coordenação podem ser visualizados na tabela 4.3 onde $\Delta\sigma^2$ representa o fator de Debye-Waller que está vinculado a desordem local próxima ao átomo alvo e o coeficiente chi-quadrado reduzido χ_{red}^2 atrelado a qualidade dos ajustes. Ajustes considerados bons apresentam valores de χ_{red}^2 próximos a uma unidade.

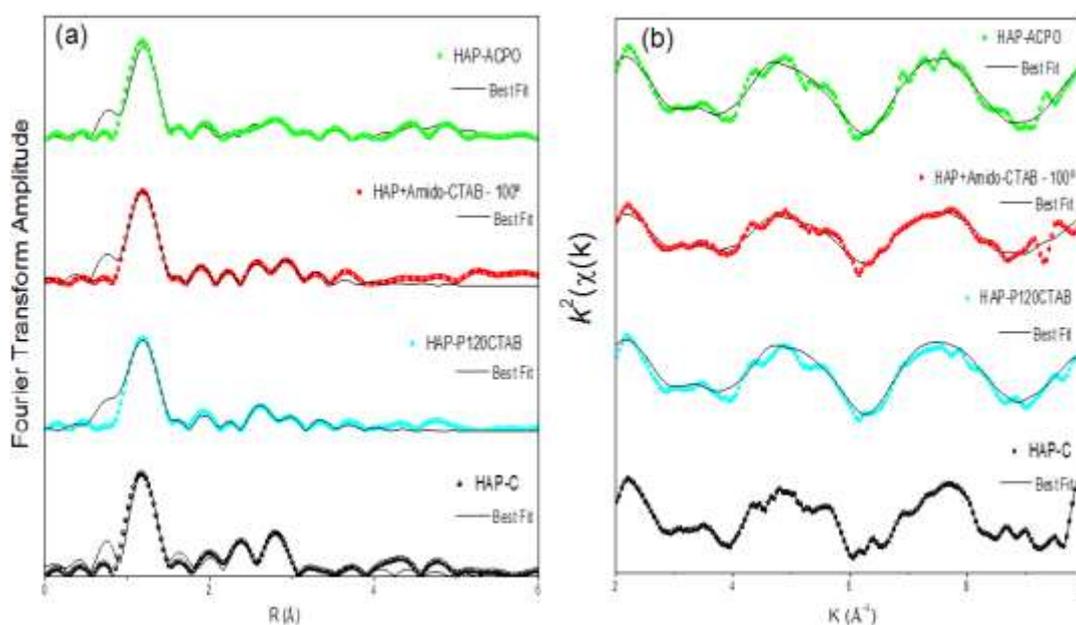


Figura 4.30- Em (a) transformada de Fourier (pontos) e melhor ajuste no espaço- r (linhas sólidas) para as amostras de hidroxiapatitas, (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k^2 (pontos) e melhor ajuste (linhas sólidas).

É possível perceber com os resultados da tabela 4.3 que a formação do tetraedro da ligação P-4O $\sim 1,54 \text{ \AA}$ é muito pouco sensível a adição de 120 mM de $C_{16}TAB$ /Amido na solução de reação. Então o surfactante $C_{16}TAB$ de carga positiva não interfere diretamente na primeira esfera de coordenação próximo ao P. Entretanto, nas esferas de coordenação mais afastadas fica nítido as alterações promovidas pela adição de $C_{16}TAB$.

A observação levantada no parágrafo anterior, pode ser sustentada pela comparação direta das distâncias encontradas para a amostra HAP-C e HAP-P120CTAB. A diferença entre estas amostras para distâncias da segunda esfera P-2O e terceira esfera P-2Ca₁ são ~ 0,32 Å e ~0,69 Å, respectivamente. Como a única diferença entre as amostras é adição de 120mM de C₁₆TAB na solução de reação é possível dizer que o surfactante impõe uma compressão local sentida nos sítios de P na rede da hidroxiapatita com aproximação de sítios Ca(1) para mais próximos de sítios de PO₄³⁻, como também, aumento no fator de desordem local Debye-Waller para primeira esfera de Ca(1).

Tabela 4.3- Resultados dos ajustes de EXAFS na borda k do P para as primeiras esferas de coordenação. NC- número de coordenação dos primeiros vizinhos; R(Å) a distância média entre P e átomos vizinhos, $\Delta\sigma^2$ fator de Debye Waller atrelado a desordem local próximo ao átomo alvo e o coeficiente de qualidade de ajuste χ_{red}^2 .

Amostra	Esfera	NC	R(Å)	$\Delta\sigma^2$	χ_{red}^2
HAP-C	O	4	1,54 (0,02)	0,005	3,58
	O	2	3,00 (0,02)	0,031	
	Ca ₁	2	3,40 (0,01)	0,055	
	Ca ₁	2	3,54 (0,01)	0,001	
HAP-P120CTAB	O	4	1,54 (0,04)	0,001	4,84
	O	2	2,68 (0,01)	0,037	
	Ca ₁	2	2,71 (0,01)	0,109	
	Ca ₁	2	3,49 (0,02)	0,002	
HAP+Amido-CTAB seco 100°	O	4	1,57 (0,05)	0,002	5,21
	O	2	3,11 (0,02)	0,041	
	Ca ₁	2	3,12 (0,02)	0,002	
	Ca ₁	2	3,33 (0,02)	0,002	
HAP-ACPO	O	4	1,54 (0,02)	0,001	4,90
	O	2	3,17 (0,01)	0,026	
	Ca ₁	2	2,80 (0,02)	0,054	
	Ca ₁	2	3,59 (0,03)	0,002	

Nota: 1,54 (0,02) representa $1,54 \pm 0,02$.

Estas observações podem sustentar a hipótese levantada na sessão de SEM-FEG e explicar o crescimento longitudinal das partículas de hidroxiapatita quando adicionado C₁₆TAB na solução de reação. Como dito, especula-se que as quantidades de surfactante, 120mM, utilizada seja mais que necessária para formar agregados de micelas do C₁₆TAB com um núcleo micelar semelhante a um esferoide longitudinal de carga externa positiva.

Os grupos de PO_4^{3-} recobrem inicialmente estes núcleos micelares e posteriormente uma segunda camada é formada com sítios de Ca^{2+} envolvendo os sítios de PO_4^{3-} para formar as partículas de hidroxiapatita [55], conforme esquema da figura 4.31 para meio reacional aquoso. Isto pode promover maior aproximação espacial entre os sítios de Ca e P, e assim, causar efeitos estruturais sentidos com as leves alterações no tamanho de cristalitos para hidroxiapatita produzidas com ordem de gotejamento regular $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$ na presença de C_{16}TAB conforme descrito nos resultados de XRD.

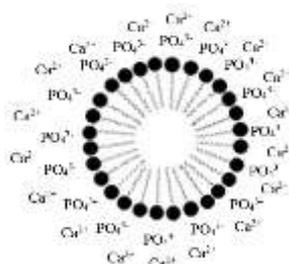


Figura 4.31- Esquema de interação entre sítios de PO_4^{3-} e Ca^{2+} com micelas de C_{16}TAB

Uma comparação direta das distâncias das primeiras esferas de coordenação próximas ao P nas amostras HAP-C e HAP-ACPO é possível observar o mesmo comportamento de aproximação dos primeiros sítios de Ca(1) a $\sim 2,80 \text{ \AA}$. A amostra que apresenta maior diferença em termos das distâncias das esferas de coordenação é HAP+Amido-CTAB seca a 100° . Quando esta amostra é calcinada a $450^\circ\text{C}/4\text{h}$ obtêm-se a amostra HAP-ACPO.

É importante observar que o tratamento térmico a 450° para degradar o molde orgânico Amido-CTAB implica no rearranjo estrutural de sítios de Ca(1) com aproximação aos sítios de P. Os efeitos da adição do amido são sentidos na hidroxiapatita pela leve expansão de $0,17 \text{ \AA}$ da segunda esfera P-2O para amostra HAP-ACPO se comparados com a amostra controle HAP-C.

Já em relação aos mecanismos envolvidos na incorporação do Eu^{3+} na hidroxiapatita, em princípio, os íons de európio no estado de carga trivalente podem substituir qualquer sítio catiônico na matriz da hidroxiapatita. Mas considerando a natureza covalente das ligações P-O no íon molecular PO_4^{3-} e também o número de coordenação IV do P na hidroxiapatita, em comparação com o número de coordenação VI do Eu^{3+} , é improvável que Eu^{3+} ocupe um local do sítio de P. Assim, deve-se esperar que o íon Eu^{3+} seja incorporado um dos dois sítios de Ca, Ca(1) ou Ca(2), e como consequência, a carga positiva 1+ dessa substituição tem de ser compensada por algum outro defeito na matriz da hidroxiapatita.

Os possíveis defeitos incluem o oxigênio intersticial (O_i), incorporação de $(CO_3)^{2-}$ em sítios de OH^- e substituição de O^{2-} no local dos sítios de OH^- . Carbonatos $(CO_3)^{2-}$ é um contaminante comum na maioria das hidroxiapatitas e existem dois sítios conhecidos onde este íon molecular pode ser acomodado. Um é a substituição no sítio de PO_4^{3-} e outro é no sítio de OH^- . O primeiro é um defeito com carga total positiva 1+ que não pode ser utilizado na compensação da substituição local do Eu^{3+} em Ca^{2+} , mas o último é um defeito carregado negativamente que pode dar conta da carga extra promovida pela incorporação do íon dopante em sítios de Cálcio. Outra questão relevante é saber qual dos dois sítios de Cálcio, Ca(1) ou Ca(2), na matriz da hidroxiapatita tem a preferência do Eu^{3+} .

Os resultados de EXAFS pode pôr a prova essas hipóteses de mecanismo de compensação de carga como também revelar a preferência de sítios de Cálcio na incorporação do Eu^{3+} na hidroxiapatita. Na presente Tese será comparada as oscilações de EXAFS com o sinal simulado de EXAFS obtido para diferentes modelos que representam a incorporação do Eu^{3+} .

O primeiro estágio é comparar os dados experimentais de EXAFS com os possíveis modelos de partida sem nenhum ajuste, com intuito de testar qual destes modelos reproduz melhor os dados experimentais. Para a substituição de Eu no sítio de Ca(1) são consideradas duas possibilidades: i) o Eu^{3+} está dissolvido na rede da hidroxiapatita, sem formação de *clusters* devido a precipitação de concentração e sem nenhuma compensação local de carga, ii) o Eu^{3+} ocupa o sítio de Cálcio com um oxigênio intersticial de carga negativa dupla (O_i'' defeito na notação de Kröger – Vink ^[94]) compensado por dois Eu^{3+} que ocupa sítio de Ca^{2+} ($2Eu_{Ca(1)}$) na hidroxiapatita. A compensação por carbonatos $(CO_3)^{2-}$ em OH^- não foi considerada desde que o primeiro sítio de OH^- está localizado além da quinta esfera de coordenação do sítio Ca(1). Do ponto de vista das oscilações de EXAFS, contribuições de dois átomos de oxigênio e de um átomo de carbono a mais nestas distâncias seria muito pequena e provavelmente suprimida pelas flutuações experimentais dos sinal de EXAFS.

Para substituição no sítio de Ca(2), são três possibilidades de incorporação: i) Eu^{3+} ocupa Ca(2) sem nenhuma compensação local de carga, ii) Eu^{3+} em sítios de Ca(2) é compensada por defeito extrínseco O_i'' , como no caso do sítio de Ca(1), e iii) a incorporação de Eu^{3+} em Ca(2) é compensada por O^{2-} em OH^- representado por O'_{OH} . Este último mecanismo de compensação de carga pode ser gerado por íons hidroxila presentes no meio reacional perdendo um átomo de H^+ durante etapa de mistura em meio aquosa das soluções de partida.

A compensação e carga via $(\text{CO}_3)^{2-}$ em OH^- não foi formalmente considerada devido ao efeito na rede desta substituição ser igual a introduzir um O^{2-} próximo ao local de $\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$, logo $(\text{CO}_3)^{2-}$ em OH^- tem similar configuração de O'_{OH} . A comparação de todos defeitos para compensação de carga com as oscilações de EXAFS e transformada de Fourier do sinal de EXAFS estão mostradas na figura 4.32 (a) e (b) para hidroxiapatitas dopadas com Eu.

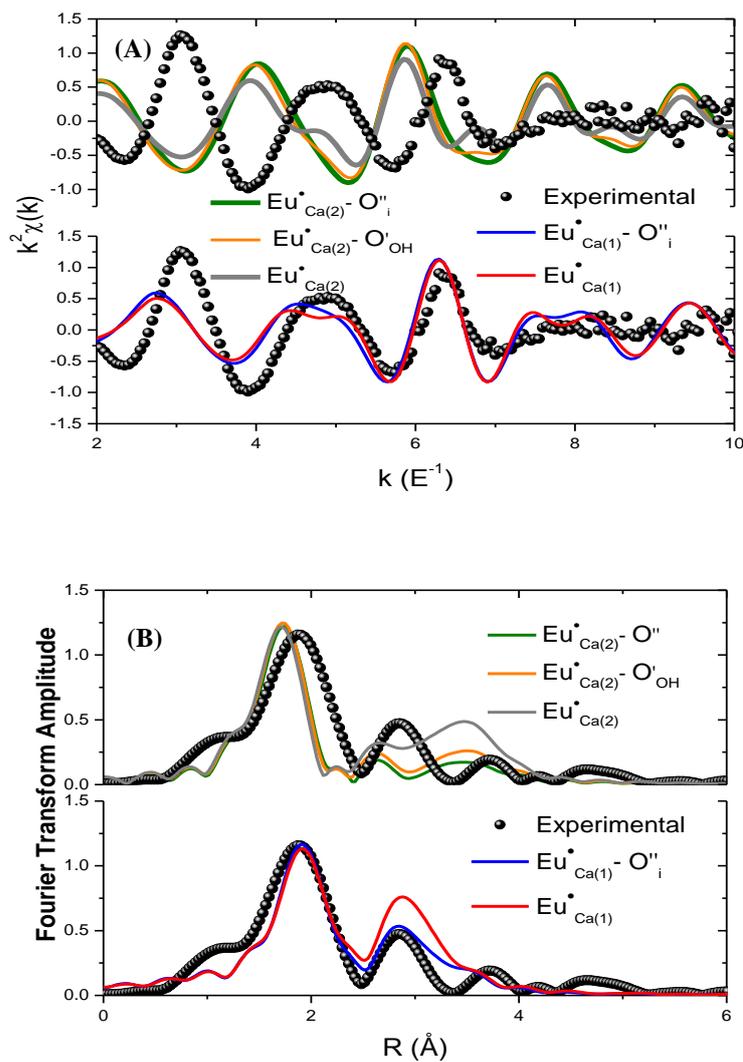


Figura 4.32– Comparação entre os diferentes modelos de incorporação de Eu^{3+} na hidroxiapatita com os dados experimentais de EXAFS para amostra HAP-C:Eu. Em (a) Oscilações de EXAFS usando o peso k^2 e (b) corresponde a transformada de Fourier. Os círculos sólidos representam os pontos experimentais. Modelos envolvendo o Eu^{3+} no sítio de Ca(1) estão nos gráficos inferiores enquanto que modelo para Eu^{3+} em Ca(2) estão nos gráficos superiores.

Na figura 4.32 há um indício de que o melhor modelo é Eu^{3+} substituindo $\text{Ca}(1)$ e O_i'' como defeito de compensação de carga. Este modelo mostra uma boa concordância com a primeira e segunda esfera de coordenação dos dados experimentais. Um melhor entendimento deste resultado pode ser feito comparando algumas das características do sítio de $\text{Ca}(1)$ e $\text{Ca}(2)$ hidroxiapatita.

A tabela 4.3 mostra as distâncias dos primeiros vizinhos para ambos os sítios de Cálcio e para a distância dos sítios de P. A figura 4.33 representa a estrutura da hidroxiapatita para os poliedros de $\text{Ca}(1)$ e $\text{Ca}(2)$. O sítio de $\text{Ca}(1)$ é coordenado por 6 íons de O^{2-} em duas distâncias distintas. O poliedro do $\text{Ca}(1)$ é formado por um prisma triangular distorcido de uma base formada por três sítios de $\text{O}(1)$ e outra formada por três sítios de $\text{O}(2)$. O sítio de $\text{Ca}(2)$ é muito distorcido com seis (6) íons de O^{2-} em quatro distâncias diferentes com mais um (1) íon O^{2-} próximo, produzindo um sítio com número de coordenação de VII. Um dos íons de oxigênio, sítio $\text{O}(4)$, pertence ao grupo OH^- e forma com $\text{Ca}(2)$ um canal de hidroxila ao longo do eixo c .

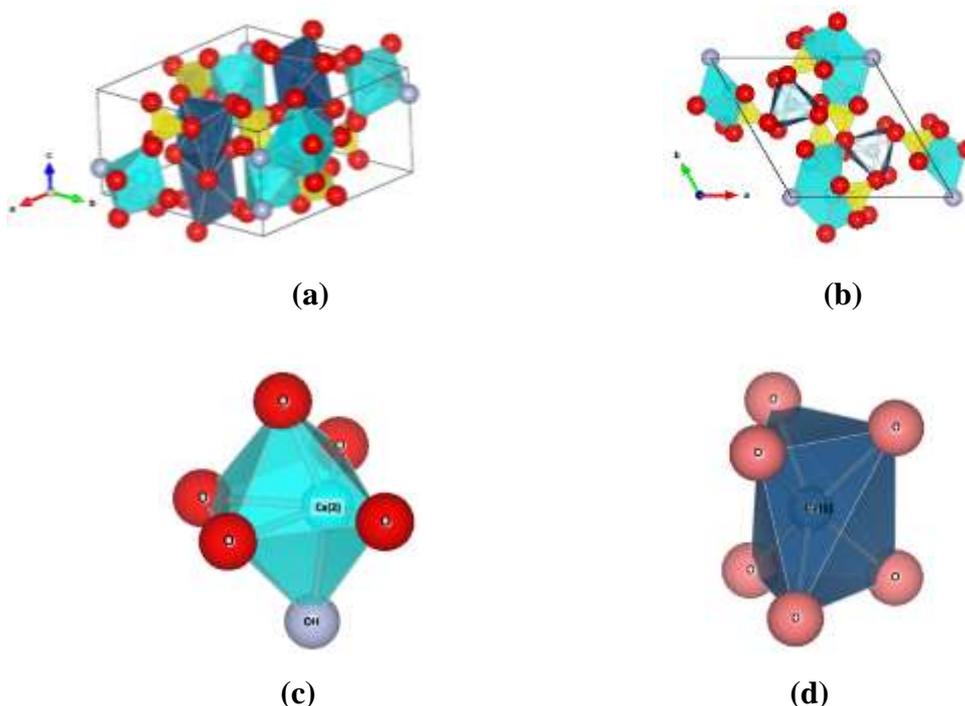


Figura 4.33– Em (a) representação da estrutura da hidroxiapatita construída usando código Vesta ^[95] baseada na estrutura de Andrade e colaboradores, 2004 ^[44], em (b) projeção no plano ab . Grupos de fosfatos são mostrados em amarelo. Em (c) poliedros de sítio do $\text{Ca}(2)$ e em (d) sítios de $\text{Ca}(1)$

Existem duas características importantes que podem explicar a preferência do Eu^{3+} pelo Ca(1). Tomando como base os valores da tabela 4.4, a primeira está relacionada com a média das distâncias entre os primeiros vizinhos de 2,41Å para o Ca(1) e 2,34Å para Ca(2). Esta observação pode ser sustentada na transformada de Fourier das oscilações de EXAFS, ver figura 4.34, onde a primeira esfera de coordenação está deslocada para distâncias menores no espaço- r das simulações feitas do Eu^{3+} em sítio de Ca(2) se comparadas para as simulações usando a substituição no sítio Ca(1). Isto significa que para acomodar o Eu^{3+} no sítio de Ca(2) a rede hospedeira precisa sofrer uma expansão local, fenômeno este não necessário se o Eu^{3+} ocupar o sítio de Ca(1).

A segunda questão está relacionada a esfera de coordenação. No Eu_2O_3 o íon Eu^{3+} ocupa dois sítios octaédricos não equivalentes de distância média Eu(1)-6O igual a 2,46 Å e Eu(2)-6O igual a 2,49Å. Isso significa que o Ca(1) é o sítio com configuração de primeiros vizinhos mais perto do ambiente encontrado pelos sítios de Eu^{3+} no composto de referência.

Tabela 4.4- Número de esferas de coordenação para distâncias dos sítios Ca(1), Ca(2) e P na hidroxiapatita baseados na estrutura do modelo de Andrade e colaboradores, 2004 [44].

Ca (1) sítio			Ca (2) sítio			P sítio		
Ligação	NC	R(Å)	Ligação	NC	R(Å)	Ligação	NC	R(Å)
Ca ₁ -O ₁	3	2.387	Ca ₂ -O ₃	2	2.327	P-O ₂	1	1.539
Ca ₁ -O ₂	3	2.438	Ca ₂ -O ₂	1	2.367	P-O ₃	2	1.540
Ca ₁ -O ₃	3	2.798	Ca ₂ -O ₄	1	2.371	P-O ₁	1	1.551
Ca ₁ -P	3	3.204	Ca ₂ -O ₃	2	2.517	P-O ₃	2	3.079
Ca ₁ -Ca ₁	1	3.398	Ca ₂ -O ₁	1	2.675	P-Ca ₂	1	3.089
Ca ₁ -Ca ₁	1	3.469	Ca ₂ -P	1	3.089	P-Ca ₁	2	3.204
Ca ₁ -P	3	3.583	Ca ₂ -P	1	3.272	P-Ca ₂	1	3.273
Ca ₁ -Ca ₂	3	3.923	Ca ₂ -P	2	3.451	P-Ca ₁	2	3.583
Ca ₁ -Ca ₁	3	4.032	Ca ₂ -P	2	3.662	P-Ca ₂	2	3.662
			Ca ₂ -Ca ₁	2	3.923			
			Ca ₂ -Ca ₁	2	4.032			
			Ca ₂ -Ca ₁	2	4.072			

Baseado nesta discussão, o modelo de Eu^{3+} substituindo o Ca(1) ($\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$) e Eu^{3+} substituindo o Ca(2) ($\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$) ambos com compensação de carga por O_i'' foi ajustado aos dados experimentais de EXAFS para todas as amostras e os resultados são mostrados na tabela 4.5. Por sua vez, a figura 4.34 (a) mostra a transformada de Fourier e 4.34 (b) as oscilações de EXAFS, onde é possível observar que foi alcançado uma boa qualidade nos ajustes em relação as curvas experimentais.

Tabela 4.5- Resultados dos ajustes de EXAFS na borda L_3 -Eu para os modelos $\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$ e $\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$ com O_i'' . Onde NC- número de coordenação dos primeiros vizinhos; $R(\text{Å})$ a distância média entre Eu - átomos vizinhos, $\Delta\sigma^2$ fator de Debye Waller vinculado a desordem local e χ_{re}^2 .

Modelo	HAP:Eu	NC	$R(\text{Å})$	$\Delta\sigma^2$	χ_{re}^2	Modelo	HAP	NC	$R(\text{Å})$	$\Delta\sigma^2$	χ_{re}^2
						P30CTAB:Eu					
$\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$	O	6	2,30 (0,03)	0,009	1,62	$\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$	O	6	2,29 (0,04)	0,009	1,05
	O_i	1	2,47 (0,01)	0,001			O_i	1	2,46 (0,01)	0,013	
	P	3	3,55 (0,01)	0,003			P	3	3,46 (0,02)	0,004	
	Ca_1	2	3,74 (0,02)	0,003			Ca_1	2	3,81 (0,02)	0,002	
$\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$	O	6	2,12 (0,08)	0,028	3,34	$\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$	O	6	2,10 (0,01)	0,029	3,18
	O_i	1	2,28 (0,03)	0,003			O_i	1	2,28 (0,01)	0,003	
	O	3	2,96 (0,01)	0,004			O	3	2,95 (0,02)	0,002	
	P	2	3,26 (0,01)	0,002			P	2	3,25 (0,02)	0,002	

Modelo	HAP	NC	$R(\text{Å})$	$\Delta\sigma^2$	χ_{re}^2
Ca30CTAB:Eu					
$\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$	O	6	2,31 (0,01)	0,009	4,08
	O_i	1	2,47 (0,01)	0,002	
	P	3	3,55 (0,01)	0,002	
	Ca_1	2	3,72 (0,02)	0,001	
$\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$	O	6	2,11 (0,01)	0,022	5,20
	O_i	1	2,30 (0,01)	0,002	
	O	3	2,95 (0,02)	0,002	
	P	2	3,26 (0,03)	0,002	

Nota: 2,30 (0,03) representa $2,30 \pm 0,03$.

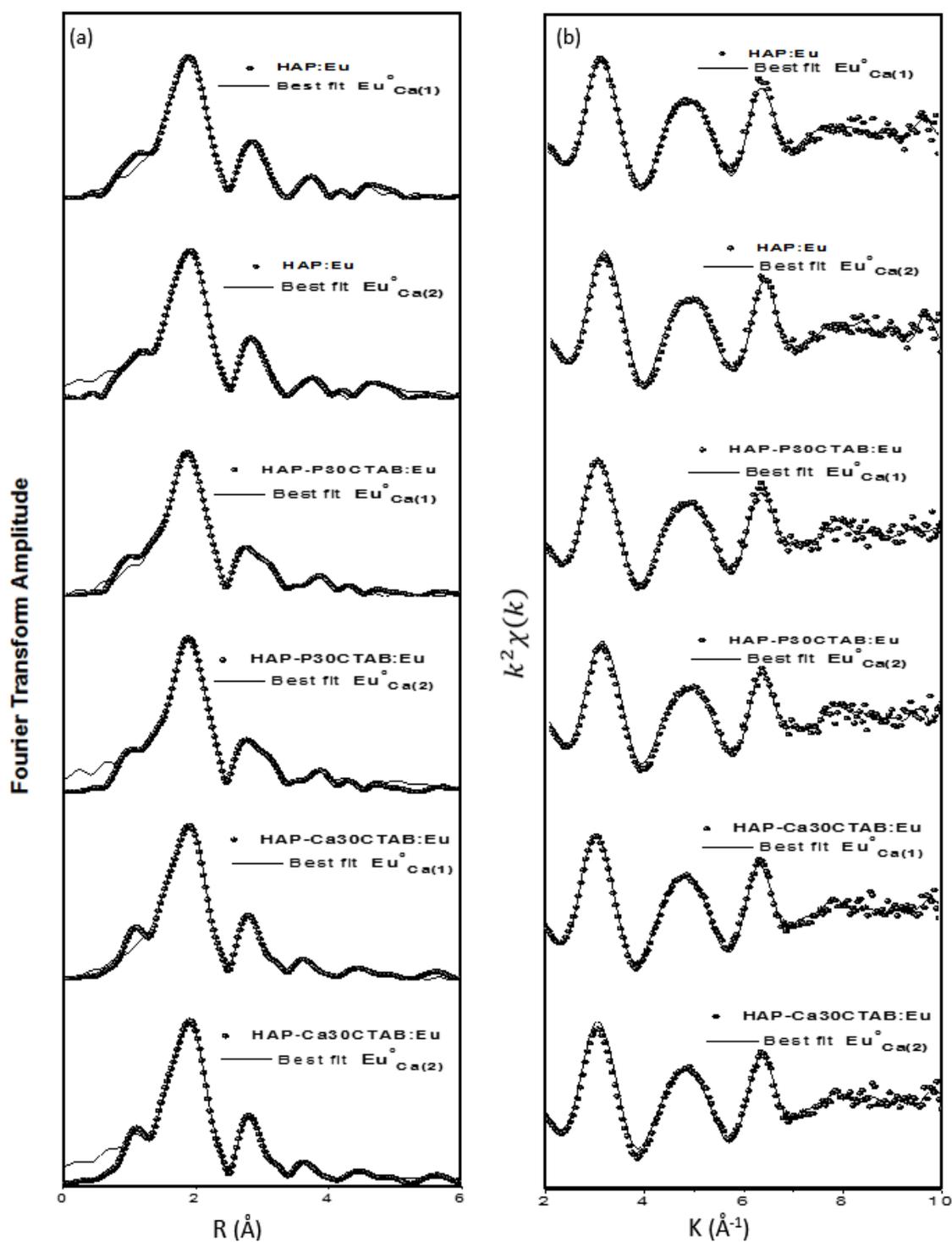


Figura 4.34– Em (a) a transformada de Fourier (pontos pretos) e melhor ajuste no espaço- r (linhas sólidas) para hidroxiapatitas preparadas com $C_{16}TAB$ nos $Eu_{Ca(1)}^{2+}$ e $Eu_{Ca(2)}^{2+}$ com O''_i . (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k^2 (pontos pretos) e melhor ajuste (linhas sólidas). Não foi aplicada a correção de fase na transformada de Fourier.

Os resultados das distâncias das primeiras esferas de coordenação, fator de Debye-Waller e o chi-quadrado reduzido (χ_{red}^2) também é mostrado na tabela 4.5. Valores apresentados na tabela 4.4 e tabela 4.5 também mostram que a primeira esfera de coordenação de íons O^{2-} ao redor do íon Eu^{3+} experimenta um pequeno encolhimento, se comparado com os valores da primeira esfera de coordenação do Ca(1) na tabela 4.4.

Isto pode ser promovido pela presença extra de um íon O^{2-} em um sítio intersticial entre as primeiras esferas de coordenação. Outro interessante resultado é revelado na tabela 4.5 onde há uma expansão da primeira esfera de P localizada a 3,55 Å de Eu^{3+} , se comparado com a distância regular de 3,2 Å para Ca(1)-P na matriz da hidroxiapatita. A carga positiva extra na rede com $Eu_{Ca(1)}$ junto com rearranjo espacial dos O^{2-} é provavelmente a causa da expansão das esferas que contém P. Esse fenômeno também é notado para as primeiras esferas de Cálcio próximas ao íon Eu^{3+} onde a distância de 3,74 Å é maior que ~ 3,4 Å para Ca(1)- Ca(1) na matriz da hidroxiapatita.

Para efeitos de comparação, os modelos envolvidos com a substituição de Eu^{3+} no sítio de Ca(2) compensado por O'_{OH} também foram ajustados aos dados experimentais e mostrados na figura 4.35. É possível ver que para todas as amostras de hidroxiapatita produzida com 30 mM de $C_{16}TAB$ a substituição de Eu^{3+} em Ca(1) com O''_i para neutralizar a carga positiva extra mostra os melhores resultados se comparados a substituição de Eu^{3+} em Ca(2) com O'_{OH} .

Para completar a análise dos resultados da incorporação do Eu na hidroxiapatita, as amostras obtidas via adição do molde Amido-CTAB também tiveram suas oscilações de EXAFS analisadas. Para estas amostras foi proposto o modelo de incorporação de Eu^{3+} no sítio de Ca(1) ou Ca(2) com defeito O''_i para compensação de carga positiva da substituição.

Os ajustes aos dados experimentais das amostras HAP-ACCA:Eu e HAP-ACPO:Eu estão mostrados na figura 4.36, onde (a) mostra a transformada de Fourier e (b) as oscilações de EXAFS com peso k^2 . É possível observar que foi alcançado uma melhor qualidade nos ajustes, em relação as curvas experimentais, para a situação de incorporação do Eu^{3+} no sítio de Ca(1). Como já era de se esperar, as amostras dopadas preparadas com molde de Amido-CTAB apresentariam resultados semelhantes para as primeiras esferas de coordenação das amostras preparadas somente com 30mM de $C_{16}TAB$, já que o molde orgânico é eliminado com o tratamento térmico de 450°C para consolidação da fase de hidroxiapatita e obtenção das amostras em pó.

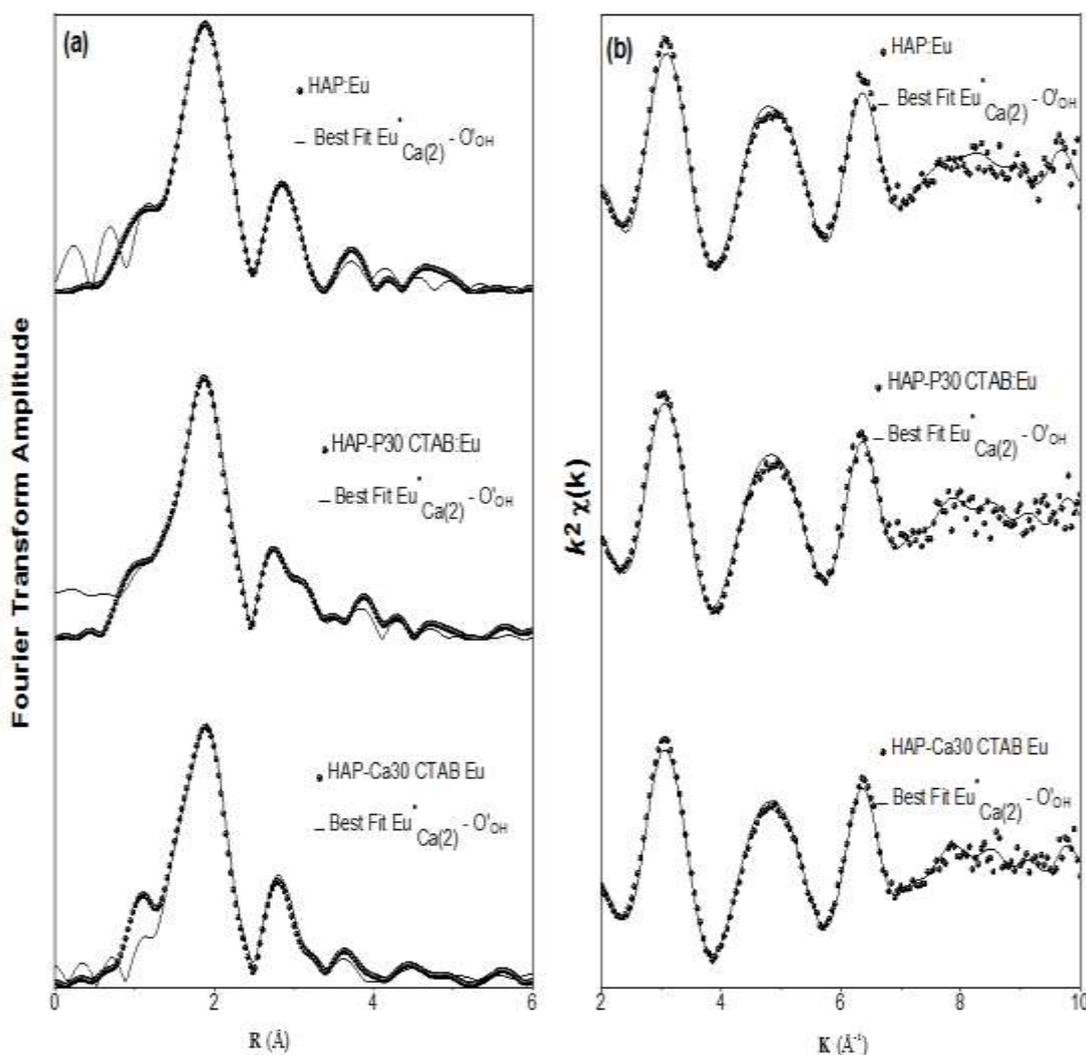


Figura 4.35– Em (a) a transformada de Fourier (pontos pretos) e melhor ajuste no espaço- r (linhas sólidas) para hidroxiapatitas preparadas com C_{16}TAB para Eu^{3+} em $\text{Ca}(2)$ com O'_{OH} . (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k^2 (pontos pretos) e melhor ajuste (linhas sólidas). A transformada de Fourier não teve a correção de fase.

Na tabela 4.6 está contabilizado os resultados dos ajustes para o Eu^{3+} em sítios de $\text{Ca}(1)$ e $\text{Ca}(2)$ com oxigênio intersticial. Conforme é possível observar nos valores chi-quadrado reduzido (χ_{red}^2) os melhores ajustes foram obtidos para Eu^{3+} em $\text{Ca}(1)$ com χ_{red}^2 próximos a uma unidade, ao contrário do observado para substituição de Eu^{3+} em $\text{Ca}(2)$. Este resultado reforça as análises anteriores de que o Eu^{3+} é assimilado na rede da hidroxiapatita com a substituição dos sítios $\text{Ca}(1)$ e mecanismo de compensação de carga preferencial de oxigênio intersticial O'_i .

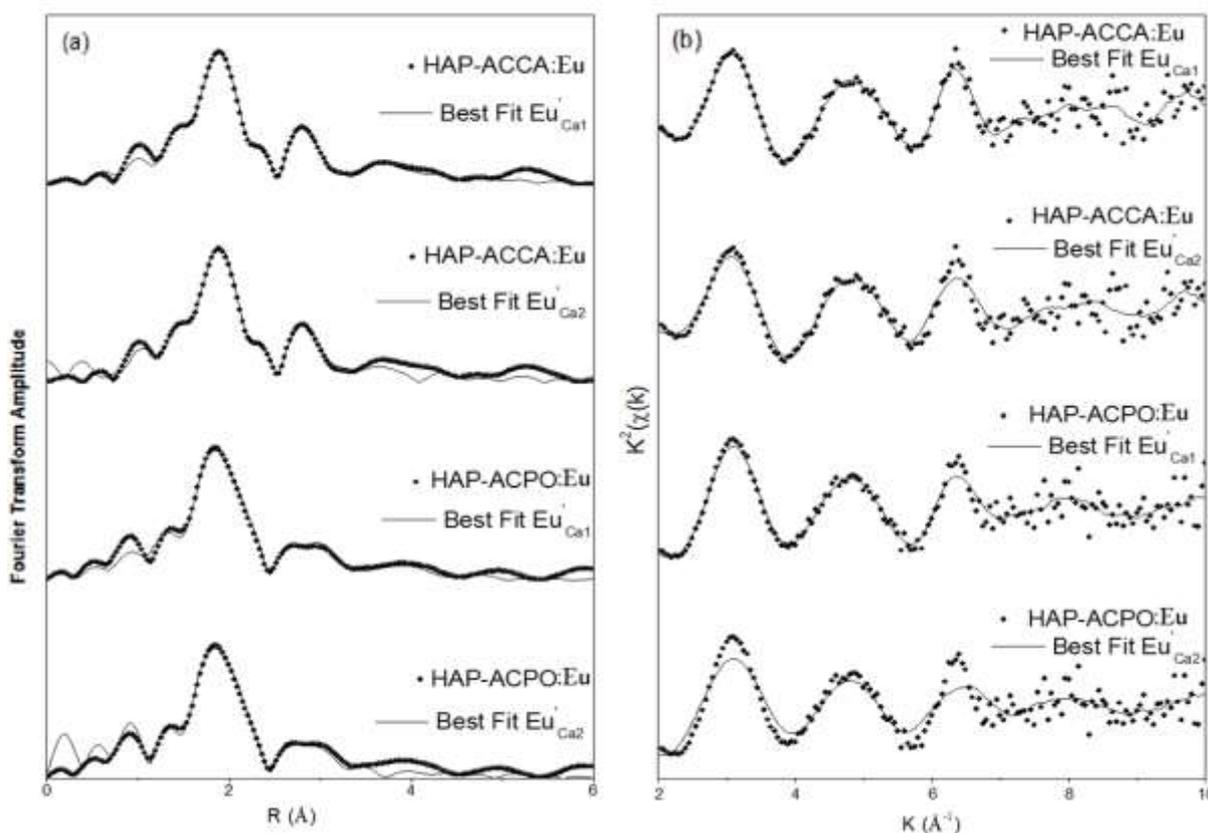


Figura 4.36– Em (a) transformada de Fourier (pontos pretos) e melhor ajuste no espaço- r (linhas) para amostras HAP-ACCA e HAP-ACPO dopadas com 6mol% de Eu e preparadas com Amido-CTAB para incorporação em $\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$ e $\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$ com O''_i . (b) corresponde as oscilações de EXAFS com peso k^2 (pontos pretos) e melhor ajuste (linhas). Não foi aplicada a correção de fase na transformada de Fourier.

Tabela 4.6- Resultados dos ajustes de EXAFS na borda L_3 -Eu para $\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$ e $\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$ com O''_i .

Modelo	HAP-ACCA:Eu	NC	R(Å)	$\Delta\sigma^2$	χ^2_{re}	Modelo	HAP-ACPO:Eu	NC	R(Å)	$\Delta\sigma^2$	χ^2_{re}
$\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$	O	6	2,28 (0,03)	0,010	1,89	$\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}$	O	6	2,29 (0,04)	0,009	1,34
	O_i	1	2,46 (0,01)	0,001			O_i	1	2,46 (0,01)	0,015	
	P	3	3,58 (0,01)	0,003			P	3	3,52 (0,02)	0,008	
	Ca_1	2	3,72 (0,01)	0,002			Ca_1	2	3,78 (0,02)	0,002	
$\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$	O	6	2,15 (0,06)	0,038	4,26	$\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}$	O	6	2,13 (0,01)	0,039	3,18
	O_i	1	2,27 (0,01)	0,003			O_i	1	2,28 (0,01)	0,002	
	O	3	3,01 (0,05)	0,008			O	3	2,95 (0,02)	0,002	
	P	2	3,28 (0,01)	0,002			P	2	3,25 (0,02)	0,002	

Nota: 2,28 (0,03) representa $2,28 \pm 0,03$.

Para concluir a discussão dos resultados de absorção de raios das amostras, alguns estudos da literatura sobre luminescência em apatitas^[50] reportam que a incorporação de Eu^{3+} no sítio de Ca(1) é mais favorável em baixas temperaturas. Para temperaturas acima de 800°C-1200°C, entretanto, os autores sugerem que o íon Eu^{3+} migrem para o sítio de baixa simetria Ca(2) com sistema de compensação de carga de O^{2-} em OH^- , ou que, a substituição Eu^{3+} em Ca(2) é favorecida para redes perfeitas simuladas de hidroxiapatita, sem desvio de estequiometria provocados por tratamentos térmicos ou incorporação de impurezas durante preparação das amostras, por exemplo íons carbonatos $(\text{CO}_3)^{2-}$. Desde que as amostras de hidroxiapatita produzidas na presente Tese foram produzidas por mistura de soluções de partida em atmosfera aberta a 74°C e calcinadas a 450°C, apenas pode-se esperar que o íon dopante Eu^{3+} será incorporado na hidroxiapatita no sítio de Ca(1). A incorporação do Eu^{3+} na hidroxiapatita nos sítios de Ca(2) são favorecidos apenas para alto grau de desordem da rede hospedeira e isto explica porque os autores precisam de altas temperaturas para observarem alguns íons de Eu^{3+} em sítios de Ca(2).

4.5 Espectroscopia de Fotoluminescência do Európio na Hidroxiapatita

A fotoluminescência é uma técnica empregada para investigar a luminescência das amostras dopadas com Eu e produzidas com hierarquia de porosidade por meio do molde Amido-CTAB. Para que um sistema poroso possa atuar como um completo veículo de liberação gradual de fármacos *in situ* ele necessita ter propriedades luminescentes que indiquem o estágio da liberação das moléculas de fármaco próximo ao local de tratamento. Um candidato que pode suprir essa necessidade luminescente é o Eu. O rendimento da luminescência do Eu é afetada pela simetria no entorno do centro luminescente, ou seja, a simetria local do sítio de incorporação do Eu na hidroxiapatita. Conhecer os mecanismos por trás da luminescência do Eu em hidroxiapatitas porosas é de mais valia para possíveis aplicações clínicas e terapêuticas dos sistemas desenvolvidos nesta tese.

Com este intuito, a figura 4.37 representa em (a) o espectro de excitação monitorando a emissão em 612 nm e (b) o espectro de emissão com excitação em 393 nm para amostras controle de HAP-C:Eu com 6mol% e 3mol% de Eu. Para efeitos comparativos, nesta fase do estudo foi analisada a amostra de hidroxiapatita com 3mol% de Eu para investigar possível supressão de luminescência devido a concentração.

A supressão de luminescência promovida por excesso de concentração de íon dopante é bem conhecida na literatura [50,51] e consiste na possibilidade da transferência de energia não radiativas entre níveis eletrônicos ressonantes dos íons terra raras próximos. Este processo aumenta a migração dos sítios com estados excitados dentro da matriz hospedeira, portanto é aumentada a possibilidade da energia de excitação ser liberada por um sítio que favorece o decaimento não radiativo com decréscimo da intensidade luminescente.

A figura 4.37 (b) da emissão das amostras de hidroxiapatita dopadas com 3 mol% e 6 mol% de Eu revela que a intensidade relativa da luminescência é aparentemente aumentada para concentrações de 6mol% de Eu. Entretanto uma ressalva tem que ser feita: apesar das medidas de fotoluminescência das duas amostras serem obtidas sob mesma geometria de medida, a área de amostra irradiada e o volume emitido não foi o mesmo entre as amostras e isto dificulta a comparação direta das intensidades da luminescência. É bem aceito na literatura [96,97] que concentrações de Eu próximas a 5 mol% na hidroxiapatita promovem o melhor rendimento luminescente, sendo os efeitos de supressão de luminescência observados para concentrações superiores a 6 mol%.

Ainda é observado na figura 4.37 (b) as linhas de emissão devido a transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ para $J=0,1,2,3$ e 4 do Eu^{3+} com excitação em 393 nm a temperatura ambiente. Geralmente a transição entre o principal nível emissor e o fundamental ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ é de paridade proibida pela regra de seleção de Laport e não é degenerada, ou seja não se desdobra em qualquer simetria do centro luminescente. Entretanto dependendo da simetria do sítio (C_s, C_1, C_2, \dots) que o Eu^{3+} ocupe a proibição de paridade será parcialmente proibida e a transição forçada ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ de dipolo elétrico 574-580 nm poderá ser observada em fracas linhas de emissão [49]. Este fato se deve por não haver centro de inversão no sítio de Eu^{3+} , ou seja, o Eu^{3+} está em local com baixa simetria e o campo cristalino ligante formado entre íon central, Eu, e primeiros vizinhos atua de forma não homogênea misturando os estados eletrônicos de paridade oposta $4f^{n-1}5d$ dentro dos níveis configuracionais $4f^n$. A transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ de dipolo elétrico forçada é um indício de baixa simetria do Eu^{3+} , já que ela não é degenerada mas em ambientes de baixa simetria tem sua intensidade aumentada pela atuação do campo cristalino ligante que mistura os estados eletrônicos de diferentes momentos angulares totais J mas com mesmo S e L [50].

É sabido que a hidroxiapatita possui dois sítios de Ca com simetrias locais diferentes: a primeira é a simetria do sítio Ca(1) com simetria molecular triangular C_3 que apresenta uma relativa alta simetria local, apesar dos modelos de EXAFS propostos na seção anterior

revelarem que o sítio de Ca (1) seja formado por prisma triangular distorcido. A segunda simetria do Ca está nos sítio de Ca(2) com centro de simetria monoclinica C_s de baixa simetria. O sítio de incorporação do Eu^{3+} em Ca(1) apresenta uma alta simetria se comparada com os sítios de Ca(2) conforme resultado comprovado pelos modelos de EXAFS. Segundo estudos da literatura [50;96] a presença de um único pico referente a transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ é um indício de que o Eu^{3+} ocupa apenas um sítio sem centro de inversão na rede hospedeira. Entretanto, no recorte da figura 4.37 para comprimento de onda 560-580 nm é percebido uma assimetria na região da transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ e isto sugere que o Eu^{3+} está em dois ou mais ambientes distintos. Porém, na amostra dopada com 6mol% de Eu esta transição apresenta uma intensidade relativa baixa, e portanto, isto pode ser o primeiro indício da simetria ao redor do íon Eu^{3+} pode ser relativamente alta como a encontrada no sítio de Ca(1).

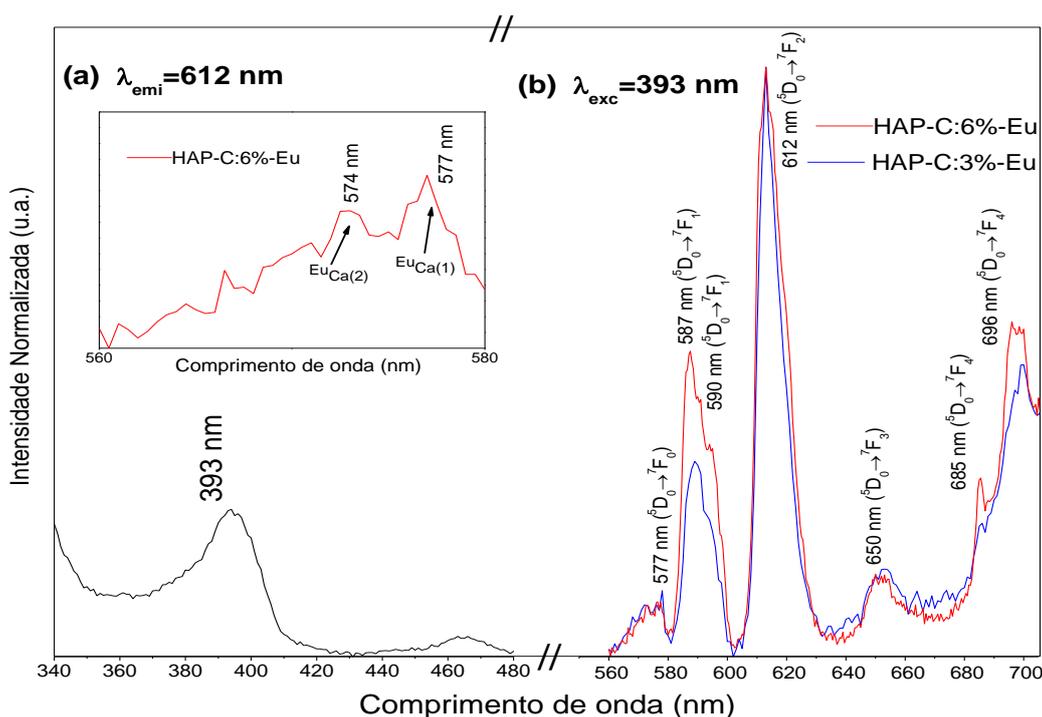


Figura 4.37– Espectros de excitação (a) e emissão (b) das hidroxiapatitas para concentrações de 6mol% e 3mol% de Eu^{3+} .

De acordo com a região de 560 nm a 580 nm do espectro de emissão da amostra HAP-C:6%Eu a transição ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ apresenta picos localizados a 574 nm e 577 nm que indica o Eu^{3+} em Ca(2) e Ca(1) respectivamente, como reportado por estudos de Gaft et al, 2005^[50] para apatitas luminescentes. O resultado mostra que o pico em 577 nm é mais intenso que o pico 574 nm, isto é uma indicação que o íon Eu^{3+} prefere ocupar o sítio de Ca(1) ao invés do Ca(2) na hidroxiapatita. Estudos de ^[50;96] ainda revelam que a substituição de Eu^{3+} em Ca(1) é dependente do tamanho das partículas de hidroxiapatitas. Quanto menor for as partículas maior a probabilidade da substituição Eu^{3+} em Ca(1) ocorrer. Conforme visto na sessão de SEM-FEG e SAXS as partículas de hidroxiapatitas investigadas nesta tese apresentaram tamanhos nanométricos. Vale apenas ressaltar que, a discussão dos resultados de fotoluminescência sobre o sítio de incorporação do Eu^{3+} na hidroxiapatita concorda com os resultados dos ajustes de EXAFS e, portanto, pode-se afirmar com razoável precisão que a preferência de incorporação do Eu^{3+} na hidroxiapatita acontece no sítio de Ca(1).

Em relação as amostras porosas HAP-ACCA:6%Eu e HAP-ACPO:6%Eu preparadas com molde Amido-CTAB têm o espectro de fotoluminescência representado na figura 4.38 para excitação a 391 nm. A diferença entre as amostras está justamente na ordem de gotejamento das soluções fontes de Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Durante a reação de precipitação da amostra HAP-ACPO:6%Eu a solução íon fonte de PO_4^{3-} entra em contato inicialmente com solução de 120mM de C_{16}TAB e posteriormente com solução gotejada de Ca^{2+} . Os possíveis efeitos desta interação inicial entre PO_4^{3-} e C_{16}TAB já foram descritas nas seções de USAXS para obtenção uma estreita distribuição de tamanho de poros, uniporosidade, e EXAFS nas borda k do P para investigação da ordem local e simetria dos primeiros vizinhos do átomo alvo P.

Apesar dos espectros de fotoluminescência da figura 4.38 (b) apresentarem as mesmas transições já observadas na amostra controle, HAP-C:6%Eu, os espectros das duas amostras preparadas com molde Amido-CTAB revelaram diferentes perfis de intensidade relativa da luminescência. Esta diferença entre os espectros é percebida na região das transições de dipolo magnético ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ (585- 600 nm) e dipolo elétrico ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (610-625 nm) de $\Delta J=2$. As transições 4f de dipolo magnético permitidas pela regra de Laporte apresentam intensidade baixas e são pouco sensíveis ao ambiente do campo cristalino. Ou seja, ela é pouco afetada pela simetria dos primeiros vizinhos ao Eu^{3+} . Por esta razão a intensidade desta transição é utilizada como referência de intensidade relativas para outras transições ^[49]. Análise da intensidade relativa em termos áreas relativas sobre os picos das transições ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ e ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ pode render

informações sobre a simetria envolvidas no sítio de európio [50], sendo possível definir uma razão de assimetria pela equação 4.5.

$$R_{21} = \frac{I(^5D_0 \rightarrow ^7F_2)}{I(^5D_0 \rightarrow ^7F_1)} \quad (4.5)$$

A razão de assimetria R_{21} segue da evolução a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ que é de dipolo elétrico e sensível ao campo cristalino entre o Eu e ligantes vizinhos. O parâmetro R_{21} é inversamente proporcional a simetria da vizinhança do sítio de Eu. Para R_{21} diminuir é necessário que a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ seja menos intensa em relação a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$. Isto só acontece para o fato da simetria dos vizinhos de Eu^{3+} aumentar, já que a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ é fracamente observada ou ausente quando o íon se encontra em ambientes com centro de inversão, alta simetria [49,50]. No espectro de emissão, figura 4.38 (b) a amostra HAP-ACPO:6%Eu apresenta a maior razão de assimetria, $R_{21\text{-HAP-ACPO:6\%Eu}} = 1,92$ e $R_{21\text{-HAP-ACCA:6\%Eu}} = 1,74$, logo o íon Eu^{3+} na amostra HAP-ACPO:6%Eu está em ambiente com menor simetria que na amostra HAP-ACCA:6%Eu. Para efeitos comparativos, a razão de assimetria da amostra controle, HAP-C:6%Eu representada na figura 4.37, calculada em termos de áreas relativas foi de $R_{21\text{-HAP-C:6\%Eu}} = 1,68$. Ou seja, com este último dado é possível perceber que o surfactante C_{16}TAB na concentração de 120mM promove uma diminuição de simetria próximo ao sítio do íon Eu^{3+} .

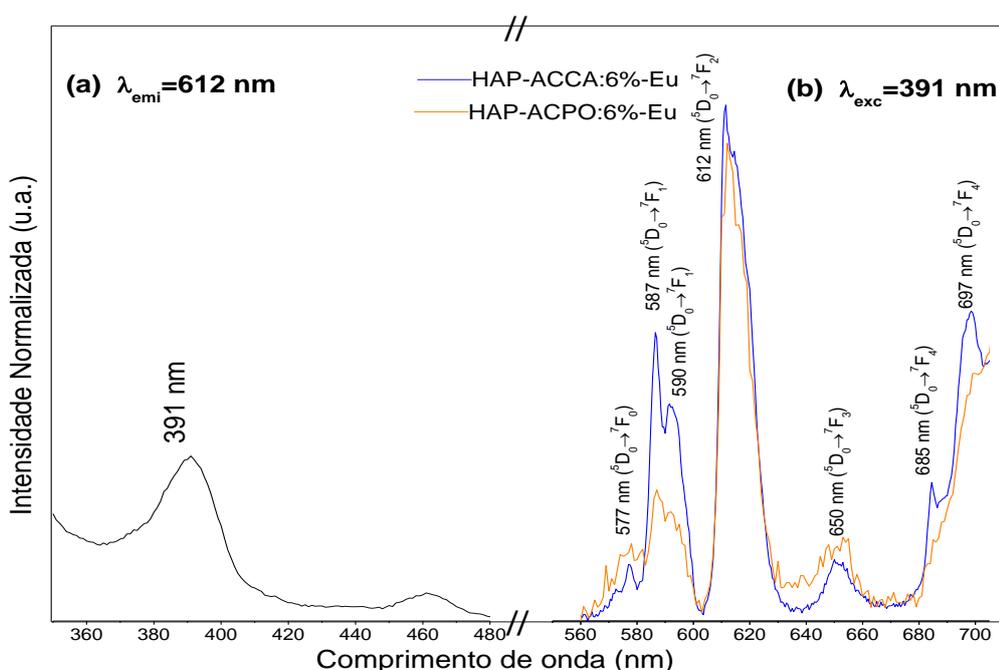


Figura 4.38– Espectros de excitação (a) e emissão (b) das hidroxiapatitas preparadas com molde para porosidade de Amido-CTAB e dopadas com 6mol% de Eu^{3+} .

Essas são informações de que a ordem de gotejamento regular entre as soluções de partida de Ca^{2+} sob soluções de PO_4^{3-} aliada a presença de 120mM de C_{16}TAB favorece a desordem da simetria local do sítio hospedeiro do Eu^{3+} , que neste caso é o sítio de Ca (1). Como nos resultados discutidos nas seções anteriores, mais uma vez a relação entre ordem de gotejamento das soluções e C_{16}TAB interferem na formação da rede cristalina da hidroxiapatita.

Mapeando o perfil da luminescência das transições eletrônica do Eu na hidroxiapatita porosa é possível conhecer o potencial deste íon TR^{3+} como sonda luminescente na região do vermelho no espectro visível. Para um sistema nanocarreador luminescente de fármaco, dependendo da distribuição dos níveis energéticos do fármaco escolhido ele pode intensificar a luminescência do Európio, via efeito antena, quando está próximos a sítios de Eu^{3+} ou suprimir a luminescência se os níveis energéticos encontrados no Eu^{3+} são ressonantes com alguns subníveis do fármaco escolhido, e assim, há transferência de energia e o decaimento não radioativo ao estado fundamental é favorecido. Nesta última situação quando o fármaco é liberado a intensidade dos íons Eu^{3+} são aumenta, e assim, emitindo uma luminescência característica no vermelho. Por este motivo, é proposto nesta tese que os sistemas de hidroxiapatita porosas com Eu^{3+} tem grande potencial para indicar a liberação de fármacos e podem ser usados em tratamentos cutâneos, como câncer de pele. Para estudos futuros fica a tarefa de investigar a relação da luminescência entre fármaco escolhido e Európio, bem como, a dosagem de libração *in situ* do fármaco em função da luminescência do Eu^{3+} .

4.6 Resultados de Citotoxicidade das amostras

Os resultados do teste de citotoxicidade pelo método MTT com gráficos que ilustram a porcentagem de viabilidade celular estão representados na figura 4.39. Para o teste de avaliação da biocompatibilidade dentre os sistemas de fosfatos de cálcio foram escolhidas as amostras controle preparadas sem nenhum molde orgânico: HAP-C e β -TCP-C, como também as amostra β -TCP-ACPO, HAP-ACPO:3% Eu^{3+} e HAP-ACPO:6% Eu^{3+} dopadas com 3 mol% e 6mol% de Európio. Estas duas últimas foram escolhidas para avaliar a biocompatibilidade das amostras dopadas com Európio, bem como, se concentração de európio utilizado no estudo é tóxica as células. Vale a pena ressaltar que, todas estas amostras tiveram a mesma ordem de gotejamento da reação de precipitação, ou seja solução fonte de Ca^{2+} sob solução de P.

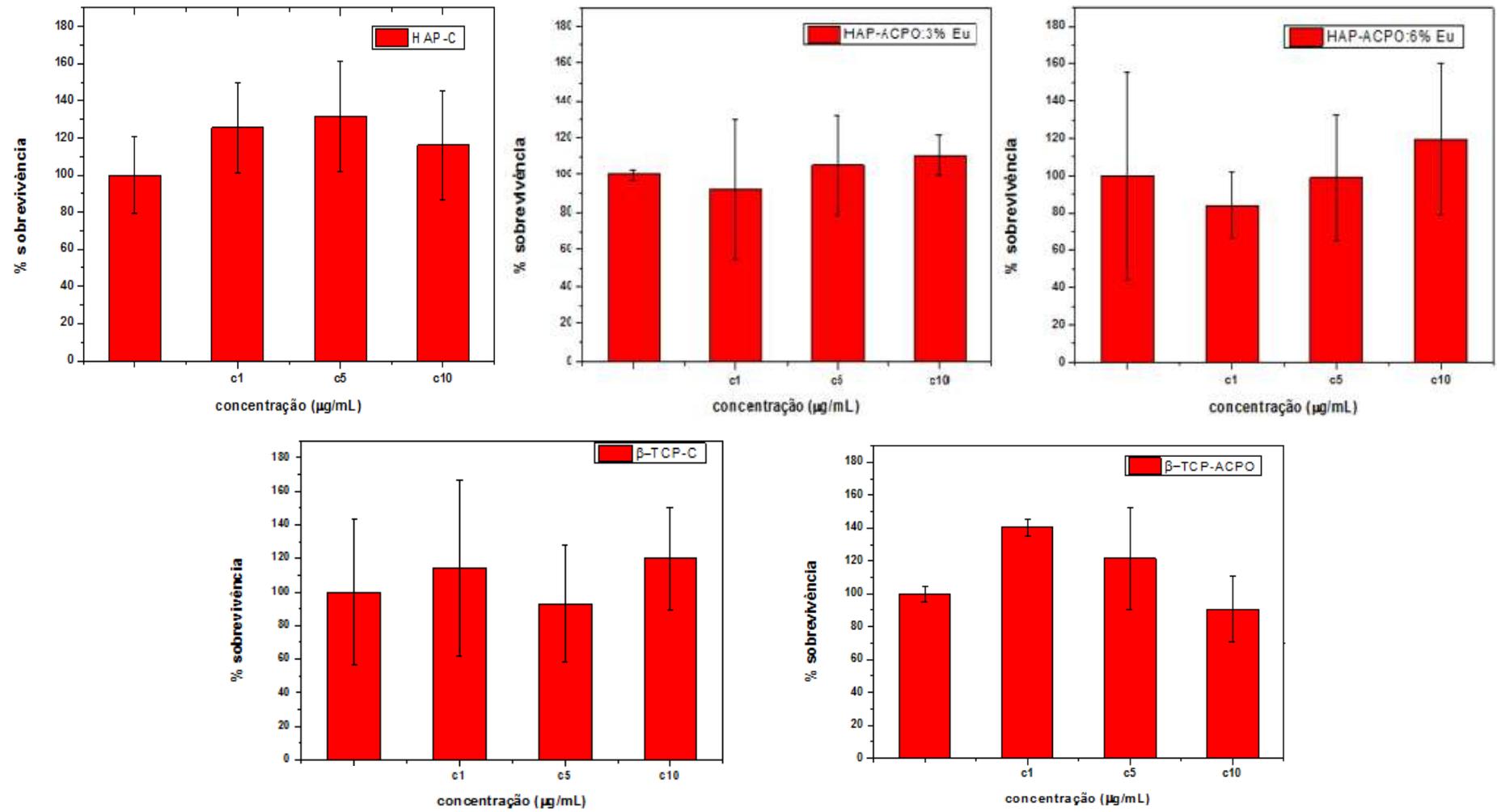


Figura 4.39- Gráficos de viabilidade celular indicando a porcentagem de sobrevivência celular em função da concentração de amostra em pó.

Como já era esperado as amostras controle de hidroxiapatita e β -TCP apresentaram pouca flutuação na porcentagem de sobrevivência celular em função da variação da concentração de pó depositada sob o meio de cultura celular. Este resultado sugere que as amostras controle apresentam ótima biocompatibilidade com as células avaliadas. A amostra β -TCP-ACPO apresentou uma flutuação um pouco maior na taxa de sobrevivência celular dentre as cinco amostras avaliadas. Mas considerando os intervalos das barras de erro pode-se afirmar que esta amostra também apresenta boa biocompatibilidade à células humanas e pode ser futuramente empregado em testes *in vivo* de citotoxicidade.

Por sua vez, as amostras HAP-ACPO:3%Eu³⁺ e HAP-ACPO:6%Eu³⁺ apresentaram comportamento da taxa de sobrevivência idênticas e bem próximos aos apresentados para a amostra controle HAP-C. Este resultado sugere duas análises: (i) que a adição do molde Amido-CTAB na rota de síntese destas amostras não alterou a biocompatibilidade do sistema e (ii) a dopagem com diferentes concentrações de Európio não acrescentou efeitos de toxicidade à hidroxiapatita, mesmo dobrando a concentração do dopante a taxa de sobrevivência permaneceu próxima de 100%. Este ótimo resultado sugere que todas as amostras produzidas de hidroxiapatita apresentam excelente biocompatibilidade celular *in vitro*.

Portanto, este resultado agrega novos valores aos estudos de Luminescência e de incorporação do íon Eu³⁺ desenvolvidos nesta tese. Na qual, pôde-se comprovar a vinculação do Európio atuando como uma sonda luminescente na hidroxiapatita sem afetar a sua principal característica: biocompatibilidade em meio celular. Este resultado fecha os estudos apresentados na presente Tese e proporciona aos sistemas de fosfato de cálcio porosos desenvolvidos um viés tecnológico para concretização da quinta geração de biocerâmicas porosas, cerâmicas de excelente biocompatibilidade que aliam em um único sistema a hierarquia de porosidade e sonda luminescente para indicar possível liberação de fármacos *in situ*.

CONCLUSÕES

Todas as abordagens dos resultados apresentados e discutidos nesta tese tiveram como perspectiva principal a produção e caracterização estrutural de fosfatos de cálcio com hierarquia de porosidade obtida pelo desenvolvimento inédito de um molde proveniente da combinação de um biopolímero, amido de milho, e surfactante C₁₆TAB. As principais conclusões podem ser resumidas nos itens a baixo:

Foi comprovado por XRD de que a rota de co-precipitação adotada produz fosfatos de cálcio cristalino nas fases desejadas e foram observadas variações qualitativas nas dimensões dos cristalitos alternando a natureza iônica da solução de gotejamento e do tipo de molde orgânico empregado. Apesar da adição dos moldes orgânicos propostos para formação de poros, não foram observadas fases adjacentes à hidroxiapatita. Entretanto, foi verificado por XRD que no β -tricálcio fosfato, o molde Amido-CTAB promove a formação de fases adicionais, como a hidroxiapatita carbonatadas e pirofosfatos de cálcio. As análises de FT-IR revelaram que o tratamento térmico a 450°C/4h para consolidação da fase mineral da hidroxiapatita é suficiente para promover a extração dos moldes orgânicos usados.

As micrografias por SEM-FEG forneceram informações que foram posteriormente comprovadas nos experimentos de SAXS/USAXS, tais como, a rota de co-precipitação promove aglomeração de partículas com morfologia de partículas distorcidas que apresentam razão de aspecto condizente com esferoides para amostra controle ou bastonetes cilíndricos nas amostras obtidas na presença de micelas de C₁₆TAB. Entretanto, somente o C₁₆TAB não foi suficiente para produzir poros ordenados nas amostras de hidroxiapatita. Enquanto que o molde de distribuição lamelar formado da combinação entre amido e 120mM C₁₆TAB formou na hidroxiapatita uma distribuição de poros em três dimensões (3D) com hierarquia de poros com tamanhos entre \approx 2 μ m a 40nm, que corresponde ao intervalo de meso a macroporos, de acordo com a classificação da IUPAC, e que era um dos objetivos desta tese. Vale ressaltar que a proposta do molde do combinado orgânico de 4 g de amido e 120mM de C₁₆TAB apresentada neste trabalho é inédito e que, a partir dele, pode-se obter porosidade na hidroxiapatita. Para o β -tricálcio fosfato não foi possível notar a eficiência do molde Amido-CTAB na formação da mesoporosidade ordenada devido à alta temperatura de calcinação a 800°C e coalescência das partículas. Mas para o β -tricálcio produzido com 4g de amido foi percebido a formação de poros na escala micrométrica que podem ser aplicadas como *scaffolds* na medicina de regeneração de tecidos.

Os resultados de SAXS comprovaram que as partículas estão fortemente aglomeradas, com geometria de esferoides e bastonetes cilíndricos para diferentes razões de aspecto entre as dimensões. A dopagem com Európio provocou um crescimento dos centros espalhadores que pode ser um indício de maior tamanho de partículas. O molde combinado orgânico de Amido-CTAB apresentou distribuição lamelar bem definida. Uma conclusão importante dos resultados de SAXS e que combina com a análise por SEM-FEG foi de que somente o molde de 30 mM de C₁₆TAB não foi capaz de promover a mesoporosidade almejada na hidroxiapatita. Poucos trabalhos na literatura reportam estudos de fosfatos de cálcio por SAXS. Neste sentido, outro resultado inédito apresentado nesta tese se refere a utilização da técnica de USAXS na investigação da porosidade em fosfatos de cálcio.

Com as análises dos resultados experimentais de USAXS observou-se que a porosidade foi obtida somente com adição de amido de milho à rota de co-precipitação, enquanto que o ordenamento dos poros encontrados na hidroxiapatita é local. A hierarquia de porosidade com meso e macroporos está mais presente na amostra HAP-ACCA enquanto que a menor distribuição de tamanhos de poros foi alcançada para ordem de precipitação usual das soluções fontes de Ca²⁺ sob a solução com PO₄³⁻. Logo, este resultado inédito comprova que a simples alteração da ordem de precipitação entre os reagentes provoca mudanças significativas da distribuição de tamanho de poros da hidroxiapatita. Este conhecimento de quais parâmetros da rota de síntese altera a propriedade final em estruturas de hidroxiapatitas é de mais valia para desenvolvimento de produtos como nanocarreadores de fármacos baseados em poros de hidroxiapatita.

Em relação aos resultados de XAFS há constatação da incorporação de Eu com valência 3+ na matriz cristalina da hidroxiapatita, assim como, os sinais de EXAFS revelaram que o dopante assume coordenação VI semelhante ao ambiente encontrado no Eu₂O₃. Com os ajustes dos modelos de incorporação propostos foi possível determinar que o Eu³⁺ prefere o sítio de Ca(1) do que Ca(2) com a formação de O_i^{''} (oxigênio intersticial) como mecanismo de compensação de carga local na hidroxiapatita. Esta preferência de incorporação foi confirmada tanto para amostras produzidas com 30mM de C₁₆TAB quanto com 4 g de amido mais 120mM C₁₆TAB. Os resultados de EXAFS revelaram que o surfactante C₁₆TAB impõe uma compressão local sentida nos sítios de P na rede da hidroxiapatita. Este fato é devido ao deslocamento de sítios Ca na direção de sítios de P, bem como, alterações no fator de desordem estrutural para as esferas de coordenação próximas aos sítios de fosfato.

Os espectros de fotoluminescência do Eu^{3+} na hidroxiapatita revelaram um bom rendimento luminescente para concentrações de dopagem de 6mol%, como também há uma tendência de incorporação do íon dopante pelo sítio de Ca(1). A ordem de gotejamento entre as soluções fontes de Ca^{2+} e PO_4^{3-} aliada a presença de 120mM de C_{16}TAB promove a diminuição da simetria local em torno do sítio hospedeiro de Eu^{3+} .

Para o devido desfecho dos estudos realizados nesta tese, os resultados de citotoxicidade *in vitro* confirmaram a biocompatibilidade da hidroxiapatita e de β -TCP. As amostras apresentaram excelentes taxas de sobrevivências em meio de cultura celular. A dopagem com 6mol% de Eu^{3+} não afetou a característica biocompatível da hidroxiapatita. Tornando assim, este sistema apto a seguir para próximas etapas de desenvolvimento de um produto final visando aplicação no tratamento de câncer de pele com dosagem controlada, já que alia em um único sistema três características: porosidade, luminescência e biocompatibilidade.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Serão citados a seguir as perspectivas para estudos futuros com o intuito da continuidade de pesquisa visando futuros resultados pertinentes para o tema da presente tese.

- (1) Aprimoramento da rota de síntese para beneficiar a ordenação e consolidação de hierarquia de porosidade em amostras de β -TCP. Nesse sentido, poderão ser testadas novas estequiometrias e/ou adição de um terceiro composto, por exemplo um polímero denso, no molde orgânico Amido-CTAB com as características desenvolvidas;
- (2) Estudo quantitativo de XRD com análises de refinamento de Rietveld das nanopartículas de fosfatos de cálcio em função dos moldes de porosidade;
- (3) Estudo da interface porosa ordenada do arranjo das partículas das amostras de fosfatos de cálcio por adsorção de nitrogênio (N_2) da área superficial obtidas por BET, por exemplo conhecer o volume total de poros das amostras;
- (4) Efetuar uma análise química por EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva) da constituição de algumas estruturas detectadas sob a superfície das partículas de hidroxiapatita;
- (5) Comprovar por experimentos de SAXS em solução à 74°C a formação de estruturas micelar de $C_{16}TAB$, bem como, sua ordenação em meio reativo durante a co-precipitação dos fosfatos de cálcio;
- (6) Investigar a relação da luminescência entre fármacos e Európio, bem como, conhecer os processos físicos envolvidos e a dosagem de liberação *in situ* do fármaco em função da luminescência do Eu^{3+} através do desenvolvimento de aparatos experimentais para observação da liberação de fármaco em fluido biológico simulado;
- (7) Conhecer a taxa de degradação em meio de fluido biológico simulado dos fosfatos de cálcio biocompatíveis carreadores de fármaco e realização de estudos *in vivo* sob a epiderme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ELLIOTT, J. C. Recent studies of apatites and other calcium orthophosphates. **Calcium Phosphate Materials, Fundamentals**. Montpellier, p.25, 1998. Special Edition: Sauramps Medical.
- [2] ÖNER, M.; YETIZ, E.; AY, E.; UYSAL, U. Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets. **Ceramics International**, v. 37, n. 7, p. 2117-2125, 2011.
- [3] ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2769-81, 2011.
- [4] NIETO, A.; BALAS, F.; COLILLA, M.; MANZANO, M.; VALLET-REGÍ, M. Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 116, n. 1-3, p. 4-13, 2008.
- [5] CHANG, P. R.; YU, J.; MA, X. Preparation of porous starch and its use as a structure-directing agent for production of porous zinc oxide. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 1016-1019, 2011.
- [6] YANG, C.; YANG, P.; WANG, W. Solvothermal synthesis and characterization of Ln (Eu³⁺, Tb³⁺) doped hydroxyapatite. **Journal of colloid and interface science**, v. 328, n. 1, p. 203-10, 2008.
- [7] CIESLA, U. SCHUTCH, F. Ordered mesoporous materials. **Microporous and Macroporous Materials**, v. 27, p. 131-149, 1999.
- [8] SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W. . Reporting physisorption data for gas/solid systems. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. 57, n. 4, p.603-619, 1985.
- [9] McCUSKER, L.B.; LIEBAU, F.; ENGELHARDT, G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous with inorganic hosts. **International Applied Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 381-394, 2001.
- [10] GULTEPE, E.; NAGESHA, D.; SRIDHAR, S.; AMIJI, M. Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 3, p. 305-15, 2010.
- [11] NIU, D.; MA, Z.; LI, Y.; SHI, J. Synthesis of core-shell structured dual-mesoporous silica spheres with tunable pore size and controllable shell thickness. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 43, p. 15144-7, 2010.

- [12] YUN, H. S.; PARK, J. W.; KIM, S.H. Effect of the pore structure of bioactive glass balls on biocompatibility in vitro and in vivo. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2651-60, 2011.
- [13] SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; NIETO, A.; VALLET-REGÍ, M. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, n. 1, p. 62-71, 15 2008.
- [14] VALLET-REGÍ, M. Hexagonal ordered mesoporous materials as a matrix for the controlled release amoxicillin. **Solid State Ionics**, v. 172, p. 435-439, 2004.
- [15] STEIN, A.; HOLLAND, B. T.; BLANFORD, C. F.; YAN, H. **Synthesis of macroporous structures**. U.S. n. 6680013, 20 jan. 2004.
- [16] GUDA, T.; APPLEFORD, M.; ONG, J. L. A cellular perspective to bioceramic scaffolds for bone tissue engineering: the state of art. **Curr Top Med Chem**, v. 9, n. 8, p. 290, 2008.
- [17] CHEN, F.; ZHU, Y. J.; ZHANG, K. H. *et al.* Europium-doped amorphous calcium phosphate porous nanospheres: preparation and application as luminescent drug carriers. **Nanoscale research letters**, v. 6, n. 1, p. 67, 2011.
- [18] ZHU, M.; WANG, H.; LIU, J.. A mesoporous silica nanoparticula/ β -TCP/BG composite drug delivery system for osteoarticular therapy. **Biomaterials** v. 32, n. 7, p. 1986-95, 2011.
- [19] WANG, H.; ZHAI, L.; LI, Y.; SHI, T. Preparation of irregular mesoporous hydroxyapatite. **Materials Research Bulletin**, v. 43, n. 6, p. 1607-1614, 2008.
- [20] YANG, C.; YANG, P.; WANG, W. Synthesis and characterization of Eu-doped hydroxyapatite through a microwave process. **Solid State Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1923-1928, 2009.
- [21] HU, J.; GAO, F.; SHANG, Y.. One-step synthesis of micro/mesoporous material templated by CTAB and imidazole ionic liquid in aqueous solution. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 142, n. 1, p. 268-275, 2011.
- [22] SHANTHI, P. M.; ASHOK, M.; BALASUBRAMANIAN, T.. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite at ambient temperature using cationic surfactant. **Materials Letters**, v. 63, n. 24-25, p. 2123-2125, 2009.
- [23] ZHANG, K.; ZHENG, L.; ZHANG, X.; CHEN, X.; YANG, B. Silica-PMMA core-shell and hollow nanospheres. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 277, n. 1-3, p. 145-150, 2006.
- [24] GÓRKA, J.; JARONIEC, M. Hierarchically porous phenolic resin-based carbons obtained by block copolymer-colloidal silica templating and post-synthesis activation with carbon dioxide and water vapor. **Carbon**, v. 49, n. 1, p. 154-160, 2011.

- [25] ZHU, M.; WANG, H.; LIU, J. A mesoporous silica nanoparticulate/ β -TCP composite drug delivery system for osteoarticular tuberculosis therapy. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1986-95, 2011.
- [26] XIA, Z.; LIAO, L.; ZHAO, S. Synthesis of mesoporous hydroxyapatite using a modified hard-templating route. **Materials Research Bulletin**, v. 44, n. 8, p. 1626-1629, 2009.
- [27] ANUNZIATA, O. A.; MARTÍNEZ, M. L.; BELTRAMONE, A. R. Hydroxyapatite /MCM-41 and SBA-15 Nano-Composites: Preparation, Characterization and Applications. **Materials**, v. 2, n. 4, p. 1508-1519, 2009.
- [28] ZHANG, S.; XU, Lei, LIU, H. A dual template method for synthesizing hollow silica spheres with mesoporous shell. **Materials Letters**, v. 63, p. 258-259, 2009.
- [29] ZHAO, Q.; WANG, T.; WANG, J. Fabrication of mesoporous hydroxycarbonate apatite for oral delivery of poorly water-soluble drug carvediol. **J. of Non-Crystalline Solids**, v. 358, p. 229-235, 2012.
- [30] YANG, X. Y.; LI, Y.; LEMAIRE, A. Hierarchically structured functional material: Synthesis strategies for multimodal porous networks. **Pure Appl. Chem.**, v. 81, n.12, p 2265-2307, 2009.
- [31] MIAO, Z.; DING, K.; WU, T. Fabrication of 3D-networks of native starch and their application to produce porous inorganic oxide networks through a supercritical route. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 111, n. 1-3, p. 104-109, 2008.
- [32] HUANG, Y.; HO, J.; WANG, Z. Mesoporous carbon confined conversion of silica nanoparticles into zeolite nanocrystals. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1-2, p. 490-496, 2009.
- [33] WANG, T.; ZOU, M.; JIANG, H.. Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large mesopores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 653-659, 2011.
- [34] RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M.; VALLET-RÉGI, M.; FERREIRA, J. M. F. Fabrication of porous of hydroxyapatite bodies by a new direct consolidation method: starch consolidation. **Mater Sci. Eng.** v. 10, p. 35-40, 2001.
- [35] SUNDARAM, J.; DURANCE, T. D.; WANG, R. Porous scaffold of gelatin-starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying. **Acta biomaterialia**, v. 4, n. 4, p. 932-42, 2008.
- [36] LYCKFELDT, O.; FERREIRA, J. M. F. Processing of porous ceramics by starch consolidation. **Journal of European Ceramic Soc.**, v. 18, p. 131-140, 1998.

- [37] KUNDU, B.; LEMOS, A.; FERREIRA, J. M. F. Development of porous HAp and β -TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold based drug delivery system. **J. Mater Sci.: Mater Med**, v. 21, p. 2955-2969, 2010.
- [38] VALLETREGI, M. Synthesis of β -tricalcium phosphate in layered or powdered forms for biomedical applications. **Solid State Ionics**, v. 172, n. 1-4, p. 445-449, 2004.
- [39] TRICOTEAUX, A.; RGUITI, E.; CHICOT, D. Influence of porosity on the mechanical properties of microporous beta-TCP bioceramics by usual and instrumented Vickers microindentation. **Journal of European Ceramic Society**, v. 31, n. 8, p. 1361-1369, 2011.
- [40] DOROZHKIN, S. V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 715-34, 2009.
- [41] CÖLFEN, H. Bio-inspired mineralization using hydrophilic polymers. **Top Curr Chem**, v. 271, p.1-77, 2007.
- [42] VALLET-RÉGI, M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. **C.R. Chimie**, v. 13, p. 174-185, 2010.
- [43] FLEET, M. E.; LIU, X. Local structure of channel ions in carbonate apatite. **Biomaterials**, v. 26, n. 36, p. 7548-54, 2005.
- [44] ANDRADE, A.V.C.; SILVA, J.C.Z.; PAIVA, C.O.S.; WEBER, C. Synthesis and crystal phase evaluation of hydroxylapatite using the Rietveld - maximum entropy method. **Ceramic Engineering and Science Proceedings**, v. 25, p. 639-645, 2004.
- [45] YASHIMA, M. Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 175, n. 2, p.272-277, 2003.
- [46] CARRODEGUAS, R.G; De AZA, S. α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v.7, p. 3536-3546, 2011.
- [47] GOPAL, R.; CALVO, C. R. Whitlockite Mineral. **Nat. Phys. Sci**, v.237 p. 30-32, 1972.
- [48] DICKENS, B.; SCHROEDER, L. W ; BROWN, W. E. Crystallographic Studies of the Role of Mg as a Stabilizing Impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. **J. Solid State Chem**, v. 10, p. 232-248, 1974.
- [49] WOLFBEIS, O.S. **Lanthanide Luminescence**. New York: Springer, 2011. 398 p.
- [50] GAFT, M.; REISFEL, R.; PANCZER, G. **Luminescence Spectroscopy of Minerals and Materials**. 2. ed. New York: Springer, 2005. 356 p.
- [51] MOELLER, T. **The Chemistry of the Lanthanides**. New York: Pergamon, v. 26, 1975. 110 p.

- [52] PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Effect of native crystalline structure of isolated potato starch on gelatinization and consequently on glycemic response. **Food Research Int.**, v. 45, p. 238-243, 2012.
- [53] BULEON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **Int. J. Bio. Macromol.**, v. 23, p. 85-112, 1998.
- [54] IZIDORO, D.R.; JUNIOR, D.B.; HAMINIUK, C.W.I. Granules morphology and rheological behavior of green banana (*Musa cavendishii*) and corn (*Zea mays*) starch gels. **Ciências e Agrotecnologia**, v.31, p. 1443-1448, 2007.
- [55] LI, Y.; TJANDRA, W.; TAM, C.K. Synthesis and characterization of nanoporous hydroxyapatite using cationic surfactants as template. **Materials Research Bulletin**, v.43, p. 2318-2326, 2008.
- [56] MODARESSI, A.; SIFAOU, H.; GRZESIAK, B.; CTAB aggregation in aqueous solution of ammonium based ionic liquids. **Colloids and Surfaces A**, v. 296, p. 104-108, 2007.
- [57] CULLITY, B.D. **Elements of X-ray diffraction**. Michigan: Addison-Wesley Publishing Company, 1978. 555p.
- [58] KITTEL, C. **Introduction to Solid State Physics**. 7 ed. Brisbane: Wiley, 1996. 506 p.
- [59] WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science**. 2. ed. New York: Springer, 2009. 779 p.
- [60] SAYERS, D. E.; STERN, E. A.; LYTLE, F. W. New technique for investigating noncrystalline structures: Fourier analysis of the extended x-ray-absorption fine structure. **Physical Review Letters**, v. 27, p. 1204-1207, 1971.
- [61] BUNKER, G. **Introduction to XAFS: A practical guide to X-ray absorption fine structure spectroscopy**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2010. 260 p.
- [62] STERN, E.A. Theory of the extended x-ray-absorption fine structure. **Physical Review B**, v. 10, p. 3027-3037, 1974.
- [63] JANSSENS, K. H. A. **Modern Methods for Analyzing Archaeological and Historical Glass**. v. 1. Oxford: John Wiley & Sons Ltd, 2013. 746 p.
- [64] KONINGSBERGER, D. C. **X-ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES**. New York: John Wiley & Sons, 1988. 668 p.
- [65] RIBEIRO, E. S.; FRANCISCO, M. S.; GUSHIKEM, Y.; GONÇALVES, J. E. **Princípios Básicos de XAS e XPS**. 2003. Disponível em <<http://chemkeys.com/br/2003/02/24/principios-basicos-de-xas-e-xps>>. Acesso em 05 de JANEIRO de 2015.

- [66] TOLENTINO, H.; CEZAR, J. C.; CRUZ, D. Z.; Et all. Commissioning and first results of the LNLS XAFS beamline. **Synchrotron Radiation**. v. 5, p. 521-523, 1998.
- [67] ABBATE, M.; VICENTIN, F.C. COMPAGNON-CAILHOL, V; ROCHA, M. C.; TOLENTINO, H. The soft X-ray spectroscopy beamline at the LNLS: technical description and commissioning results. **Journal Synchrotron Rad.** v. 6, p.964-972, 1999.
- [68] NEWVILE, M. [IFEFFIT: interactive EXAFS analysis and FEFF fitting.](#) *Sync.Rad*, v. 8, p. 322-324, 2001.
- [69] GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small Angle X-ray Scattering**. 1. ed. London: Academic,1982. 515p.
- [70] SVERGUN, D.I.; KOCH, M.H.J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, v.66, p.1735-1782, 2003.
- [71] ILAVSKY, J.; ZHANG, F.; ALLEN A.J., LEVINE L.E.; JEMIAN, P.R.; LONG, G.G. Ultra-Small-Angle X-ray Scattering Instrument at the Advanced Photon Source: History, Recent Development, and Current Status. **Metallurgical and Materials Transactions a-Physical Metallurgy and Materials Science**. v. 44, p. 68-76, 2013.
- [72] ILAVSKY, J. ; JEMIAN, P.R. Irena: tool suite for modeling and analysis of small-angle scattering. **J. Appl. Cryst**, v.42, n.2 , p. 347-353, 2009.
- [73] SOLÉ, J. G., BAUSÁ, L. E., JAQUE, D. **An introduction to the optical spectroscopy of inorganic solids**. Madrid: Ed. Jhon Wiley & Sons Ltd, 2005. 283 p.
- [74] ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates**. Amsterdam: Ed. Elsevier Science, 1994.
- [75] FREI, M. **Cell Viability and Proliferation**. Disponível em:<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/biofilespdf/biofiles_v6_n5.pdf>. Acesso em 22 NOVEMBRO 2014.
- [76] MOGHIMIAN, P.; NAJAFI, A.; AFSHAR, S.; JAVADPOUR, J. Effect of low temperature on formation mechanism of calcium phosphate nano powder via precipitation method. **Advanced Powder Technology**, 2011.
- [77] WEIBEL, A.; BOUCHET, R.; BOULC, F.; KNAUTH, P. The Big Problem of Small Particles : A Comparison of Methods for Determination of Particle Size in Nanocrystalline Anatase Powders. **Chem. Mater**. v. 17, n.10, p. 2378-2385, 2005.
- [78] LANGFORD, J.I.; WILSON, A.J.C. Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size, **J. Appl. Cryst.**,v. 11, p.102-113, 1978.

- [79] FLEET, M.E. Infrared spectra of carbonate apatites: ν_2 -region bands. **Biomaterials**, v.30, p. 1473-1481, 2009.
- [80] FLEET, M.E., LIU, X.. Local structure of channel ions in carbonate apatite. **Biomaterials**, v. 26, p. 7548-7554, 2005.
- [81] SANTHA, N.; SUDHA, K.G.; VIJAYAKUMARI, K.P.; NAYARA, V.U.; MOORTY, S.N. Raman and infrared spectra of starch samples of sweet potato and cassava. **Indian Academy of Science**, v.102, p. 705-712, 1990.
- [82] KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J.; SEETHARAMAN, K. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem**, v.14, p. 3912-3918, 2002.
- [83]BOUDIN,S.; GRANDIN,A;BOREL,M; RAVEAU,B. Redetermination of the beta- $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ structure. **Acta Crystallographic**, v. 49, n.39, p. 2062-2064, 1983.
- [84] CALVO, C. The crystal structure of alfa- $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. *Inorganic Chem.*, v.7, p. 1345-1351, 1968.
- [85] DOAT, A.; PELLÉ, F.; LEBUGLE, A. Europium-doped calcium pyrophosphates. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 178, n. 7, p. 2354-2362, 2005.
- [86] MANO, J.F.; KONIAROVA, D.; REIS, R.L. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blenda with potential biomedical applicability. **Journal of materials science: Materials in medicine**, v.14, p.127-135,2003.
- [87] AGGARWAL, O.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochemical Acta**, v.3019, p.17-25, 1998.
- [88] ILAVSKY, J.; JEMIAN, P.R. **Irena and Indra SAXS data analysis macros, including maximum entropy**. 2008.
- [89] POTTON, J. A.; DANIELL, G. J.; RAINFORD, B. D. A New Method for the Determination of Particle Size Distributions from Small-angle Neutron Scattering Measurements. **Journal of Applied Crystallography**, v.21, p.891-897, 1988.
- [90] MEIER, W. Polymer Networks with lamellar structure. **Macromolecules**, v.31, p. 2212-2217, 1998.
- [91] MARTÍNEZ-ANTÓN, J.C.; SERROUKH, I.; BERNABEU, E. On Babinet's principle and a diffraction-interferometric techniques to determine the diameter of cylindrical wires. **Metrology**, v.38, p.125-134, 2001.
- [92] JIMÉNEZ, J.R.; HITTA, E. Babinet's principle in scalar theory of diffraction. **Optical Review**, v.8, p. 495-497, 2001.

- [93] LIOU, S.C.; CHEN, A.Y.; LEE, H.Y.; BOW, J.S. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders. **Biomaterials**, v.25, p. 189-196, 2004.
- [94] KROGER, F.A.; VINK, H.J. **Solid State Physics**, v. 3, p.307-435, 1956.
- [95] MOMMA, K.; IZUMI, F. VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. **J. Appl. Crystallography**, v. 44, p. 1272-1276, 2011.
- [96] LONG, M.; HONG, F.; LI, W.; Et all. Size-dependent microstructure and europium site preference influence fluorescent properties of Eu³⁺-doped Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ nanocrystal. **Journal of Luminescence**, v.128, p.428-436, 2008.
- [97] CHEN, F.; ZHU, Y.J.; ZHANG, K.H; Et all. Europium-doped amorphous calcium phosphate porous nanospheres: preparation and application as luminescent drug carriers. **Nanoscale research letters**,v.6, p. 6-67, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Neste apêndice é discutido a relação entre o espalhamento incoerente e o ângulo de espalhamento para experimentos de raios X a baixos ângulos. Se um feixe de elétrons com onda associativa de amplitude A_0 e comprimento de onda λ interage diretamente com um campo eletrostático de um átomo a onda espalhada terá amplitude A_s igual a equação (A-1), onde F é o fator de espalhamento para elétrons.

$$A_s = \text{Const.} \cdot A_0 \cdot F \quad (\text{A-1})$$

O fator de espalhamento pode ser achado pela equação (A-2), onde Z é o número atômico, f é o fator de espalhamento do átomo para raios X de mesmo comprimento de onda λ e θ o ângulo de espalhamento.

$$F = \frac{Z-f}{\left(4\pi \frac{\sin \frac{1}{2}\theta}{\lambda}\right)^2} \quad (\text{A-2})$$

Coerência para onda significa que a amplitude é sempre adicionada e a intensidade é dada pela raiz quadrada absoluta da amplitude. Portanto, a equação (A-1) pode ser representada pela equação (A-3) da intensidade I_s espalhada pelo átomo isolado:

$$I_s = A_s^2 = \text{Const.} \cdot I_0 F^2 \quad (\text{A-3})$$

Em adição a esta condição, em termos matemáticos, a intensidade incoerente é achada subtraindo a intensidade coerente do total da intensidade de espalhamento de um elétron livre pela fórmula de Thomson. Logo, a intensidade incoerente é proporcional ao fator de espalhamento para elétrons (F): com $I_{s \text{ incoerente}} \propto 1-F^2$. O fator de espalhamento para os elétrons decresce quando o ângulo de espalhamento aumenta conforme equação (A-2). No caso, F^2 irá ter um valor máximo de 1 para o mínimo ângulo de espalhamento $\theta=0$ quando todas as ondas estiverem em fase e com máxima intensidade de espalhamento. Entretanto, quando $\theta \rightarrow 1$ o fator $F^2 \rightarrow 0$ e o espalhamento incoerente, $\lambda \neq \lambda_0$, será predominante. Logo, espalhamento incoerente aumenta com o ângulo de espalhamento que por sua vez aumenta com o vetor de espalhamento conforme $q = (4\pi/\lambda) \cdot \text{sen } \theta$.

APÊNDICE B

A seguir neste apêndice será detalhado os procedimentos adotados para o tratamento dos dados experimentais na modelagem e ajustes do modelos para representar a dopagem do Eu^{3+} . Os dados experimentais brutos foram obtidos nas linhas de XAFS do LNLS com energia sintonizada em torno da borda de absorção L_3 do Eu^{3+} , em aproximadamente 6.977 eV, operando no modo de fluorescência. Utilizamos o *software* Athena para iniciar o tratamento dos dados. Nessa fase temos a pretensão de transformar os dados experimentais em $\mu(E)$ para dados representados por $\chi(k)$ através da seguinte rotina:

1 - Obtemos $\mu(E)$ da relação entre a intensidade I_0 de um feixe monocromático incidente a amostra e I do feixe atenuado pela amostra:

$$\mu(E)x = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

2- Atribuimos uma função de pré-borda e pós-borda lisa para eliminar qualquer *background* instrumental e absorção de outras bordas que não sejam da borda L_3 do Eu;

3- Normalizamos $\mu(E)$ para representar a curva de absorção no intervalo de 0 a 1 para estimar o passo da borda $\Delta\mu(E)$;

4- Identificamos a posição da borda de energia E_0 através do máximo valor da primeira derivada $d\mu(E)/dE$;

5- Na região de pós-borda não possuímos as medidas de $\mu_0(E)$, logo podemos aproximar uma função bem suave : uma *spline polinomial* que passa bem suavemente entre as oscilações de $\mu(E)$;

6 - Remover o *background* instrumental através da função aproximada e atribuída a $\mu_0(E)$ para isolar o sinal das oscilações de XAFS.

7- Representar as energias E em espaço k através: $k = \sqrt{\frac{2m_e(E-E_0)}{\hbar^2}}$

8- Estabelecemos o peso k^2 como fator multiplicativo do sinal de XAFS de $\chi(k)$;

9- Através da Transformada de Fourier isolamos as oscilações de $k^2\chi(k)$ para determinadas esferas de coordenação de interesse que são formadas por diferentes grupos de átomos e obtemos o sinal representado por $\chi(r)$ no espaço- r .;

10- Para certificarmos que a Transformada de Fourier de $\chi(k)$ para $\chi(r)$ leve em consideração apenas as oscilações de $\chi(k)$ das esferas de coordenação de interesse e não gere artefatos, atribuímos uma função janela do tipo *welch* aos dados experimentais;

11- Consideramos em nosso estudo o fator $R_{\text{bkg}} = 1,2$ para melhorar o perfil dos picos do sinal de $\chi(r)$;

12 - Após esses tratamentos do dado experimental obtemos os valores dos fatores $f_i(k)$, $\phi_i(k)$ que servirão de base na modelagem para determinar os ajustes nos parâmetros N_i , R_i , e σ^2_i .

Os modelos possíveis de $Eu_{Ca(1)}$ e $Eu_{Ca(2)}$ foram criados *software* Artemis e esses modelos foram criados baseando-se na estrutura "perfeita" de hidroxiapatita obtida de estudos de Andrade e colaboradores (2004) [44] na qual foi proposto que uma pequena parcela dos sítios de Ca (1) e Ca(2) foram substituídos por átomos de Eu. Também no *software* Artemis esses modelos foram ajustados aos dados experimentais previamente tratados com a rotina discriminada nesse apêndice. Na rotina de ajustes foram considerados: (i) a não correção de fase, (ii) ajustes simultâneos no espaço k e r , (iii) contribuições até a quarta esfera de coordenação através da delimitação de trajetos de retroespalhamento do fotoelétron com r inferior a 4,4 Å. Os softwares Artemis e Athena pertencem aos códigos livres do pacote IFEFFIT v. 8 [68]. A seguir é mostrado os dados de entrada do arquivo FEFF.inp gerados para os modelos $Eu_{Ca(1)}$ e $Eu_{Ca(2)}$ e que serão a base dos ajustes desses modelos sobre os dados da curva experimental das amostras de hidroxiapatita dopadas com európio.

Arquivo de entrada FEFF.inp gerado para o padrão da hidroxiapatita de referência (rede perfeita) de Andrade e colaboradores (2004) [44] para o átomo absorvedor Ca(1) e Ca(2) e primeiros vizinhos.

* The following crystallographic data were used:

* title Apatite-(CaOH) Pentacalcium tris(phosphate(V)) hydroxide Ca5 (P O4)3 (O H)

* title de Andrade, A.V.C.

* title Synthesis and crystal phase evaluation of hydroxylapatite using the Rietveld

* space = P 63/m

* a = 9.39830 b = 9.39830 c = 6.86770

* alpha = 90.0 beta = 90.0 gamma = 120.0

* core = **Ca1** edge = K

```

* atoms
* ! elem x y z tag occ
* Ca 0.66670 0.33330 0.00260 Ca1 1.00000
* Ca 0.25430 0.00840 0.25000 Ca2 1.00000
* P 0.36900 0.39950 0.25000 P1 1.00000
* O 0.48500 0.32650 0.25000 O1 1.00000
* O 0.46360 0.58860 0.25000 O2 1.00000
* O 0.25740 0.34300 0.06900 O3 1.00000
* O 0.00000 0.00000 0.20500 O4 0.50000
* H 0.00000 0.00000 0.05100 H1 0.50000
* -----
HOLE 1 1.0 * Ca K edge (4038.50 eV), second number is S0^2
* mphase,mpath,mfeff,mchi
CONTROL 1 1 1 1
PRINT 1 0 0 0
RMAX 7.55447
*CRITERIA curved plane
*DEBYE temp debye-temp
NLEG 4
POTENTIALS
* ipot Z element
0 20 Ca
1 20 Ca
2 15 P
3 8 O
4 1 H

ATOMS * this list contains 161 atoms
* x y z ipot tag distance
0.00000 0.00000 0.00000 0 Ca1 0.00000
-0.05562 1.67525 1.69907 3 O1_1 2.38671

```

1.47862	-0.78946	1.69907	3 O1_1	2.38671
-1.42300	-0.88579	1.69907	3 O1_1	2.38671
0.63540	1.59113	-1.73478	3 O2_1	2.43821
-1.69566	-0.24530	-1.73478	3 O2_1	2.43822
1.06026	-1.34584	-1.73478	3 O2_1	2.43822
2.63438	0.80731	-0.49173	3 O3_1	2.79884
-2.01634	1.87778	-0.49173	3 O3_1	2.79884
-0.61803	-2.68509	-0.49173	3 O3_1	2.79883
-2.46481	1.08785	-1.73478	2 P1_1	3.20440
2.17451	1.59066	-1.73478	2 P1_1	3.20440
0.29030	-2.67852	-1.73478	2 P1_1	3.20440
0.00000	0.00000	3.39814	1 Ca1_1	3.39814
0.00000	0.00000	-3.46956	1 Ca1_2	3.46956
0.53854	3.10849	1.69907	2 P1_2	3.58324
-2.96130	-1.08785	1.69907	2 P1_2	3.58323
2.42276	-2.02063	1.69907	2 P1_2	3.58323
0.07868	3.89184	0.45602	3 O3_2	3.91926
-3.40977	-1.87778	0.45602	3 O3_2	3.91925
3.33109	-2.01406	0.45602	3 O3_2	3.91925
3.35632	1.11605	1.69907	1 Ca02_1	3.92394
-2.64469	2.34864	1.69907	1 Ca02_1	3.92394
-0.71163	-3.46468	1.69907	1 Ca02_1	3.92393
-0.64327	3.58310	-1.73478	1 Ca02_2	4.03260
3.42469	-1.23447	-1.73478	1 Ca02_2	4.03260
-2.78142	-2.34864	-1.73478	1 Ca02_2	4.03260
2.63438	0.80731	-2.97783	3 O3_3	4.05699
-2.01634	1.87778	-2.97783	3 O3_3	4.05699
-0.61803	-2.68509	-2.97783	3 O3_3	4.05699
-3.73045	0.24530	1.69907	3 O2_2	4.10649
2.07766	3.10802	1.69907	3 O2_2	4.10649
1.65279	-3.35331	1.69907	3 O2_2	4.10649

```

-4.00311  0.88579  -1.73478  3 O1_2    4.45185
 2.76867  3.02390  -1.73478  3 O1_2    4.45185
 1.23444  -3.90969  -1.73478  3 O1_2    4.45185

```

END

* The following crystallographic data were used:

* title Apatite-(CaOH) Pentacalcium tris(phosphate(V)) hydroxide Ca₅ (P O₄)₃ (O H)

* title de Andrade, A.V.C.

* title Synthesis and crystal phase evaluation of hydroxylapatite using the Rietveld

* space = P 63/m

* a = 9.39830 b = 9.39830 c = 6.86770

* alpha = 90.0 beta = 90.0 gamma = 120.0

* core = **Ca2** edge = K

* atoms

* ! elem x y z tag occ

* Ca 0.66670 0.33330 0.00260 Ca1 1.00000

* **Ca 0.25430 0.00840 0.25000 Ca2 1.00000**

* P 0.36900 0.39950 0.25000 P1 1.00000

* O 0.48500 0.32650 0.25000 O1 1.00000

* O 0.46360 0.58860 0.25000 O2 1.00000

* O 0.25740 0.34300 0.06900 O3 1.00000

* O 0.00000 0.00000 0.20500 O4 0.50000

* H 0.00000 0.00000 0.05100 H1 0.50000

* -----

HOLE 1 1.0 * Ca K edge (4038.50 eV), second number is S0^2

* mphase,mpath,mfeff,mchi

CONTROL 1 1 1 1

PRINT 1 0 0 0

RMAX 7.55447

*CRITERIA curved plane

*DEBYE temp debye-temp

NLEG 4

POTENTIALS

* ipot Z element

0 20 Ca

1 20 Ca

2 15 P

3 8 O

4 1 H

ATOMS * this list contains 164 atoms

* x	y	z	ipot tag	distance
0.00000	0.00000	0.00000	0 Ca2	0.00000
0.09360	0.77959	2.19080	3 O3_1	2.32726
0.09360	0.77959	-2.19080	3 O3_1	2.32726
2.36443	0.11137	0.00000	3 O2_1	2.36705
-2.00142	-1.23447	0.30905	3 O4_1	2.37173
0.79031	-2.04178	1.24305	3 O3_2	2.51766
0.79031	-2.04178	-1.24305	3 O3_2	2.51766
-0.71136	2.57889	0.00000	3 O1_1	2.67520
-2.00142	-1.23447	1.36667	4 H1_1	2.71981
-2.00142	-1.23447	-1.36667	4 H1_1	2.71981
1.25018	-2.82513	0.00000	2 P1_1	3.08939
-2.00142	-1.23447	2.06718	4 H1_2	3.13095
-2.00142	-1.23447	-2.06718	4 H1_2	3.13095
-2.24967	2.37683	0.00000	2 P1_2	3.27266
-2.69813	1.58690	1.24305	3 O3_3	3.36799
-2.69813	1.58690	-1.24305	3 O3_3	3.36799
3.13439	1.44405	0.00000	2 P1_3	3.45104
2.19025	2.67523	0.00000	3 O1_2	3.45746
1.00193	0.78617	3.43385	2 P1_4	3.66241
1.00193	0.78617	-3.43385	2 P1_4	3.66241
-2.00142	-1.23447	3.12480	3 O4_2	3.91075

```

-2.00142 -1.23447 -3.12480 3 O4_2 3.91075
0.71163 3.46468 1.69907 1 Ca1_1 3.92393
0.71163 3.46468 -1.69907 1 Ca1_1 3.92393
2.78929 -2.82560 0.00000 3 O2_2 3.97041
1.94607 -0.44501 3.43385 3 O1_3 3.97197
1.94607 -0.44501 -3.43385 3 O1_3 3.97197
3.42496 -1.23462 1.73478 1 Ca1_2 4.03288
3.42496 -1.23462 -1.73478 1 Ca1_2 4.03288
-4.07121 -0.11842 0.00000 1 Ca2_1 4.07293
-1.93305 -3.58498 0.00000 1 Ca2_1 4.07293
-2.06979 1.11605 3.43385 1 Ca2_2 4.16184
0.06837 -2.35051 3.43385 1 Ca2_2 4.16184
-2.06979 1.11605 -3.43385 1 Ca2_2 4.16184
0.06837 -2.35051 -3.43385 1 Ca2_2 4.16184
0.65602 -4.25837 0.00000 3 O1_4 4.30861
1.77190 2.11885 3.43385 3 O2_3 4.40687
1.77190 2.11885 -3.43385 3 O2_3 4.40687
-2.00142 -1.23447 3.74290 3 O4_3 4.42028
-2.00142 -1.23447 -3.74290 3 O4_3 4.42028

```

END

Arquivo de entrada FEFF.inp gerado para simulação dos modelos de incorporação do Eu na hidroxiapatita para $\text{Eu}_{\text{Ca}(1)}^{\circ}$ e $\text{Eu}_{\text{Ca}(2)}^{\circ}$ para os primeiros vizinhos.

* The following crystallographic data were used:

* title Apatite-(CaOH) Pentacalcium tris(phosphate(V)) hydroxide Ca₅ (P O₄)₃ (O H)

* title de Andrade, A.V.C.

* title Synthesis and crystal phase evaluation of hydroxylapatite using the Rietveld

* space = P 63/m

* a = 9.39830 b = 9.39830 c = 6.86770

* alpha = 90.0 beta = 90.0 gamma = 120.0

* core = **Eu** edge = L3

```

* atoms
* ! elem x y z tag occ
* Ca 0.66670 0.33330 0.00260 Ca1 0.99999
* Ca 0.25430 0.00840 0.25000 Ca2 1.00000
* P 0.36900 0.39950 0.25000 P1 1.00000
* O 0.48500 0.32650 0.25000 O1 1.00000
* O 0.46360 0.58860 0.25000 O2 1.00000
* O 0.25740 0.34300 0.06900 O3 1.00000
* O 0.00000 0.00000 0.20500 O4 0.50000
* H 0.00000 0.00000 0.05100 H1 0.50000
* Eu 0.66670 0.33330 0.00260 Eu 0.00001
* -----
HOLE 4 1.0 * Eu L3 edge (6977.0 eV), second number is S0^2
* mphase,mpath,mfeff,mchi
CONTROL 1 1 1 1
PRINT 1 0 0 0
RMAX 7.55447
*CRITERIA curved plane
*DEBYE temp debye-temp
NLEG 4
POTENTIALS
* ipot Z element
0 63 Eu
1 20 Ca
2 15 P
3 8 O
4 1 H
ATOMS * this list contains 161 atoms
* x y z ipot tag distance
0.00000 0.00000 0.00000 0 Eu 0.00000
-0.05562 1.67525 1.69907 3 O1_1 2.38671

```

1.47862	-0.78946	1.69907	3 O1_1	2.38671
-1.42300	-0.88579	1.69907	3 O1_1	2.38671
0.63540	1.59113	-1.73478	3 O2_1	2.43821
-1.69566	-0.24530	-1.73478	3 O2_1	2.43822
1.06026	-1.34584	-1.73478	3 O2_1	2.43822
2.63438	0.80731	-0.49173	3 O3_1	2.79884
-2.01634	1.87778	-0.49173	3 O3_1	2.79884
-0.61803	-2.68509	-0.49173	3 O3_1	2.79883
-2.46481	1.08785	-1.73478	2 P1_1	3.20440
2.17451	1.59066	-1.73478	2 P1_1	3.20440
0.29030	-2.67852	-1.73478	2 P1_1	3.20440
0.00000	0.00000	3.39814	1 Ca1_1	3.39814
0.00000	0.00000	-3.46956	1 Ca1_2	3.46956
0.53854	3.10849	1.69907	2 P1_2	3.58324
-2.96130	-1.08785	1.69907	2 P1_2	3.58323
2.42276	-2.02063	1.69907	2 P1_2	3.58323
0.07868	3.89184	0.45602	3 O3_2	3.91926
-3.40977	-1.87778	0.45602	3 O3_2	3.91925
3.33109	-2.01406	0.45602	3 O3_2	3.91925
3.35632	1.11605	1.69907	1 Ca2_1	3.92394
-2.64469	2.34864	1.69907	1 Ca2_1	3.92394
-0.71163	-3.46468	1.69907	1 Ca2_1	3.92393
-0.64327	3.58310	-1.73478	1 Ca2_2	4.03260
3.42469	-1.23447	-1.73478	1 Ca2_2	4.03260
-2.78142	-2.34864	-1.73478	1 Ca2_2	4.03260
2.63438	0.80731	-2.97783	3 O3_3	4.05699
-2.01634	1.87778	-2.97783	3 O3_3	4.05699
-0.61803	-2.68509	-2.97783	3 O3_3	4.05699
-3.73045	0.24530	1.69907	3 O2_2	4.10649
2.07766	3.10802	1.69907	3 O2_2	4.10649
1.65279	-3.35331	1.69907	3 O2_2	4.10649

```

-4.00311  0.88579  -1.73478  3 O1_2    4.45185
 2.76867  3.02390  -1.73478  3 O1_2    4.45185
 1.23444  -3.90969  -1.73478  3 O1_2    4.45185

```

END

* The following crystallographic data were used:

* title Apatite-(CaOH) Pentacalcium tris(phosphate(V)) hydroxide Ca5 (P O4)3 (O H)

* title de Andrade, A.V.C.

* title Synthesis and crystal phase evaluation of hydroxylapatite using the Rietveld

* space = P 63/m

* a = 9.39830 b = 9.39830 c = 6.86770

* alpha = 90.0 beta = 90.0 gamma = 120.0

* core = **Eu** edge = L3

* atoms

* ! elem x y z tag occ

* Ca 0.33333 0.66667 0.00260 Ca1 1.00000

* O 0.15850 0.48500 0.25000 O1 1.00000

* O 0.58860 0.12500 0.25000 O2 1.00000

* O 0.34300 0.08560 0.06900 O3 1.00000

* P 0.39950 0.03050 0.25000 P1 1.00000

* **Ca 0.24590 0.25430 0.25000 Ca2 0.99999**

* O 0.00000 0.00000 0.20500 O4 0.50000

* H 0.00000 0.00000 0.05100 H1 0.50000

* **Eu 0.24590 0.25430 0.25000 Eu 0.00001**

* -----

HOLE 1 1.0 * Eu L3 edge (6977.0 eV), second number is S0^2

* mphase,mpath,mfeff,mchi

CONTROL 1 1 1 1

PRINT 1 0 0 0

RMAX 6.0

*CRITERIA curved plane

*DEBYE temp debye-temp

NLEG 4

POTENTIALS

* ipot Z element

0 63 Eu

1 20 Ca

2 8 O

3 15 P

4 1 H

ATOMS * this list contains 78 atoms

* x	y	z	ipot tag	distance
0.00000	0.00000	0.00000	0 Eu	0.00000
0.09360	0.77959	2.19080	2 O3_1	2.32726
0.09360	0.77959	-2.19080	2 O3_1	2.32726
2.36443	0.11137	0.00000	2 O2_1	2.36705
-2.00142	-1.23447	0.30905	2 O4_1	2.37173
0.79031	-2.04178	1.24305	2 O3_2	2.51766
0.79031	-2.04178	-1.24305	2 O3_2	2.51766
-0.71136	2.57889	0.00000	2 O1_1	2.67520
-2.00142	-1.23447	1.36667	4 H1_1	2.71981
1.25018	-2.82513	0.00000	3 P1_1	3.08939
-2.00142	-1.23447	-2.06718	4 H1_2	3.13095
-2.24967	2.37683	0.00000	3 P1_2	3.27266
-2.69813	1.58690	1.24305	2 O3_3	3.36799
-2.69813	1.58690	-1.24305	2 O3_3	3.36799
3.13439	1.44405	0.00000	3 P1_3	3.45104
2.19025	2.67523	0.00000	2 O1_2	3.45746
1.00193	0.78617	3.43385	3 P1_4	3.66241
1.00193	0.78617	-3.43385	3 P1_4	3.66241
-2.00142	-1.23447	-3.12480	2 O4_2	3.91075

0.71161	3.46473	1.69907	1 Ca1_1	3.92398
0.71161	3.46473	-1.69907	1 Ca1_1	3.92398
2.78929	-2.82560	0.00000	2 O2_2	3.97041
1.94607	-0.44501	3.43385	2 O1_3	3.97197
1.94607	-0.44501	-3.43385	2 O1_3	3.97197
3.42472	-1.23451	1.73478	1 Ca1_2	4.03264
3.42472	-1.23451	-1.73478	1 Ca1_2	4.03264
-4.07121	-0.11842	0.00000	1 Ca2_1	4.07293
-1.93305	-3.58498	0.00000	1 Ca2_1	4.07293
-2.06979	1.11605	3.43385	1 Ca2_2	4.16184
0.06837	-2.35051	3.43385	1 Ca2_2	4.16184
-2.06979	1.11605	-3.43385	1 Ca2_2	4.16184
0.06837	-2.35051	-3.43385	1 Ca2_2	4.16184
0.65602	-4.25837	0.00000	2 O1_4	4.30861
1.77190	2.11885	3.43385	2 O2_3	4.40687
1.77190	2.11885	-3.43385	2 O2_3	4.40687
-2.00142	-1.23447	3.74290	2 O4_3	4.42028

END.