

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA**

**ELTON SIMOMUKAY**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO DOPADOS  
COM NIÓBIO (V) POR MEIO DA ROTA HIDROTÉRMICA E AVALIAÇÃO DE  
CITOCOMPATIBILIDADE**

**PONTA GROSSA**

**2013**

---

**ELTON SIMOMUKAY**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO DOPADOS  
COM NIÓBIO (V) POR MEIO DA ROTA HIDROTÉRMICA E AVALIAÇÃO DE  
CITOCOMPATIBILIDADE**

Dissertação apresentada para a obtenção do  
Título de Mestre em Química Aplicada no  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Aplicada da Universidade Estadual de  
Ponta Grossa.

**Orientador: Prof. Dr. Augusto Celso  
Antunes**

**PONTA GROSSA**

**2013**

---

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

S593 Simomukay, Elton  
Síntese e caracterização de ortofosfatos de cálcio dopados com nióbio (V) por meio da rota hidrotérmica e avaliação de citocompatibilidade/ Elton Simomukay. Ponta Grossa, 2013.  
200f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientador: Prof. Dr. Augusto Celso Antunes.

1.Ortofosfatos de cálcio. 2.Nióbio (V). 3.Hidroxiapatita. 4.Hidrotermal. 5.Biomateriais. I.Antunes, Augusto Celso. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Química Aplicada. III. T.

CDD: 547

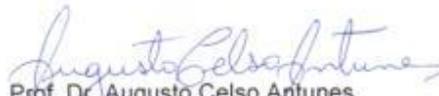
TERMO DE APROVAÇÃO

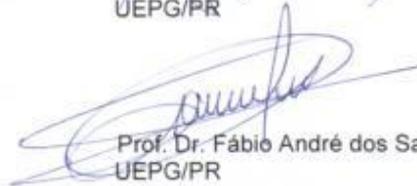
ELTON SIMOMUKAY

**"SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO  
DOPADOS COM NIÓBIO (V) POR MEIO DA ROTA HIDROTÉRMICA E  
AVALIAÇÃO DE CITOCOMPATIBILIDADE."**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:

  
Prof. Dr. Augusto Celso Antunes  
UEPG/PR

  
Prof. Dr. Fábio André dos Santos  
UEPG/PR

  
Prof. Dr. Henrique de Santana  
UEL/PR

Ponta Grossa, 05 de setembro de 2013.

## DEDICATÓRIA

Um projeto de pesquisa adquire sua “personalidade própria” ao longo do seu desenvolvimento.

É a superação dos muitos desafios e obstáculos que concretizam a sua realização. Esta dissertação é dedicada a todos aqueles que contribuíram de forma positiva nesta concretização.

---

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus

Ao meu orientador

Aos Professores dos Programas de Pós-graduação da UEPG: Química Aplicada, Ciência e Engenharia de Materiais e Farmácia.

Aos colegas e amigos

Aos colaboradores

*“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade”.*

(Santo Agostinho)

---

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de possíveis biomateriais sintetizados pela reação hidrotérmica entre o etanoato de cálcio monohidratado e o monofosfato de amônio anidro aditivados com 57.6, 288 e 576 ppm de um precursor de íons nióbio (V), o complexo de nióbio oxo-tris (oxalato) niobato de amônio e hidrogênio trihidratado que até o momento é pouco empregado na síntese de biomateriais. Em uma área de crescentes inovações, esta aditivação possibilita a obtenção de ortofosfatos de cálcio com novas perspectivas no campo dos biomateriais em relação às características de biocompatibilidade, morfológicas e estruturais. A síntese foi realizada com temperaturas variando de 100 a 200 °C durante 24 horas com o emprego do diaminometanal para controle do pH de precipitação e do ácido 2-hidroxi-1,2,3 propanotricarboxílico monohidratado como regulador do pH inicial da síntese e como agente quelante para os íons metálicos. Para a caracterização das fases formadas nas amostras obtidas foi utilizada a técnica de difração de raios X (DRX) sendo estas fases confirmadas pelas técnicas espectroscópicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (IV-TF) e espectroscopia Raman. As técnicas de microscopia eletrônica de varredura acoplada com detector de energia dispersiva de raios X (MEV-EDX) e, de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram empregadas para visualização do formato das partículas e mapeamento de elementos presentes enquanto as técnicas de análise granulométrica por difração de laser (DL) e, de análise por espalhamento dinâmico de luz (EDL) caracterizaram a distribuição do tamanho de partículas. Análises térmicas (TG e ATD) foram realizadas para verificar o comportamento térmico e a composição química foi determinada através da fluorescência de raios X (FRX). A rugosidade da amostras foi avaliada através da técnica de microscopia de força atômica (AFM). Estes materiais foram submetidos a testes de citotoxicidade através dos ensaios do emprego do corante azul de Tripán, medida da redução do MTT e, medida da captação do corante vermelho neutro a fim de inicialmente caracterizá-lo como um biomaterial. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a fase predominante nas amostras é a hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . O aumento da aditivação do precursor de íons nióbio (V) a partir de 288 ppm provoca o surgimento de fases minoritárias de compostos de nióbio e o mesmo precursor afeta a morfologia e o crescimento das partículas originando aglomerados do tipo flower também conhecidas como morfologias auto-estruturadas sendo estes aglomerados predominantemente arredondados com dimensões micrométricas formados por cristalitos nanométricos. As amostras mantiveram estabilidade térmica até 1000 °C sem a formação de outros ortofosfatos de cálcio além da hidroxiapatita. A presença dos íons nióbio (V) foram identificados em todas as amostras aditivadas. A citotoxicidade das amostras pode ser comprovada pelos resultados nos ensaios in-vitro que apresentaram resultados aceitáveis para a possibilidade de realização de outras caracterizações de biocompatibilidade de modo a definir o emprego das amostras obtidas como biomateriais.

**Palavras-Chaves:** Ortofosfatos de cálcio, Hidroxiapatita, Nióbio (V), Hidrotermal, Biomateriais.

## ABSTRACT

This study aimed to obtain potential biomaterials synthesized through hydrothermal reaction between monohydrated calcium ethanoate and the anhydrous ammonium monophosphate with addition of 57.6, 288 and 576 ppm niobium ion precursor (V), the ammonium niobate oxo-tris (oxalate) niobium complex and trihydrated hydrogen that so far has not been often used in biomaterial synthesis. In such an area of increasing innovations, this addition enables to obtain calcium orthophosphates with new perspectives in the biomaterial field in relation to the characteristics of morphological and structural biocompatibility. The synthesis was carried out at temperatures ranging from 100 to 200°C for 24 hours with the use of diaminomethanal to control the precipitation pH and the 2-hydroxy-1,2,3 propano tricarboxylic monohydrated as a regulator of the synthesis initial pH and as a chelating agent for the metallic ions. X-ray diffraction (XRD) was used to characterize the phases formed in the samples, and these phases were confirmed through the Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and Raman spectroscopy (RS). The scanning electronic microscopy coupled with X-ray dispersive energy (SEM-XDE) and, transmission electronic microscopy (TEM) were employed to visualize the format of the particles and map the elements present while the laser diffraction granulometric analysis (GDL) and dynamic light scattering analysis (DLS) characterized the distribution of particle sizes. Thermal analysis (TG and DTA) were carried out to verify the thermal behavior and the chemical composition was determined through X-ray fluorescence (XRF). The sample roughness was evaluated through the atomic force microscopy technique (AFM). These materials were submitted to toxicity tests through tests with the Tripán blue dye, MTT reduction measurement and, neutral red dye uptake measurement in order to characterize it initially as a biomaterial. Results obtained in this study enable to conclude that the predominant phase in the samples is the hydroxyapatite,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . The increase in the addition of niobium ions precursor (V) from 228 ppm on provokes the appearance of minority phases of niobium compounds and the same precursor affects the morphology and growth of particles originating flower like agglomerates also known as self-structured, and these agglomerates are mainly round with micrometric dimensions formed by nanometric crystallites. The samples kept thermal stability up to 1000°C without forming other calcium orthophosphates besides the hydroxyapatite. The presence of niobium ions (V) was identified in all added samples. The cytotoxicity of samples could be confirmed by the results of *in vitro* tests which presented reasonable results enabling other biocompatibility characterizations to be carried out to define the use of the samples obtained as biomaterial.

Keywords: Calcium Orthophosphates, Hydroxyapatite, Niobium (V), Hydrothermal, Biomaterials.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-CODIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	63
TABELA 2-RENDIMENTO DAS AMOSTRAS .....	81
TABELA 3-PH FINAL DA SÍNTESE HIDROTÉRMICA .....	94
TABELA 4-INDEXAÇÃO MET .....	108
TABELA 5-GRANULOMETRIA DA AMOSTRA 0 .....	114
TABELA 6-GRANULOMETRIA DA AMOSTRA 10-200.....	116
TABELA 7-RESULTADOS DAS AMOSTRAS .....	118
TABELA 8-TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO .....	138
TABELA 9-EDX PARA A AMOSTRA 0 .....	156
TABELA 10-EDX DA AMOSTRA 0.....	157
TABELA 11-EDX DA AMOSTRA 1.....	158
TABELA 12-TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO X TEMP.DE CALCINAÇÃO .....	167
TABELA 13-TG DA AMOSTRA 0 .....	168
TABELA 14-ATD DA AMOSTRA 0 .....	170
TABELA 15-TG DA AMOSTRA 10-200.....	171
TABELA 16-ATD DA AMOSTRA 10-200.....	173
TABELA 17-CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS.....	177
TABELA 18-TABELA DE CITOTOXICIDADE I .....	177
TABELA 19-TABELA DE CITOTOXICIDADE II.....	178

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- GRÁFICO DA PRODUÇÃO MUNDIAL E BRASILEIRA DE MINÉRIO DE NIÓBIO NO BRASIL ENTRE 2000 E 2010. ....	24
FIGURA 2 – GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DA ESPERANÇA DE VIDA NO BRASIL ENTRE 1980 E 2050. ....	26
FIGURA 3 - CÉLULA UNITÁRIA DA HIDROXIAPATITA MONOCLÍNICA.....	31
FIGURA 4 - CÉLULA UNITÁRIA DA HIDROXIAPATITA MOSTRANDO OS TETRAEDROS DE $PO_4^{2-}$ .....	32
FIGURA 5 - CÉLULA UNITÁRIA DA HIDROXIAPATITA HEXAGONAL.....	33
FIGURA 6 - SUBSTITUIÇÃO TIPO A NA HIDROXIAPATITA .....	38
FIGURA 7 - SUBSTITUIÇÃO TIPO B NA HIDROXIAPATITA.....	38
FIGURA 8 - REDE CRISTALINA DO $Nb_2O_5$ .....	40
FIGURA 9 - GRÁFICO DAS ESPÉCIES FORMADAS EM SOLUÇÕES AQUOSAS COM NIÓBIO. ....	44
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE DELIMITAÇÃO DO TRABALHO...	49
FIGURA 11 - INTERAÇÕES DOS FEIXES DE ELÉTRONS COM OS ÁTOMOS MOLECULAR .....	54
FIGURA 12 - ESPALHAMENTO DA LUZ COM PARTÍCULAS GRANDES E PEQUENAS .....	56
FIGURA 13 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE AZUL DE TRIPAN.....	59
FIGURA 14 – ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE MTT .....	60
FIGURA 15 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE VERMELHO NEUTRO.....	61
FIGURA 16 - APARATO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES HIDROTERMAIS .....	68
FIGURA 17- DIFRATOGRAMAS E FOTOMICROGRAFIAS COMPARATIVAS ENTRE O MÉTODO HIDROTERMAL E PRECIPITAÇÃO QUÍMICA EM SOLUÇÃO AQUOSA .....	83
FIGURA 18- MODELO PROPOSTO POR MA (2012) PARA CRESCIMENTO DE HIDROXIAPATITAS AUTO-ESTRUTURADAS .....	84
FIGURA 19-FOTOMICROGRAFIA COMPARATIVA ENTRE AMOSTRAS 10-200 SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DIFERENTES DE SÍNTESE.....	86
FIGURA 20- FOTOMICROGRAFIA MEV DA AMOSTRA 10-200 COM POSSÍVEL TEMPLATE PARA CRESCIMENTO DOS CRISTAIS INDICADO PELAS SETAS..	87
FIGURA 21-DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DA AMOSTRA 2H REPRESENTADA PELO CÓDIGO 6NB COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2:	

01-071-1759,00-021-0697,01-072-0713,00-003-0747,00-043-0780,00-035-0227 E 00-025-1568.....	88
FIGURA 22-FOTOMICROGRAFIA MEV DA AMOSTRA 10-200 EM DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO.....	89
FIGURA 23-FOTOMICROGRAFIA AFM DA AMOSTRA 10-200 EM FUNÇÃO DO TEMPO. (DA ESQUERDA PARA DIREITA: 23-A 23-B E 23-C).....	89
FIGURA 24-FOTOMICROGRAFIA MEV DE AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UREIA.....	90
FIGURA 25-FOTOMICROGRAFIAS MEV COMPARATIVAS ENTRE O USO DE ÁCIDO CÍTRICO E ÁCIDO TARTÁRICO NA PREPARAÇÃO HIDROTÉRMICA DAS AMOSTRAS.....	91
FIGURA 26- FOTOMICROGRAFIAS MEV DA AMOSTRA 10-200 A DIVERSAS TEMPERATURAS UTILIZADAS PARA A PREPARAÇÃO DA ROTA HIDROTÉRMICA DAS AMOSTRAS.....	92
FIGURA 27- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:1500X).....	96
FIGURA 28- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:2400X).....	97
FIGURA 29- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:5 KX).....	97
FIGURA 30- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:10 KX).....	98
FIGURA 31- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:500X).....	99
FIGURA 32- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:2400X).....	99
FIGURA 33- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:5000X).....	100
FIGURA 34- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:20KX).....	100
FIGURA 35- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:1000X).....	101
FIGURA 36- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:2400X).....	102

FIGURA 37- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:10KX).....	102
FIGURA 38- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:20KX).....	103
FIGURA 39- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10- 200.(AUMENTO:1000X).....	104
FIGURA 40- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10- 200.(AUMENTO:2400X).....	104
FIGURA 41- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10- 200.(AUMENTO:5000X).....	105
FIGURA 42- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10- 200.(AUMENTO:15KX).....	105
FIGURA 43-FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10- 200.(AUMENTO:20KX).....	106
FIGURA 44- SAED POR MET DA AMOSTRA 10-200.....	107
FIGURA 45- INDEXAÇÃO DO HALO SAED DA AMOSTRA 10-200.....	109
FIGURA 46- ANÁLISE DA MICROGRAFIA OBTIDA POR MET DA AMOSTRA 10-200 .....	110
FIGURA 47- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MET DO AGLOMERADO ARREDONDADO .....	111
FIGURA 48- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MET DE PARTÍCULAS PRIMÁRIAS AGLOMERADAS.....	111
FIGURA 49- GRÁFICO DA RUGOSIDADE X TEMPO MEDIDO ATRAVÉS AFM.....	112
FIGURA 50- DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA FREQUÊNCIA ACUMULADA DA AMOSTRA 0.....	113
FIGURA 51- CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA AMOSTRA 0 ...	114
FIGURA 52- DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA FREQUÊNCIA ACUMULADA DA AMOSTRA 10-200 .....	115
FIGURA 53- CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA AMOSTRA 10-200 .....	115
FIGURA 54- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO PARA A AMOSTRA 0.....	117
FIGURA 55- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO PARA A AMOSTRA 1 .....	117

FIGURA 56- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO PARA A AMOSTRA 5.....	118
FIGURA 57- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO PARA A AMOSTRA 10-200 .....	118
FIGURA 58- FOTOMICROGRAFIA TEM DA AMOSTRA 10-200 DEMONSTRANDO A AGLOMERAÇÃO DE AGLOMERADOS MENORES .....	119
FIGURA 59- DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 0.....	120
FIGURA 60- DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVOS DA AMOSTRA 0 COM PADRÕES COD 96-900-2214 E PDF-2 01-072-1243.....	121
FIGURA 61 – DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 1 .....	122
FIGURA 62-DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVO DA AMOSTRA 1 COM PADRÕES COD 96-900-2214 E PDF-2 01-074-0565 .....	123
FIGURA 63- DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 5.....	126
FIGURA 64 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X COMPARATIVO DA AMOSTRA 5 COM PADRÕES COD 96-900-2214 E PDF-2 01-084-1998 .....	126
FIGURA 65- DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 10-200 .....	127
FIGURA 66 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 COM PADRÕES COD 96-900-2214 E PDF-2 00-024-0033.....	128
FIGURA 67 – DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA 10-200 COMPARADOS COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELA FICHA PDF-2 01-072-1243 MOSTRANDO OS PICOS NÃO CORRELACIONADOS COM A FASE DE HIDROXIAPATITA DA AMOSTRA 10-200 .....	130
FIGURA 68 – DIFRATOGRAMA DE RAIOS X COMPARATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA 10-200 COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2: 00-002-1351,00-003-0421,00-018,0303 E 00-024-0033. ....	131
FIGURA 69 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA 10-200 COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2 DA AMOSTRA 10-200 COM COMPOSTOS DE NÍOBIO: 00-024-0033,01-089-1718,00-016-0734,01-082-1141,01-089-8456 E 00-047-1668. ....	132
FIGURA 70 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA 10-200 COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2 DA AMOSTRA 10-200 COM ÓXIDOS DE	

NIÓBIO: 00-024-0033,00-015-0553,01-071-2406,00-031-0228,00-049-0911 E 01-081-0841.....	133
FIGURA 71- DIFRATOGRAMAS DAS AMOSTRAS OBTIDAS RELACIONANDO ALGUNS PICOS NÃO CORRESPONDENTES A FASE DE HIDROXIAPATITA: AMOSTRA 10-200 (PARTE SUPERIOR),AMOSTRA 5,AMOSTRA 1 E AMOSTRA 0 (PARTE INFERIOR).....	136
FIGURA 72-DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA 1 COM DIFRATOGRAMA GERADO PELA FICHA PDF-2: 01-072-1243 E COMPARAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA.....	137
FIGURA 73-ESTIMATIVA DO TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO UTILIZANDO O PROGRAMA XPOWDER.....	138
FIGURA 74- ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 0.....	140
FIGURA 75- ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 1.....	142
FIGURA 76 - ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 5.....	143
FIGURA 77- ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 10-200 .....	144
FIGURA 78 - ESPECTRO INFRAVERMELHO COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA .....	147
FIGURA 79 - ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 0.....	150
FIGURA 80 - ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 1 .....	151
FIGURA 81 - ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 5.....	152
FIGURA 82- ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 10-200.....	153
FIGURA 83- ESPECTRO RAMAN DO ÓXIDO DE NIÓBIO.....	154
FIGURA 84- ESPECTRO RAMAN PARA O NIOBATO DE CÁLCIO.....	154
FIGURA 85- ESPECTRO RAMAN COMPARATIVO DA AMOSTRA 1 COM ESPECTROS DE REFERÊNCIA .....	155
FIGURA 86- ESPECTRO RAMAN COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 COM ESPECTROS DE REFERÊNCIAS.....	155
FIGURA 87-ESPECTRO EDS DA AMOSTRA 0 .....	157
FIGURA 88-ESPECTRO EDS DA AMOSTRA 1 .....	158
FIGURA 89-ESPECTRO EDS PARA A AMOSTRA 10-200.....	159
FIGURA 90- AMOSTRA 10-200 ANÁLISE DE MAPEAMENTO DE ELEMENTOS 2400X .....	161
FIGURA 91-MAPEAMENTO DE ELEMENTOS DA ESQUERDA PARA DIREITA: CÁLCIO ,FÓSFORO E NIÓBIO .....	162

FIGURA 92-RESULTADO DA MESCLA DOS MAPEAMENTOS DE ELEMENTOS EDS: CÁLCIO-FÓSFORO (ESQUERDA) CÁLCIO-NÍOBIO (DIREITA).....	163
FIGURA 93-FOTOMICROGRAFIA COMPARATIVA ENTRE AS AMOSTRAS 10-200 CALCINADA E NÃO CALCINADA .....	164
FIGURA 94-DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA 10-200 CALCINADA A 1000°C COMPARADA COM A FICHA PDF-2 01-089-6438 PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES .....	165
FIGURA 95 – DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE CALCINAÇÃO: 1000°C (PARTE SUPERIOR),800°C,500°C E 200°C (PARTE INFERIOR).....	165
FIGURA 96 – DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 CALCINADA A 1000°C E COMPARADA COM DIFRATOGRAMAS GERADOS A PARTIR DAS FICHAS PDF-2: 00-024-0033,00-031-0288,00-026-0885,00-037-1497 E 01-080-2498 PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES.....	166
FIGURA 97 – CURVA TG DA AMOSTRA 0.....	168
FIGURA 98 – CURVA ATD DA AMOSTRA 0.....	169
FIGURA 99 – CURVA TG DA AMOSTRA 10-200 .....	171
FIGURA 100 – CURVA DA AMOSTRA 10-200.....	172
FIGURA 101 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	174
FIGURA 102 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	174
FIGURA 103 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 72 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	175
FIGURA 104 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 96 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	176
FIGURA 105 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	179

FIGURA 106 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	180
FIGURA 107 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 72 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	180
FIGURA 108 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 96 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEOBLASTOS.....	181
FIGURA 109 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE AS AMOSTRAS X TEMPO .....	181

## LISTA DE SIGLAS

ALFA-TCP	Alfa-Fosfato tricálcio
AFM	Microscopia por força atômica
ANOVA	Analysis of Variance
ATG	Análise Termogravimétrica
BETA- TCP	Beta-Fosfato tricálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
C-LABMU	Complexo de Laboratórios Multiusuários
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COD	Crystallography Open Database
CRYSTMET	Metals Crystallographic Data File
DL	Difração a Laser (DL)
EDX	Energia Dispersiva de Raios X
ER	Espectroscopia Raman
FRX	Fluorescência de Raios X
IV-FT	Infravermelho por transformada de Fourier
HAP	Hidroxiapatita Pura
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,
ICSD	Inorganic Crystal Structure Database
KBr	Brometo de Potássio
LAMIR	Laboratório de Mineração
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PDF	Ficha padrão de difração de raios x do ICCD
RDSS	Raman Data Search and Storage
TTCP	Fosfato Tetracálcio
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFPR	Universidade Federal do Parana
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE SIGLAS.....	17
SUMÁRIO.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 JUSTIFICATIVA .....	23
1.2 REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS .....	27
1.2.1 Ortofosfatos de Cálcio .....	27
1.2.2 Hidroxiapatita .....	30
1.2.3- Monetita .....	34
1.2.4 Brushita.....	34
1.2.5 Hidroxiapatita deficiente em cálcio .....	35
1.2.6 Fosfato de cálcio amorfo .....	35
1.2.7 $\alpha$ -Fosfato tricálcico e $\beta$ -fosfato tricálcico.....	35
1.2.8- Oxiapatita .....	36
1.2.9 Fosfato de octacálcio .....	36
1.2.10 Hidroxiapatitas modificadas .....	36
1.2.11 Compostos de nióbio .....	39
1.2.12 Rota hidrotérmica .....	40
1.2.12.1 O método hidrotérmico.....	40
1.2.12.2 Equipamentos .....	41
1.2.12.3 Mecanismos de formação de precipitados pelo método hidrotermal .....	42
1.2.12.4 Comportamento em soluções aquosas de compostos de nióbio (V) e ortofosfatos de cálcio.....	44
1.2.12.5 Aditivos de síntese.....	45
1.3 DELIMITAÇÕES DO PROBLEMA .....	47
1.4 TÉCNICAS E SEUS FUNDAMENTOS .....	50
1.4.1 Difração de Raios X (DRX) .....	50

1.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) .....	51
1.4.3 Espectroscopia de espalhamento Raman .....	51
1.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	52
1.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
1.4.6 Análise Térmica.....	55
1.4.7 Análise granulométrica por difração de laser (DL) .....	55
1.4.8 Análise granulométrica por espalhamento dinâmico de luz (EDL).....	57
1.4.9 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) .....	57
1.4.10 Espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX).....	57
1.4.11 Microscopia por força atômica (AFM).....	58
1.4.12 Ensaio in vitro de biomateriais.....	58
1.4.12.1 Emprego do corante azul de Tripan.....	58
1.4.12.2 Medida da redução do MTT .....	59
1.4.12.3 Medida da captação do corante vermelho neutro (CVN) .....	60
2 OBJETIVOS .....	62
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	62
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	62
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	63
3.1 Amostras.....	63
3.2 Roteiro geral da síntese hidrotermal .....	63
3.3-Precursores e aditivos utilizados na síntese das amostras .....	64
3.3.1-Precursores .....	64
3.3.2 Aditivos utilizados.....	66
3.3.2.1 Ureia .....	66
3.3.2.2 Ácido cítrico .....	67
3.3.2.3 Solventes utilizados .....	68
3.4-Síntese hidrotermal.....	68
3.4.1-Equipamentos adicionais.....	70
3.5 Parametrização e formulação da síntese das amostras .....	70
3.5.1 Concentração dos precursores de cálcio e fósforo.....	70
3.5.2 Concentração dos precursores de nióbio .....	70
3.5.3 Concentração de ureia.....	71
3.5.4 Concentração de ácido cítrico.....	71

3.5.5- Potencial hidrogeniônico da síntese .....	72
3.5.6 Temperatura da síntese .....	72
3.5.7 Tempo da síntese hidrotérmica.....	73
3.5.8 Pressão da síntese hidrotérmica.....	73
3.6 Metodologias usadas no preparo de amostras .....	73
3.6.1 Caracterização como biomateriais.....	73
3.6.2 Difração de raios X (DRX).....	75
3.6.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (IV-TF) .....	76
3.6.4 Espectroscopia de espalhamento Raman.....	76
3.6.5 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) .....	77
3.6.6 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) .....	77
3.6.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	77
3.6.8 Granulometria por difração a laser (DL) .....	78
3.6.9 Análise térmica gravimétrica e Análise térmica diferencial (TG-ATD) .....	78
3.6.10 Análise por fluorescência de raios X (FRX).....	79
3.6.11 Análise de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz (EDL).....	79
3.6.12 Avaliação da síntese hidrotermal.....	79
3.6.12.1 Rendimento da síntese .....	79
3.6.12.2 Avaliação da Síntese.....	79
3.6.12.3 Avaliação da influência da ureia.....	80
3.6.12.4 Avaliação da influência do ácido cítrico .....	80
3.6.12.5 Avaliação da influência da temperatura .....	80
4 RESULTADOS .....	81
4.1 Resultados da síntese hidrotermal .....	81
4.1.1 Avaliação da síntese .....	81
4.1.1.1 Rendimento.....	81
4.1.1.2 Avaliação da rota empregada.....	82
4.1.1.3 Avaliação da influência da ureia.....	90
4.1.1.4 Avaliação da influência do ácido Cítrico.....	91
4.1.1.5 Avaliação da influência da temperatura hidrotérmica .....	92
4.1.1.6 Avaliação do potencial hidrogênionico final da síntese .....	93
4.2 Caracterização morfológica .....	96

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	96
4.2.1.1 Resultados da amostra 0 .....	96
4.2.1.2 Resultados da amostra 01 .....	98
4.2.1.3 Resultados da amostra 05 .....	101
4.2.1.4 Resultados da amostra 10-200.....	103
4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	106
4.2.2.1 Resultados da amostra 10-200.....	106
4.2.3 Microscopia de força atômica (AFM) .....	112
4.2.4 Distribuição de tamanho de partículas.....	113
4.2.4.1 Difração a laser (DL) .....	113
4.2.4.1.1 Difração a laser (DL) – Resultados para a amostra 0 .....	113
4.2.4.1.2 Difração a laser (DL) – Resultados para a amostra 10-200.....	115
4.2.4.2 Técnica de espalhamento de luz dinâmico (ELD) – Resultados .....	117
4.3 Identificações de fases e caracterização estrutural.....	119
4.3.1 DRX.....	119
4.3.1.1 Resultados para a difração raios X para a amostra 0 .....	119
4.3.1.2 Resultados para a difração raios X para a amostra 1 .....	122
4.3.1.3 Resultados para a Difração raios X para a amostra 5 .....	124
4.3.1.4 Resultados para a Difração raios X para a amostra 10-200.....	127
4.3.1.5 Resultados e Discussão gerais .....	135
4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV-TF) .....	139
4.3.2.1 Resultados da espectroscopia de absorção na região do infravermelho para a Amostra 0 .....	140
4.3.2.2 Resultados da espectroscopia de absorção na região do infravermelho para a Amostra 1 .....	141
4.3.2.3 Resultados da espectroscopia de absorção na região do infravermelho para a Amostra 5 .....	142
4.3.2.4 Resultados da Espectroscopia de absorção na região do infravermelho para a Amostra 10-200.....	143
4.3.3 Espectroscopia Raman.....	147
4.3.3.1 Resultados da espectroscopia Raman para a Amostra 0.....	150
4.3.3.2 Resultados da espectroscopia Raman para a Amostra 1 .....	150
4.3.3.3 Resultados da espectroscopia Raman para a Amostra 5.....	151
4.3.3.4 Resultados da espectroscopia Raman para a Amostra 10-200 .....	152

4.4 Caracterização Química.....	156
4.4.1 Espectroscopia de energia dispersiva (EDX).....	156
4.4.1.1 Resultados de EDX para a Amostra 0 .....	156
4.4.1.2 Resultados de EDX para a Amostra 01 .....	158
4.4.1.3 Resultados de EDX para a Amostra 10-200.....	158
4.4.2 Espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX).....	159
4.4.2.1 Resultados da espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX) para as amostras 01 e 10-200.....	159
4.5 Caracterização térmica e Tratamento térmico .....	163
4.5.1 Tratamento Térmico .....	163
4.5.2 Análise Térmica.....	167
4.5.2.1 Resultados da análise termogravimétrica (TG) para a Amostra 0.....	167
4.5.2.2 Resultados da análise termodiferencial (ATD) para a Amostra 0 .....	169
4.5.2.3 Resultados da análise termogravimétrica (TG) para a Amostra 10-200.....	170
4.5.2.4 Resultados da análise termodiferencial (ATD) para a Amostra 10-200.....	172
4.6 Caracterização da biocitotoxicidade .....	173
4.6.1 Resultados do teste com o corante Azul de Tripán .....	173
4.6.2 Resultados do teste com o corante MTT .....	173
4.6.3 Resultados com corante Vermelho Neutro .....	178
4 CONCLUSÃO.....	183
5.0 SUGESTÕES PARA FUTUROS DESENVOLVIMENTOS .....	185
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	186

## 1 INTRODUÇÃO

Os ortofosfatos de cálcio são materiais multifuncionais, e devido à suas características, apresentam ampla aplicação. Entre estas, cabe destacar o seu uso em aplicações biomédicas. Uma das vantagens destes materiais é a capacidade de aceitar substituições iônicas, e sua excelente biocompatibilidade. Além disso, algumas de suas propriedades variam significativamente de acordo com o tipo de fosfato, como a solubilidade ou a velocidade de reabsorção, podendo ser modificada em função da aplicação pretendida<sup>[1]</sup>.

### 1.1 JUSTIFICATIVA

Este projeto de pesquisa teve a proposta de obter um ortofosfato de cálcio, com a fase principal composta de hidroxiapatita, um material tradicionalmente empregado devido às suas propriedades de biocompatibilidade, aditivado com um precursor de íons nióbio (V)<sup>[1]</sup>.

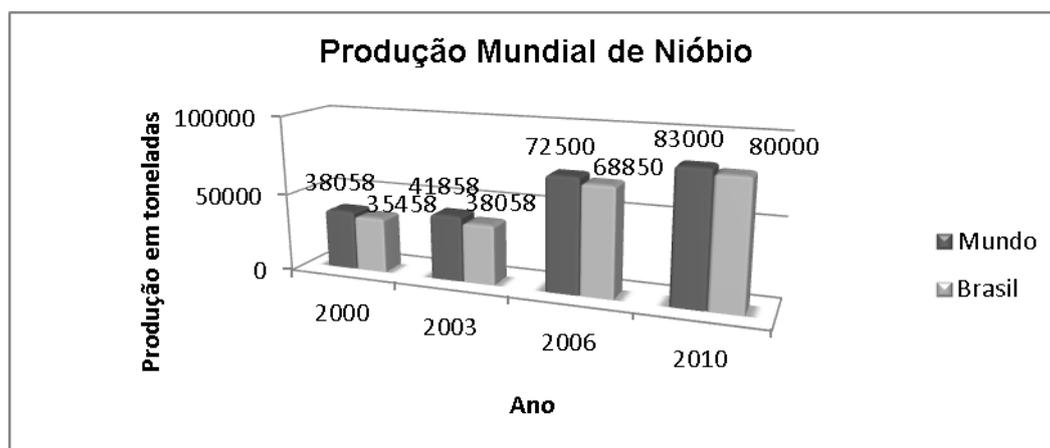
Quando se faz uma aditivação em uma matriz hospedeira justifica-se pela possibilidade de alterações nas propriedades físicas, químicas, morfológicas e de biocompatibilidade, sendo a nossa proposta o uso de uma fonte de matéria-prima que poderia alterar as propriedades de biocompatibilidade da hidroxiapatita e outras propriedades físico-químicas<sup>[1]</sup>.

Dentro das matérias-primas disponíveis em nosso território, o nióbio na forma de um sal altamente solúvel em meio aquoso e até o momento não utilizado em biomateriais conhecido como complexo amoniacal de nióbio foi selecionado para a realização deste trabalho<sup>[2]</sup>.

O Brasil detém as maiores reservas minerais de nióbio e em 2010 respondeu pela produção prevista de 96% da produção mundial do minério<sup>[2]</sup>.

A figura 1 traz um gráfico que apresenta a comparação da produção mundial de nióbio e a produção brasileira.

**Figura 1 GRÁFICO DA PRODUÇÃO MUNDIAL E BRASILEIRA DE MINÉRIO DE NIÓBIO NO BRASIL ENTRE 2000 E 2010.**



**FONTE: INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. BOLETIM DE INFORMAÇÕES E DE ANÁLISES DA ECONOMIA MINERAL BRASILEIRA - 7ª EDIÇÃO, 2012.**

O uso do nióbio continua concentrado ainda em ligas metálicas devido ao acréscimo da resistência a corrosão e a diminuição do peso das ligas metálicas ocasionando na redução de custos e aumento da sustentabilidade ambiental<sup>[2]</sup> e há limitada quantidade de pesquisas sobre a utilização do nióbio e seus compostos em biomateriais.

A literatura, até o momento, é muito restrita quanto ao uso de nióbio (V) na área de biomateriais, com cerca de 260 artigos quanto ao uso de nióbio (V) com hidroxiapatita, sendo que em grande parte composta pela utilização de Nb(V) na forma de liga metálica<sup>[3]</sup>.

É reconhecido que o método empregado e a escolha dos precursores têm grande influência nos resultados morfológicos, físicos e químicos dos materiais obtidos e a necessidade da caracterização para avaliar estes resultados são fundamentais para o entendimento do processo de síntese e do direcionamento da aplicabilidade destes novos materiais e com a verificação dos resultados obtidos com os parâmetros de síntese hidrotérmica e precursores empregados através da utilização de técnicas de caracterização, espera-se que este trabalho de pesquisa contribua e auxilie no entendimento do emprego do método hidrotérmico com a adição de dopantes na obtenção de ortofosfatos de cálcio<sup>[1,2,3]</sup>.

O método de síntese proposto nesta pesquisa é o método hidrotérmico ou hidrotérmico, um método não tão difundido como os métodos usuais de obtenção de pós a base de hidroxiapatita como os métodos da precipitação química e sol-gel<sup>[4]</sup>.

A escolha deste método foi devido à possibilidade de obter a hidroxiapatita como fase principal diretamente em solução aquosa com o uso da pressão correspondente ao vapor saturado da água, controle da temperatura da síntese e controle do pH da síntese através da decomposição e hidrólise de um agente de precipitação homogênea<sup>[4]</sup>.

A vantagem de se ter uma síntese em uma etapa única sem a necessidade de operações anteriores como a precipitação e envelhecimento e posteriores como a moagem e sinterização para obter uma distribuição de tamanho e morfologia de partículas, cristalinidade e fases presentes tornam o método hidrotérmico potencialmente atraente para novas contribuições no desenvolvimento da síntese de biomateriais<sup>[4]</sup>.

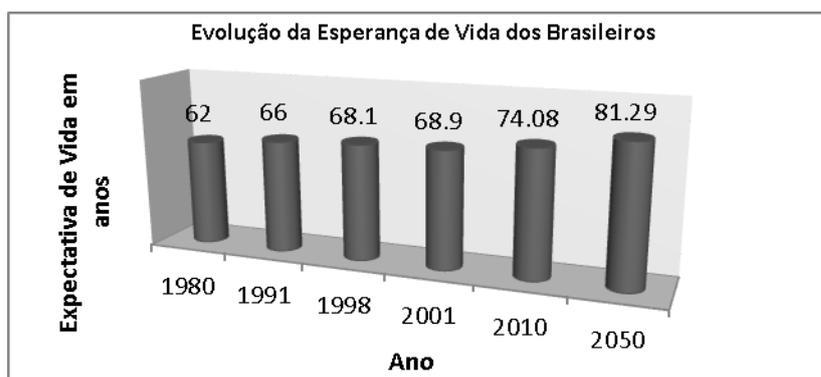
A publicação que o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) apresenta intitulada como Materiais Avançados no Brasil e publicada no ano de 2010, enfoca que a pesquisa, desenvolvimento e inovação dos processos de síntese de matéria-prima com controle das características estruturais e físico-químicas do material obtido, poderão viabilizar ao Brasil, a possibilidade de se tornar um grande produtor dos principais *commodities* de que depende a humanidade no âmbito do desenvolvimento de materiais avançados em aplicações magnéticas, eletrônicas e fotônicas; energia; defesa nacional e segurança pública; atividades espaciais; meio ambiente; recursos naturais minerais e biológicos, saúde e medico-odontológico; e tribologia<sup>[5]</sup>.

Este projeto de pesquisa inclui-se em uma destas áreas: no desenvolvimento de materiais biocompatíveis com o organismo humano, para a área da saúde e médico-odontológica aonde a necessidade do desenvolvimento de matéria-prima, pessoal especializado e conhecimento científico é necessário, pois a cada dia ocorre o aumento do uso de implantes ortopédicos; próteses endovasculares; materiais dentários; nanoestruturas para diagnóstico e tratamento de doenças; materiais carreadores para sistemas de liberação controlada; e materiais para engenharia tecidual devido à tendência da medicina diagnóstica e regenerativa que visa à melhoria da qualidade de vida da população<sup>[5]</sup>.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (IBGE), a esperança de vida ao nascer para o brasileiro vem aumentando ao longo dos anos, como pode ser visto no gráfico da figura 2, de modo que até o ano de 2050 a expectativa de vida no Brasil de 81.29 anos será comparável ao dos países desenvolvidos e maior que a média mundial de 76 anos<sup>[6]</sup>.

Este fenômeno de envelhecimento populacional, devido às condições progressivas da qualidade de vida e ao modo de vida da sociedade atual, ocasionará também o aumento das doenças ósseas que necessitará de tecnologias e dispositivos disponíveis para proporcionar a usufruição adequada do tempo de vida <sup>[5,6]</sup>.

**Figura 2 – GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DA ESPERANÇA DE VIDA NO BRASIL ENTRE 1980 E 2050.**



**FONTE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. TÁBUA DE VIDA EVOLUÇÃO DA MORTALIDADE, IBGE, 2001.**

Além disto, o aumento das fraturas traumáticas causados por acidentes no trânsito e devido à violência exigem o uso das tecnologias e dispositivos relacionados à biomateriais para tratamentos ortopédicos que estimulem e acelerem a regeneração óssea <sup>[1]</sup>.

O mercado brasileiro de biomateriais deve crescer de 2010 até 2015 algo em torno de 19,5% segundo o relatório do site da empresa CompaniesandMarkets.com<sup>[7]</sup> e assim o estímulo à pesquisa desenvolvimento e inovação nesta área deverá aumentar para poderem suprir estas necessidades, visto que em áreas como a de próteses de joelho e quadril os problemas de desgaste da prótese dentro do organismo humano e a necrose dos tecidos do local ainda são bastante frequentes <sup>[1]</sup>.

O mercado de implantes, restaurações e regeneração odontológica é outro setor de demanda de novas tecnologias em materiais biocompatíveis sendo um exemplo disto o uso alternativo de fosfatos de cálcio na técnica de capeamento pulpar em substituição ao hidróxido de cálcio de modo a prevenir o dente de sofrer uma intervenção endodôntica <sup>[8]</sup>.

Um material para ser biocompatível não deve induzir problemas inflamatórios, possuir nenhuma citotoxicidade ou provocar alterações genéticas para as células nativas, tecidos ou órgãos vivos do corpo hospedeiro e para os fluidos endógenos e para algumas

aplicações deve ter uma resistência biomecânica e facilitar a integração com tecidos ósseos<sup>[9]</sup>.

Desta forma o emprego da combinação de hidroxiapatita, nióbio e síntese hidrotermal justificam esta pesquisa com um caráter de desenvolvimento e inovação no campo dos biomateriais e materiais funcionais.

## **1.2 REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS**

### **1.2.1 ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO**

Os ortofosfatos de cálcio são muito usados devido a sua composição química similar ao osso natural e a excelente biocompatibilidade sendo os mais usados a hidroxiapatita e o fosfato tricálcico tem demonstrado grande aplicabilidade como enxerto ósseo e veículo para liberação de fármacos<sup>[9,10]</sup>.

A definição de biocompatibilidade refere-se à capacidade de um material em produzir um efeito benéfico em uma aplicação específica em um organismo vivo<sup>[11]</sup>.

Outras definições importantes quando nos referimos ao assunto de biomateriais são as seguintes<sup>[11]</sup>:

(a) materiais incompatíveis: aqueles que apresentam toxicidade desde alergias até rejeição completa;

(b) materiais bioinertes: não apresentam toxicidade, mas também não apresentam um efeito de interação celular;

(c) materiais biotolerantes: são aceitos no organismo humano em pequenas quantidades;

(d) materiais bioreabsorvíveis: são dissolvidos ou reabsorvidos nos organismos;

(e) cerâmicas bioativas: facilitam a integração óssea e às vezes são reabsorvidos e transformados em tecidos ósseos calcificados;

(f) materiais osteocondutores: permitem a proliferação celular através de estruturas interconectadas;

(g) materiais osteoindutores: possuem a propriedade intrínseca de promover o crescimento ósseo.

O termo apatita refere-se a compostos que incluem não somente os fosfatos de cálcio e possuem fórmula geral<sup>[11,12]</sup>:

$M_{10}(XO_4)_6Y_2$ , onde  $M^{+x}$  é um metal e  $XO_4^{3-}$  e  $Y^-$  são os ânions.

Os metais M mais comuns são o Ca, Pb, Cd, Sr, La, Ce, K, Na; enquanto os ânions X normalmente é o P, V, As, Cr, Si, C, Al, S; e Y são OH, Cl, F, CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, □ sendo esta uma propriedade da estrutura das apatitas que podem promover uma série de substituições iônicas que podem incluir, por exemplo, a substituição parcial ou total de  $Ca^{2+}$  por cátions bivalentes como  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  ou  $Pb^{2+}$  [11,12].

Outra característica comum das apatitas é a ocorrência de haleto e íons  $OH^-$  presentes na mesma estrutura enquanto outras substituições que podem ocorrer incluem substituições acopladas em que um íon é trocado por outro que tem o mesmo sinal, mas difere na posição. Um exemplo disso é a substituição acoplada do íon cálcio,  $Ca^{2+}$  por íons de sódio,  $Na^+$ , acompanhado pela substituição de um íon fosfato,  $PO_4^{3-}$  por um íon carbonato,  $CO_3^{2-}$  para formar  $Ca_9Na(PO_4)_5CO_3(OH)_2$ .

O quadro 1 mostra as características dos principais ortofosfatos de cálcio [13,14].

**QUADRO 1**

QUADRO 1 – PRINCIPAIS ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO				
NOME	FÓRMULA MOLECULAR	Ca/P	FASE	SIGLA
<b>Dihidrogenofosfato de cálcio monohidratado</b>	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0.50		MCPM
<b>Monohidrogenofosfato de cálcio anidro</b>	$CaHPO_4$	1.00	Monetita	DCPA
<b>Monohidrogenofosfato de cálcio dihidratado</b>	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1.00	Brushita	DCPD
<b>Fosfato de octacálcio ou Fosfato de Cálcio pentahidratado</b>	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1.33		OCP
<b>Hidroxiapatita deficiente em cálcio</b>	$Ca_{10-x}HPO_{4x}(PO_4)_{6-x}(OH)_2$	1.50- 1.67		CDHA
<b>Fosfato de cálcio amorfo n = 3-4.5; 15-20% H<sub>2</sub>O</b>	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$	1.5		ACP

<b>Dihidrogenofosfato de Cálcio</b>	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5		MCP
<b><math>\alpha</math>-Fosfato tricálcico</b>	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5		$\alpha$ -TCP
<b><math>\beta</math>-Fosfato tricálcico</b>	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5		$\beta$ -TCP
<b>Hidroxiapatita (800°C)</b>	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1.67	Hidroxiapatita	HAp
<b>Oxiapatita</b>	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1.67		OXA
<b>Fosfato tetracálcio ou Tetrafosfato de cálcio</b>	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	2.00	Hilgenticita	TetCP ou TTCP
<b>Pirofosfato de cálcio</b>	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1.0		CPP

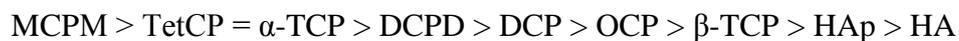
Fonte: Adaptado de GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera.

Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n. 6, 2010* <sup>[13]</sup> <sup>[14]</sup>

Um aspecto que é importante citar nos valores apresentados nesta tabela é que quanto mais próximo o valor de Ca /P para 1.67, maior será a estabilidade do material dentro do corpo humano e mais inerte será o fosfato cerâmico enquanto este valor diminui, melhor será a bioatividade <sup>[15]</sup>.

As propriedades de solubilidade de fosfatos cerâmicos podem dar uma indicação da cristalinidade, estabilidade e tamanho do cristal, e o tipo de substituições <sup>[15]</sup>.

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes e na condição de pH neutro temos a seguinte ordem de solubilidade:



Desse modo a hidroxiapatita é a mais insolúvel dos fosfatos de cálcio sendo insolúvel até PH igual a quatro e em pH inferiores a quatro a fase estável é a brushita ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Em condições fisiológicas em pH 7.2, a hidroxiapatita é a fase estável. O quadro 2 demonstra as faixas de pH estáveis para alguns ortofosfatos de cálcio <sup>[15]</sup>.

QUADRO 2

QUADRO 2 - ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO E INFLUÊNCIA DO PH	
Sigla	Faixa de pH estável
MCPM	0.0-2.0
DCPD	2.0-6.0
DCPA	Estável a temperaturas acima de 100 C
OCP	5.5-7.0
$\alpha$ -TCP	Não se precipita em solução aquosa
$\beta$ -TCP	Não se precipita em solução aquosa
ACP	5.0-12.0
CDHA	6.5-9.5
HAp	9.5-12.0
OXA	Não se precipita em solução aquosa
TTCP	Não se precipita em solução aquosa

FONTE: DOROZHKIN, SERGEY V. BIOCERAMICS OF CALCIUM ORTHOPHOSPHATES. BIOMATERIALS, VOL.31(7), PP.1465-1485,2010.

### 1.2.2 HIDROXIAPATITA

A fórmula estrutural da hidroxiapatita é representada por  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , mas é usualmente escrita como  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  para representar que a célula unitária contém duas moléculas [11, 12,16].

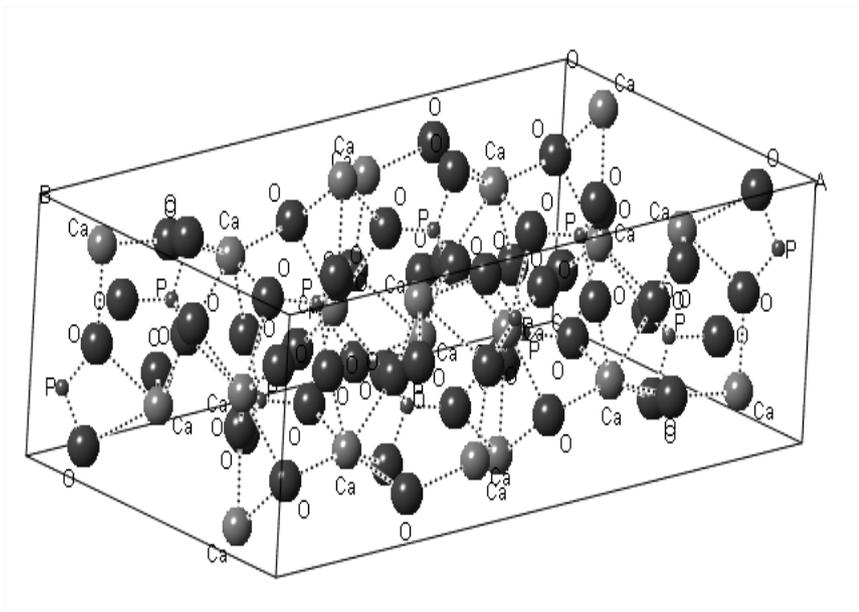
A hidroxiapatita tem uma estrutura cristalográfica e composição química definida com base em uma célula unitária de repetição e cristaliza-se em um sistema hexagonal embora haja exceções cristalizando-se no sistema monoclinico [16,17].

A hidroxiapatita do sistema hexagonal pertence ao grupo especial P63/m, com simetria e plano de rotação hexagonal e parâmetros de rede,  $a=b=9.422 \text{ \AA}$  e eixo  $c=6.883 \text{ \AA}$  [11, 12,17].

A forma monoclinica da hidroxiapatita (figura 3) pertence ao grupo espacial P21/b com parâmetros de rede,  $a=9.426 \text{ \AA}$ ,  $b=2a$ , e  $c= 6.887 \text{ \AA}$ , ângulo  $\alpha$  e  $\beta$  iguais a  $90^\circ$  e  $\gamma$  igual a  $119.97^\circ$  com volume da célula unitária de  $1060.4 \text{ \AA}^3$  e é considerada mais ordenada e termodinamicamente estável que a forma hexagonal [16, 17,19]. A figura 3

mostra a célula unitária da hidroxiapatita monoclinica. A figura 3 foi visualizada no programa Crystal Explorer 3.0 a partir de arquivos cristalográficos CIF, ficha 50656, obtidos no banco de dados ICSD disponibilizado pelo CAPES no Portal da Pesquisa <sup>[19]</sup>.

**FIGURA 3 - CÉLULA UNITÁRIA DA HIDROXIAPATITA MONOCLÍNICA**

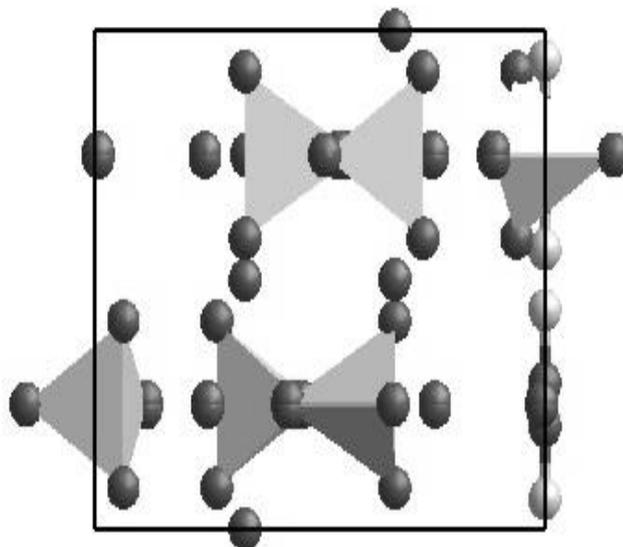


**FONTE: ICSD (2013)**

Na célula unitária da hidroxiapatita há duas posições cristalográficas diferentes para os dez átomos de cálcio sendo que quatro átomos ocupam o sítio I e estão rodeados por nove átomos de oxigênio que pertencem ao tetraedro  $\text{PO}_4^{2-}$ .

Na figura 4 podem-se visualizar os tetraedros da célula unitária da hidroxiapatita hexagonal.

**FIGURA 4 - CÉLULA UNITÁRIA DA HIDROXIAPATITA MOSTRANDO OS TETRAEDROS DE  $\text{PO}_4^{2-}$**



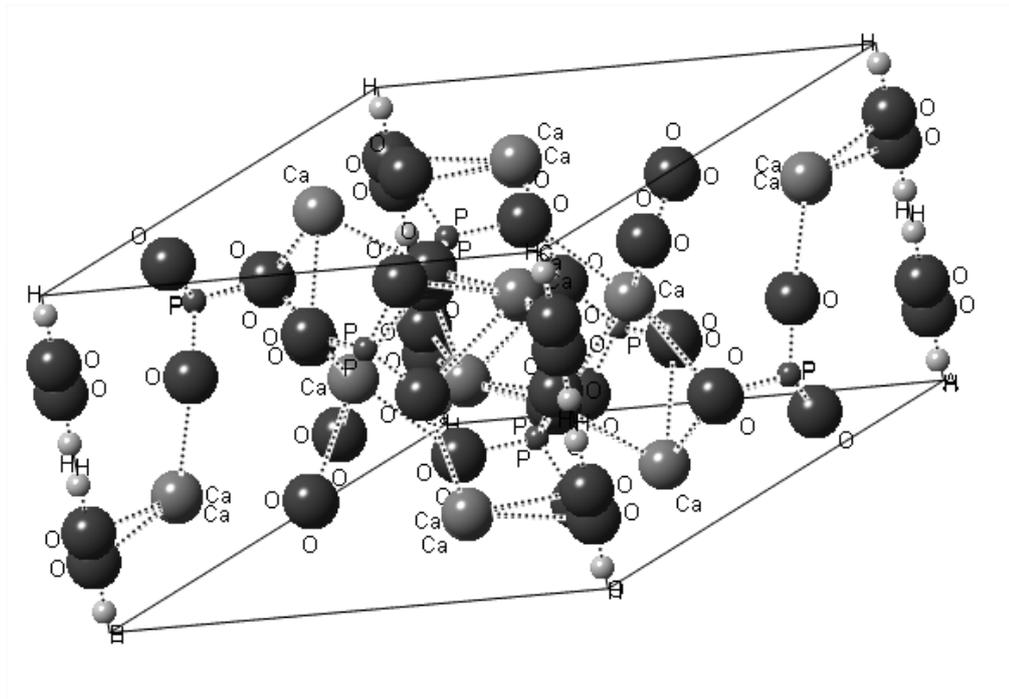
**FONTE: ICSD (2013)**

Há seis átomos de cálcio no chamado sítio II sendo eles coordenados por seis átomos de oxigênio do tetraedro e um oxigênio do grupo hidroxila<sup>[18]</sup>.

A figura 5 mostra a estrutura hexagonal da hidroxiapatita onde se podem visualizar os sítios I e II do cálcio. Os parâmetros de rede desta estrutura são:  $a= 9.412 \text{ \AA}$ ,  $b=a$  e  $c=6.853 \text{ \AA}$  e os ângulos  $\alpha$  e  $\beta$  iguais a  $90^\circ$  e  $\gamma$  de  $120^\circ$ .

A figura 5 foi visualizada no programa Crystal Explorer 3.0 a partir de arquivos cristalográficos CIF, ficha 157481, obtidos no banco de dados ICSD disponibilizado pelo CAPES no Portal da Pesquisa<sup>[19]</sup>.

**FIGURA 5 - CÉLULA UNITÁRIA DA HIDROXIAPATITA HEXAGONAL**



**FONTE: ICSD (2013)**

Apesar de a hidroxiapatita estequiométrica servir como modelo, é sabido que a hidroxiapatita produzida biologicamente é muito mais complexa, não são estequiométricas, possuem uma razão atômica  $\text{Ca} / \text{P} < 1,67$  e não contém íons e radicais oriundos só da hidroxiapatita, mas também traços de  $\text{CO}_3$ ,  $\text{Mg}$ ,  $\text{Na}$ ,  $\text{F}$  e  $\text{Cl}$  e estas quantidades variam de acordo com o tipo específico de tecido, que está relacionado com as propriedades e bioatividade do mesmo <sup>[20,21]</sup>.

A hidroxiapatita pura é composta de 39% em peso de  $\text{Ca}$ , 18,5% de  $\text{P}$  e 3,38% de  $\text{OH}$  dando uma relação em peso de  $\text{Ca} / \text{P}$  de 2,151 e razão em quantidade de matéria de 1,6667 enquanto a hidroxiapatita densa contendo apenas a fase de hidroxiapatita ou misturado com outras fases  $\text{Ca-P}$  pode apresentar uma variação na relação  $\text{Ca} / \text{P}$ , quando sinterizados, e isto podem ser atribuídos à presença de fases secundárias, tais como  $\beta\text{-TCP}$ . A presença de defeitos na rede estrutura cristalina da hidroxiapatita sinterizados a temperaturas mais baixas são conhecidos por induzir uma resposta biológica *in vivo* em comparação com aqueles sinterizadas a maior temperatura. Esta resposta está relacionada com o tipo e quantidade de defeitos que residem no material <sup>[21]</sup>.

Em temperaturas de 950 °C a hidroxiapatita contém defeitos que são paralelepípedos hexagonais, bem como outros tipos de defeitos que são mais predominantes que os presentes a 1250 °C [21].

As propriedades de dissolução da hidroxiapatita densa é importante na determinação da química da superfície do material em relação às interações biológicas para a hidroxiapatita usada em implante. Quando a hidroxiapatita é submetida a um ambiente ácido parcial a dissolução ocorre na superfície formando uma camada hidratada que consiste de íons minerais. Este comportamento é análogo à interação de apatitas biológicas com fluidos biológicos e isto sugere que a composição da biocerâmica e o pH da solução influenciam a química da superfície, uma vez que o ambiente mais ácido irá causar uma maior dissolução da hidroxiapatita da superfície [21].

### 1.2.3- MONETITA

O composto  $\text{CaHPO}_4$  (DCPA) é um fosfato dicálcio anidro e é um fosfato de cálcio moderadamente ácido e altamente solúvel. Cristaliza-se no sistema triclinico com parâmetros de rede:  $a=6.910 \text{ \AA}$ ,  $b=6.627 \text{ \AA}$ ,  $c=6.998 \text{ \AA}$  e é obtida pelo tratamento térmico da brushita [22].

### 1.2.4 BRUSHITA

A brushita é o fosfato dicálcio dihidratado ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) cristaliza-se no sistema monoclinico, grupo espacial Cc, com parâmetros de rede:  $a=6.359 \text{ \AA}$ ,  $b=15.177 \text{ \AA}$  e  $c=5.81 \text{ \AA}$  e pode ser sintetizado usando  $\text{CaCO}_3\text{-NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  como precursores e os cristais de brushita podem ser transformados em monetita por tratamento térmico a 200 °C por 2 horas através da desidratação das moléculas de água segundo a reação 1. Os cristais obtidos são agulhados, prismáticos e tabulares [23].



Reação 1 – Reação de Transformação da Brushita em Monetita

### 1.2.5 HIDROXIAPATITA DEFICIENTE EM CÁLCIO

Na estrutura óssea, a hidroxiapatita é usualmente encontrada como deficiente em cálcio, com valores da razão Ca/P abaixo de 1.67, o que confere a capacidade de troca iônica com vários cátions <sup>[24]</sup>. A hidroxiapatita deficiente em cálcio é formada em soluções aquosas através da reação de íons cálcio e fósforo ou através da transformação do OCP. Através da reação do estado sólido em temperaturas de 700 a 1200 °C ser transformada em hidroxiapatita e β-TCP segundo as reações químicas do estado sólido <sup>[15,29]</sup> de modo que uma hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA),  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ , com x variando de 0 até 2 teremos para x=0.5 a seguinte reação química do estado sólido:



Reação 2 – Transformação da CDHA em hidroxiapatita estequiométrica e β-TCP

### 1.2.6 FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO

O fosfato de cálcio amorfo é uma fase intermediária que surge na preparação de fosfatos de cálcio por precipitação. Em soluções aquosas ou em sistemas água-álcool, o fosfato de cálcio amorfo (ACP) surge de uma relação menor de Ca/P, e podem corresponder ao OCP amorfo  $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$  ou ao DCP amorfo ( $\text{CaHPO}_4$ ) enquanto fases de ACP geralmente com estrutura  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  aparecem quando a razão em quantidade de matéria de Ca/P igual a 1.5 que pode ser explicado pela presença de íons como carbonato ou íons provenientes de óxidos em meio básico (9.0 até 11.0) <sup>[25]</sup>.

### 1.2.7 A-FOSFATO TRICÁLCICO E B-FOSFATO TRICÁLCICO

β-TCP, ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), possui uma taxa de degradação maior que a hidroxiapatita e os pós de fosfato tricálcico são preparados por reações do estado sólido ou decomposição térmica de um sistema cristalino monoclinico <sup>[26, 27,29]</sup>.

Na decomposição térmica, o fosfato de cálcio amorfo ou hidroxiapatita deficiente em cálcio são obtidos em meio neutro ou ácido e são usados para a obtenção do fosfato tricálcico, sendo que este não é formado em sistemas aquosos em condições normais, mas sim a whitlockita que pode ser precipitada quando os íons  $\text{Ca}^{2+}$  são substituídos por  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$ . A fase  $\beta$ -TCP aparece quando calcinada a  $800\text{ }^\circ\text{C}$  e mantém a estabilidade até  $1100\text{ }^\circ\text{C}$ . A elevação da temperatura do tratamento térmico leva a transformação de fase de  $\beta$ -TCP para  $\alpha$ -TCP. A presença de  $\beta$ -TCP, fosfato tetracálcico,  $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ , ou  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  juntamente com a fase de hidroxiapatita no material sinterizado é indicativo de uma relação Ca / P relação menor do que apenas a da fase de hidroxiapatita pura (Ca / P = 1,67) e é influenciada pelas condições de sinterização e da temperatura, pois quando a relação Ca / P é maior que 1,67 indica a presença de CaO com a fase de hidroxiapatita. Compostos com fases simples de fosfato tricálcico e bifásicos com hidroxiapatita tem sido sintetizados por meio do controle da razão Ca/P e do pH da solução em pós obtidos por coprecipitação [26, 27,29].

### 1.2.8- OXIAPATITA

A presença de íons  $\text{OH}^-$  dentro da estrutura cristalina da hidroxiapatita estequiométrica possibilita que quando aquecida a temperaturas acima de  $1400\text{ }^\circ\text{C}$  ocorra à desidratação devido à diminuição da pressão parcial de água a altas temperaturas para produzir a oxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$ ) [28].

### 1.2.9 FOSFATO DE OCTACÁLCIO

Também chamado de fosfato de cálcio pentahidratado,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , o OCP é transformado em uma hidroxiapatita deficiente em cálcio através de uma hidrólise em pH neutro [29].

### 1.2.10 HIDROXIAPATITAS MODIFICADAS

A hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , possui a capacidade de substituição de íons o que pode afetar as propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade assim como outras propriedades como mecânica e estrutural [30]. A dopagem com magnésio aumenta a estabilidade térmica da fase HA+ $\beta$ -TCP até em temperaturas superiores a  $1350\text{ }^\circ\text{C}$

enquanto adições de lítio e silício diminuem esta estabilidade [30]. Os íons fluoreto facilmente substituem íons hidroxila diminuindo a solubilidade da hidroxiapatita, mas em presença de  $Mg^{2+}$ ,  $CO_3^{3-}$ ,  $Ti^{4+}$ ,  $Zn^{2+}$ , ocorre o processo inverso com o aumento da solubilidade e com o aparecimento da fase ACP o que aumenta a reabsorção do material [30].

A substituição do cálcio, por exemplo, com magnésio é limitada pela grande diferença de raios atômicos o que acarreta em distorções da rede cristalina da hidroxiapatita e conseqüente redução da cristalinidade. As hidroxiapatitas dopadas com magnésio têm maior solubilidade e biodegradação [31].

As adições de íons metálicos com zinco e cobre podem aumentar a atividade microbiana da hidroxiapatita. Os íons metálicos ligam-se as proteínas e desativando-as e passam a interagir com a membrana microbiana ocasionando mudança estrutural e permeabilidade para depois interagir com os ácidos nucleicos microbianos e prevenindo sua replicação [32].

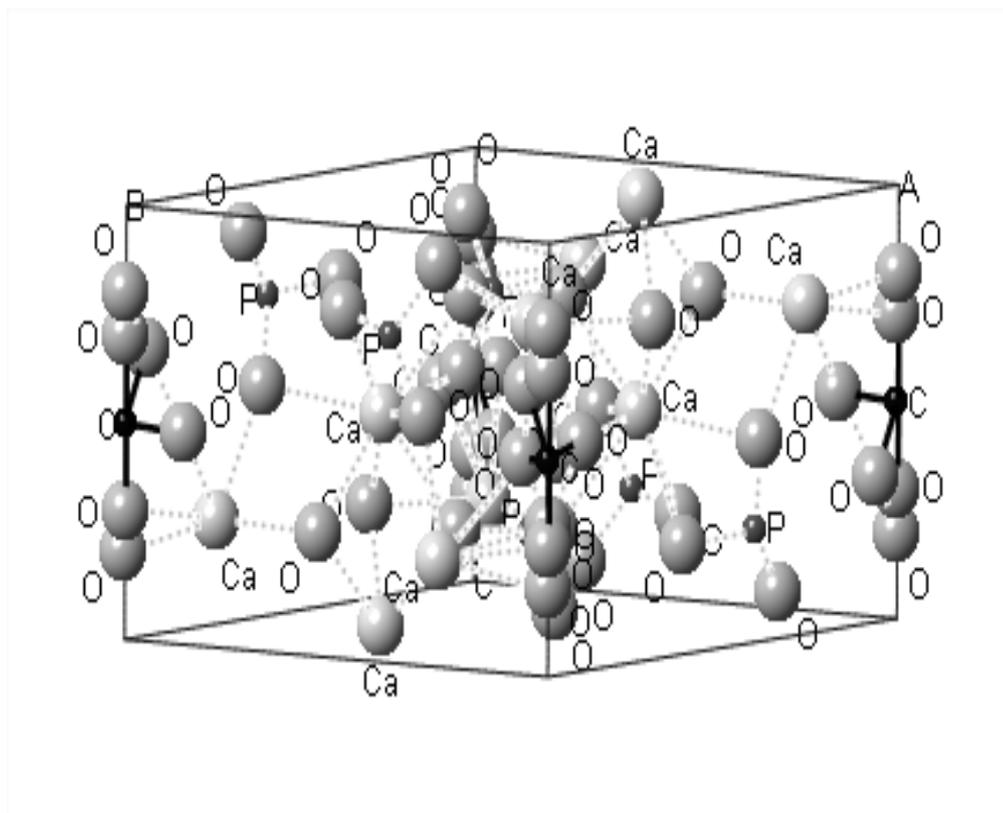
Algumas substituições podem ter o objetivo de uma atividade benéfica específica como a incorporação de selênio através da substituição parcial de íons fosfato  $PO_4^{2-}$  por grupos selenito  $SeO_3^{2-}$  a fim de combater células cancerígenas [33].

Na hidroxiapatita biológica é comum a presença de íons carbonato nos ossos e dentes humanos podendo chegar até 7.4% em peso. As substituições por íons carbonato são divididas em três grupos:

a) substituição do tipo A: quando os íons carbonato ocupam sítios da OH (figura 6) [34];

A figura 6 foi visualizada no programa Mercury 3.0 a partir de arquivos cristalográficos CIF, ficha 97440, obtidos no banco de dados ICSD disponibilizado pelo CAPES no Portal da Pesquisa [34].

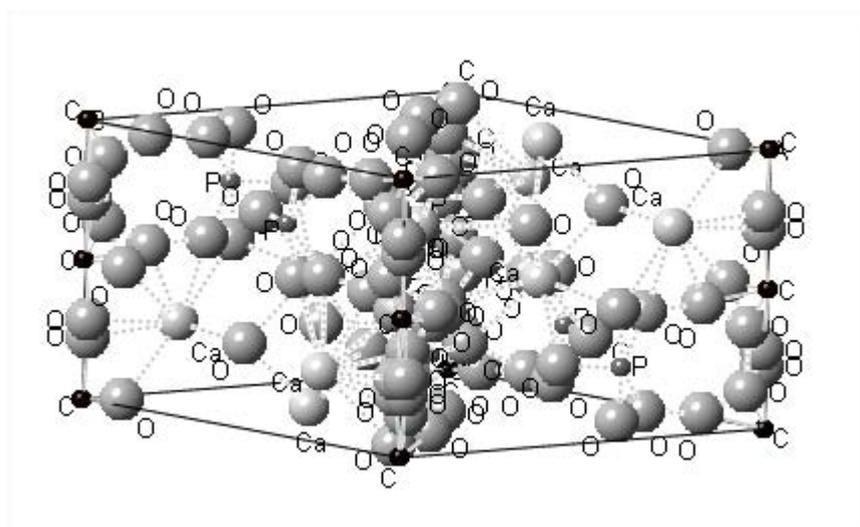
**FIGURA 6 - SUBSTITUIÇÃO TIPO A NA HIDROXIAPATITA**



**FONTE: ICSD (2013)**

(b) substituição tipo B: quando os íons carbonato ocupam sítios do  $\text{PO}_4^{2-}$  (figura 7) <sup>[35]</sup>;

**FIGURA 7 - SUBSTITUIÇÃO TIPO B NA HIDROXIAPATITA**



**FONTE: ICSD (2013)**

A figura 7 foi visualizada no programa Mercury 3.0 a partir de arquivos cristalográficos CIF, ficha 150310, obtidos no banco de dados ICSD disponibilizado pelo CAPES no Portal da Pesquisa<sup>[35]</sup>.

(c) substituição tipo AB: ocupam ambos os sítios.

As substituições podem ser parciais ou totais de modo que a substituição dos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$  pelo íon  $\text{CO}_3^{2-}$  normalmente provocam a contração do eixo *a* e *b* e expansão do eixo *c*<sup>[36]</sup>.

### 1.2.11 COMPOSTOS DE NIÓBIO

Os estados de oxidação do nióbio em compostos variam de -3 até +5 sendo o estado pentavalente o mais estável e o estado -2 inexistente e os compostos de nióbio formam-se com diferentes cores dependendo do estado de oxidação: cloreto de nióbio (V): amarelo; cloreto de nióbio (II): marrom; cloreto de nióbio (III): verde-escuro; cloreto de nióbio (IV): marrom brometo de nióbio (V): vermelho; iodeto de nióbio (IV): cinza; iodeto de nióbio (II): cinza-escuro; óxido de nióbio (V): branco e complexo peroxo de nióbio (V) são amarelos<sup>[37]</sup>.

O nióbio na forma metálica é usado em muitas ligas metálicas para aplicações em biomateriais devido ao aumento da resistência a corrosão como em ligas Ti-12Mo-3Nb<sup>[38]</sup>. Já na forma de óxido existem trabalhos de uso do pentóxido de nióbio como elemento capaz de melhorar algumas propriedades biológicas como a adesão e a proliferação celular<sup>[39]</sup>. O  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  tem mostrado propriedades bioativas e usado em revestimentos antialérgicos em endopróteses e também em adesivos para dentística servindo como carga de preenchimento<sup>[39]</sup>. A adição do pentóxido de nióbio em hidroxiapatita através de moagem e sinterização tem resultado em compósitos com boa sinterabilidade e propriedades mecânicas com uma estrutura densificada com poros interconectados<sup>[40]</sup>.

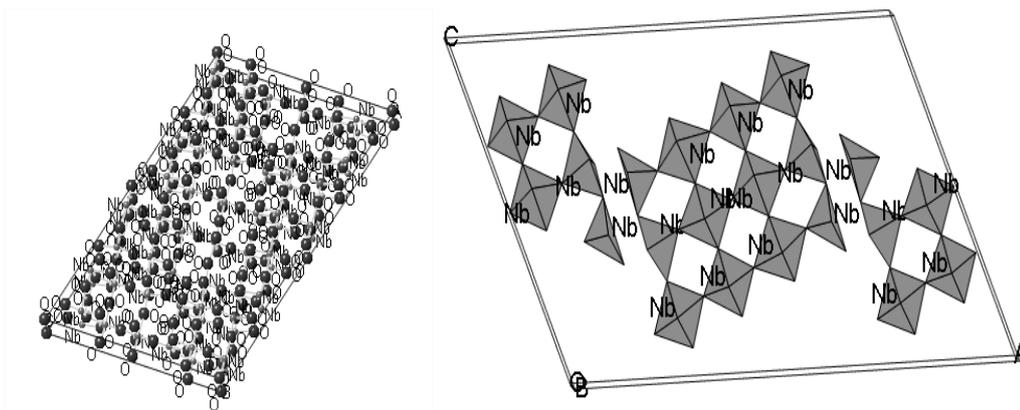
O pentóxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) é também chamado de ácido nióbico, cristaliza-se na forma monoclinica, e é preparado através da hidrólise de compostos solúveis de nióbio ou em soluções ácidas de nióbio sendo um sólido insolúvel em água mas solúvel em ácido fluorídrico, a redução do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  nas temperaturas de 1300 até 1700 °C produz

o monóxido de nióbio (NbO), de cor cinza e estrutura cúbica enquanto formas polimórficas sofrem transformações em temperaturas mais baixas.

O Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> apresenta polimorfismo devido aos blocos de octaedros de NbO<sub>6</sub> ligados nos vértices por átomos de oxigênios e assim polióxidos como Nb<sub>12</sub>O<sub>29</sub>, Nb<sub>22</sub>O<sub>54</sub>, Nb<sub>47</sub>O<sub>111</sub>, Nb<sub>25</sub>O<sub>62</sub>, Nb<sub>53</sub>O<sub>132</sub>, Nb<sub>28</sub>O<sub>70</sub> e H-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> podem existir. Os blocos são empilhados verticalmente com os blocos adjacentes que estão compartilhados pelos vértices. O Nb<sub>22</sub>O<sub>54</sub> cristaliza-se na forma monoclinica pertencente ao grupo espacial P12/m1 enquanto o composto o-Nb<sub>12</sub>O<sub>29</sub> é ortorrômbico com grupo espacial Cmc21 [41,42].

Na figura 8 pode-se observar a célula unitária do pentóxido de nióbio que foi visualizada no programa Crystal Explorer 3.0 a partir de arquivos cristalográficos CIF, ficha 24111, obtidos no banco de dados ICSD disponibilizado pelo CAPES no Portal da Pesquisa [43].

**FIGURA 8 - REDE CRISTALINA DO Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**



FONTE: ICSD (2013)

## 1.2.12 ROTA HIDROTÉRMICA

### 1.2.12.1 O MÉTODO HIDROTÉRMICO

A síntese hidrotérmica ou hidrotermal é baseada na cristalização de materiais em soluções aquosas a temperaturas maiores que 25 °C, normalmente próximas ou iguais à temperatura crítica, e pressões maiores que 100 kPa ou igual à pressão crítica embora

condições mais amenas de temperatura e pressão tem sido aplicadas na obtenção dos mais diversos materiais <sup>[44,52]</sup>.

A síntese hidrotermal possui as vantagens de produzir pós de elevada pureza, distribuição de tamanho de partículas uniforme, composição química estequiométrica e nem sempre exigir, diferentemente de muitos outros processos de síntese de pós cerâmicos que necessitam de operações posteriores como a moagem e calcinação para se ter as características desejadas de morfologia, cristalinidade e tamanho de partícula <sup>[44]</sup>.

Não há uma nomenclatura oficial dos métodos hidrotermais, mas entende-se como síntese hidrotermal como a síntese propriamente dita enquanto pode-se por outro lado obter-se pós através de outras técnicas e submete-los a um tratamento hidrotermal com o objetivo de se aumentar a cristalinidade sem aumento do tamanho do cristal <sup>[45]</sup>.

A técnica também pode ser modificada como, por exemplo, com o uso de aquecimento por micro-ondas que proporciona maior taxa de reação, redução do consumo de energia, menor tempo de síntese e maior eficiência quando comparada ao aquecimento convencional <sup>[46]</sup>.

O método hidrotermal mecânico-químico envolve o uso de surfactantes juntamente com o uso de um moinho para obter pós sem aglomerados <sup>[47]</sup>.

É possível utilizar outros solventes quando o método passa a ser chamado de solvotermal ou solvotérmico quando do uso da mistura de dois ou mais solventes ou adquire o nome do solvente utilizado como, por exemplo, glicotermal, alcooltermal. Os solventes orgânicos podem ter efeito na quelação de íons cálcio, adsorção moleculares nas faces cristalinas da hidroxiapatita, e controle morfológico originando morfologia de placas semelhante à hidroxiapatita biológica enquanto misturas álcool-agua tem originado diferentes morfologias com controle da taxa de dissolução dos ortofosfatos de cálcio <sup>[48]</sup>.

### **1.2.12.2 EQUIPAMENTOS**

Os equipamentos para a realização do método hidrotermal são chamados de autoclave e existem versões para escala industrial que podem atingir até 500 Mpa <sup>[49]</sup>. O equipamento para laboratório normalmente é constituído por uma camisa metálica aonde é inserido um cilindro em material plástico normalmente feito de Teflon. Os controladores de mistura, temperatura e pressão além de válvulas de segurança e

válvulas de escape de gás são acessórios comumente utilizados para garantir a segurança e eficiência do método <sup>[50]</sup>.

### 1.2.12.3 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE PRECIPITADOS PELO MÉTODO HIDROTÉRMAL

Os pós obtidos hidrotérmicamente geralmente seguem o mecanismo de precipitação quando do surgimento de soluções supersaturada nas quais as taxas de nucleação, crescimento e envelhecimento influenciam na formação da fase sólida e nas propriedades de tamanho do cristal e morfologia. Um núcleo pode ser considerado como uma pequena partícula que surge espontaneamente a partir de uma solução supersaturada que dará o surgimento de uma fase sólida precipitada. Geralmente na síntese hidrotérmal as taxas de nucleação e crescimento ocorrem de forma uniforme o que facilita a obtenção das mais diferentes formas morfológicas e da possibilidade do controle de tamanho de partículas <sup>[51]</sup>.

Se levarmos em conta o fator temperatura, inicialmente a baixas temperaturas a taxa de crescimento é mais lenta com a formação de muitos núcleos os quais somente aqueles com condições favoráveis termodinamicamente continuarão o crescimento sendo os demais redissolvidos na solução. A elevação da temperatura acelera a taxa de crescimento de modo que são poucos o(s) número(s) de núcleos e o crescimento é favorecido termodinamicamente. Usando-se baixas concentrações de precursores a nucleação é lenta e a taxa de crescimento é alta favorecendo o crescimento dos cristais por um mecanismo de difusão. O uso de concentrações maiores provoca uma rápida formação de núcleos estáveis e pouca variação no diâmetro dos cristais <sup>[52,53]</sup>.

A nucleação pode ser homogênea ou heterogênea <sup>[53]</sup> enquanto na nucleação homogênea o processo ocorre sem um sítio preferencial de precipitação na heterogênea, impurezas ou outros elementos adicionados auxiliam na precipitação <sup>[53,54]</sup>.

A nucleação homogênea para partículas esféricas a variação da energia livre total é igual a:

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 kbT \ln(S) + 4\pi r^2 \gamma$$

Equação 1- Variação de energia livre para partículas esféricas

Onde  $V$  é o volume molecular do precipitado;  $r$  é o raio do núcleo;  $k$  é a constante de Boltzmann;  $S$  é a taxa de saturação e  $\gamma$  é a energia livre superficial por unidade de área superficial.

Quando a taxa de saturação é maior que 1, a solução encontra-se no estado de supersaturação e, então a, variação da energia livre total atinge um máximo positivo para um raio crítico igual a:

$$r_{\text{crítico}} = \frac{2V\gamma}{3kbT \ln(S)}$$

Equação 2- Raio crítico

A conclusão a partir desta equação é que núcleos formados maiores que o raio(s) crítico(s) conseguirão se tornar estáveis e começarão a etapa de crescimento assim como núcleos com raios menores que o raio crítico se dissolverão <sup>[54]</sup>.

Outro fenômeno envolvido é o efeito de aglomeração de pequenas partículas em partículas maiores. A cristalização por aglomeração ocorre em partículas que cresceram até seu tamanho estável e que continuam seu crescimento combinando-se com pequenos núcleos instáveis através de mecanismos de colisão com outras partículas estáveis <sup>[54]</sup>.

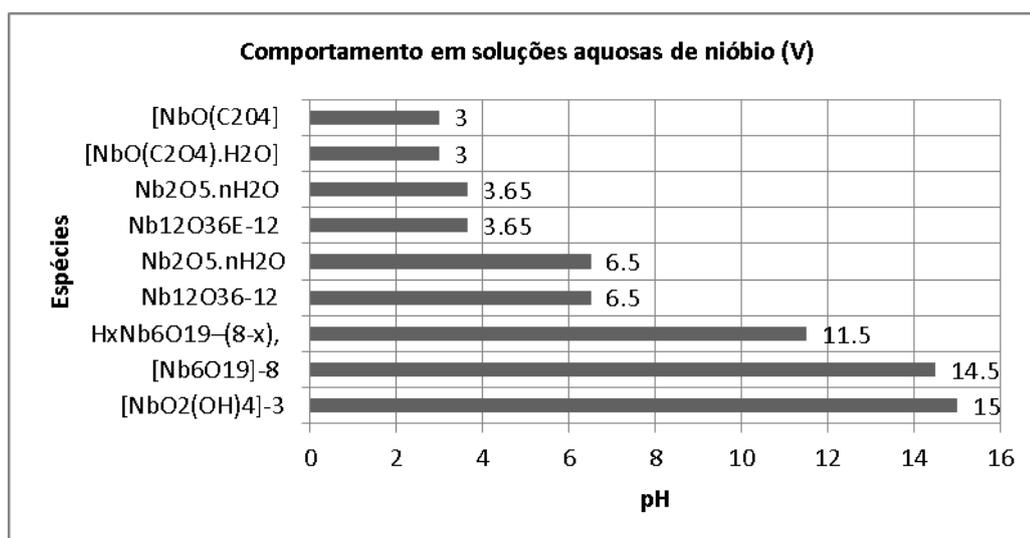
O envelhecimento de Ostwald é o crescimento de cristais maiores em função de cristais menores, ocorre devido ao fato dos cristais maiores serem termodinamicamente mais favoráveis que os menores, apesar de que do ponto de vista cinético, a criação de muitos núcleos serem muito mais favoráveis, este número muito grande de núcleos origina uma alta energia superficial devido ao aumento da energia superficial e, assim os muitos cristais pequenos tentam diminuir esta energia dissolvendo-se de forma que eles reprecipitam-se ao redor dos cristais maiores no chamado amadurecimento ou envelhecimento de Ostwald <sup>[54,55]</sup>.

A co-precipitação pode ocorrer com a formação de duas ou mais fases sólidas precipitadas devido à contaminação do precipitado por outros compostos que seriam solúveis nas condições de reação de precipitação. Outros fenômenos que podem ocorrer são a adsorção superficial de íons na superfície do cristal precipitado; a oclusão de íons nos planos cristalinos evitando a sua retirada por operações como a lavagem; a adsorção de água na estrutura cristalina e, a substituição iônica <sup>[56]</sup>.

### 1.2.12.4 COMPORTAMENTO EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE COMPOSTOS DE NIÓBIO (V) E ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO

O comportamento em solução aquosa de precursores de nióbio gera a existência de espécies iônicas em função do pH da solução conforme o gráfico mostrado na figura 9 [57]:

**FIGURA 9 - GRÁFICO DAS ESPÉCIES FORMADAS EM SOLUÇÕES AQUOSAS COM NIÓBIO.**



**FONTE: JEHNG,JIH-MIRN;WACHS,ISRAEL,E.NIOBIUM OXIDE SOLUTION CHEMISTRY.JOURNAL OF RAMAN SPECTROSCOPY, V.22, P.83-89,1991.**

Em pH superiores a 14.5 existe a espécie iônica:  $[\text{NbO}_2(\text{OH})_4]^{-3}$ , em pH = 14.5 há o íon hexaniobato  $[\text{Nb}_6\text{O}_{19}]^{-8}$  já em pH=11.5 predomina a espécie iônica  $\text{H}_x\text{Nb}_6\text{O}_{19}^{-(8-x)}$ , sendo x variando de 1 até 3, em soluções ácidas teremos em pH 6.5 as duas espécies:  $\text{Nb}_{12}\text{O}_{36}^{-12}$  e a precipitação de  $\text{Nb}_2\text{O}_5.n\text{H}_2\text{O}$ , em pH 3.65 existirá  $\text{Nb}_{12}\text{O}_{36}^{-12}$  e ocorrerá a precipitação de  $\text{Nb}_2\text{O}_5.n\text{H}_2\text{O}$  enquanto em pH 0.55 haverá a precipitação de  $\text{Nb}_2\text{O}_5.n\text{H}_2\text{O}$ . Em soluções ácidas de oxalato,  $[\text{NbO}(\text{C}_2\text{O}_4).\text{H}_2\text{O}]$  e  $[\text{NbO}(\text{C}_2\text{O}_4)]$  que são estáveis até pH =3.0 e que precipitarão como  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  a pH superiores a 3.0 [57].

O íon nióbio(V) é fortemente hidrolisável em soluções aquosas originando diversas espécies que precipitam como pentóxido de nióbio hidratado ( $\text{Nb}_2\text{O}_5.\text{H}_2\text{O}$ ) sendo que estudos em soluções aquosas marítimas demonstram que o  $\text{Nb}(\text{OH})^6$  em águas com pH acima de 7.4 [58].

O comportamento de ânions niobato como o hexaniobato como o  $\text{Nb}_6\text{O}_{19}^{8-}$  geralmente formam o ácido nióbio em pH ácidos, normalmente abaixo de cinco, mas diversos estudos necessitam ser realizados nesta área<sup>[59]</sup>.

Em relação à hidroxiapatita utilizando concentrações de precursores de cálcio maiores que 0.5 mol/L em pH variando de 10 até 11 têm sido demonstrado que ocorrem reações intermediárias de transformação. O octafosfato de cálcio se transforma em fosfato de cálcio amorfo que se torna hidroxiapatita deficiente de cálcio e finalmente em hidroxiapatita estequiométrica sendo que na síntese via precipitação via úmida à temperatura ótima é de 60 °C<sup>[60]</sup>.

A solubilidade em a 25 °C dos fosfatos cerâmicos está apresentada no quadro 3.

**QUADRO 3**

QUADRO 3- ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO E SOLUBILIDADE	
Fosfato de Cálcio	Solubilidade em g/L
MCPM	~18
MCPA	~17
DCPD	~0.088
DCPA	~0.048
OCP	~0.0081
$\alpha$ -TCP	~0.0025
$\beta$ -TCP	~0.0005
ACP	Valor indefinido
CDHA	~0.0094
Hidroxiapatita	~0.0003
Fluorapatita	~0.0002
TTCP	~0.0007

**FONTE: DOROZHKIN,V.SERGEY.BIOCERAMICS OF CALCIUM ORTHOPHOSPHATES.BIOMATERIALS,VOL.31(7), PP.1465-1485,2010.**

### 1.2.12.5 ADITIVOS DE SÍNTESE

Aspectos morfológicos, controle de tamanho de partícula e cristalinidade, obtenção de propriedades únicas além de controle do processo de síntese como pH são alguns dos motivos para que além dos precursores e do solvente mineralizador sejam

adicionados aditivos para auxiliarem na rota hidrotérmica, pois muitas vezes apenas o ajuste da concentração de precursores não é suficiente para a obtenção do material desejado apesar da possibilidade de surgirem outras fases de fosfatos de cálcio como a monetita <sup>[61]</sup>.

Um tipo de morfologia chamado de tipo-flores ou flower-like tem sido bastante desenvolvido para produzir microesferas de hidroxiapatita para servir como carregadores para aplicações biomédicas sendo que existem diversos aditivos que auxiliam na obtenção desta morfologia. O poli(estirenosulfonado) é um polieletrólito que origina microesferas uniformes e, com controle dos tamanhos, de acordo com a sua concentração na rota hidrotérmica <sup>[62]</sup>.

Outros aditivos como citrato de sódio, polietileno glicol, EDTA, PVA e dendrímeros são utilizados para controle da morfologia originando micro e nano fibras, hastes, elipsoides e outras formas. O EDTA atua como uma agente quelante para os íons cálcio (II) e, evita a formação de DCPD e OCP, isto, resulta em uma diminuição da nucleação da hidroxiapatita e o crescimento ao longo do eixo c provocando um alongamento da partícula obtendo partículas tipo whiskers <sup>[63]</sup>.

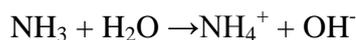
É possível montar a síntese hidrotermal com um agente precipitante para que a precipitação ocorra com um aumento gradual do pH de modo que podem ser obtidas morfologias de placas, prismas hexagonais, agulhas e placas finas. A ureia é um dos compostos mais utilizados por sua alta solubilidade em meios aquosos e baixa temperatura de degradação. O processo de dissociação e hidrólise da ureia na rota hidrotermal é que provoca o aumento gradual do pH <sup>[64]</sup>. Este modo de aumento gradual do pH provoca uma baixa nucleação inicial com baixa supersaturação.

A ureia se dissocia em água da seguinte forma:



Reação 3- Dissociação da Ureia

A hidrólise da  $NH_3$  resulta em:



Reação 4- Hidrólise da Amônia

Os íons carbonato(s) se dissolvem em água formando íons  $HCO_3^-$  e  $CO_3^{2-}$  podendo levar ao surgimento de substituições dos grupos fosfatos enquanto os grupos

hidroxila provocam o aumento do pH da solução aquosa e a precipitação da hidroxiapatita [65, 66,67].

As partículas de hidroxiapatita precipitadas na presença de ácido cítrico formam compostos não tóxicos e com o aumento da proliferação de osteoblastos em comparação com a hidroxiapatita precipitada sem ácido cítrico [68].

Além disto, o ácido cítrico tem a propriedade de diminuir as camadas superficiais carregadas e encurtar a distância entre partículas carregadas através da adsorção de cargas opostas e eliminação de água adsorvida [69].

### 1.3 DELIMITAÇÕES DO PROBLEMA

O desenvolvimento desta pesquisa é sintetizar um biomaterial aditivado com um precursor de nióbio (V) e para isto o fluxograma apresentado na figura 4 apresenta a sequência delimitante das escolhas para a realização deste trabalho.

A hidroxiapatita é um dos fosfatos de cálcio mais estudados e utilizados em biomateriais, é o mais estável dos fosfatos de cálcio em uma ampla faixa de pH e por isto apresenta-se a princípio como o melhor candidato para ser aditivado visto que apesar da maior vantagem de inovação de se usar, por exemplo, Beta-TCP, este é mais solúvel que a hidroxiapatita e necessitaria um maior tempo de caracterização em relação à questão de solubilidade e possibilidades de liberação de íons nióbio (V) quando da sua dissolução e reabsorção.

O precursor de nióbio (V) escolhido foi o sal amoniacal de nióbio, altamente solúvel em meio aquoso e adequado para esta síntese e, até o momento este sal não foi utilizado na incorporação de matrizes de HAp para aplicações como biomateriais.

Os óxidos de nióbio são mais comuns em biovidros, mas possuem a desvantagem de serem insolúveis em meio aquoso. A rota hidrotérmica apresenta as vantagens já citadas e, também, possibilita maior sustentabilidade e, menor impacto ambiental por utilizar água como solvente ao invés de solventes orgânicos da rota solvotermal.

Alguns aditivos são necessários para complementar à síntese e como a reação da síntese deve iniciar-se em pH ácido é necessário o uso de substâncias ácidas como os ácidos minerais inorgânicos. O problema do uso do ácido clorídrico e ácido fluorídrico é a troca iônica que promove a formação de cloroapatita ou fluorapatita. O uso dos ácidos nítrico e ácido sulfúrico a altas temperaturas de síntese podem gerar gases NOx ou SOx

além da incompatibilidade química da ureia com compostos nitrogenados como nitratos podendo apresentar o risco de fogo e explosão o que, impossibilita o uso de ácido nítrico e precursores de cálcio como o nitrato de cálcio. Desta forma optou-se pelo uso de um ácido orgânico que conseguisse acidificar a solução inicial no pH desejado, sendo neste caso optado pelo ácido cítrico que já vem sendo utilizado para controlar a liberação de íons cálcio na formação da hidroxiapatita e para que ocorresse a precipitação da hidroxiapatita seria então necessária à utilização de um agente de precipitação capaz de elevar até o pH adequado à formação da fase de hidroxiapatita seno optada pela ureia, um material de baixo custo e capaz de promover esta condição.

O tempo de síntese foi escolhido inicialmente de 24 horas a fim de se usar uma menor quantidade de ureia e, conseqüentemente uma menor geração de gases e, pressão de vapor.

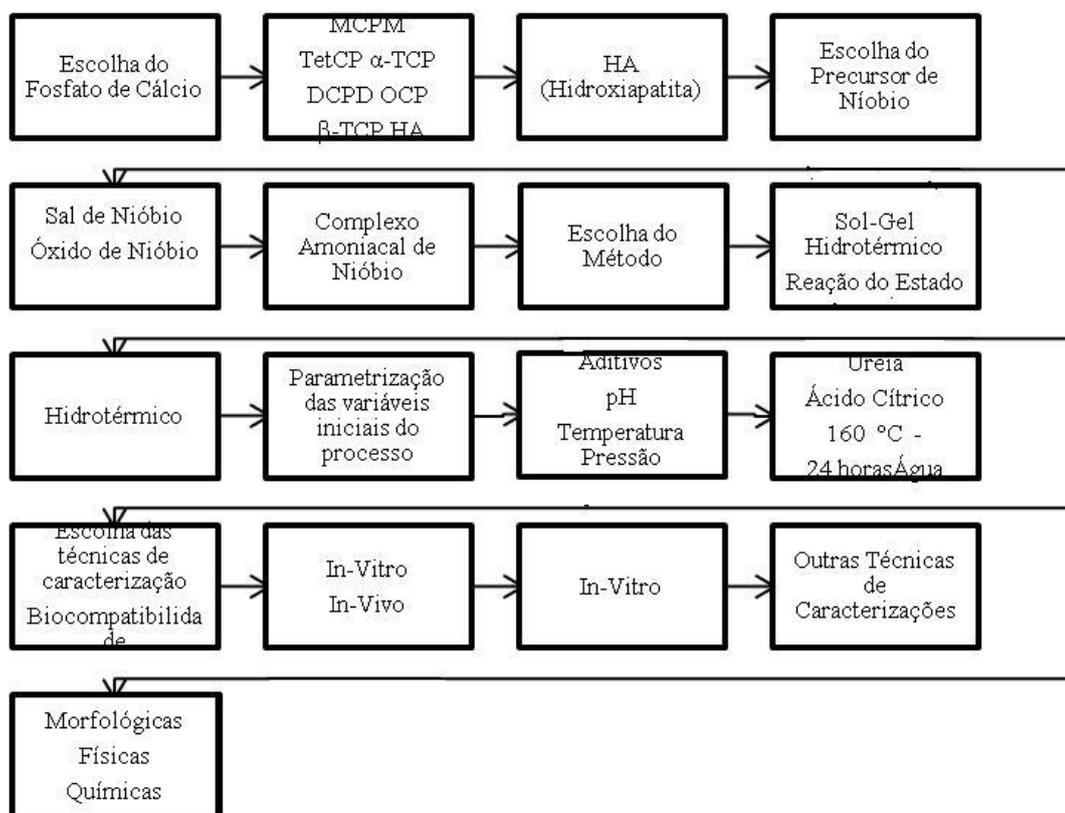
A temperatura inicial foi estipulada em função da temperatura de degradação e, limite de temperatura de uso de cada precursor e aditivo utilizado.

O ensaio de biocompatibilidade e citotoxicidade *in vitro* torna-se necessários para caracterizar em um primeiro momento a provável interação entre a HAp dopada ou não e, as culturas de osteoblastos com adições de corantes específicos.

A disponibilidade dos ensaios *in vitro* e *in vivo* ficaram dependentes da possibilidade da realização em função do tempo e da disponibilidade de realização por outros setores da UEPG com mais experiência na execução destes ensaios como os departamentos de Farmácia e Odontologia. Em função disto foram escolhidos os ensaios de citotoxicidade e biocompatibilidade *in vitro* mais comuns para a obtenção destas duas informações.

Confirmado ou não a biocompatibilidade dos materiais obtidos, outras técnicas de caracterização foram escolhidas devido à importância em se conhecer as fases presentes e a morfologia e tamanho das partículas.

**FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE DELIMITAÇÃO DO TRABALHO**



**FONTE: AUTOR (2013)**

O uso de precursores altamente solúveis em soluções aquosas de íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Nb}^{5+}$ , conjuntamente em uma síntese hidrotérmica pode resultar na formação de um material que possui propriedades de biocompatibilidade capaz de considerá-lo como um biomaterial?

A hipótese principal deste trabalho é que se utilizando relações estequiométricas de precursores de cálcio e fósforo e depois com a dopagem com precursores de nióbio (V) e, controlando-se os parâmetros da síntese tais como: temperatura, pH com a elevação gradual obtida por meio da hidrólise de um agente precipitante, tempo e grau de liberação de íons metálicos por meio de agentes de complexação é possível se obter um fosfato de cálcio com fase principal de hidroxiapatita com a presença de nióbio e assim atinge-se uma alteração das propriedades biocompatíveis da hidroxiapatita.

Com a presença de nióbio, este dependendo das condições submetidas durante o processo da síntese, poderá se apresentar incorporado na forma de íons  $\text{Nb(V)}$  envolvido

em mecanismos de substituição iônica, adsorvido superficialmente na estrutura do ortofosfato de cálcio formado além da possibilidade de fenômenos de oclusão e aprisionamento mecânico. A presença de uma segunda fase não poderá ser descartada já que é possível a presença de outros fosfatos de cálcio como a hidroxiapatita deficiente em cálcio, OCP entre outros, assim como a adição do nióbio poderá originar compostos insolúveis como um óxido ou fosfato de nióbio de modo que este trabalho é uma contribuição no entendimento da preparação de hidroxiapatitas substituídas preparadas pela rota hidrotermal através do controle de diversas variáveis como pH e temperatura, e a posterior, caracterização por diversas técnicas de caracterização físico-química, como p.ex., espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia Raman, DRX entre outras e, em uma última etapa a caracterização das condições de biocompatibilidade da hidroxiapatita pura e dopada com íons Nb (V) poderão ajudar a determinar a influência da composição das amostras obtidas nos resultados obtidos.

## 1.4 TÉCNICAS E SEUS FUNDAMENTOS

### 1.4.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A difração de raios X é uma técnica não destrutiva baseada na interferência construtiva de raios X monocromáticos e uma amostra cristalina sendo o método do pó o mais utilizado. Serve para o estudo de materiais cristalinos e gera informações como as fases presentes, tipo de estrutura cristalina, parâmetros de rede, ângulos de ligações, composição química e composição quantitativa das fases presentes podem ser obtidas a partir de um difratograma e os dados obtidos. O equipamento de difração é chamado de difratometro. Os raios X são gerados por um tubo de raios catódicos que através de um filtro produzem a radiação monocromática. É a interação entre os raios incidentes com a amostra que produzem a interferência construtiva que obedece a lei de Bragg's.

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Equação 3- Equação da lei de Bragg's

onde n é um número inteiro;  $\lambda$  é o comprimento de onda incidente; d é a distância entre planos atômicos e  $\theta$  é o ângulo de incidência do plano desejado.

Os raios X difratados são detectados através de um arranjo geométrico chamado de geometria Bragg-Brentano que possibilitará a obtenção do ângulo  $2\theta$ . Estes ângulos são processados e contados para originar os dados que possibilitam a construção de um difratograma que servirá para a identificação das fases. O difratograma registra os dados em função da intensidade e o ângulo  $2\theta$  ou à distância interplanar  $d$ . A análise pode ser qualitativa verificando-se as posições, larguras, alturas e intensidades dos picos comparando-se com banco de dados cristalográficos ou quantitativa para determinação de parâmetros estruturais e composição de fases através do uso de programas computacionais específicos<sup>[70]</sup>.

#### **1.4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)**

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho mede a intensidade da absorção ou transmissão da luz infravermelha que é capaz de afetar os movimentos de rotação e vibração de uma amostra sendo que a espectroscopia por transformada de Fourier foi desenvolvida para melhorar as limitações dos instrumentos dispersivos que se baseavam na leitura de frequências individualmente. Com o uso de um dispositivo conhecido como interferômetro capaz de dividir um feixe conseguiu-se produzir um único tipo de sinal contendo todas as frequências decodificadas chamadas interferograma que depois é convertido matematicamente através da transformada de Fourier em um espectro de modo que o processo de identificação dos compostos e a leitura se tornaram mais eficientes e rápidas<sup>[71, 72,73]</sup>.

O equipamento de infravermelho consiste basicamente de uma fonte emissora na região do infravermelho, um interferômetro, um porta amostra, um detector e um sistema de saída de dados para gerar um espectrograma que normalmente apresenta no eixo das ordenadas à grandeza número de onda que representa o valor inverso do comprimento de onda<sup>[71, 72,73]</sup>.

#### **1.4.3 ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN**

A energia de uma radiação monocromática como a proveniente de um laser é irradiada sobre uma molécula ela poderá ser transmitida para o seu interior, absorvida na

forma de calor, ou espalhada e é neste princípio da detecção da luz espalhada que a espectroscopia Raman é fundamentada para a identificação das moléculas [71, 72, 73,74].

Quando a interação de uma molécula com o fóton da radiação monocromática não provocar mudanças nos níveis de energia vibracional e/ou rotacional este fenômeno é conhecido como espalhamento Rayleigh. O efeito Raman que é o utilizado para a identificação das moléculas ocorre somente com 0,001% da radiação incidente e é devido à mudança das energias vibracionais e/ou rotacionais da molécula devido à colisão entre o fóton incidente da radiação monocromática e a molécula. Quando a frequência do espalhamento é menor que a incidente, o espalhamento é chamado de Stokes e na situação inversa é anti-Stokes [71, 72, 73,74].

Através deste espalhamento resultante das diferenças entre as radiações incidentes e espalhadas chamadas de deslocamento Raman podemos descobrir as frequências dos modos vibracionais [71, 72, 73,74].

O equipamento Raman consiste de uma fonte emissora laser, um sistema de iluminação, um seletor do comprimento de onda e um detector. O laser mais comum são o verde de comprimento de onda de 532 nm e o vermelho de comprimento de onda de 633 nm. Algumas moléculas podem ser excitadas causando a fluorescência destas moléculas quando usado o laser verde devido à alta energia deste laser, enquanto o laser vermelho de menor energia poderá evitar a transição eletrônica das moléculas [75,76].

#### **1.4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)**

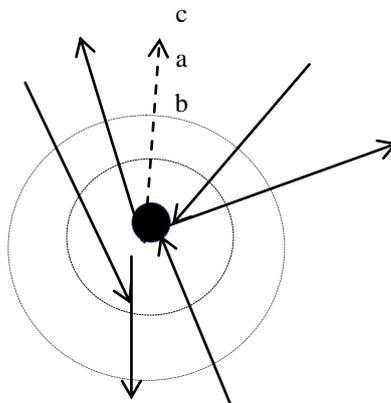
O microscópio de transmissão possui um canhão que emite um feixe de elétrons de alta energia capaz de incidir sobre uma amostra e fornecer informações como a análise de defeitos, discordâncias, defeitos de empilhamento, áreas cristalinas, fases presentes e tamanho de partículas. Os elétrons que sofrem contraste de difração (espalhamento em muitas direções devido à estrutura cristalina) e contraste de fase (espalhamento com baixos ângulos) são importantes na análise de amostras cristalinas. Outros componentes são o sistema de vácuo, o conjunto de lentes objetivas e condensadoras e o programa computacional de controle. É necessário que a fonte de elétrons produza uma alta densidade de elétrons e um pequeno espalhamento da energia cinética dos elétrons e para isto os equipamentos mais modernos têm utilizados os canhões com fonte de emissão de campo (FEG) ou com LaB<sub>6</sub> ao invés do filamento de tungstênio. O hexaboreto de lantânio produz maior iluminação que o filamento de

tungstênio, mas exige um alto vácuo enquanto o FEG possui uma capacidade de brilho de 1000 vezes maior que ao do filamento de tungstênio e são usadas em aumentos superiores a 100 mil vezes. As lentes do microscópio de transmissão são magnéticas para provocar a deflexão dos elétrons. Um canhão paralelo é o responsável pela iluminação sobre a amostra que deve ser suficientemente espessa para que ocorra a transmissão de elétrons. As lentes objetivas servem para formar uma imagem magnificada da área iluminada que depois serão projetadas através de lentes projetoras em um dispositivo visualizador da imagem formada. O microscópio eletrônico de transmissão convencional permite a análise através dos modos imagem ou difração. Esta segunda opção permite a análise de áreas cristalinas de uma amostra através da formação de padrões de difração nas quais os planos paralelos ao feixe incidente contribuirão para a formação de uma figura de difração formada por pontos ou spots brilhantes em amostras cristalinas. Estes spots são um ponto do espaço recíproco correspondentes a um plano hkl no espaço real. O modo de análise por varredura é possível somente em microscópios dotados de FEG onde o canhão de elétrons é focado sobre a amostra através de lentes condensadoras e objetivas <sup>[77,78]</sup>.

#### **1.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

Quando um feixe de elétrons com elevadas energias emitidos por um canhão varre através de um conjunto de bobinas defletoras a superfície de uma amostra, esta pode emitir elétrons possibilitando a construção de imagens a partir deste procedimento de varredura. A microscopia eletrônica de varredura envolve a formação de imagens devido a efeitos como o surgimento de elétrons secundários e elétrons retroespalhados conforme mostrado na figura que mostra algumas dessas interações do elétron <sup>[77,78]</sup>.

**FIGURA 11 - INTERAÇÕES DOS FEIXES DE ELÉTRONS COM OS ÁTOMOS MOLECULAR**



**FONTE: PARRY-VERNON, K.D. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY: AN INTRODUCTION. ILL-VS REVIEW, V.13, P.40-44, 2000.**

A geração dos elétrons secundários (c) com alta energia são os responsáveis pela mais alta resolução das imagens amostra devido a maior proximidade destes elétrons com a superfície da amostra. Os elétrons espalhados de baixo ângulo devido a menor interação com o núcleo (a) perdem pouca energia ao atravessar as camadas atômicas enquanto os elétrons retroespalhados (b) são menos numerosos que os elétrons secundários e originam menor resolução de imagem.

A resolução de um microscópio eletrônico de varredura depende principalmente das aberrações da lente e o brilho da fonte de elétrons. Imperfeições da lente são chamadas de aberrações e dificultam o foco do canhão e provoca distorções na imagem sendo necessário o uso de elétrons com estreita faixa de distribuição de energia e/ou a regulagem da abertura das lentes objetivas afim de limitar o ângulo dos raios mais externos que atravessam as lentes<sup>[77,78,79,80]</sup>.

A respeito da fonte geradora de elétrons, os mais utilizados são os filamentos de tungstênio que apresentam as vantagens de serem mais baratos mas com baixa vida útil de funcionamento se comparado com outros materiais como o tetraboro de lantânio. Este dosi materiais funcionam através da emissão termiônica de elétrons quando aquecidos a 2700 K. Para solucionar o problema de resolução, materiais que emitem através de um processo de emissão de campo conhecidos como FEG foram desenvolvidos porém ainda possuem um custo elevado<sup>[77,78,79,80]</sup>.

#### 1.4.6 ANÁLISE TÉRMICA

As análise termogravimétricas referem-se a medição da variação da massa de uma amostra em função do tempo ou da temperatura em uma atmosfera controlada. O equipamento para análise termogravimétrica (TGA) consiste em um forno, uma balança analítica e um sistema de purga de gases. As propriedades mais comuns relacionadas a gravimetria e a estabilidade térmica e da estabilidade da composição química de uma amostra podem ser avaliadas como a perda de água, pirólise, oxidação, decomposições, descarboxilação, hidratações, entre outras<sup>[81,82,83]</sup>.

A análise térmica diferencial funciona utilizando a amostra a ser analisada e uma amostra de referencia que submetidos a um ciclo térmico na qual as diferenças de temperatura entre a amostra e a referencia são medidas<sup>[82,83]</sup>.

Propriedades como fusão, cristalização, sublimação, temperatura de transição vítrea que estão relacionadas a fenômenos endotérmicos e exotérmicos podem ser avaliados. Os equipamentos consistem de porta-amostras, termopares, forno e programadores de temperatura<sup>[82,83]</sup>.

#### 1.4.7 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA POR DIFRAÇÃO DE LASER (DL)

A irregularidade do formato das partículas levou a adotarem-se modelos teóricos que fazem a aproximação do formato das partículas como se elas possuíssem o formato esférico devido à esfera ser representadas somente pelo seu diâmetro sendo que para partículas cilíndricas esta aproximação funcionará relativamente bem, mas para partículas de forma de agulhas ou placas alguns erros poderão acontecer<sup>[84,85]</sup>.

As teorias de espalhamento de Fraunhofer e Mie são utilizados como modelo para os cálculos da distribuição de tamanhos de partículas sendo que a teoria de Mie é mais utilizada devido ao fato de levar em conta a presença das partículas menores<sup>[84,85]</sup>.

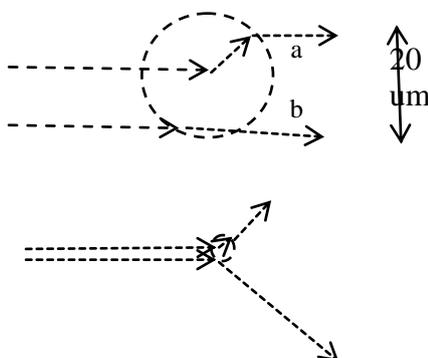
Os granulômetros são os equipamentos utilizados para a análise granulométrica por difração de laser (DL) e consistem de uma fonte de luz monocromática de alta intensidade apesar de atualmente existirem equipamentos como duas fontes de laser que emitem na região do vermelho e no azul devido ao comportamento do tamanho de partículas, um porta amostras e um conjunto de fotodiodos capazes de detectar o ângulo e a intensidade do espalhamento de luz pelas partículas<sup>[84,85]</sup>.

Quando a luz do laser incide sobre as partículas vários fenômenos podem ocorrer. O tamanho de partícula é medido através do ângulo e da intensidade da luz difratada (a)refratada (b) através de fotodetectores.

A figura representa este efeito para partículas de diferentes tamanhos. O fenômeno da difração predomina até um limite de tamanho de partícula grandes de dimensões aproximado até 20 micron gerando alta intensidade e baixo ângulo de espalhamento.

Abaixo deste valor há baixas intensidades e maiores ângulos de espalhamento visto que o espalhamento é inversamente proporcional ao tamanho da partícula <sup>[84,85]</sup>.

**FIGURA 12 - ESPALHAMENTO DA LUZ COM PARTÍCULAS GRANDES E PEQUENAS**



**FONTE: MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. A BASIC GUIDE TO PARTICLE CHARACTERIZATION.MALVERN INSTRUMENTS,2012.**

A circularidade de uma partícula é a relação entre o perímetro e o perímetro da área de um círculo equivalente e é um parâmetro importante quando desejamos saber informações sobre a esfericidade de uma partícula <sup>[84,85]</sup>.

Se não houver nenhum tipo de conversão, as técnicas de difração a laser fornecem a distribuição de volumétrica de cada partícula aonde à média significa o tamanho médio da população; a mediana é o tamanho onde 50% da população estão acima ou abaixo deste tamanho e a moda que se refere a mais alta frequência da distribuição.

A distribuição poder ser unimodal ou polimodal dependendo do número de picos que aparecerem na distribuição dos tamanhos das partículas. Alguns dados extraídos da distribuição são o  $D_{10}$  que é igual ao valor do tamanho de partícula abaixo do qual se situam 10% da amostra e também o  $D_{50}$  e  $D_{90}$  aos quais valem o mesmo raciocínio <sup>[84,85]</sup>.

#### **1.4.8 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL)**

Também conhecida como Espalhamento de Luz Quasi-Elastico a técnica de espalhamento dinâmico de luz permite a determinação da distribuição do tamanho de partículas na faixa dos nanômetros. Quando as partículas em uma suspensão estável são atingidas por um feixe de luz, elas conseguem dispersar esta luz em todas as direções sem perda ou ganho de energia (Espalhamento Rayleigh) e que a variação na intensidade do espalhamento sofre alterações em função do tempo devido ao movimento browniano das partículas. Matematicamente estas variações podem ser calculadas e usadas para resultar na distribuição do tamanho de partículas<sup>[86]</sup>.

#### **1.4.9 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)**

Acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, o EDS é utilizado para análises qualitativas e quantitativas de amostras através medição da emissão de raios X dos elementos químicos presentes na amostra. Possibilita a determinação de elementos químicos com número atômico superior a quatro através de microanálises e também a criação de mapas que mostram a distribuição de elementos químicos presentes na amostra chamados de mapping<sup>[87,88]</sup>.

#### **1.4.10 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (FRX)**

Utilizando-se o espectrômetro de fluorescência de raios X pode-se determinar quantitativamente e de forma não destrutiva os elementos presentes em uma amostra. A incidência de raios X na superfície da amostra provoca a ejeção de elétrons das camadas mais próximas do núcleo que criam vacâncias que são preenchidas por elétrons das camadas mais externas resultando nesta etapa na emissão de raios X fluorescentes de energia igual à diferença entre as energias dos níveis e sub-níveis das transições eletrônicas, e como a fluorescência emitida é característica de cada elemento possibilita-se a análise elementar da amostra<sup>[89]</sup>.

#### 1.4.11 MICROSCOPIA POR FORÇA ATÔMICA (AFM)

O microscópio de força atômica possui uma ponteira chamada com o termo em inglês de cantiliver que interage com a amostra. Quando a separação do cantiliver e da superfície da amostra é da ordem de 10-100 nm as forças atuantes são as forças de atração como as forças de Van der Waals, eletrostática, magnéticas e capilares fornecendo informações da superfície. Este modo de operação é chamado de não-contato. Com a aproximação maior do cantiliver as forças de repulsão atuam e possibilitam a medida topográfica da superfície e esta operação é chamada de modo por contato<sup>[90]</sup>.

#### 1.4.12 ENSAIOS IN VITRO DE BIOMATERIAIS

Um material candidato a ser usado como biomaterial passa basicamente por:

- a) Ensaio *in vitro* em que são usadas condições fisiológicas e cultura de células próximas em que o material será utilizado;
- b) Ensaio *in vivo*, em animais;
- c) Ensaio *in vivo*, em seres humanos.

Os ensaios *in vitro* apresentam resultados que permitem saber sobre as respostas positivas e negativas quanto à interação tecidual na presença de biomateriais sendo que estes para serem considerados aprovados nos testes de citotoxicidade não devem apresentar alteração nem morte celular<sup>[91, 92, 93]</sup>.

O estudo *in vitro* tem como vantagens principais<sup>[91, 92, 93]</sup>:

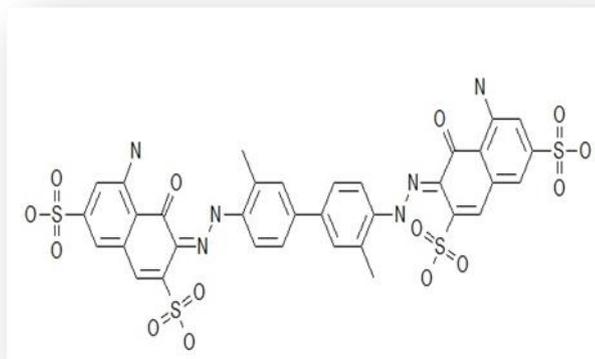
- a) executados em menor tempo e custo que os, sensíveis, reprodutíveis testes *in vivo*;
- b) servem como seleção inicial eliminando materiais não biocompatíveis;
- c) evitam inicialmente o uso de animais.

##### 1.4.12.1 EMPREGO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN

O corante ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfônico), (figura 5), é conhecido usualmente como azul de Tripán é um composto de fórmula molecular C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>

com peso molecular de 872.87792 g/mol muito utilizado para estudos in vitro da viabilidade e proliferação celular<sup>[94]</sup>.

**FIGURA 13 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE AZUL DE TRIPAN**



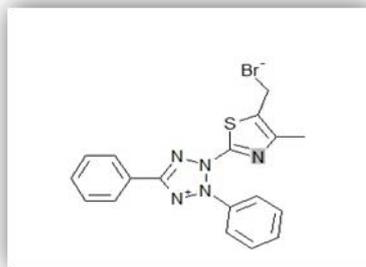
**FONTE: PUBCHEM, 2013.**

O método consiste na contagem de células vivas e mortas quando em contato com o biomaterial e o corante. O corante azul de Tripaflavin atravessa as membranas celulares em células mortas e torna-as com uma coloração azul enquanto as células que continuam vivas não alteram sua coloração demonstrando a maior ou menor proliferação celular<sup>[95]</sup>.

#### **1.4.12.2 MEDIDA DA REDUÇÃO DO MTT**

O brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio, (figura 6) também conhecido como corante MTT possui fórmula molecular  $C_{18}H_{18}BrN_5S$  massa molecular de 416.338013 g/mol é utilizada em testes de toxicidade para avaliar a integridade celular<sup>[96]</sup>.

**FIGURA 14 – ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE MTT**



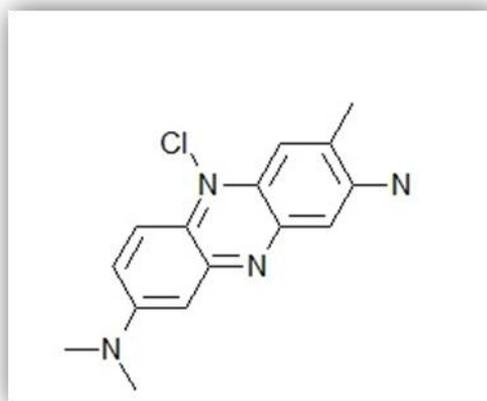
**FONTE: PUBCHEM, 2013.**

O método consiste em medir espectrofotometricamente a absorvância entre 500 e 600 nm da redução para púrpura de formazan de células tratadas com o biomaterial e células não tratadas. O número de células vivas está diretamente ligado à quantidade de enzimas succínico desidrogenase mitocondrial responsável pela redução, e quando a cor púrpura de formazan é formada pela quebra do anel tetrazólio, pode-se comparar a absorvância das células não tratadas com as células tratadas com o biomaterial e assim ter um resultado de citotoxicidade.

Um aumento do número de células resulta em um aumento da púrpura de formazan e conseqüentemente um aumento da absorvância medida no espectrofotômetro<sup>[97,98]</sup>.

#### **1.4.12.3 MEDIDA DA CAPTAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO (CVN)**

O corante vermelho neutro, cloreto de 8-N, 8-N,3-trimetilfenazina-2,8-diamina,(figura 7) é um composto de fórmula molecular  $C_{15}H_{17}ClN_4$  de peso molecular 288.77528 [g/mol]<sup>[99]</sup>.

**FIGURA 15 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CORANTE VERMELHO NEUTRO**

**FONTE: PUBCHEM, 2013.**

O ensaio mede a liberação do corante vermelho neutro devido à perda da viabilidade celular causada por uma substância. Os lisossomos e endossomos absorvem e/ou adsorvem o corante e difundem-se através da membrana celular acumulando-se no citoplasma celular. e se a substância apresentar citotoxicidade há liberação deste corante vermelho neutro devido à interferência da divisão e multiplicação celular. As medidas de absorbância são realizadas em um espectrofotômetro em faixas de 570 nm e indicam a capacidade do corante de se ligar com células vivas<sup>[99]</sup>.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

- a) Sintetizar através da rota hidrotérmica, fosfatos de cálcio com e sem aditivação do complexo amoniacal de nióbio utilizado como precursor de nióbio, avaliando a possibilidade de estes materiais obtidos serem considerados como biomateriais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os parâmetros da síntese hidrotérmica: temperatura, concentração de ureia, concentração de ácido cítrico, uso do agente quelante e a rota empregada;
- b) Identificar as fases presentes através da difração por raios X (DRX);
- c) Identificar através da técnica da espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IV) e espectroscopia de espalhamento Raman, os grupos funcionais característicos da hidroxiapatita e outras fases formadas;
- d) Caracterizar e avaliar morfologicamente as partículas obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- e) Avaliar os resultados da distribuição granulométrica das amostras;
- f) Determinar por espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) e espectroscopia por energia dispersiva (EDX) a presença elementar qualitativa de cálcio, fósforo e nióbio.
- g) Avaliar a biocitotoxicidade das amostras obtidas através de ensaios in-vitro de citotoxicidade;
- h) Aperfeiçoar a rota de síntese utilizada

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS

As amostras preparadas nesta dissertação foram rotuladas e preparadas segundo as condições apresentadas na tabela 1:

**TABELA 1-CODIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Tabela 1 – Codificação e Parâmetros da Síntese Hidrotérmica

Código	Ca/P	Aditivação com o Precursor contendo Níobio (V)	Ureia	Ácido Cítrico	pH inicial	Temperatura da Síntese
Amostra 0	1.67	0 ppm	0.3330 mol/L	0.095 mol/L	4.0	160 °C
Amostra 1	1.67	57.6 ppm	0.3330 mol/L	0.095 mol/L	4.0	160 °C
Amostra 5	1.67	288 ppm	0.3330 mol/L	0.095 mol/L	4.0	160 °C
Amostra 10-160	1.67	576 ppm	0.3330 mol/L	0.095 mol/L	4.0	160 °C
Amostra 10-200	1.67	576 pmm	0.3330 mol/L	0.095 mol/L	4.0	200 °C

**FONTE:AUTOR,2013**

Estas condições obtidas estão apresentadas na sequencia desta dissertação.

Os testes de biocitotoxicidade foram realizados com a amostra 10-200 por esta ter apresentado uma maior homogeneidade morfológica.

#### 3.2 ROTEIRO GERAL DA SÍNTESE HIDROTERMAL

O fluxogramas a seguir apresentam a sequencia do preparo das amostras.

### FLUXOGRAMA REPRESENTATIVO DA ROTA HIDROTHERMAL PARA AS AMOSTRAS



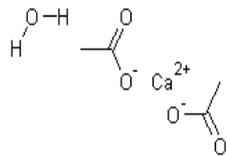
## 3.3-PRECURSORES E ADITIVOS UTILIZADOS NA SÍNTESE DAS AMOSTRAS

### 3.3.1-PRECURSORES

Os precursores de cálcio e fósforo foram selecionados em função de suas solubilidades em água. O precursor de nióbio foi selecionado conforme já exposto na introdução teórica e delimitação do problema desta dissertação em que a sua alta solubilidade em meio aquoso torna-o ideal para uma síntese hidrotermal. O precursor de cálcio utilizado foi o acetato de cálcio monohidratado, o precursor de fósforo utilizado foi o fosfato de amônio monobásico e o precursor de nióbio foi o complexo amoniacal de nióbio com características colhidas a partir

das fichas de informação de segurança de produtos químicos e/ou boletins técnicos conforme apresentado nos quadros a seguir.

**QUADRO 4**

QUADRO 4- PRECURSOR DE CÁLCIO							
Acetato de Cálcio Monohidratado							
Fabricante	Grau	Nome Usual	Nome Oficial	Fórmula Molecular e Estrutural	Massa Molar (g/mol)	Propriedades Físico-Químicas e Toxicológicas	
VETEC	P.A. Concentração Mín.: 99,0%	Acetato de Cálcio Monohidratado	Etanoato de Cálcio Monohidratado	$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 	76.1822	Solúvel em água; Parcialmente solúvel em metanol; Praticamente insolúvel em etanol, acetona e benzeno. Toxicidade aguda: LD50 (oral rato): 4280 mg/kg	

QUADRO 5

QUADRO 5 – PRECURSOR DE FÓSFORO						
Fosfato de Amônio Monobásico						
Fabricante	Grau de pureza	Nome Usual	Nome Oficial	Fórmula Molecular e Fórmula Estrutural	Massa Molar (g/mol)	Propriedades Físico-Químicas e Toxicológicas
Ecibra-Cetus	P.A	Fosfato de amônio monobásico (MAP)	Monofosfato de amônio anidro	$NH_4H_2PO_4$ 	15.0259	Toxicidade aguda (DL = Dose Letal) DL 50 (oral, rato) = 5.750 mg/kg

QUADRO 6 – PRECURSOR DE NÍÓBIO						
Complexo Amoniacal de Níbio						
Fabricante	Grau	Nome Usual	Nome Oficial	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Propriedades Físico-Químicas e Toxicológicas
CBMM	Comercial	Complexo Amoniacal de Níbio trihidratado	Complexo de níbio oxo-tris (oxalato) niobato de amônio e hidrogênio trihidratado	$(NH_4H_2[NbO(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O)$	447.0640	Não Disponível

### 3.3.2 ADITIVOS UTILIZADOS

#### 3.3.2.1 UREIA

Empregada como agente de precipitação homogênea.

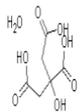
QUADRO 7

QUADRO 7 – AGENTE DE PRECIPITAÇÃO HOMOGÊNEA						
Ureia						
Fabricante	Grau	Nome Usual	Nome Oficial	Fórmula Molecular e Fórmula Estrutural	Massa Molar (g/mol)	Propriedades Físico-Químicas e Toxicológicas
Cinética	P.A	Ureia	Diaminometanal	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO 	60.0553	Não Disponível

### 3.3.2.2 ÁCIDO CÍTRICO

Utilizado como regulador de pH e agente complexante dos íons metálicos na solução.

QUADRO 8

QUADRO 8 – REGULADOR DE PH E QUELANTE						
Ácido Cítrico						
Fabricante	Grau	Nome Usual	Nome Oficial	Fórmula Molecular e Fórmula Estrutural	Massa Molar (g/mol)	Propriedades Físico-Químicas e Toxicológicas
Vetec	P.A. Concentração Mín: 99,5%	Ácido Cítrico Monohidratado	Ácido 2-hidroxi-1,2,3 propanotricarboxílico monohidratado	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O 	210,1396	Solúvel em água e solventes orgânicos. Toxicidade aguda: LD50 (oral rato): 3000 mg/kg (substância anidra)

### 3.3.2.3 SOLVENTES UTILIZADOS

O solvente utilizado foi à água deionizada produzida internamente nos laboratórios da UEPG.

**QUADRO 9**

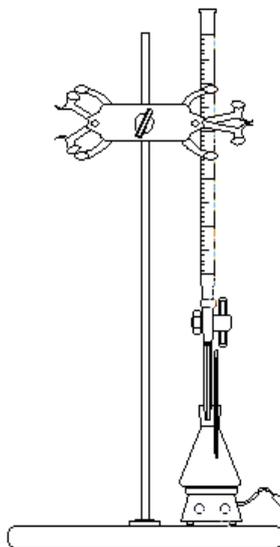
**QUADRO 9 – SOLVENTE**

Água							
Fabricante	Grau	Nome Usual	Nome Oficial	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Propriedades Químicas e Toxicológicas	Físico-
-	Deionizada	Água	Água Óxido de dihidrogênio	H <sub>2</sub> O	18,0153	Não Disponível	

### 3.4-SÍNTESE HIDROTERMAL

O preparo das amostras foi realizado no aparato ilustrado na figura 16 abaixo.

**FIGURA 16 - APARATO PARA O PREPARO DAS SOLUÇÕES HIDROTERMAIS**



**FONTE: AUTOR (2013)**

Após o preparo das soluções dos precursores e pesagem dos aditivos foi realizada a mistura delas para a realização da síntese hidrotermal. 50 ml da solução de acetato de cálcio monohidratado foram transferidos para um erlenmeyer de 250 ml.

Este erlenmeyer foi colocado sobre um agitador magnético da marca que foi ligado com as seguintes condições: 25 °C de temperatura e 80% de velocidade rotação. Adicionou-se então lentamente o ácido cítrico e efetuou-se a leitura do pH para verificar se estava dentro da condição inicial fixada.

A solução ficou sob agitação por 30 minutos. Em uma bureta foi adicionada 50 ml de uma solução de fosfato de amônio monobásico, ao qual foi gotejada lentamente a velocidade de sobre a solução acidificada de acetato de cálcio e ácido cítrico. Procedeu-se em seguida a adição da ureia e a leitura do pH. A mistura resultante ocorreu sem a formação de qualquer tipo precipitação inicial originando uma solução límpida. Esta mistura foi transferida para uma bomba hidrotermal e um autoclave de fabricação terceirizada e submetidos à síntese na temperatura e tempo fixados. Este autoclave foi construído em material metálico e possui uma bomba interna de Teflon. Não possuem controle de pressão e agitação interna. O volume máximo de solvente permitido na bomba hidrotérmica medido através de uma bureta foi de 132 ml.

As operações de tratamento hidrotermal e secagem dos pós foram feitos em estufa da marca Neuoni com temperatura máxima de 320 °C. A temperatura foi controlada com multímetro digital da marca LeePro MAS838 dotado de termopar do tipo K possibilitando leituras até 750 °C.

Decorrido o tempo da síntese, o autoclave ficou resfriando em estufa até ser levado na capela para a abertura. Após a abertura foi feita a leitura do pH final que a síntese alcançou e em seguida realizada uma filtração lenta com papel filtro quantitativo faixa azul, seguida de uma lavagem com água deionizada sonificada até que o pH da solução ficasse neutro e com isto ocorresse à eliminação de compostos aquosos solúveis. As soluções residuais foram envasadas em frascos de vidro âmbar, sendo algumas guardadas para análise e outras encaminhadas para tratamento. Os pós obtidos foram secos em estufa por 24 horas a 110 °C, pesados e guardados em eppendorf para posterior caracterização.

Para o preparo das amostras com nióbio (1,5 e 10-200) o procedimento é idêntico nas condições e etapas diferenciando apenas na inclusão do precursor de nióbio nas concentrações desejada após a adição da solução de fósforo.

### **3.4.1-EQUIPAMENTOS ADICIONAIS**

Os pós foram submetidos a operações de sinterização em fornos com resistência de carbeto de silício no Laboratório de Moagem e Fornos do grupo de Química de Materiais da UEPG.

## **3.5 PARAMETRIZAÇÃO E FORMULAÇÃO DA SÍNTESE DAS AMOSTRAS**

Os tópicos a seguir referem-se ao modo pelo qual a síntese hidrotermal foi planejada.

### **3.5.1 CONCENTRAÇÃO DOS PRECURSORES DE CÁLCIO E FÓSFORO**

A determinação da quantidade da concentração de cálcio na solução deve ser relacionada ao fosfato de cálcio pretendido. Nesta síntese o objetivo é a obtenção de hidroxiapatita logo a relação estequiométrica molar de 1,6667 deve ser seguida.

As soluções aquosas preparadas do precursor de cálcio foram preparadas na concentração de 0,0835 mol/L enquanto a concentração de fósforo utilizada foi de 0,0501 mol/L. As soluções foram preparadas com água deionizada e foram sonificadas em lavadora ultrassônica da marca Sanders-Soniclean por 15 minutos a fim de eliminar a presença de dióxido de carbono e outros gases e melhorar a homogeneidade da solução.

### **3.5.2 CONCENTRAÇÃO DOS PRECURSORES DE NIÓBIO**

Trabalhos anteriores utilizaram a concentração de 1%, 5% e 10% de oxifosfatos de nióbio, mas o método de síntese empregado foi o da reação química do estado sólido. Neste trabalho foi empregada à adição dos precursores de nióbio em concentrações mais baixas devido à diferença do método o qual a possível adição de concentrações maiores poderia resultar em problemas nos testes de citotoxicidade desse modo mantendo a relação de proporção citada definiu-se que a amostra 5 seria 5 vezes mais aditivada com nióbio que a amostra 1 e esta amostra seriam 10 vezes menos aditivada que a amostra 10.

A concentração teórica do precursor de nióbio adicionado à solução hidrotermal foi então determinada:

- ✓ Amostra 0: amostra sem o precursor de nióbio
- ✓ Amostra 1: amostra aditivada com 57,6 ppm do precursor de nióbio correspondente a 5,2825 ppm de íons nióbio (V)
- ✓ Amostra 5: amostra aditivada com 288 ppm do precursor de nióbio correspondente a 26,4125 ppm de íons nióbio (V)
- ✓ Amostra 10-200: amostra aditivada com 576 ppm do precursor de nióbio tratada a 200 C correspondente a 52,8250 ppm de íons nióbio (V)

As massas foram pesadas em balança analítica e adicionadas conjuntamente com a solução de fósforo durante a execução da síntese.

### 3.5.3 CONCENTRAÇÃO DE UREIA

A concentração da ureia deve ser tal que o pH final da síntese seja atingido. Para a determinação da quantidade de ureia a ser usada foi procurado usar a menor quantidade possível para evitar a interferência da ureia no crescimento dos cristais formados e minimizar a possibilidade de contaminações ou reações paralelas a da síntese.

O procedimento adotado foi à montagem de experimentos-piloto aonde tínhamos uma síntese com a concentração os precursores de cálcio e fósforo da amostra 0 e uma síntese com os precursores de nióbio, cálcio e fósforo das amostras 1,5 e 10.

Foi adicionada inicialmente a quantidade de 1 grama de ureia correspondente e após a realização da síntese o pH da solução resultante foi medido. A adição posterior nas sínteses seguintes foi de 1,5 gramas e posteriormente de 2 gramas ao qual se atingiu os valores de pH=10 para a amostra 0 e 1 e pH=9.5 para as amostras aditivadas com nióbio 5 e 10 sendo estes valores admitidos de pH da precipitação da hidroxiapatita e assim a concentração de ureia em quantidade de matéria na solução hidrotermal foi determinada como 0,3330 mol/L.

A ureia foi adicionada sob agitação constante por 15 minutos após adição de todos os demais aditivos e soluções de precursores.

### 3.5.4 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

A quantidade de ácido cítrico foi estimada com a adição progressiva e sobre agitação constante a 25 C de 0,1 gramas de ácido cítrico na solução aquosa de cálcio até que o pH atingisse o valor de 4,0. Deste modo chegou-se a uma quantidade fixa de ácido cítrico a ser

adicionada na síntese que foi determinada em 2 gramas correspondente a concentração de 0,095 mol/L na solução hidrotermal.

O ácido cítrico foi adicionado sob agitação constante por 20 minutos na solução do precursor de cálcio com o objetivo de acidificar a solução até o pH de 4,0 e também promover a complexação do cálcio evitando a precipitação de compostos quando da adição das soluções dos outros precursores.

### **3.5.5- POTENCIAL HIDROGENIÔNICO DA SÍNTESE**

Para evitar à formação inicial de hidroxiapatita as soluções devem ter pH abaixo de 5,0 e para compostos de nióbio há formação de compostos de nióbio também em pH ácidos. Baseando-se nestas informações o pH inicial da síntese foi estipulado em 4,0 enquanto o pH final de 10,0 é o reportado na literatura que favorece a formação da hidroxiapatita. O pH final ficou relacionado à quantidade de ureia utilizada de modo que após os testes-piloto experimentais chegou-se aos valores de pH=10 para a amostra 0 e 1 e pH=9,5 para as amostras com nióbio 5 e 10.

O uso de um pH mais ácido (próximo a 0,0 ou 1,0) não foi possível devido a grande quantidade de ácido cítrico necessário o que poderia interferir no planejamento da síntese inicial. Os valores de pH foram medidos no início de cada síntese, durante o processo de mistura das soluções dos precursores e após a síntese hidrotérmica para verificar a condição final obtida com um aparelho de medição de pH digital marca CE com faixa de medição de pH entre 0,0 até 14, 0, temperatura de operação até 50 C, precisão e resolução de 0,1. O peagâmetro foi calibrado para ser usado com solução tampão de ftalato de potássio em pH=4,0.

### **3.5.6 TEMPERATURA DA SÍNTESE**

A temperatura da síntese foi fixada como a recomendada e utilizada em outros trabalhos do grupo para a obtenção de hidroxiapatita pelo método hidrotérmico em 160 C. A temperatura inicialmente foi considerada como uma variável fixa para as amostra 0,1 e 5. Após o ensaio de micrografia eletrônica de varredura observou-se que a 200 C para a amostra 10200 o que determinou para a amostra nesta faixa de concentração uma temperatura fixa de 200 C. A temperatura foi controlada com multímetro digital da marca LeePro MAS838 dotado de termopar do tipo K.

### **3.5.7 TEMPO DA SÍNTESE HIDROTÉRMICA**

O tempo de síntese foi estipulado inicialmente em 24 horas a fim de garantir a dissociação total da ureia e a liberação de íons  $\text{OH}^-$  capazes de elevar o pH até o valor final desejado assim como a dissolução e reprecipitação de outros compostos que tenham se formado durante a síntese. O tempo inicialmente foi considerado como uma variável fixa para todas as concentrações utilizadas.

### **3.5.8 PRESSÃO DA SÍNTESE HIDROTÉRMICA**

A pressão da síntese não pode ser medida devido à ausência de um manômetro no equipamento utilizado. Teoricamente a manutenção de um volume de síntese constante e os outros parâmetros também constantes a pressão interna deverá ser a mesma em todos os lotes produzidos. O volume da síntese foi fixado em 100 ml.

## **3.6 METODOLOGIAS USADAS NO PREPARO DE AMOSTRAS PARA AS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO EMPREGADAS**

As metodologias empregadas na caracterização das amostras estão apresentadas nos tópicos que se seguem.

### **3.6.1 CARACTERIZAÇÃO COMO BIOMATERIAIS**

A caracterização foi realizada externamente ao laboratório de Química de Materiais sendo realizado nos laboratórios do programa de mestrado e doutorado em odontologia da UEPG.

As amostras 0, 1,5 e 10 foram preparadas em quadruplicata a fim de se obter uma quantidade de pós suficiente para o preparo das soluções para a análise. Uma quantidade destes pós foi reservada para caracterizações físico-químicas.

Para a cultura de células uma linhagem ROS, proveniente de osteoblastos de ratos foi cultivada em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modification Eagle's Minimum Essential Medium) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) em garrafas p/ cultivo celular 60 ml,

25cm<sup>2</sup> e 50 cm<sup>2</sup> c/ filtro – TPP, mantidas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas utilizando-se microscópio invertido . Os subcultivos foram feitos quando as células atingiam a 80% de confluência. O meio do frasco de cultivo era aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com solução salina fosfato sem cálcio e sem magnésio (PBS-A), pH 7,4. A seguir, as células foram separadas com 1 ml de solução de tripsina 0,1% durante 2 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada com 5 ml de meio de cultura contendo soro fetal bovino. Alíquotas foram transferidas para outras garrafas com meio de cultura fresco.

Uma vez determinada a viabilidade e a quantificação da viabilidade celular com emprego do corante azul de Tripan a 0,4% em câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer), 7X10<sup>3</sup> células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo 100µL de DMEM a 10%. Após 24 horas 1 mg dos biomateriais foram acrescentados em seis poços, sendo subdivididos nos seguintes grupos: G1- Células em meio de cultura; G2- Biogran®; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita 5% de nióbio e G6- Hidroxiapatita 10% de nióbio.

Os osteoblastos foram analisados nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h período em que as células atingiram a total confluência nos ensaios com o corante MTT. Após as 96h de incubação o meio foi renovado por meio fresco não suplementado com SFB contendo 0,5 mg/ml solução de MTT preparada no momento do uso. As placas foram, então, incubadas e protegidas da luz por 3h em estufa a 37°C. Decorrido o tempo de reação o meio foi descartado e o corante extraído com (1 ml/poço) etanol (PA). O formazan azul foi quantificado em espectrofotômetro usando o comprimento de onda de 570nm.

O plaqueamento para os demais testes de citotoxicidade seguiram o mesmo procedimento realizado para o teste MTT. Posteriormente, o meio foi renovado por meio fresco não suplementado com SFB contendo 50µg/ml de corante vermelho neutro. A solução estoque do corante 0,4% m/v foi preparada em água deionizada. Antes de ser adicionado às células, o corante diluído em meio de cultura foi incubado por 4h a 37°C protegido da luz e posteriormente filtrado em membrana Millipore (Ø=0,22 mm). O tempo de exposição ao corante foi de 3h, após o qual o meio foi removido e as células foram rapidamente lavadas com PBS-Ca<sup>2+</sup> gelado. O corante incorporado foi então extraído através de uma solução aquosa contendo etanol (50%) e ácido acético (1%).

Os testes de MTT e CVN foram realizados simultaneamente, ou seja, as células semeadas eram obtidas do mesmo lote sob as mesmas condições de cultivo. Foram realizados dois experimentos independentes para cada teste com n=6.

A comparação entre os diferentes grupos de tratamento foi obtida através da análise de variância de um critério (one-way ANOVA). Para comparar os resultados obtidos entre os grupos do estudo, primeiramente foi testado à normalidade dos dados através do teste de Kolgomorov-Smirnov (amostra pequena) e a equivalência das variâncias foi testada com o teste de Bartlett. Quando não houve distribuição normal e/ou equivalência das variâncias foi feita a transformação dos dados (logaritmo). Após a realização da ANOVA, quando obtidas diferenças significativas, as comparações múltiplas foram realizadas como o pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados com o programa estatístico Graph Pad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3.6.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A análise por difração de raios X foi realizada no Complexo de Laboratórios Multiusuários (CLABMU) da UEPG utilizando um difratômetro de raios X modelo XRD-6000 da marca Shimadzu. As amostras foram submetidas à secagem em estufa por 24 horas a 110 °C, acondicionadas em eppendorf e armazenadas em dessecador até serem levadas para a análise. Os pós foram analisados em triplicata usando radiação Cu- $\alpha$ 1 de 1,5406 ângstrom com diferença de potencial de 40 kV e corrente de 30 mA. As amostras foram submetidas à varredura qualitativa modo varredura contínua de  $2\theta$  entre 3 a 100° com passo de 2°/min. Os difratogramas obtidos foram comparados com dados encontrados nos bancos de dados acessíveis através do portal da pesquisa do CAPES:

- a)CRYSTMET
- b)Inorganic Crystal Structure Database (ICSD)
- c)Crystallography Open Database (COD)

Os difratogramas obtidos também foram analisados usando o programa de análise de dados de licença acadêmica gratuita QualX com a base de dados PDF-2 utilizando-se as operações para a análise qualitativa para a identificação dos picos:

- ✓ K- $\alpha$  stripped: evitar a contagem de picos  $\alpha$ 2 devido ao uso de radiação bicromática.
- ✓ Subtracted Background: subtrair o background devido ao espalhamento no ar e a presença de fases amorfas.
- ✓ Smoothing: utilizado para redução de ruídos.
- ✓ Peak Search: Pesquisa dos picos presentes.

✓ Search on Pdf: Identificação das fases presentes através da comparação de fichas-padrão.

O tamanho médio dos cristalitos ( $L$ ) foi calculado em triplicata utilizando o programa X Powder para todas as amostras e tomando o valor médio usando a equação de Scherrer<sup>[122]</sup>:

$$L = k \cdot \lambda / \beta \cdot \cos\Theta$$

Equação 4-Equação para cálculo do tamanho médio do cristalito

Onde  $k$  é uma constante que depende do formato das partículas (para hidroxiapatita com partículas próximas a esferas habitualmente usa-se de 0.9 a 1.0),  $\lambda$  é o comprimento de onda em nm,  $\beta$  é a largura a meia altura, que é calculada pela diferença:  $\beta^2 = \beta_{\text{exp}}^2 - b^2$  onde  $\beta_{\text{exp}}$  é a largura a meia altura do pico difratado da amostra, e  $b$  a largura a meia altura de um pico difratado do padrão a uma região próxima ao pico da amostra analisada.

### **3.6.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)**

A análise por espectroscopia na região do infravermelho foi realizada no complexo de laboratórios multiusuários (CLABMU) da UEPG utilizando um espectrofotômetro de infravermelho Ftir da marca Shimadzu modelo Ir Prestige 21 em uma faixa de leitura de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram submetidas à secagem em estufa por 24 horas a 110 °C, acondicionadas em eppendorf e armazenadas em dessecador até serem levadas para a análise. Os pós foram analisados em triplicata. As amostras foram prensadas em pastilhas com brometo de potássio (KBr) seco por 24 horas para serem analisadas. Os espectros obtidos foram abertos para análise dos grupos funcionais no programa de licença gratuita para acadêmicos KnowItAll 9.0 da Bio-Rad.

### **3.6.4 ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN**

A análise por espectroscopia Raman foi realizada pelo Prof. Dr. Henrique de Santana do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (CCE/UDEL).

As amostras encaminhadas foram submetidas à secagem em estufa por 24 horas a 110 °C, acondicionadas em eppendorf e armazenadas em dessecador até o momento do encaminhamento. Os espectrogramas obtidos foram analisados para análise no programa de

licença gratuita para acadêmicos KnowItAll 9.0 da Bio-Rad e Raman Data Search and Storage (RDSS) v2013. 04.01.

### **3.6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

A análise de microscopia foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Microscopia do curso de Engenharia de Materiais da UEPG utilizando um microscópio eletrônico de varredura Microscópio Eletrônico de Varredura com EDX - Shimadzu - SS 550 em conjunto com o Prof. Dr. Milton Domingos Michel. As amostras foram submetidas à secagem em estufa por 24 horas a 110 °C, acondicionadas em eppendorf e armazenadas em dessecador até serem levadas para a análise. Os pós foram analisados em duplicata. As amostras foram dispersas em álcool isopropílico e metalizadas em evaporadora para deposição de ouro Shimadzu para facilitar a análise microscópica. As imagens obtidas foram analisadas no programa de licença gratuita para uso acadêmico ImageJ.

### **3.6.6 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX)**

A análise de EDX para realização da identificação de elementos foi realizada no Laboratório de Microscopia do curso de Engenharia de Materiais da UEPG utilizando um microscópio eletrônico de varredura Microscópio Eletrônico de Varredura com EDX - SHIMADZU - SS 550 e no Grupo de Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais do Departamento de Física da UEPG sendo neste local realizado em um espectrômetro Shimadzu EDX-720. As amostras eram as mesmas utilizadas na microscopia eletrônica de varredura.

### **3.6.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)**

A análise de microscopia foi realizada nos laboratórios da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) em Araraquara utilizando um microscópio eletrônico de transmissão Phillips C-20 com constante de câmera de 1224 pixel x Angstrom. As amostras foram submetidas à secagem em estufa por 24 horas a 110 °C, acondicionadas em eppendorf e armazenadas em dessecador até ser encaminhada para a análise. As micrografias foram analisadas com o programa ImageJ.

Para indexação dos planos cristalinos os raios dos halos foram medidos por três vezes com o programa DiffractionRing Profiler for Windows versão 1.7 sendo a medida dos raios dos círculos em pixels e a distância dos planos interplanares (h k l) foi calculada usando-se a relação da equação 5:

$$(hkl) = \text{constante da câmara/raio do círculo (angstroms)}$$

Equação 5- Equação para indexação dos planos (hkl) a partir dos raios dos halos obtidos na MET.

### **3.6.8 GRANULOMETRIA POR DIFRAÇÃO A LASER (DL)**

A análise de granulometria por difração de laser foi realizada no laboratório de Análise Mineral e de Rochas da Universidade Federal do Paraná (LAMIR) utilizando um granulômetro Cilas 1064. As amostras foram submetidas à secagem em estufa por 24 horas a 110 °C, acondicionadas em eppendorf e armazenadas em dessecador até serem encaminhadas para a análise. As amostras foram sonificadas no LAMIR por 60 segundos para a realização da análise.

### **3.6.9 ANÁLISE TÉRMICA GRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (TG-ATD)**

A análise térmica foi realizada no Complexo de Laboratórios Multiusuários (CLABMU) da UEPG utilizando o equipamento de TGA-DTA modelo 2960 SDT V3. 0F da TA Instruments Thermal Analysis. Para a amostra 0 foi utilizado no cadinho um total de amostra de 3,3938 mg e para a amostra 10 um total de 2,7576 mg. A análise foi realizada em atmosfera em ar com vazão de fluxo de 100 ml/min com taxa de aquecimento de 10 °C/min até a temperatura máxima de 1200 °C.

Os dados obtidos foram analisados através do programa do próprio equipamento chamado de Universal Analysis 2000.

### **3.6.10 ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (FRX)**

As amostras 1 e 10 foram acondicionadas em eppendorf e encaminhadas para as análises de fluorescência de raio X realizadas no Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP. Os teores dos elementos foram determinados por análise sem padrões (standarless) de elementos químicos do flúor até o urânio em espectrômetro de fluorescência de raio X modelo Axios Advanced da marca PANalytical. Os resultados foram expressos em % de óxido em base calcinada normalizada a 100%.

### **3.6.11 ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL)**

Para a realização da análise em equipamento de espalhamento dinâmico de luz modelo ZetaSizer da marca Malvern foram preparadas 30 ml de suspensões com 80% v/v de água destilada e 20% v/v de álcool isopropílico grau absoluto. O dispersante utilizado foi o poliacrilato de sódio (1.0 % m/v) e metasilicato de sódio (3% m/v) para uma quantidade de amostra de 0.05 gramas. As suspensões foram sonificadas em 2 ciclos de 40 minutos.

### **3.6.12 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE HIDROTERMAL**

#### **3.6.12.1 RENDIMENTO DA SÍNTESE**

Amostras em triplicata foram secas em estufa a 110 °C por 24 horas e depois pesadas em balança analítica. Os resultados foram arredondados para quatro algarismos.

#### **3.6.12.2 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE**

A fim de verificar o efeito da síntese hidrotermal e a rota empregada foi elaborada uma síntese utilizando-se a rota por precipitação em solução aquosa.

A rota foi realizada utilizando as quantidades utilizadas na preparação da amostra 10-200. A solução dos precursores de fósforo e nióbio (50 ml) foi gotejada lentamente na solução do precursor de cálcio (50 ml). O pH da solução foi ajustado com hidróxido de amônio até pH igual a 10. Após a precipitação, a solução foi deixada envelhecendo por 24 horas antes de ser

filtrada, lavada e seca. A amostra foi caracterizada através da microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X.

### **3.6.12.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA UREIA**

A amostra escolhida foi a mais concentrada, 10-200, que foi reformulada com a diminuição da ureia para 1.5 gramas. A proporção dos demais reagentes permaneceu constante. A amostra obtida foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura.

### **3.6.12.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÁCIDO CÍTRICO**

A amostra escolhida foi a mais concentrada, 10-200, que foi reformulada com o emprego de duas situações:

- a) substituição do ácido cítrico por ácido tartárico mantendo a mesma proporção.
- b) Aumento da quantidade de ácido cítrico para o dobro da utilizada.

As amostras obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura.

### **3.6.12.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA**

A amostra escolhida foi a mais concentrada, 10-200, que foi sintetizada com o emprego de três situações:

- a) Com a temperatura estipulada em 200 °C
- b) Com a temperatura estipulada em 160 °C
- c) Com a temperatura estipulada em 100 °C

As amostras obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DA SÍNTESE HIDROTERMAL

#### 4.1.1 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE

##### 4.1.1.1 RENDIMENTO

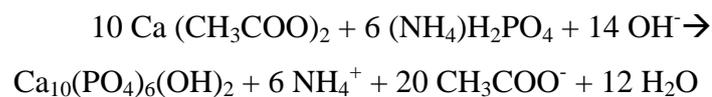
Os resultados obtidos da massa obtida das amostras de cada síntese estão demonstrados na tabela 2 abaixo.

**TABELA 2-RENDIMENTO DAS AMOSTRAS**

TABELA 2 – RESULTADOS DE MASSAS OBTIDAS			
Amostra	Massa Média Obtida em gramas	Desvio-Padrão	Coefficiente de Variação (CV)
0	0.4967	0.060681	0.003682
1	0,4887	0,092938	0,008637
5	0.5059	0.114414	0.013091
10-200	0.5030	0.098344	0.009672

**FONTE:AUTOR,2013.**

Utilizando a reação química mostrada na reação 5 para as amostras sem aditivação 0, a massa teórica a ser obtida na síntese hidrotermal seria de 0,50332 gramas. Este valor está concordante e é obtido considerando-se os precursores utilizados e a possível reação estequiométrica balanceada para a amostra 0 e considerando a não formação de subprodutos e substituições do tipo carbonato, portanto considerando-se uma pureza do produto obtido de 100%.



Reação 5

Para as amostras aditivadas podemos ter a substituição do cálcio, por exemplo, com íons  $\text{Nb}^{5+}$  ou a formação de fases de compostos de nióbio além de outras substituições como a dos grupos carbonato por grupos fosfato ou hidroxila.

Além disto, conforme Tamai e Isama (2007) sugerem que o monômero aniônico  $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$  é mais favorável à incorporação iônica substitucional na hidroxiapatita nas posições do grupo  $\text{PO}_4$  devido à semelhança nos raios iônicos de modo que a substituição intersticial ou a adsorção na superfície da estrutura da hidroxiapatita seja mais provável que a substitucional. Não há até o momento dados suficientes para a previsão da fórmula estrutural e a quantidade teórica das amostras aditivadas com nióbio (V).

#### **4.1.1.2 AVALIAÇÃO DA ROTA EMPREGADA**

O quadro comparativo desta rota e a rota hidrotermal são mostrados na figura 17 que demonstra a diferença entre dois métodos.

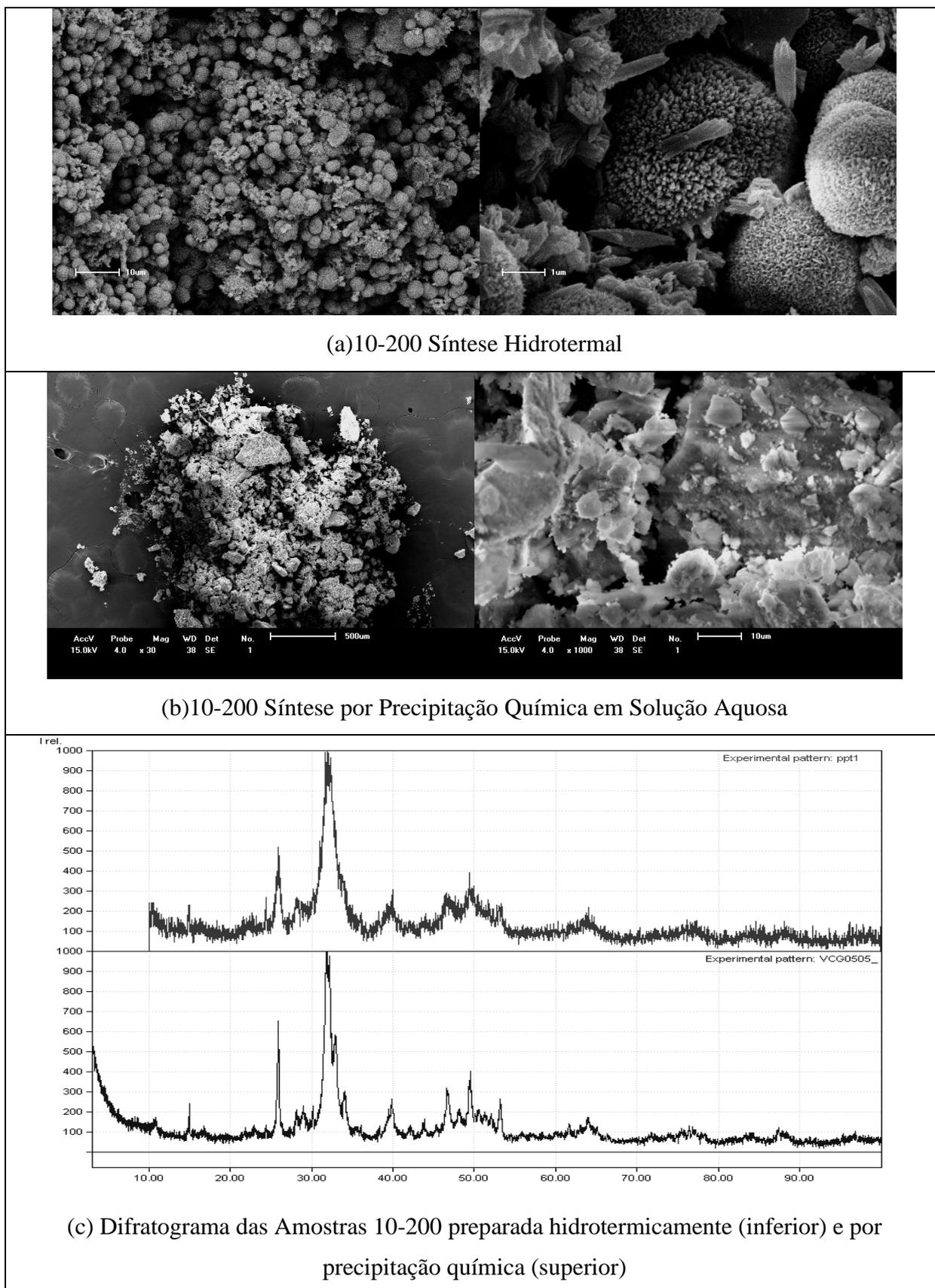
Pode-se notar a diferença morfológica quando se utiliza o método hidrotermal em comparação ao método por precipitação em solução aquosa e isto confirmou a sua escolha no método de preparo das amostras.

Os aglomerados arredondados obtidos pelo método hidrotermal, (figura 17-a) aparentemente apresentam uma estrutura mais homogênea enquanto pelo outro método empregado observam-se placas ou flakes aglomerados e uma estrutura morfológica muito mais heterogênea (figura 17-b).

A análise por difração de raios X destas amostras, aditivadas com a maior concentração do precursor de nióbio, (figura 17-c parte superior), apresentam a fase de hidroxiapatita como fase principal, mas qualitativamente pode-se perceber a maior cristalinidade da amostra obtida pelo método hidrotermal com picos de difração menos largos que o do método por precipitação em solução aquosa (figura 17-c parte inferior).

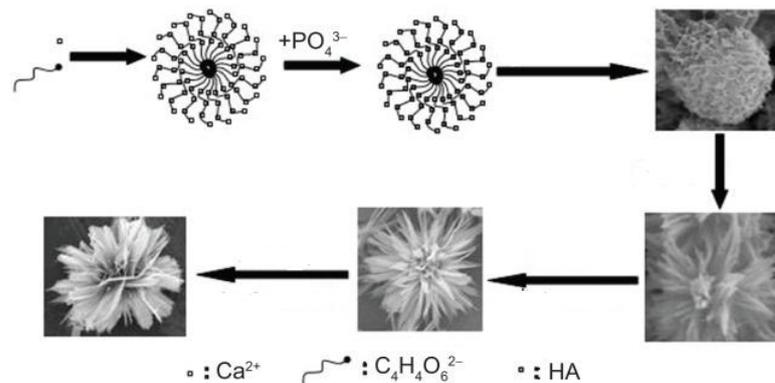
O emprego da ureia como agente de precipitação e a presença de agentes complexantes como o ácido cítrico são habitualmente empregados e podem explicar esta diferença morfológica assim como o emprego da temperatura e pressão hidrotermal podem influenciar na cristalinidade das amostras.

**FIGURA 17- DIFRATOGRAMAS E FOTOMICROGRAFIAS COMPARATIVAS ENTRE O MÉTODO HIDROTHERMAL E PRECIPITAÇÃO QUÍMICA EM SOLUÇÃO AQUOSA**



O mecanismo proposto por Ma (2012) utilizando como agente de complexação e template, o tartarato de sódio e potássio, para a obtenção de hidroxiapatita nanoestruturada hierárquica é ilustrado na figura 18.

**FIGURA 18- MODELO PROPOSTO POR MA (2012) PARA CRESCIMENTO DE HIDROXIAPATITAS AUTO-ESTRUTURADAS**



**FONTE: MA, MING-GUO. HIERARCHICALLY NANOSTRUCTURED HYDROXYAPATITE: HYDROTHERMAL SYNTHESIS, MORPHOLOGY CONTROL, GROWTH MECHANISM, AND BIOLOGICAL ACTIVITY INT J NANOMEDICINE, V.7, P.1781–1791,2012.**

Este mecanismo sugere a nucleação de íons cálcio complexados por íons do quelato e o crescimento auto-organizado em condições hidrotermais dos íons fosfato neste template formando hidroxiapatita com a morfologia tipo flower.

A amostra 0 apresenta morfologia semelhante à apresentada neste modelo enquanto as amostras aditivadas conforme os resultados morfológicos apresentam uma estrutura mais fechada com evidenciado menor crescimento. Estes resultados podem ser vistos na seção de resultados por microscopia eletrônica de transmissão e varredura das amostras.

Como visto na introdução teórica<sup>[54]</sup> e citado por Zhang et al (2010), pode-se concluir-se que a solução hidrotermal no estado de supersaturação tem um raio crítico igual a:

$$r_{\text{crítico}} = \frac{2V\gamma}{3kbT\ln(S)}$$

Equação 6- Cálculo do Raio Crítico

Assim as soluções contendo os precursores de nióbio (V) possivelmente estejam aumentando o valor deste raio crítico dificultando o crescimento dos núcleos formados devido à presença adicional de agentes de complexação dos íons cálcio (II) do precursor de nióbio. O

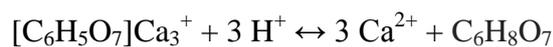
uso do ácido cítrico permitiu além da regulação do pH para as condições iniciais da síntese, mas também o mesmo efeito complexante com os íons cálcio e a obtenção de morfologia auto estruturada pois a presença na solução hidrotermal dos grupos carboxílicos do ácido cítrico, dos grupos oxalato do precursor amoniacal e da liberação controlada de OH<sup>-</sup> provavelmente restringem o crescimento dos grupos Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> durante a síntese hidrotermal.

Nas amostras aditivadas este efeito é maior devido a presença de grupos oxalato na estrutura do complexo amoniacal e o crescimento é ainda mais lento em relação a amostra pura tornando a morfologia mais fechada como será visto na análise dos resultados morfológicos das amostras.

Observa-se ainda uma formação de placas retangulares na figura 20, sendo esta uma amostra submetida a tratamento a 160 °C por 24 horas (10-160) e isto pode sugerir a dissolução ou decomposição destas placas durante a síntese hidrotermal, visto que a amostra 2H não tem fase de hidroxiapatita estequiométrica conforme visto no difratograma da amostra 2H e estas placas podem ser provavelmente fases de monetita, brushita e/ou citrato metálico devido ao baixo pH neste tempo de síntese (pH=4.0) que favorecem o crescimento destas fases visto que a hidroxiapatita só se torna estável a partir de pH 6.0.

A amostra 10-200 apresentou uma estrutura mais homogênea que a 10-160 e isto pode ser devido à temperatura de síntese hidrotermal empregada que está acima da temperatura de decomposição do ácido cítrico (175-180°C) provocando a decomposição deste e podendo supersaturar a solução com mais íons Ca (II) que a da amostra 10-160 que está abaixo da temperatura de decomposição.

A reação de complexação de íons citrato e cálcio podem ser adaptados da proposta por Roeder (2006), que utilizou ácido láctico para precipitar hidroxiapatita na forma de whiskers.

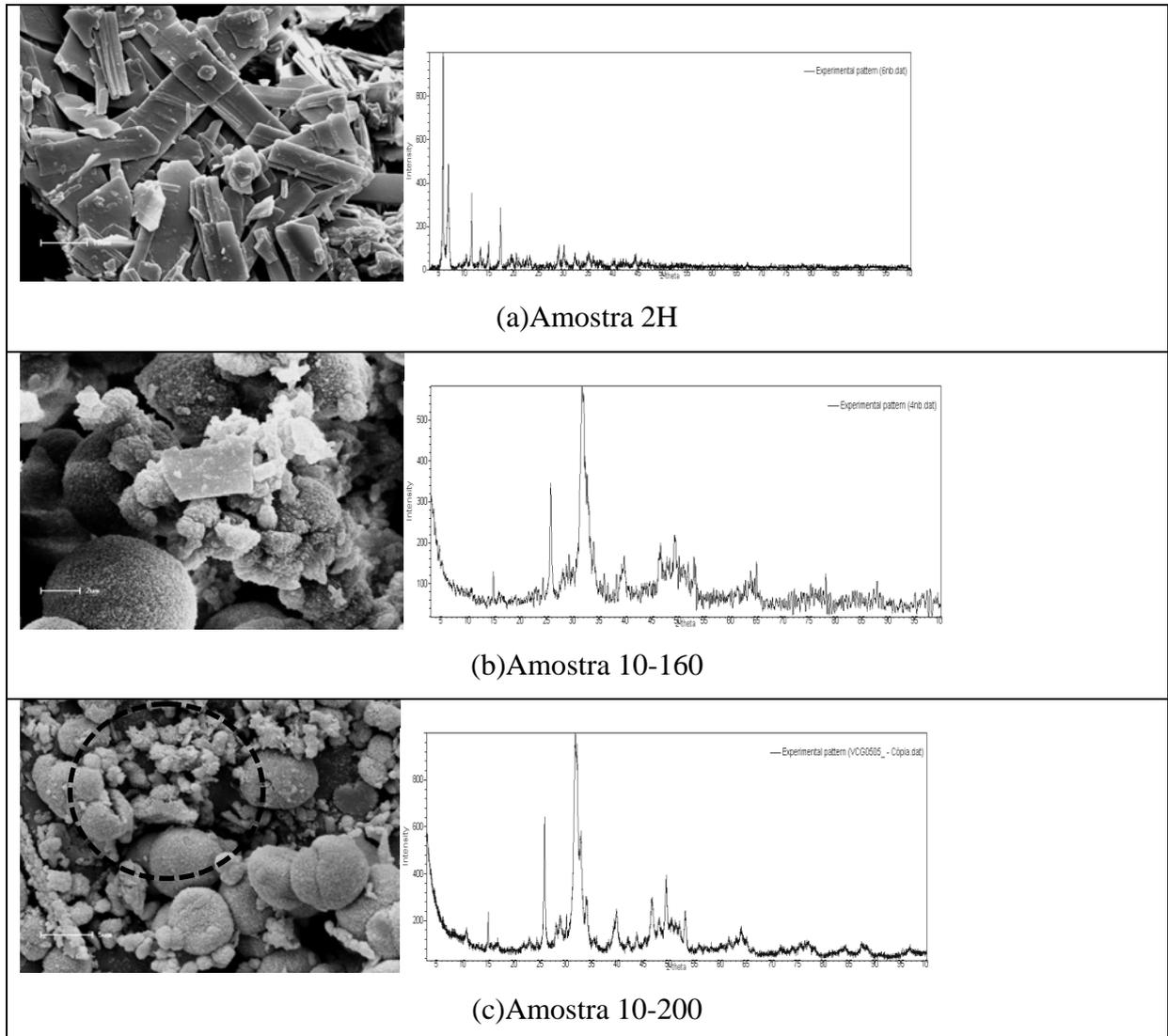


Reação 6

A maior temperatura desloca o equilíbrio para a direita e a degradação do ácido cítrico formado provocando uma maior liberação de íons Ca (II) e assim teríamos um crescimento de hidroxiapatita e menor quantidade de placas como as visualizadas.

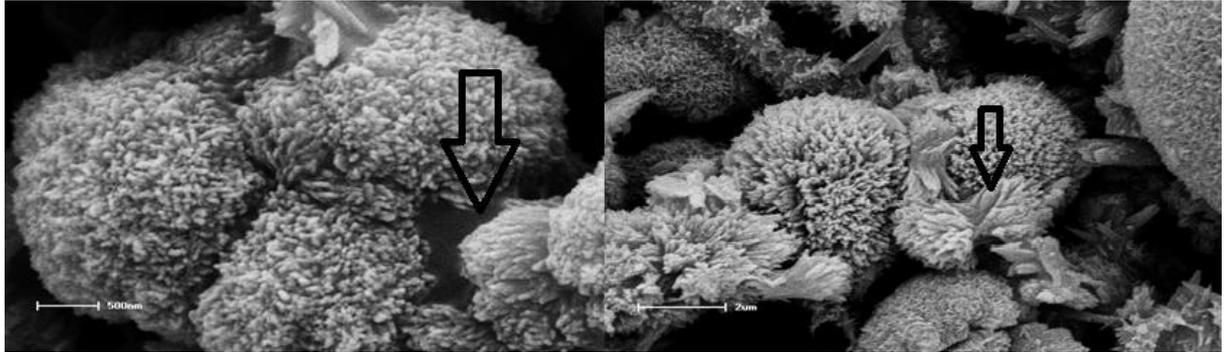
A figura 19(a) mostra a morfologia de amostras 10-200 submetida a 2 horas de tratamento hidrotermal (2H) enquanto a figura 19(b) e 19(c) corresponde à amostra com nióbio na maior concentração sintetizadas em diferentes temperaturas.

**FIGURA 19-FOTOMICROGRAFIA COMPARATIVA ENTRE AMOSTRAS 10-200 SUBMETIDAS A CONDIÇÕES DIFERENTES DE SÍNTESE.**



O possível crescimento nas placas que serviriam como template é indicado na figura 20 enquanto o crescimento da hidroxiapatita a partir da transformação da monetita ou outro fosfato de cálcio formado quando se atinge o pH favorável à formação da fase de hidroxiapatita é um mecanismo viável conforme pode ser visto no trabalho de Zhang e Vecchio (2007) que sintetizaram hidroxiapatitas com morfologia de bastões (rods) utilizando fosfato dicálcio anidro ( $\text{CaHPO}_4$ , DCPA) e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) através da síntese hidrotermal entre 120 e 180 °C.

**FIGURA 20- FOTOMICROGRAFIA MEV DA AMOSTRA 10-200 COM POSSÍVEL TEMPLATE PARA CRESCIMENTO DOS CRISTAIS INDICADO PELAS SETAS.**

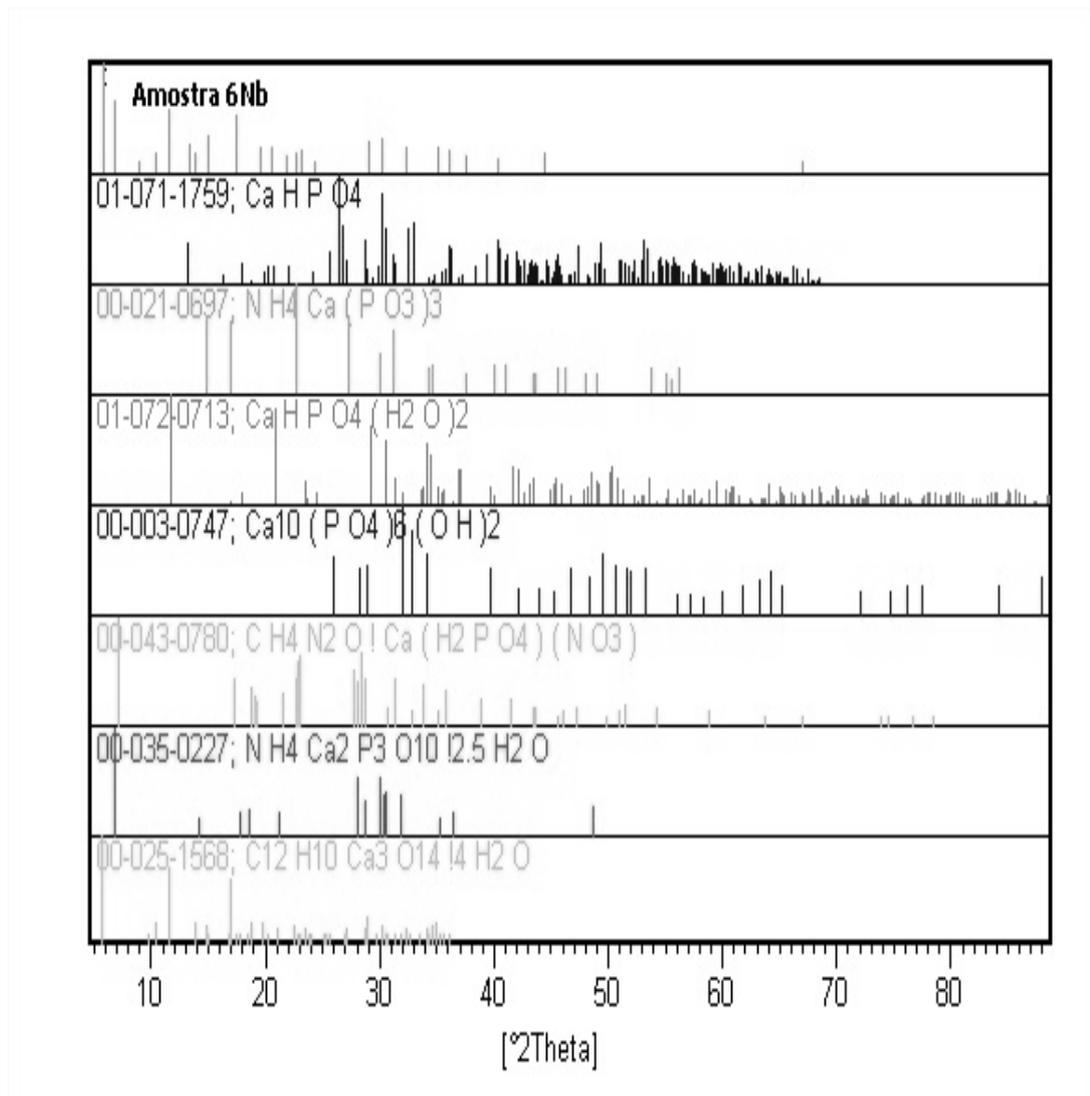


A comparação com as fases citadas e algumas possíveis de ocorrer está representada na figura 21.

Nota-se qualitativamente a maior concordância com as fases de citrato de cálcio tetra hidratado (PDF2-00-025-1568), monetita (PDF2- 01-071-1759) e brushita (PDF-2 01-072-0713) o que mostra concordância com os dados obtidos e a teoria citada.

Comparando-se com a fase de hidroxiapatita da ficha PDF-2 00-003-0747 não se consegue a correlação de picos o que era previsível pelo baixo pH, (4.0), da solução hidrotermal nestas condições o que favorece a precipitação das fases acima. Na figura 21 ainda a picos que correspondem a nenhuma das fases citadas e que correspondem a compostos intermediários que se formam no início da síntese.

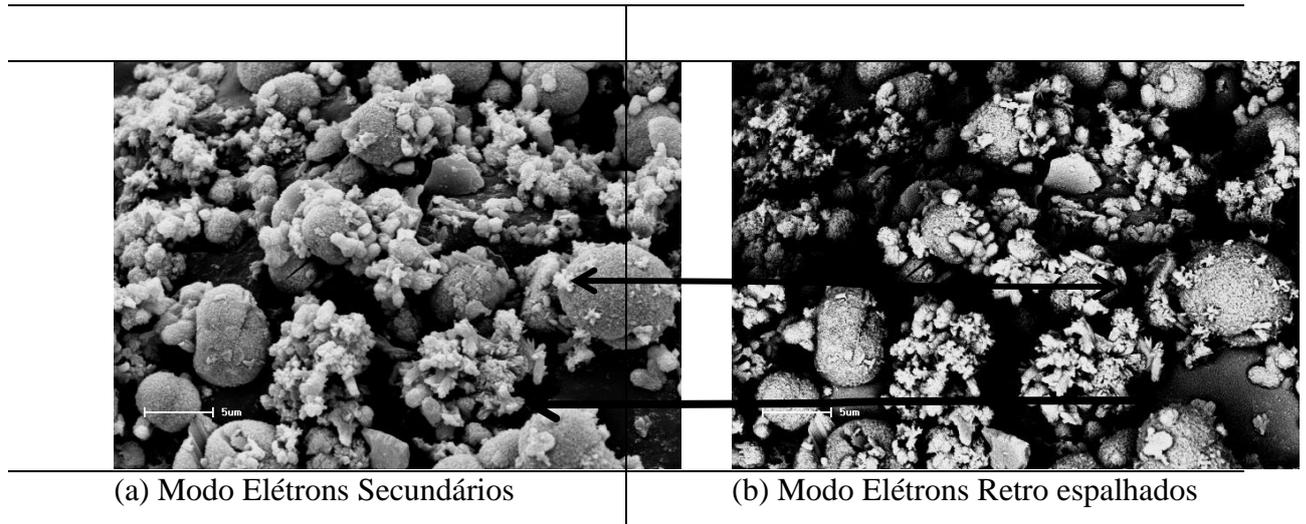
**FIGURA 21-DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DA AMOSTRA 2H REPRESENTADA PELO CÓDIGO 6NB COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2: 01-071-1759,00-021-0697,01-072-0713,00-003-0747,00-043-0780,00-035-0227 E 00-025-1568.**



A análise por microscopia eletrônica de varredura no modo de elétrons retro espalhados permitiu visualizar o contraste dos elementos presentes, (figura22).

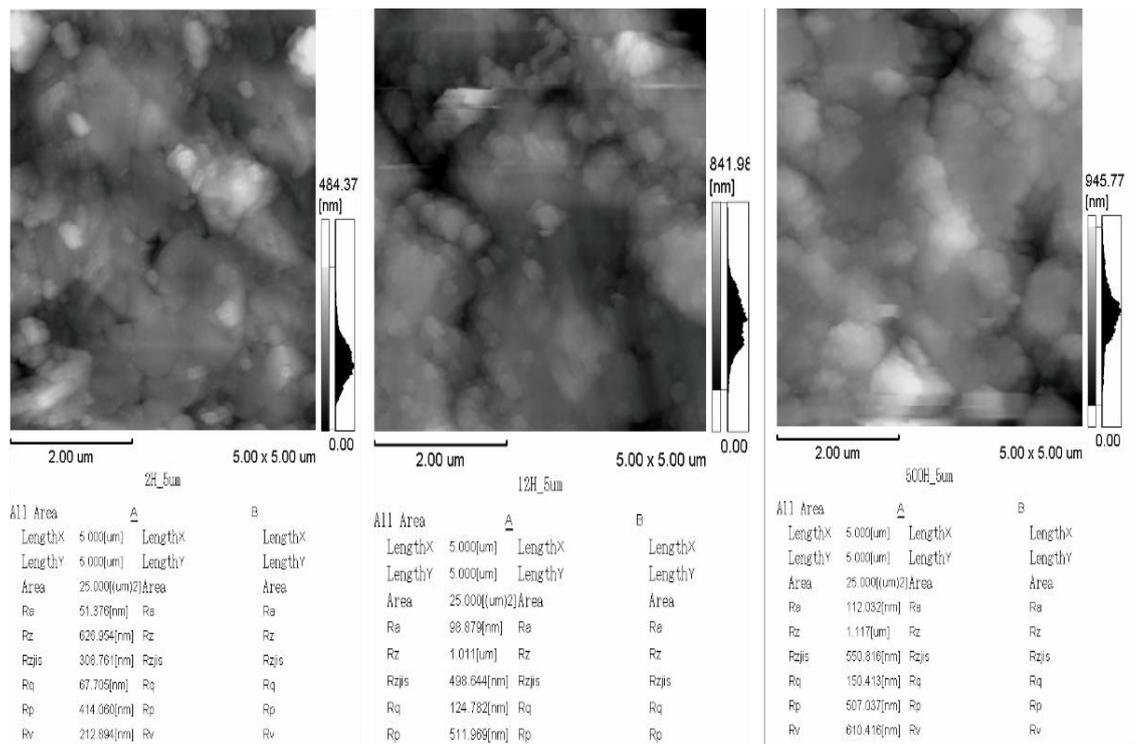
Percebe-se que as fases mais claras compostas por átomos de número atômico mais pesado indicam provavelmente a presença de cálcio ( $z=40$ ) e/ou nióbio ( $z=41$ ) enquanto se percebe a presença de placas com uma tonalidade mais escura, devido a elementos de menor peso atômico (22b).

**FIGURA 22-FOTOMICROGRAFIA MEV DA AMOSTRA 10-200 EM DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO**



Outra evidência destas transformações são os resultados obtidos através da microscopia de força atômica (figuras 23 (a, b, c)).

**FIGURA 23-FOTOMICROGRAFIA AFM DA AMOSTRA 10-200 EM FUNÇÃO DO TEMPO. (DA ESQUERDA PARA DIREITA: 23-A 23-B E 23-C).**



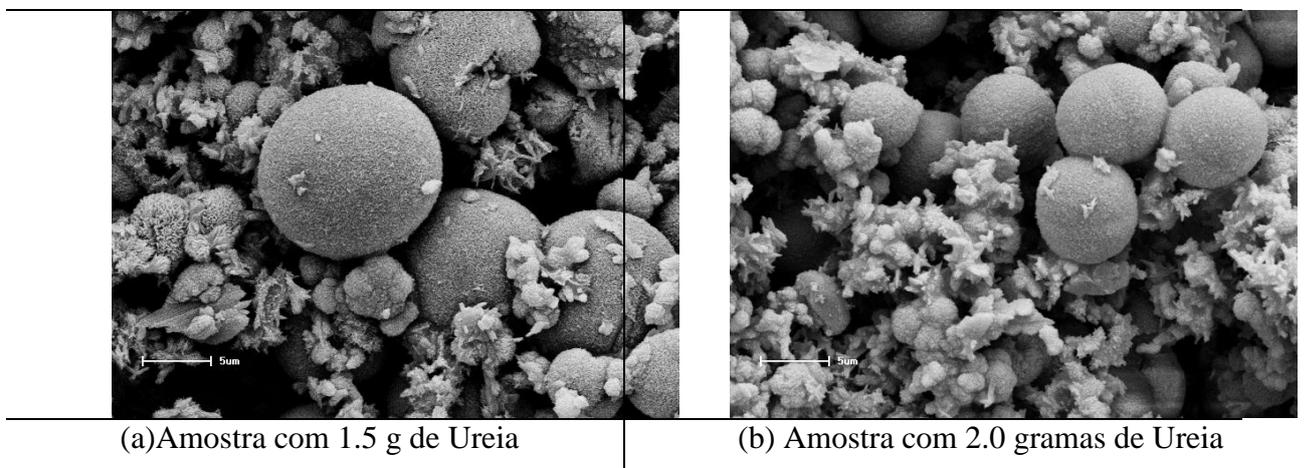
Com duas horas de síntese (figura 23-a) os valores de rugosidade média Ra e raiz média quadrática da Rq são inferiores aos valores com 12 horas de síntese (figura 23-b) e com

24 horas de síntese (figura 23-c) o que explica as placas planas no início da síntese e a posterior formação dos aglomerados arredondados ao final da síntese que acarreta no aumento da rugosidade.

#### 4.1.1.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA UREIA

A rota da amostra 10-200 foi empregada para verificar o efeito da adição da ureia na síntese. A quantidade de ureia foi diminuída gradativamente de 2 gramas, a quantidade padrão da síntese, para as quantidades de 1.5 g, 1.0 g e 0.5 g. Para estas duas últimas quantidades o pH final da síntese não ultrapassou o valor de 7.0 sendo então descartadas.

**FIGURA 24-FOTOMICROGRAFIA MEV DE AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE UREIA**



A amostra com 1.5 gramas de ureia teve um pH final de 8.0 e observa-se na micrografia da figura 24 a formação de aglomerados arredondados, mas um pouco maiores que o padrão 10-200.

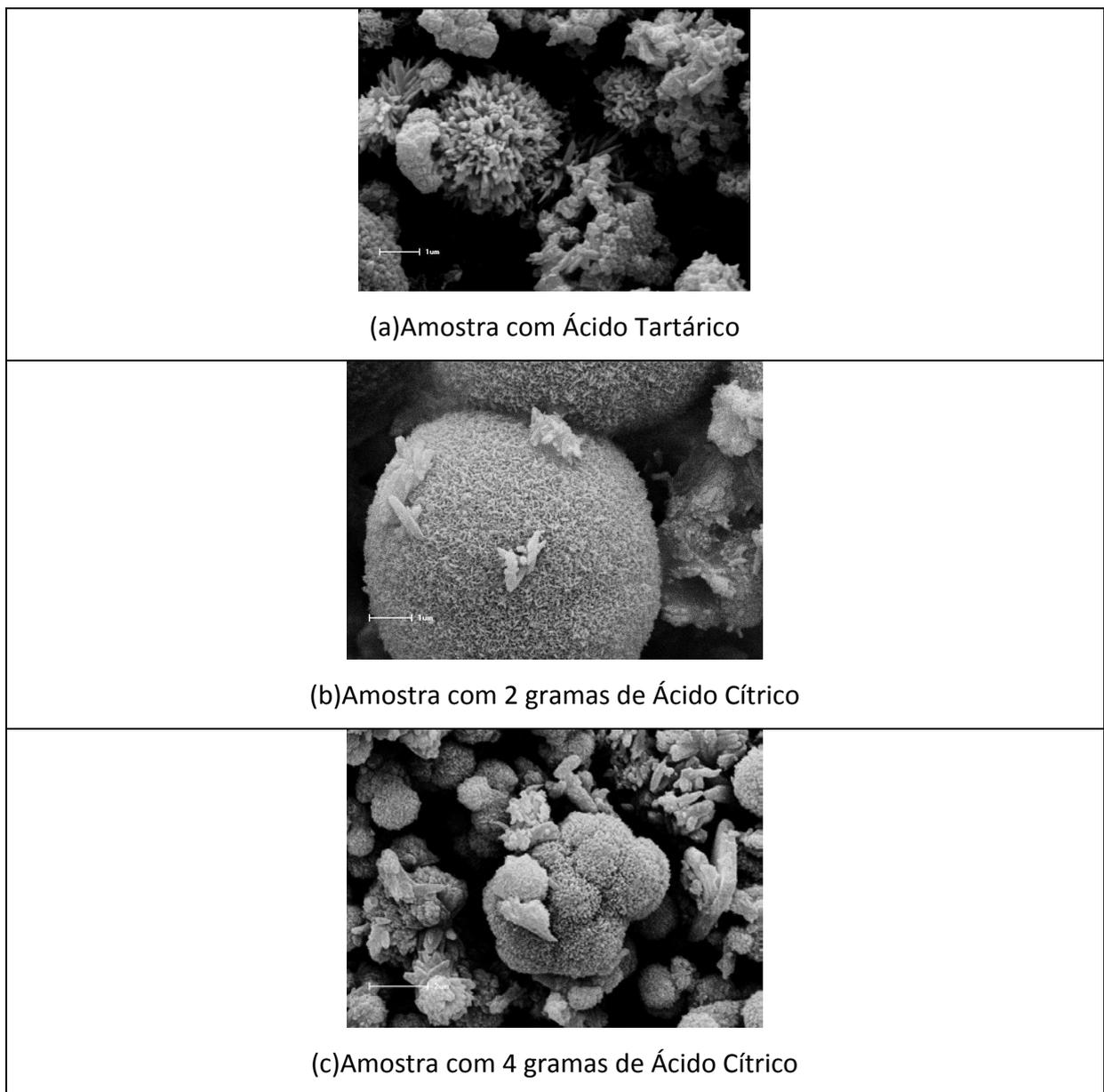
A amostra 10-200 tem um pH final de síntese em 9.0 e a possibilidade de se obter a mesma morfologia com uma quantidade menor de ureia este fato pode auxiliar na diminuição de grupos carbonato gerados na síntese hidrotermal assim como uma menor redução na quantidade de contaminantes.

#### 4.1.1.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ÁCIDO CÍTRICO

O uso de uma maior quantidade de ácido cítrico deixou o pH inicial da síntese em 3.5 e, o pH final da síntese em 9.0 e os aglomerados continuaram arredondados.

O uso do ácido tartárico produz aglomerados com maior crescimento das partículas pontiagudas em relação ao ácido cítrico (figura 25). Esta avaliação serviu como parâmetro para a escolha do ácido cítrico na síntese hidrotermal.

**FIGURA 25-FOTOMICROGRAFIAS MEV COMPARATIVAS ENTRE O USO DE ÁCIDO CÍTRICO E ÁCIDO TARTÁRICO NA PREPARAÇÃO HIDROTÉRMICA DAS AMOSTRAS**



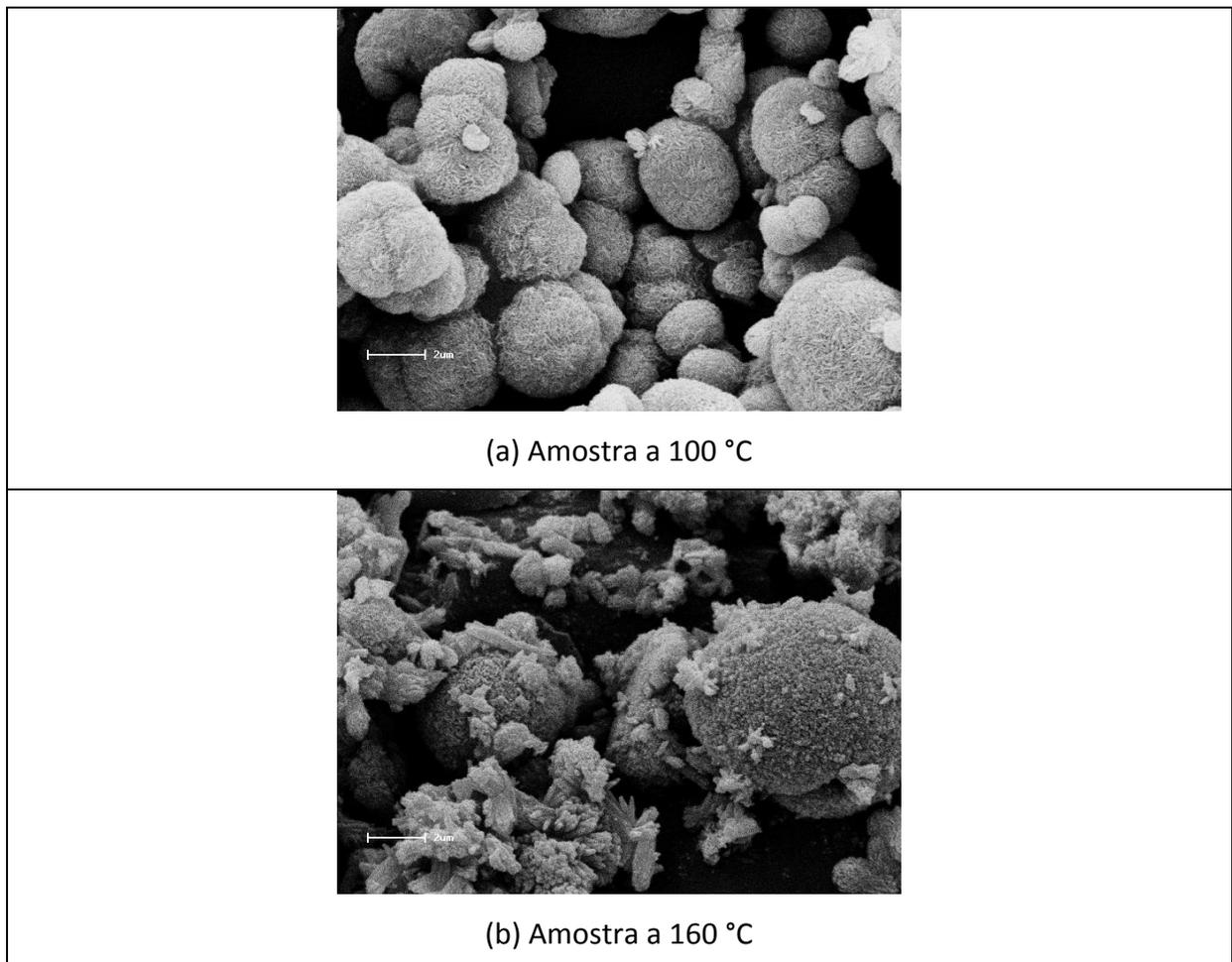
#### 4.1.1.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA HIDROTÉRMICA

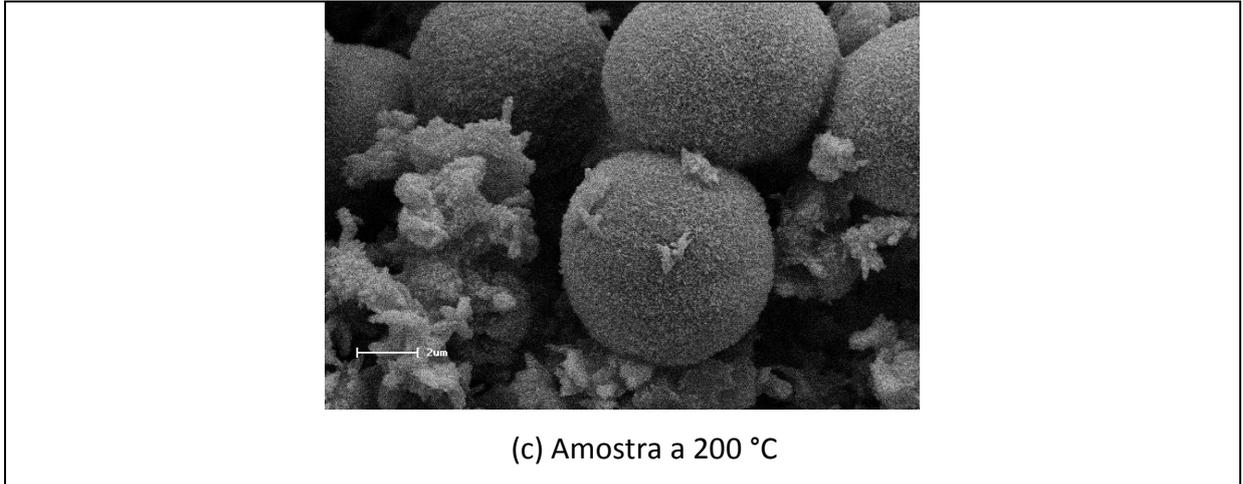
O uso de uma menor temperatura (100 °C) não produziu o pH final da síntese na faixa de precipitação desejada (8 a 10) e, por isso o tempo da síntese teve que ser ajustado para além de 24 horas. O tempo utilizado para a síntese desta amostra nesta temperatura foi de 168 horas de forma a ter um pH final de síntese igual a 10.

Obteve-se uma amostra com aglomerados arredondados, mas visualmente mais uniformes conforme visualizado na figura 26. A amostra sintetizada nesta avaliação foi a mais aditivada com o precursor de nióbio (V).

A amostra a 200 °C aparentemente apresentou uma morfologia mais homogênea que a 160 °C, o que justificou a sua escolha para os testes de biocompatibilidade (figura 26-c)

**FIGURA 26- FOTOMICROGRAFIAS MEV DA AMOSTRA 10-200 A DIVERSAS TEMPERATURAS UTILIZADAS PARA A PREPARAÇÃO DA ROTA HIDROTÉRMICA DAS AMOSTRAS.**





No entanto, nas temperaturas descritas anteriormente, (100,160 e 200°C), as partículas produzidas em grande parte constituem morfologicamente aglomerados arredondados. Liang et al. (2012), compararam as morfologias de partículas agulhadas e cilíndricas de hidroxiapatita por meio do método hidrotérmico e em baixas temperaturas (70 a 100 °C) e, tempo de 2 a 4 horas de síntese hidrotérmica obtiveram partículas agulhadas e concluíram que para a obtenção de partículas cilíndricas foi necessário o uso de temperaturas mais elevadas.

Esta influência da temperatura e do tempo de síntese hidrotérmico são bastante conhecidas e neste trabalho mesmo a baixas temperaturas foi obtido aglomerados arredondados. Isto pode ser explicado pelo uso de um agente de precipitação homogênea que a baixas temperaturas foi hidrolisado mais lentamente que a maiores temperaturas assim como a presença da combinação de agentes de controle da liberação de Ca(II).

#### **4.1.1.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGÊNIONICO FINAL DA SÍNTESE**

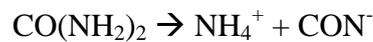
O uso de quantidades constantes de ureia em todas as formulações da síntese estipulava um objetivo de se atingir um pH final da síntese após 24 horas igual a 10. Este valor foi atingido para as amostras puras enquanto nas amostras aditivadas com o precursor de nióbio (V) ocorreu a precipitação em faixas de pH menores, visualizado na tabela 3.

**TABELA 3- pH FINAL DA SÍNTESE HIDROTÉRMICA**

TABELA 3 – RESULTADOS DO pH FINAL DA SÍNTESE HIDROTÉRMICA		
Amostra	Faixa de pH inicial da Síntese	Faixa de pH final da Síntese
0	4.0	10.0
1	4.0	9.5
5	4.0	9.0
10-200	4.0	9.0

FONTE:AUTOR,2013.

A decomposição da ureia segundo Neira et.al. (2009) é realizada a partir de 80°C, segundo a reação 7:



Reação 7

O íon  $\text{CON}^-$  hidrolisa-se rapidamente em meio aquoso Segundo a reação 8:



Reação 8

e isto permite o controle do pH final da síntese em função da quantidade de ureia adicionada na síntese hidrotermal, e este controle é fundamental para a precipitação da hidroxiapatita.

É evidente que a presença do precursor de nióbio (V) torna a solução mais ácida devido à presença dos grupos amônio do precursor amoniacal sendo conhecido que o íon  $\text{NH}_4^+$  sofre hidrólise, liberando íons  $\text{H}^+$ , que conferem a solução um caráter ácido capaz de influenciar no pH final da síntese, sendo possível também, que o pH seja influenciado pela formação de compostos ácidos derivados do nióbio (V) como o ácido nióbico e outros íons que sofram hidrólise segundo o quadro 10.

O controle do pH inicial com a adição correta de ureia e ácido cítrico e dos demais componentes é um fator importante para o sucesso da síntese visto que devido à presença de diversas espécies químicas na solução hidrotermal a precipitação adequada do ortofosfato de cálcio desejado é dependente desta variável. No quadro é possível listar algumas espécies químicas que podem estar presentes na solução hidrotermal em função dos reagentes utilizados.

QUADRO 10

QUADRO 10- ALGUMAS ESPÉCIES QUÍMICAS QUE PODEM ESTAR PRESENTES NA  
SÍNTESE HIDROTHERMAL

Componente	
Acetato	Acetato <sup>-</sup> H-Acetato (aq)
Cálcio	Ca <sup>+2</sup> Ca-Acetato <sup>+</sup> CaHPO <sub>4</sub> (aq) CaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>+</sup> CaHCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> Ca-Citrato <sup>-</sup> CaH-Citrato (aq) CaH <sub>2</sub> -Citrato <sup>+</sup> Ca-Oxalato (aq)
Amônio	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> NH <sub>3</sub> (aq) NH <sub>4</sub> -Oxalato <sup>-</sup>
Fosfato	HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Citrato	Citrato <sup>-3</sup> H-Citrato <sup>-2</sup> H <sub>2</sub> -Citrato <sup>-</sup> H <sub>3</sub> -Citrato (aq)
Oxalato * apenas em amostras aditivadas	Oxalato <sup>-2</sup> NH <sub>4</sub> -Oxalato <sup>-</sup> H <sub>2</sub> -Oxalato H-Oxalato <sup>-</sup>
Carbonato	CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (aq)
Nióbio * apenas em amostras aditivadas	[NbO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> ] <sup>-3</sup> Nb <sub>12</sub> O <sub>36</sub> <sup>-12</sup> Nb(OH) <sub>6</sub> <sup>-6</sup>
Outros	H <sup>+</sup> OH <sup>-</sup>

FONTE: AUTOR,2013.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

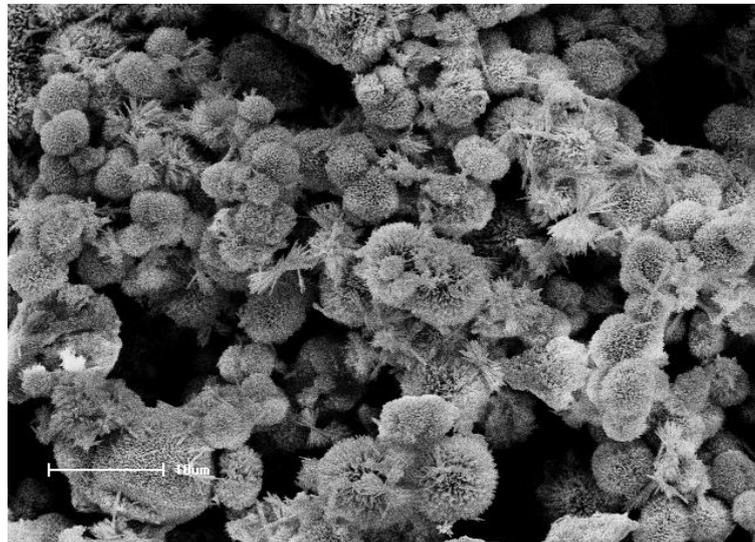
As técnicas microscópicas MEV, MET e AFM foram empregadas para observar aspectos morfológicos das amostras.

### 4.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

#### 4.2.1.1 RESULTADOS DA AMOSTRA 0

A amostra não aditivada com o precursor de nióbio apresentou uma mistura morfológica composta de aglomerados arredondados alongados chamada do tipo flower (flor) e aglomerados arredondados como apresentado na figura 27 sendo estes tipos de morfologias também conhecidos como auto estruturados.

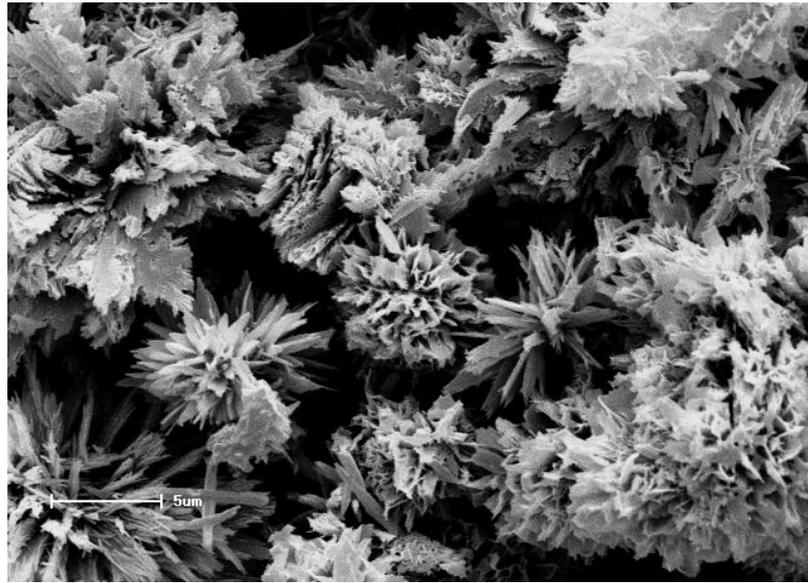
**FIGURA 27- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:1500X)**



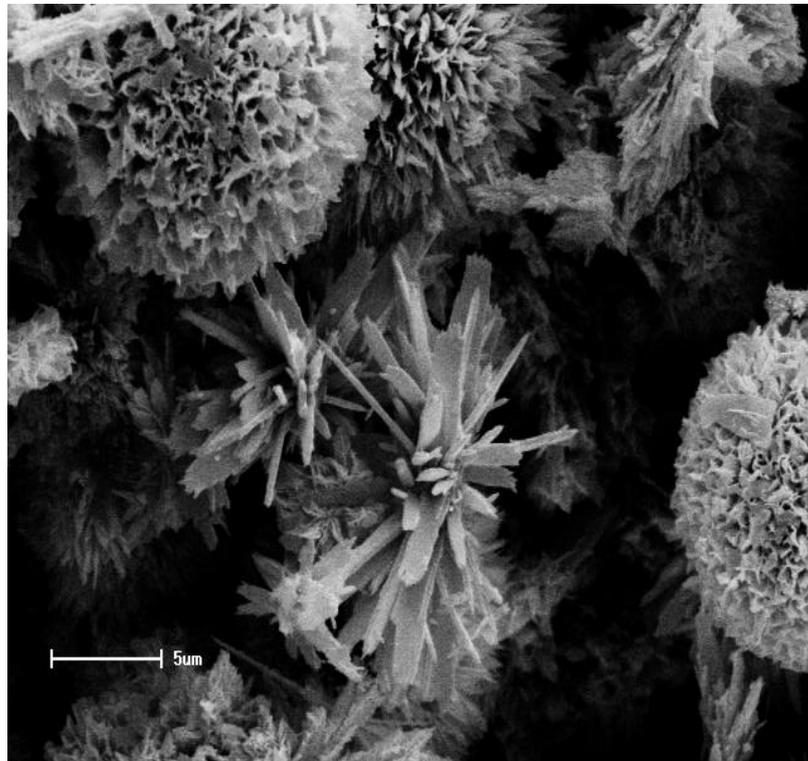
Observando-se com um maior aumento, pode-se observar que as partículas que compõem os aglomerados são no formato de placas-lâminas com as bordas irregulares conforme as figuras 28,29.

Este formato irregular e pontiagudo é importante, pois poderia influenciar os resultados de citotoxicidade devido à interação celular podendo causar problemas como perfurações ou deformações celulares.

**FIGURA 28- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:2400X)**



**FIGURA 29- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:5 KX)**

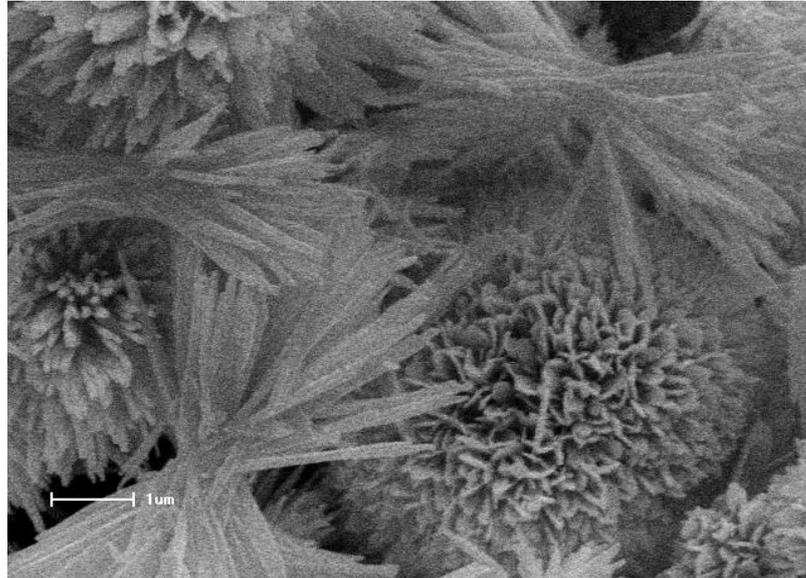


O crescimento das partículas resulta em uma morfologia parecida com uma flor aberta (figura 29) e estudos sobre este tipo de morfologia como o trabalho de Wang et al (2009) que testaram morfologias tipo flower com aglomerados entre 10 e 20 microns como candidatos a uso como liberadores de fármaco utilizando um agente inflamatório, o ibuprofeno obtiveram

como resultados uma liberação controlada utilizando-se esta morfologia devido ao espaço entre as partículas do aglomerado que permitem um controle da difusão do fármaco ao longo da liberação do fármaco.

Desta forma esta morfologia obtida para a amostra 0 apresenta um potencial elevado de aplicação nesta área para controlar o fornecimento de fármacos e proteínas.

**FIGURA 30- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 0.(AUMENTO:10 KX)**

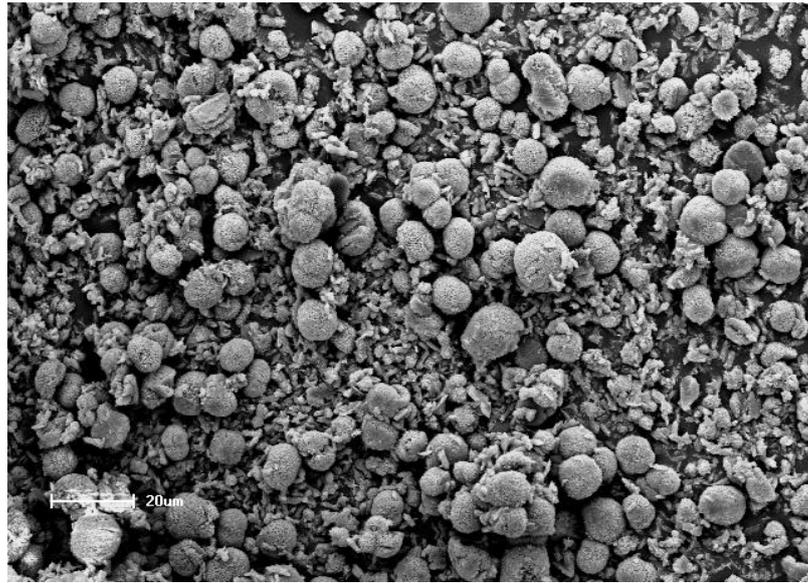


Observa-se que o crescimento das partículas não é homogêneo sendo que há partículas que crescem mais, enquanto, outras com crescimento menor e com estrutura morfológica mais fechada conforme visto na figura 30 de modo que a presença de partículas mais alongadas nas amostras não aditivadas com o precursor de nióbio (V) pode ser atribuída a não presença deste precursor visto que as demais variáveis são idênticas as amostras 1 e 5. A amostra 10 -200 tem uma temperatura diferente, com um acréscimo de 40°C, e era de se esperar que nesta amostra que devido ao fator temperatura, que favorece o crescimento das partículas, apresentasse um alongamento maior, fato que não ocorreu de modo que o uso do precursor amoniacal de nióbio (V) afeta o crescimento morfológico.

#### **4.2.1.2 RESULTADOS DA AMOSTRA 01**

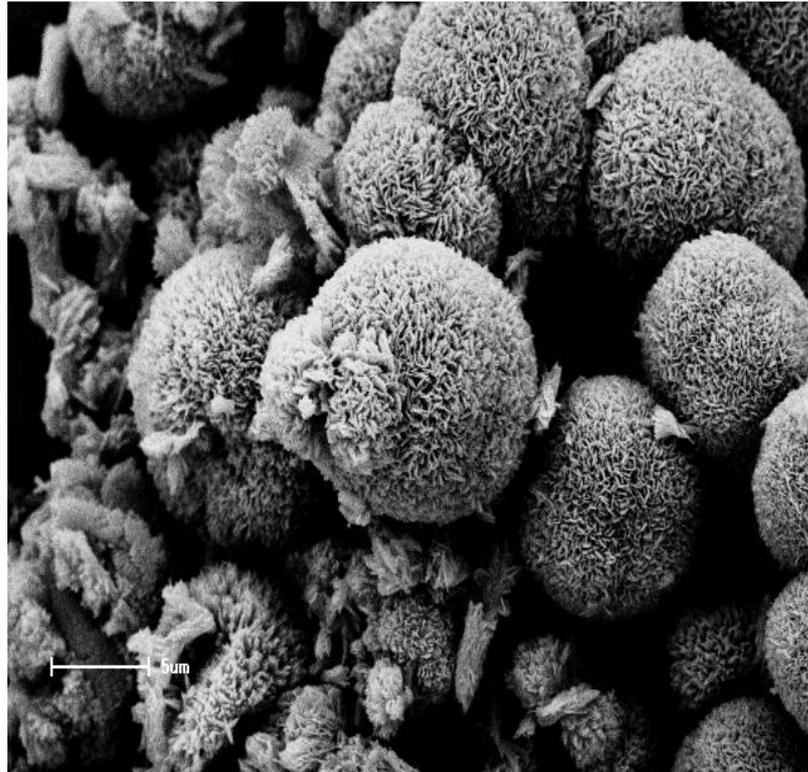
A amostra aditivada 01 apresentou também uma morfologia composta por aglomerados arredondados (figura 31).

**FIGURA 31- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:500X)**

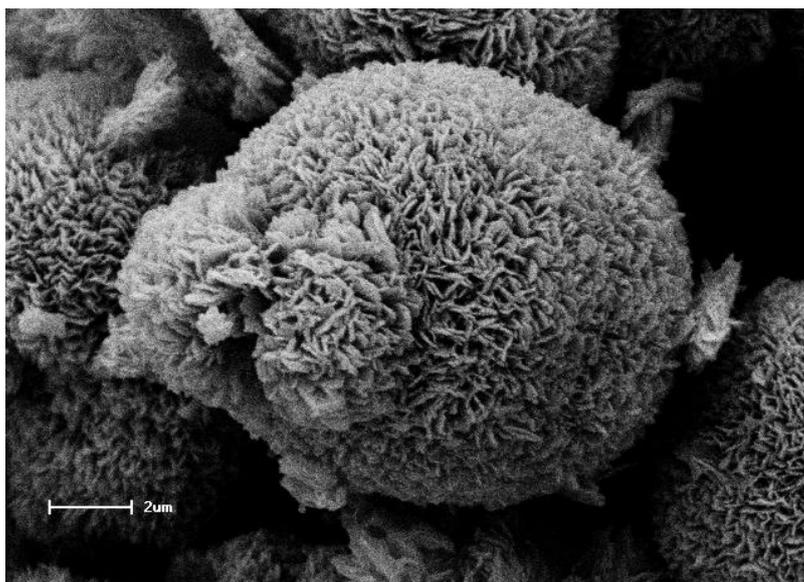


No entanto a observação com regiões mais ampliadas observa-se que as partículas estão diferentes da amostra não aditivada 0 e que os aglomerados permanecem mais “fechados” no formato arredondado figura 32,33 e 34.

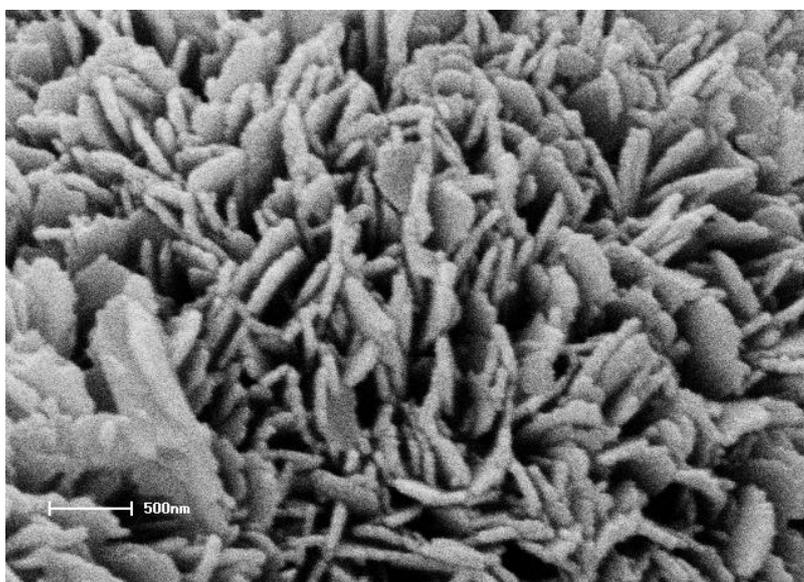
**FIGURA 32- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:2400X)**



**FIGURA 33- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:5000X)**



**FIGURA 34- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 1.(AUMENTO:20KX)**

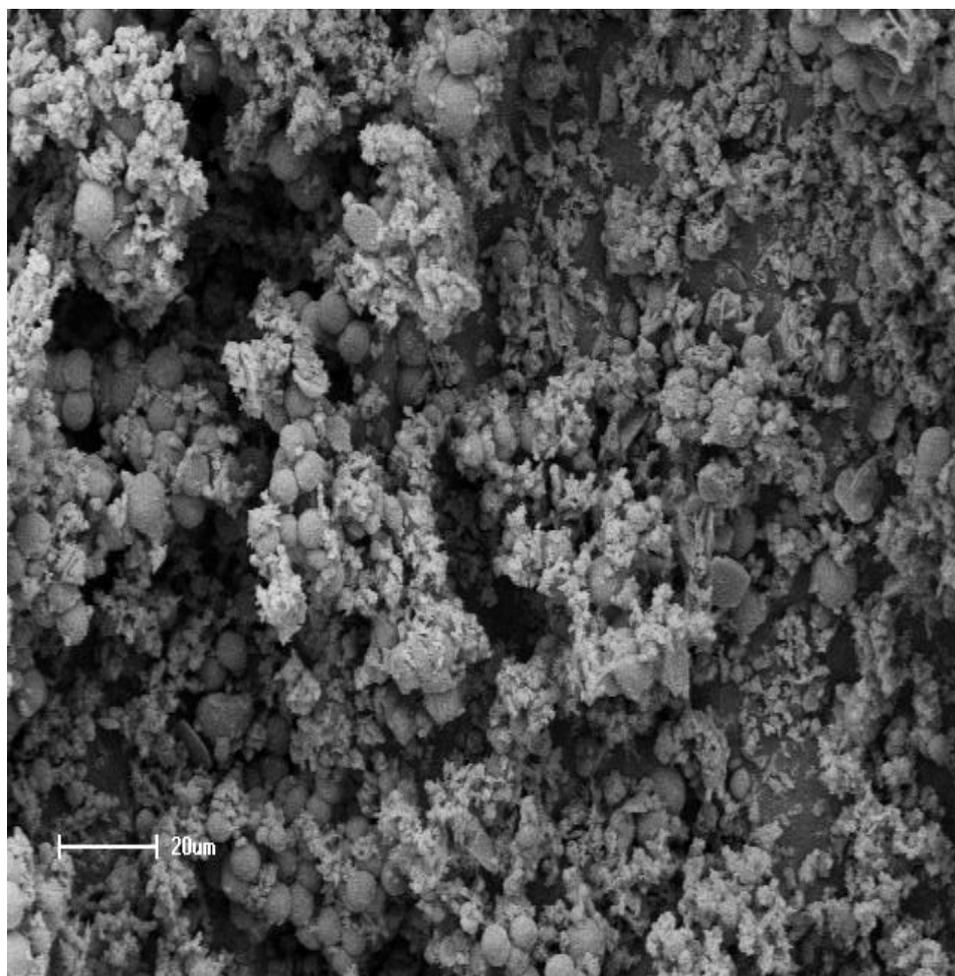


Avaliando os resultados em função das conclusões obtidas por Wang et al. (2009), e já comentados para a amostra não aditivada, esta morfologia mais fechada poderá diminuir a aplicabilidade desta morfologia na liberação de fármacos apesar de que o controle de liberação depender do tipo de aplicação e funcionalidade desejada e como será visto com o aumento da quantidade do precursor de nióbio mais compacta é a superfície da amostra.

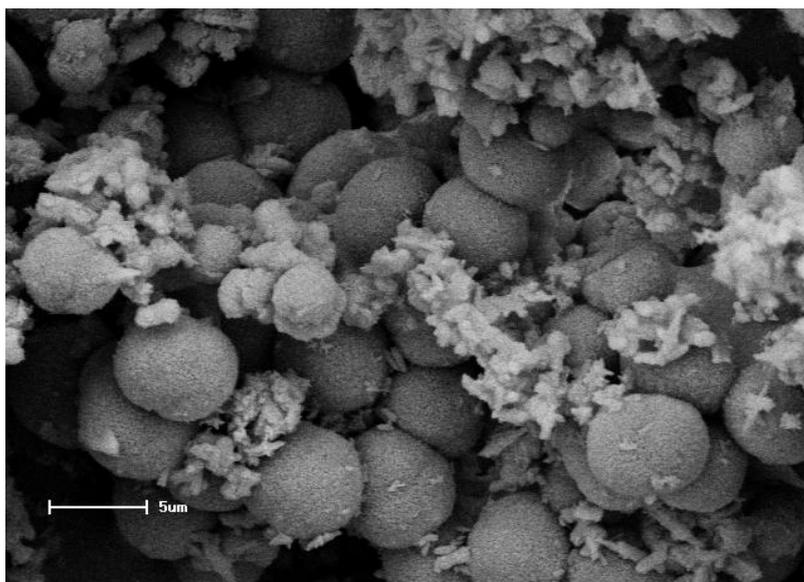
#### 4.2.1.3 RESULTADOS DA AMOSTRA 05

A morfologia da amostra aditivada 05 também é composta por aglomerados arredondados figura 35, 36,37 e 38.

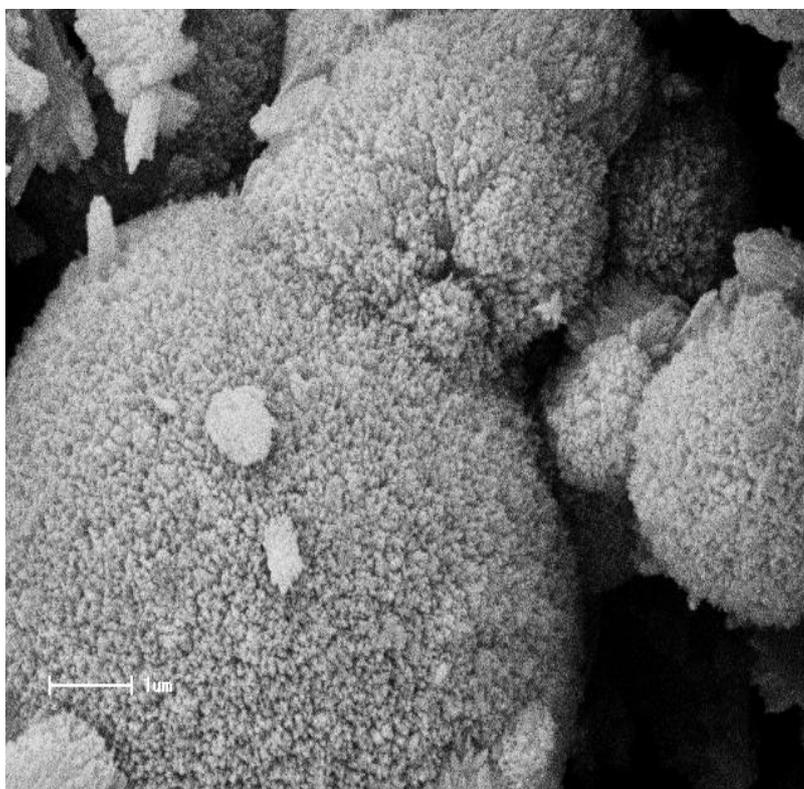
**FIGURA 35- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:1000X)**



**FIGURA 36- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:2400X)**



**FIGURA 37- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:10KX)**



**FIGURA 38- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 5.(AUMENTO:20KX)**

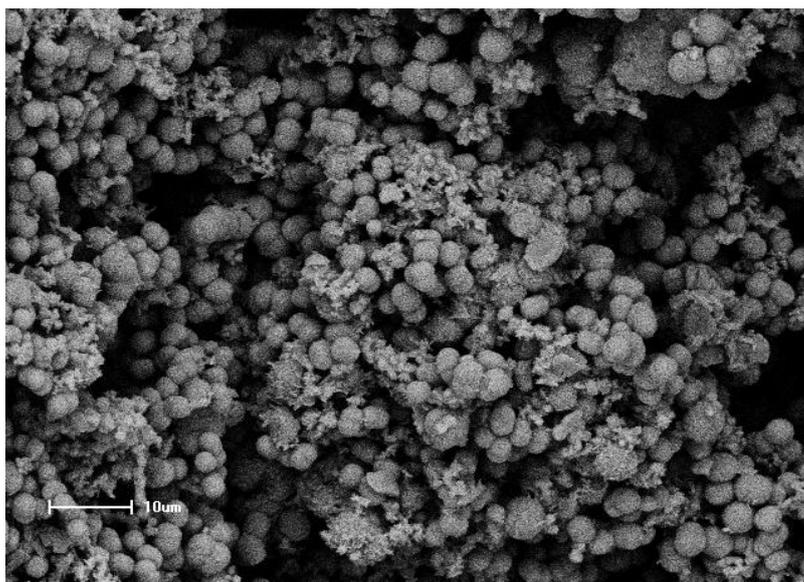


Os aglomerados com o precursor de nióbio da amostra 05 visualmente possuem a superfície menos “aberta” que a amostra 0 e 1 formando aglomerados mais compactados.

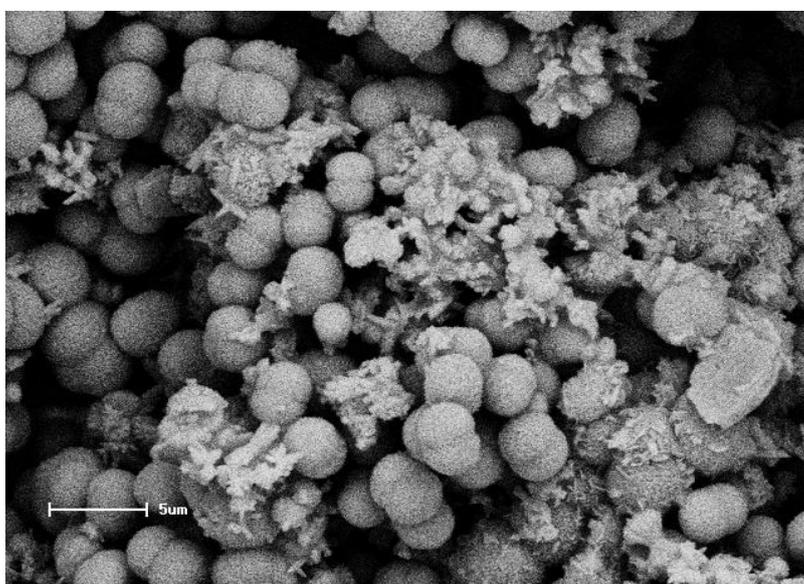
#### **4.2.1.4 RESULTADOS DA AMOSTRA 10-200**

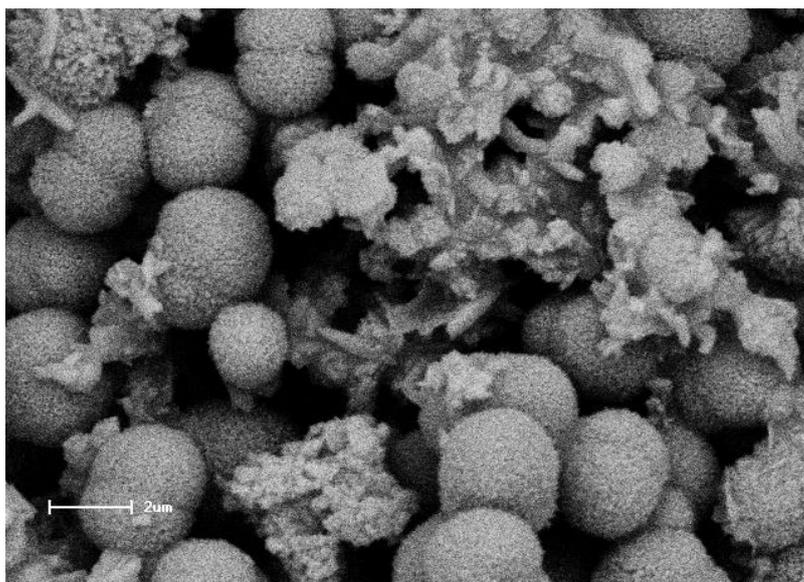
Aparentemente a amostra aditivada 10-200 tem uma superfície com aglomerados arredondados e com tamanhos mais uniformes figura 39, 40,41.

**FIGURA 39- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10-200.(AUMENTO:1000X)**

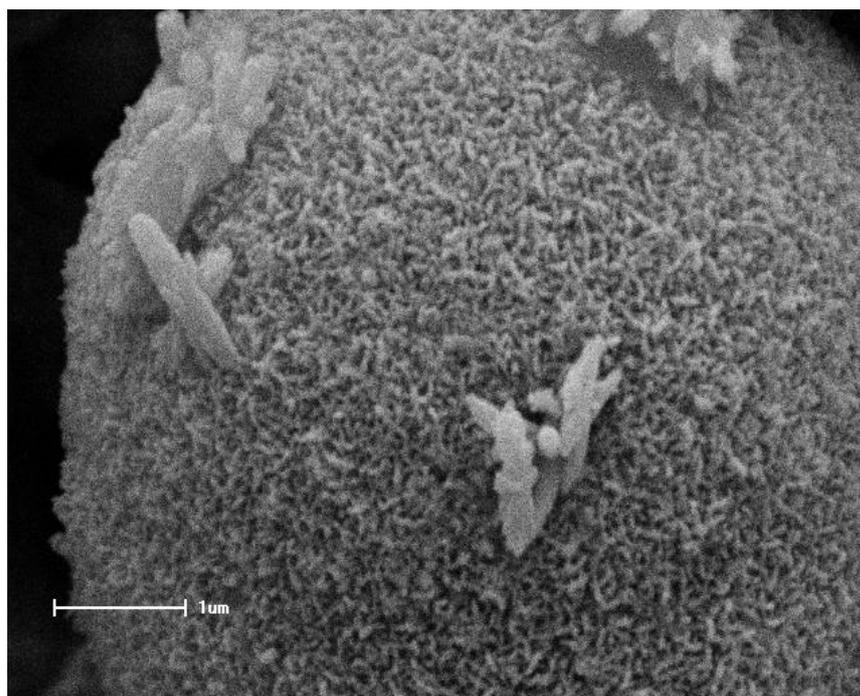


**FIGURA 40- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10-200.(AUMENTO:2400X)**

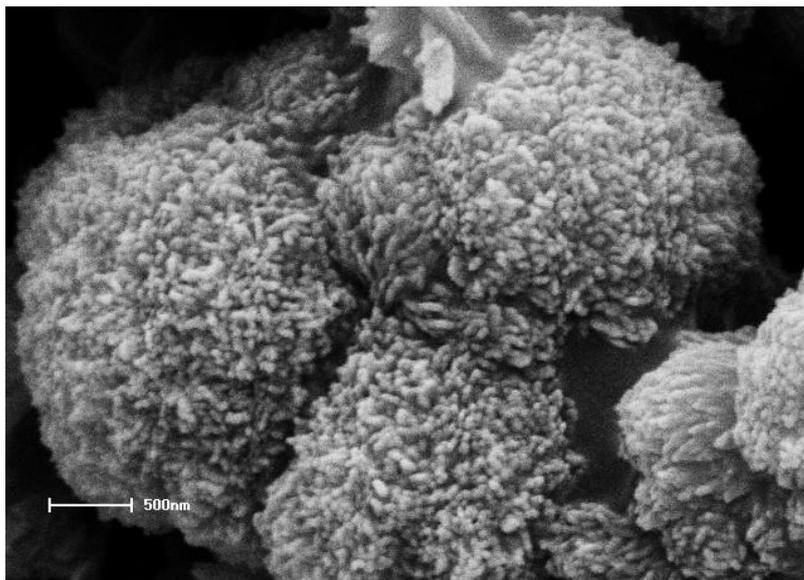


**FIGURA 41- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10-200.(AUMENTO:5000X)**

Observando uma região com um destes aglomerados com formação incompleta pode-se verificar o crescimento das partículas uma sobre as outras de modo que os aglomerados não devem ser ocos, mas porosos devido à união das partículas primárias figura 42 e 41.

**FIGURA 42- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10-200.(AUMENTO:15KX)**

**FIGURA 43-FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MEV DA AMOSTRA 10-200.(AUMENTO:20KX)**



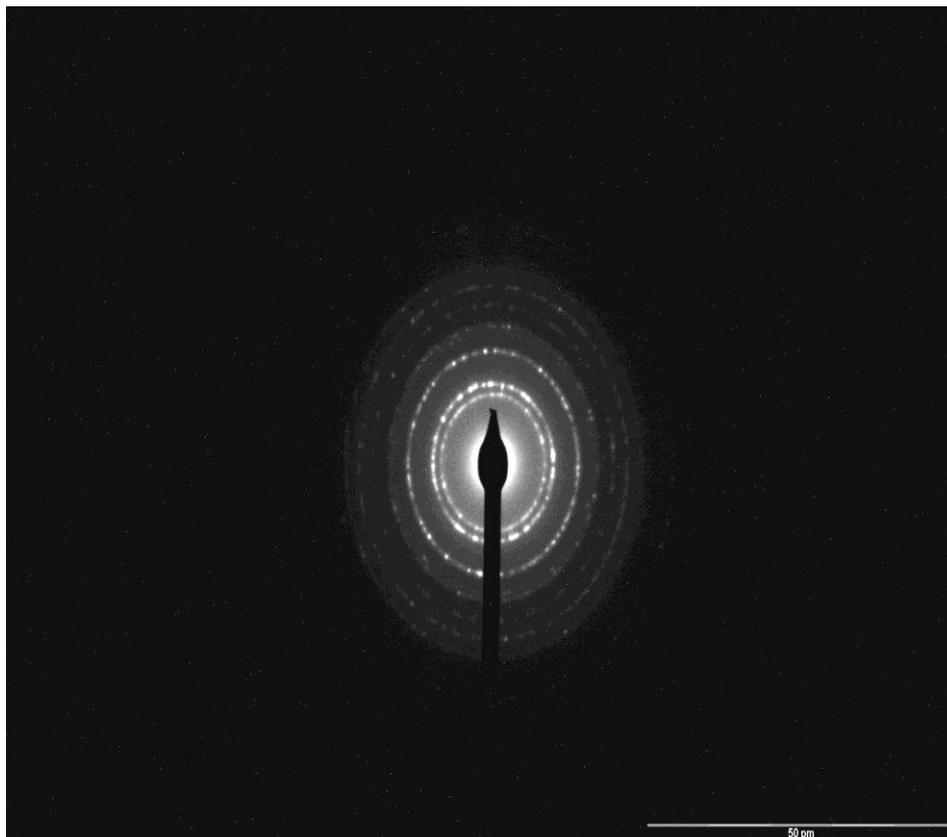
Em todas as amostras contendo a aditivaco com nbio observa-se que o crescimento das partículas primárias  menor em relao à amostra no aditivada.

## **4.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSO**

### **4.2.2.1 RESULTADOS DA AMOSTRA 10-200**

A amostra 10-200 submetida à microscopia eletrônica de varredura apresentou uma difraco de elétrons de área selecionada (SAD ou SAED) característicos de materiais policristalinos conforme visualizado na figura 44 em que ocorre a formao de anéis ou halos cristalinos. Uma amostra amorfa no apresentaria os pontos brilhantes que se pode observar nos anéis de difraco.

**FIGURA 44- DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS DE ÁREA SELECIONADA POR MET DA AMOSTRA 10-200**



Levando-se em conta a solubilidade de fosfatos de cálcio e as condições da síntese ao qual partiu de um meio ácido onde a fase de hidroxiapatita é instável, a tendência inicial seria a possível formação de fosfato de cálcio amorfo com posterior transformação para a fase de hidroxiapatita durante a realização da síntese.

Desse modo pode-se averiguar pelo resultado que o uso de um tempo longo de síntese (24 horas) e o pH final adotado permitiu que uma possível formação de fosfato de cálcio amorfo proporcionasse a transformação na fase cristalina de hidroxiapatita.

A indexação dos halos de difração da figura 44 através da medição dos seus raios e utilizando-se da constante da câmera do microscópio de transmissão, possibilitou a averiguação de algumas informações sobre a cristalinidade do material obtidos sendo estes dados tabulados na tabela 4.

**TABELA 4-INDEXAÇÃO MET**

Tabela 4 – Resultados da Indexação através da MET

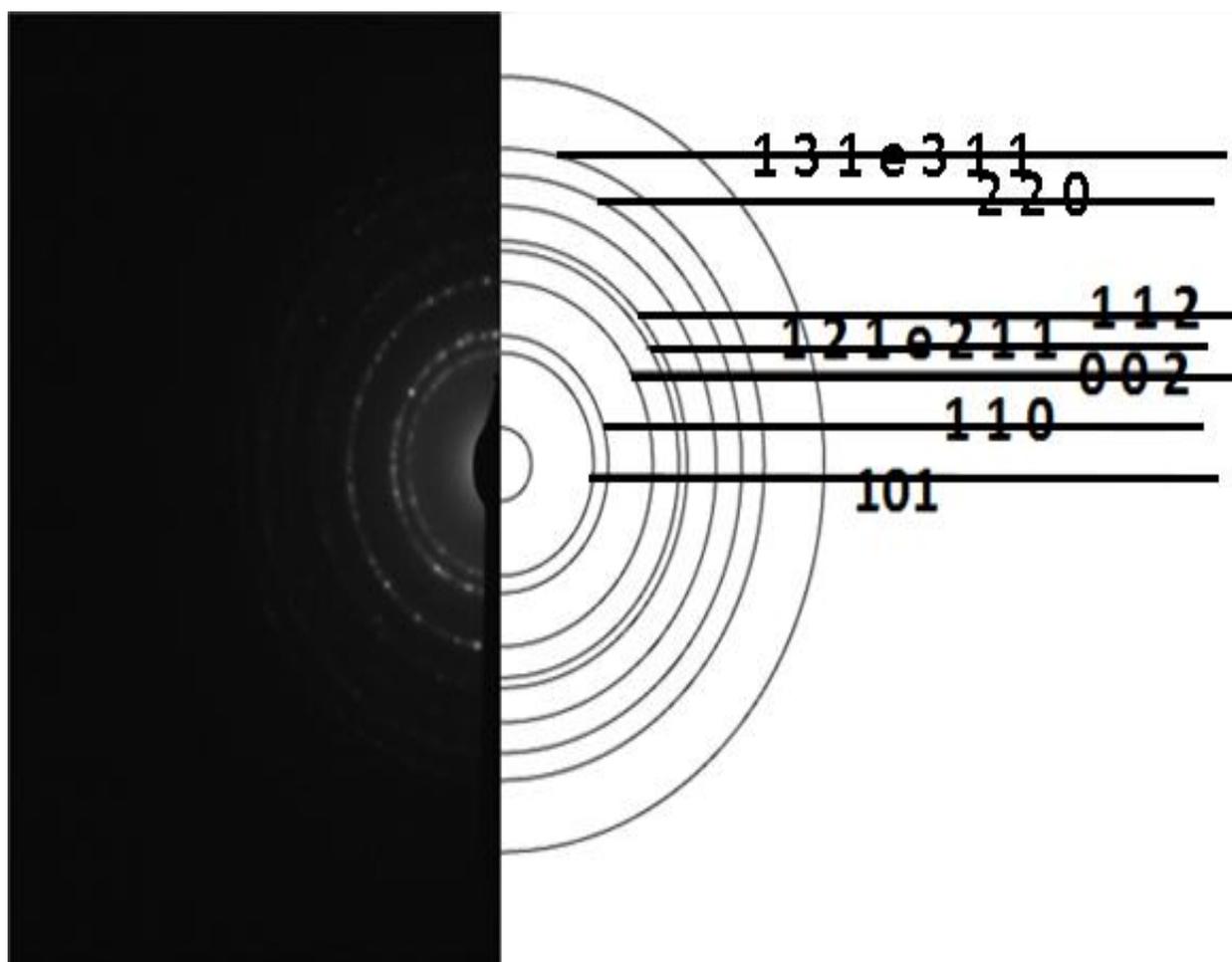
Raio	Distância Média em Pixels	Constante da Câmera (pixel. angstrom).	Distância Interplanar calculada (angstrom)	Distância Interplanar do padrão Hidroxiapatita 501568 Base de Dados Crystmet (angstrom)	Planos hkl correspondentes do Padrão de Hidroxiapatita - 501568 Base de Dados Crystmet
1	228.90	1224	5.347	5.263	1 0 1
2	259.43	1224	4.718	4.716	1 1 0
3	355.26	1224	3.445	3.440	0 0 2
4	433.59	1224	2.822	2.817	1 2 1 ou 2 1 1
5	440.37	1224	2.779	2.779	1 1 2
6	519.03	1224	2.358	2.358	2 2 0
7	568.31	1224	2.153	2.152	1 3 1 ou 3 1 1

**FONTE:AUTOR,2013**

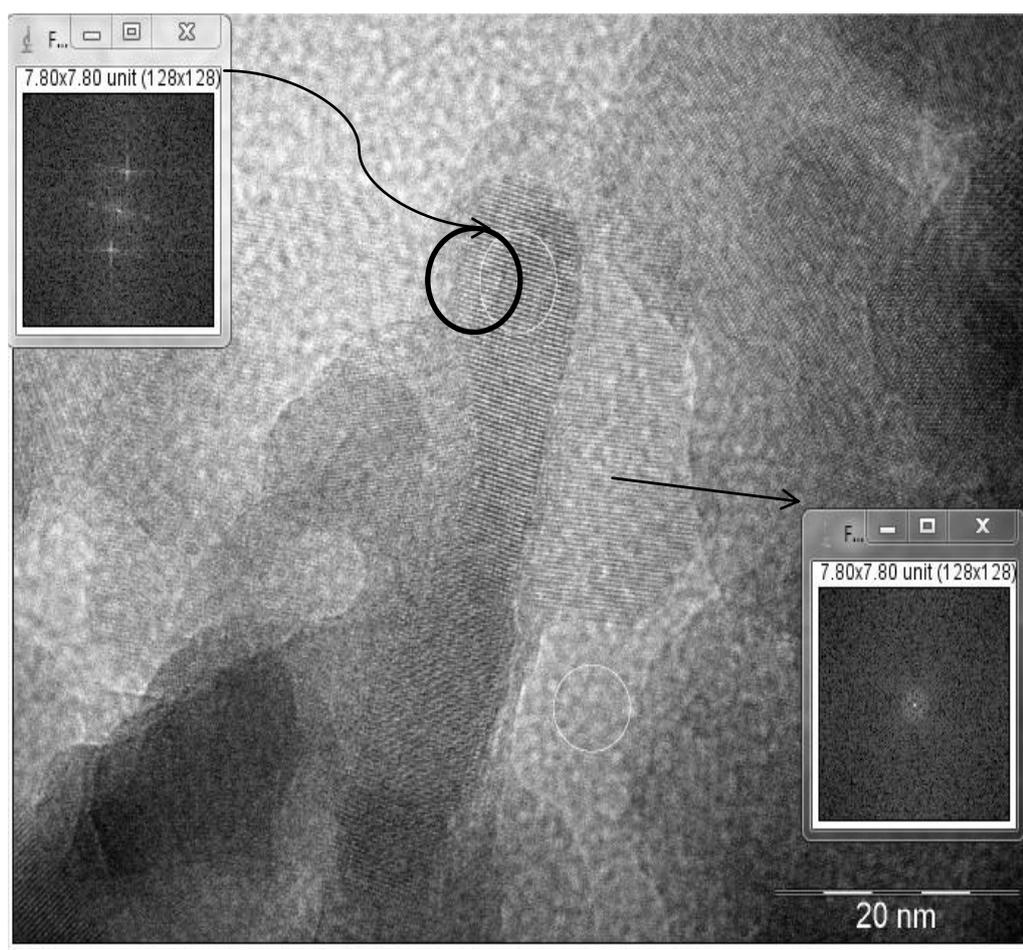
Observa-se a correlação dos raios medidos do halo de difração com a hidroxiapatita da ficha 501568 da base Crystmet, identificando os respectivos planos cristalográficos (Figura 45).

À distância interplanar de 2.817 angstroms é relacionado aos planos (1 2 1) e (2 1 1) sendo este plano o de maior intensidade ( $I=100$ ) o mesmo ocorrendo com a distância interplanar de 2.152 angstroms em que o plano de maior intensidade é o plano (3 1 1) de intensidade igual a 8.

FIGURA 45- INDEXAÇÃO DO HALO SAED DA AMOSTRA 10-200

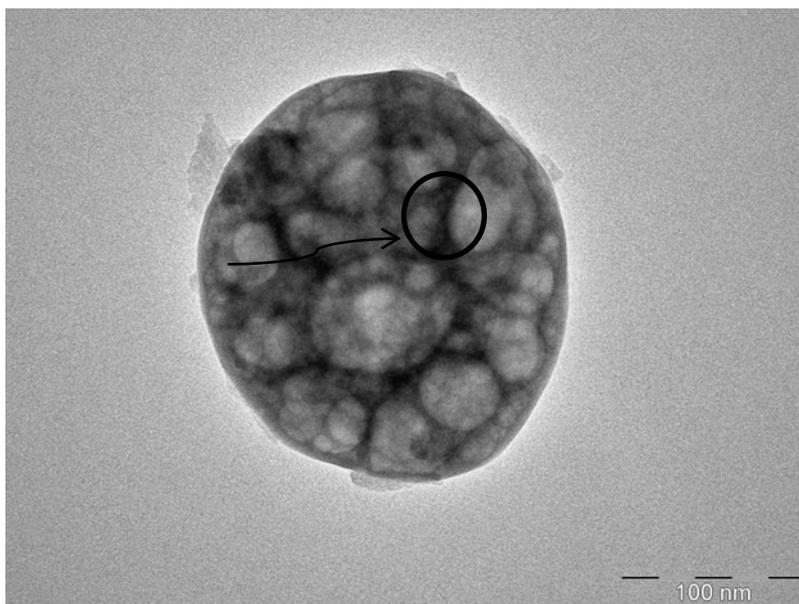


Na figura 46, uma imagem em alta resolução, pode-se observar usando a função de transformação de Fourier no programa ImageJ que a amostra não é totalmente cristalina apresentando regiões amorfas (sem pontos brilhantes) e cristalinas (com pontos brilhantes).

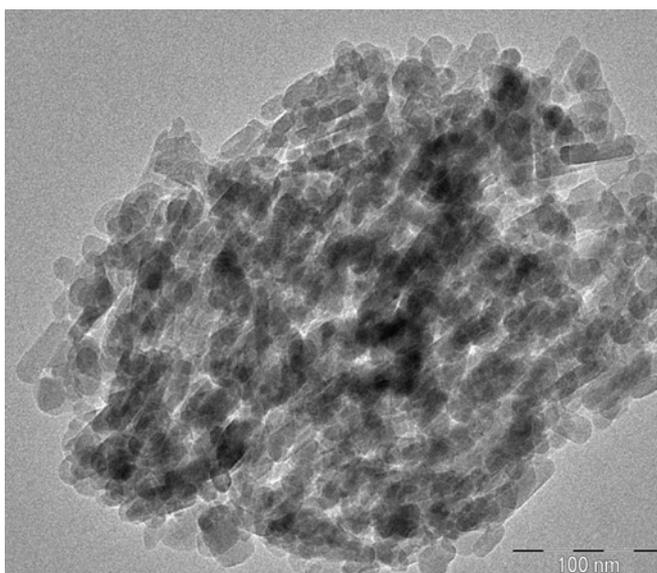
**FIGURA 46- ANÁLISE DA MICROGRAFIA OBTIDA POR MET DA AMOSTRA 10-200**

Na micrografia da figura 47 abaixo se observa visualmente que o aglomerado é arredondado com diâmetro equivalente de 189.689 nm. Os resultados no programa ImageJ apresenta uma circularidade de 0.893 devido a irregularidade da forma e uma convexidade de 0.926 o que indica um sólido compacto e relativamente regular.

Este aglomerado é composto pela aglomeração de outros aglomerados menores que também possuem o formato arredondado e com pouca formação de espaços entre a união deles.

**FIGURA 47- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MET DO AGLOMERADO ARREDONDADO**

Na figura 48 observa-se o formato predominante de bastões cilíndricos conhecido na literatura internacional como rods.

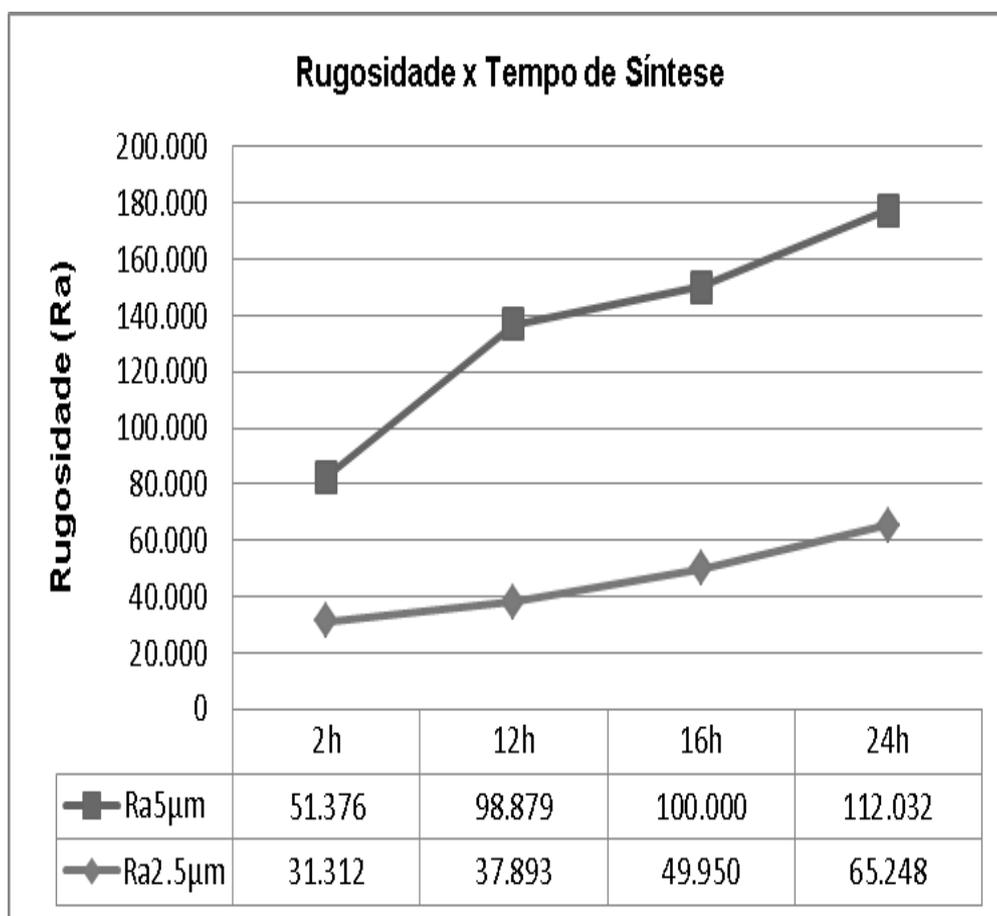
**FIGURA 48- FOTOMICROGRAFIA OBTIDA POR MET DE PARTÍCULAS PRIMÁRIAS AGLOMERADAS**

### 4.2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

O valor da rugosidade e sua aplicabilidade no estudo de biomateriais são controversos. Li et al. (2012), concluíram que a rugosidade superficial melhora a adesão e a proliferação celular enquanto Osathanon et al. (2011), estudando osteoblastos verificaram que o espalhamento e a proliferação é maior em superfícies rugosas, mas não encontraram diferenças quanto à adesão celular.

Como já comentados os valores da rugosidade (Ra) aumentaram em função do tempo (gráfico da figura 49) e podem ser observados na figura para a amostra 10-200 e isto nos leva a assumir que a variação da rugosidade pode ser controlada em função do tempo da síntese hidrotérmica e que o tempo de síntese utilizado neste trabalho de 24 horas permitiu obter uma rugosidade superficial dos aglomerados que poderia influenciar na obtenção dos resultados de biocompatibilidade.

FIGURA 49- GRÁFICO DA RUGOSIDADE X TEMPO MEDIDO ATRAVÉS AFM



## 4.2.4 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS

Análises por difração a laser e espalhamento de luz foram realizadas a fim de se caracterizar a distribuição de tamanho de partículas das amostras.

### 4.2.4.1 DIFRAÇÃO A LASER (DL)

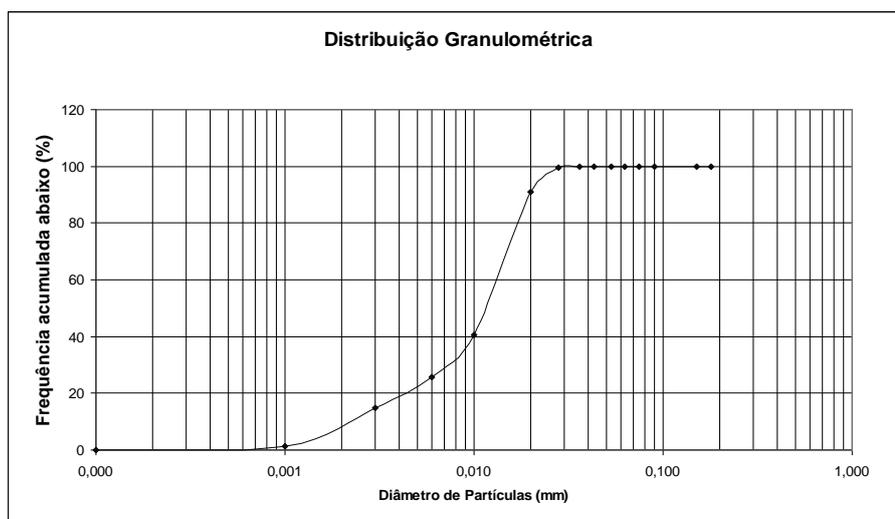
#### 4.2.4.1.1 DIFRAÇÃO A LASER (DL) – RESULTADOS PARA A AMOSTRA 0

Como observado na microscopia de transmissão, os aglomerados são compostos pela união de pequenos aglomerados das partículas primárias o que dificulta a medição do tamanho de partículas primárias sendo que provavelmente os resultados obtidos pela análise granulométrica por difração a laser estejam indicando o tamanho dos aglomerados formados.

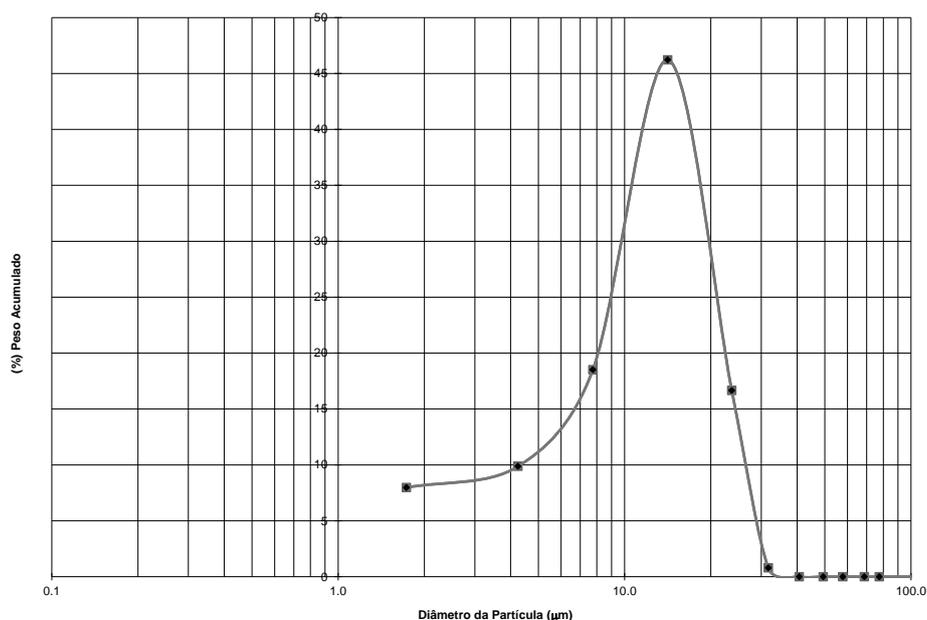
A amostra 0 apresentou um tamanho médio de 9.98  $\mu\text{m}$  com  $D_{10}=1.49 \mu\text{m}$   $D_{50}=9.06 \mu\text{m}$  e  $D_{90}=19.48 \mu\text{m}$ .

A distribuição granulométrica da frequência acumulada abaixo é mostrada na figura 50 do gráfico da distribuição granulométrica desta amostra.

**FIGURA 50- DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA FREQUÊNCIA ACUMULADA DA AMOSTRA 0**



A curva de distribuição do tamanho de partículas se mostrou unimodal conforme apresentado no gráfico do peso acumulado pelo diâmetro da partícula (figura 51).

**FIGURA 51- CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA AMOSTRA 0**

Os resultados obtidos desta análise podem ser plotados na tabela 5.

**TABELA 5-GRANULOMETRIA DA AMOSTRA 0**

TABELA 5 – RESULTADOS DA ANÁLISE GRANULOMÉTRICA PARA AMOSTRA 0

Amostra	Moda µm	D <sub>10</sub> µm	D <sub>50</sub> µm	D <sub>90</sub> µm	Desvio- Padrão µm	Span Absoluto (d <sub>90</sub> -d <sub>10</sub> )	Span Relativo (d <sub>90</sub> -d <sub>10</sub> )/d <sub>50</sub>
0	15.00	1.49	9.06	19.48	6.48	17.99	1.98

**FONTE: AUTOR,2013.**

Quando uma distribuição é estreita os índices absolutos aproximam-se de zero enquanto os relativos do valor unitário. Uma distribuição unimodal pode não ser estreita, ou seja, os tamanhos de partículas variam.

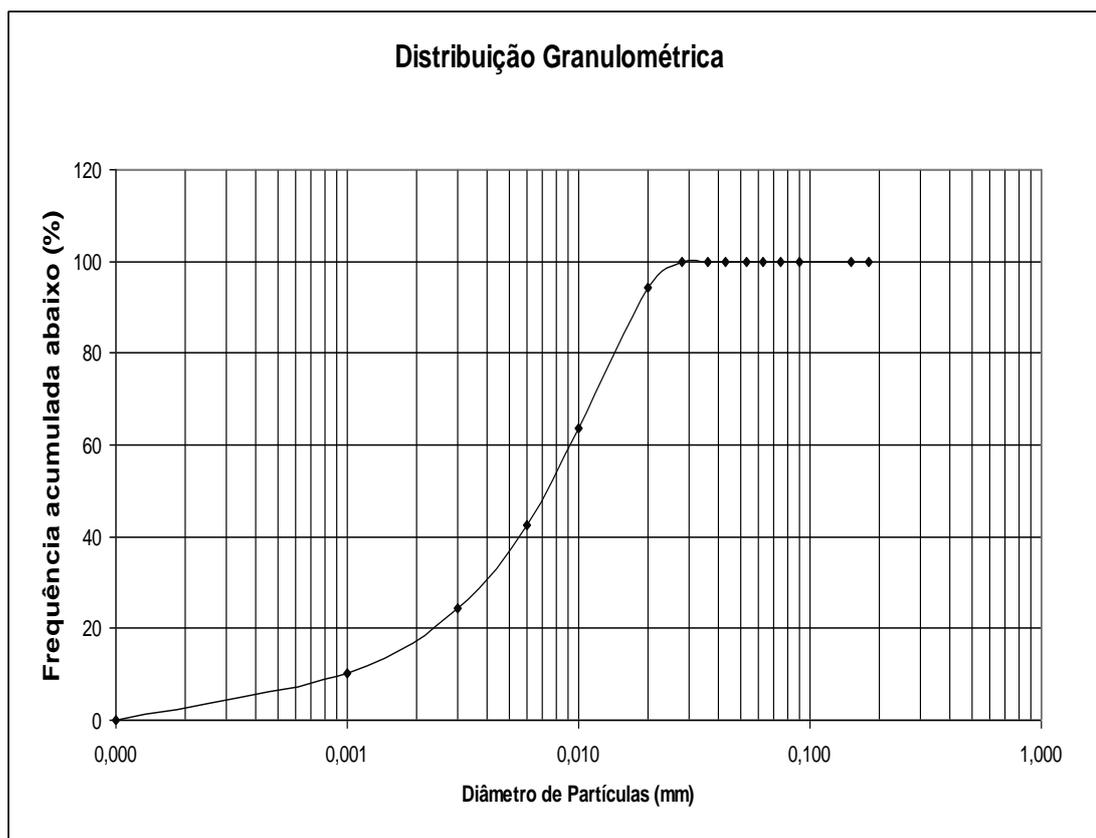
Para a amostra 0 o índice span, que mede a largura da distribuição, apresentou um span absoluto de 17.99 e um span relativo de 1.98 o que acrescenta ao resultado que a amostra tem uma distribuição unimodal e larga.

#### 4.2.4.1.2 DIFRAÇÃO A LASER (DL) – RESULTADOS PARA A AMOSTRA 10-200

A amostra 10 apresentou um tamanho médio de 8.45  $\mu\text{m}$  com  $D_{10}=0.98 \mu\text{m}$   $D_{50}=7.33 \mu\text{m}$  e  $D_{90}=17.69 \mu\text{m}$ .

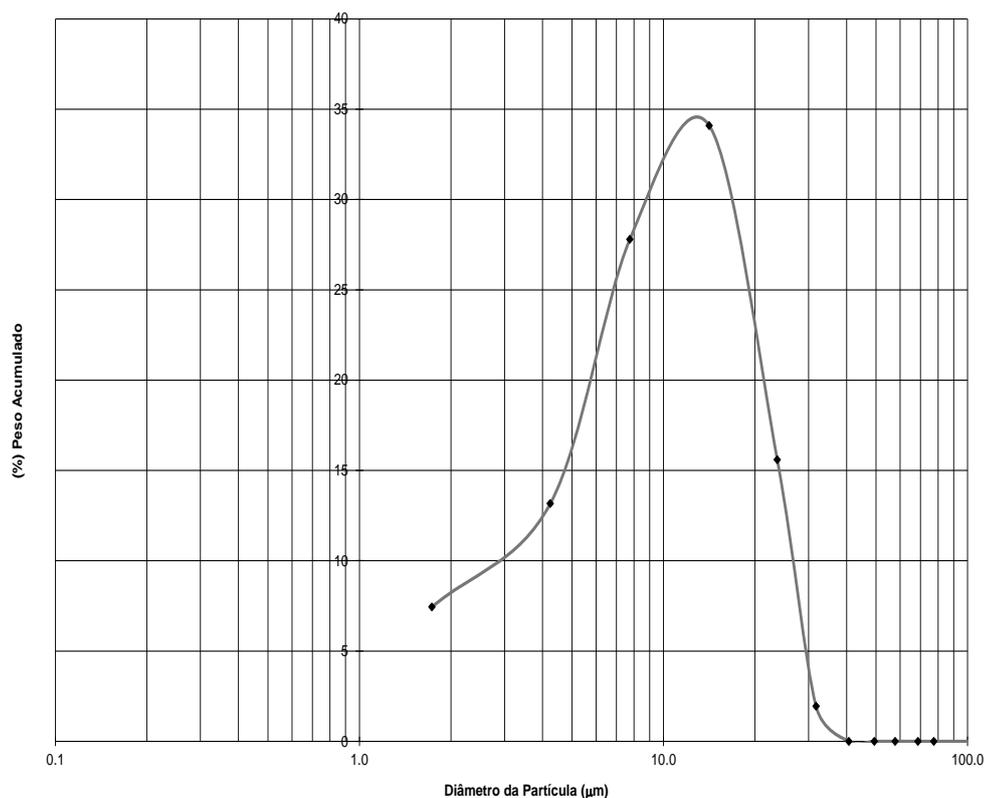
A distribuição granulométrica da frequência acumulada abaixo é mostrada na figura 52 do gráfico.

**FIGURA 52- DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA FREQUÊNCIA ACUMULADA DA AMOSTRA 10-200**



A curva de distribuição do tamanho de partículas se mostrou unimodal conforme apresentado no gráfico do peso acumulado pelo diâmetro da partícula da figura 53.

**FIGURA 53- CURVA DE DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DA AMOSTRA 10-200**



Os resultados obtidos desta análise podem ser plotados na tabela 6.

**TABELA 6-GRANULOMETRIA DA AMOSTRA 10-200**

TABELA 6 – RESULTADOS DA ANÁLISE GRANULOMÉTRICA PARA AMOSTRA 10-200

Amostra	Moda μm	D <sub>10</sub> μm	D <sub>50</sub> μm	D <sub>90</sub> μm	Desvio- Padrão μm	Span Absoluto (d <sub>90</sub> -d <sub>10</sub> )	Span Relativo (d <sub>90</sub> -d <sub>10</sub> )/d <sub>50</sub>
0	15.00	0.98	7.33	17.69	6.84	17.01	2.28

**FONTE: AUTOR,2013.**

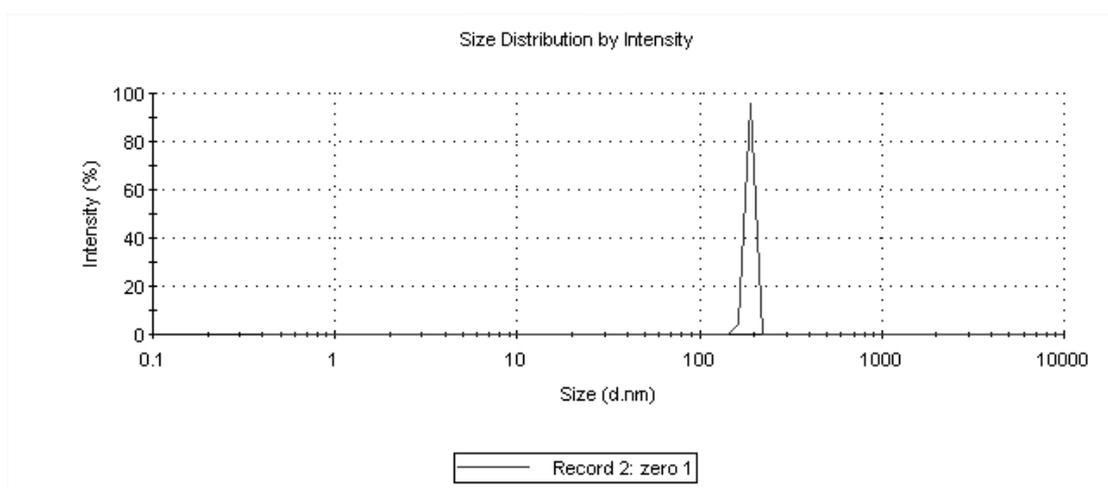
Para a amostra 10-200 o índice span que mede a largura da distribuição apresentou um span absoluto de 17.01 e um span relativo de 2.28 o que acrescenta ao resultado que a amostra tem uma distribuição unimodal e larga.

Aparentemente a diferença de temperatura de 40 °C de síntese entre a amostra 0 e a amostra 10-200 e a aditivação com o precursor de nióbio não influenciaram significamente na distribuição dos tamanhos dos aglomerados formados.

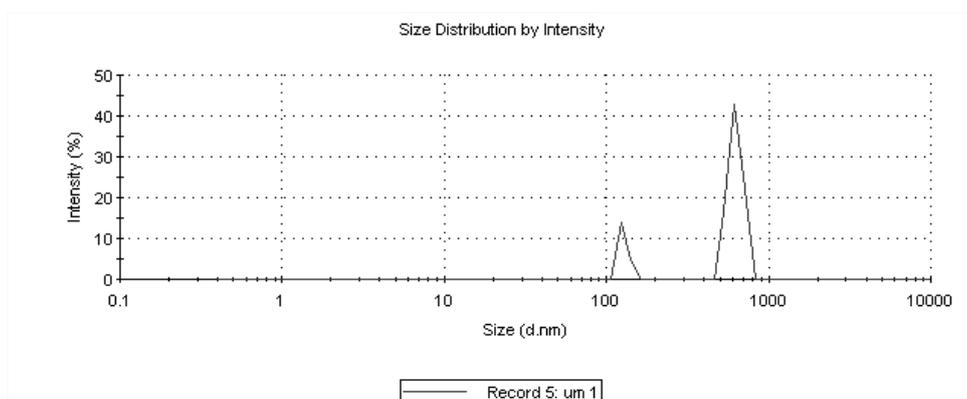
#### 4.2.4.2 TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (ELD) – RESULTADOS

A técnica de espalhamento de luz dinâmico permite a observação da desaglomeração e a medição em escala nanométrica. Observando os resultados das amostras 0,1,5 e 10-200 (figuras 54,55,56 e 57) há com exceção da amostra 01 a formação de uma distribuição unimodal de distribuição de tamanho de partícula.

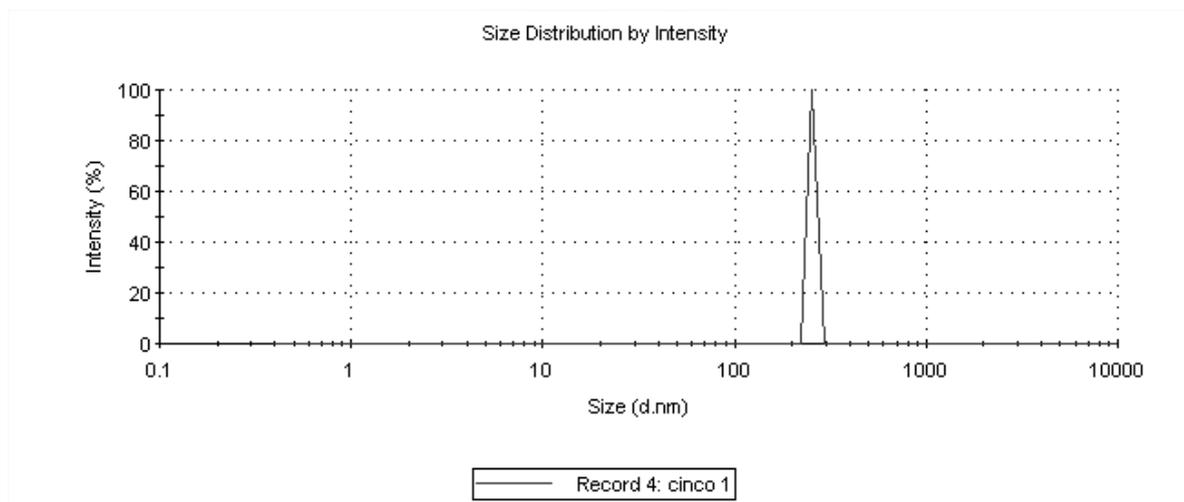
**FIGURA 54- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ  
DINÂMICO PARA A AMOSTRA 0**



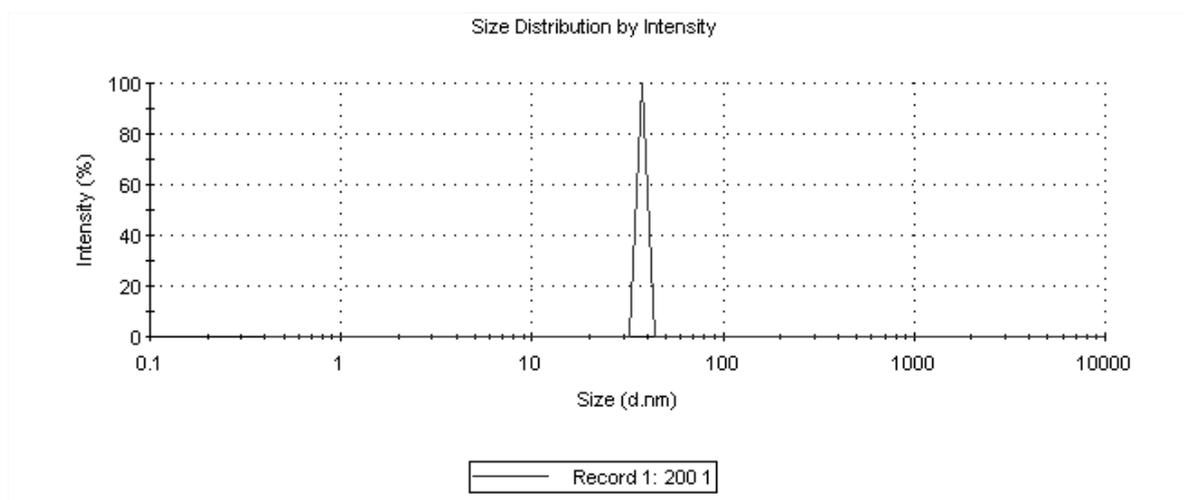
**FIGURA 55- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ  
DINÂMICO PARA A AMOSTRA 1**



**FIGURA 56- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO PARA A AMOSTRA 5**



**FIGURA 57- DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO PARA A AMOSTRA 10-200**



Os dados obtidos foram sumarizados na tabela 7.

**TABELA 7-RESULTADOS DAS AMOSTRAS**

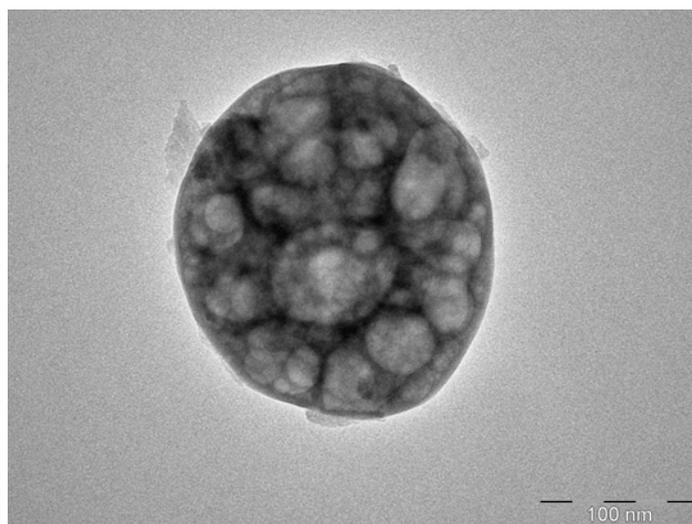
**TABELA 7-RESULTADOS DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ**

Amostra	Distribuição de Tamanho de Partícula (nm)
0	189.1
1	624.8 e 127.3
5	255
10-200	37.84

**FONTE: AUTOR,2013**

Se compararmos com os resultados da análise da difração a laser pode-se ter uma noção que se na análise por distribuição de partículas por difração a laser se está medindo e indicando o tamanho médio dos aglomerados, na técnica por espalhamento de luz, após desaglomeração estamos tendo uma indicação dos pequenos aglomerados que compõem um aglomerado maior como pode ser visto na imagem da figura 58 obtida por microscopia eletrônica de transmissão.

**FIGURA 58- FOTOMICROGRAFIA TEM DA AMOSTRA 10-200 DEMONSTRANDO A AGLOMERAÇÃO DE AGLOMERADOS MENORES**



### **4.3 IDENTIFICAÇÕES DE FASES E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL**

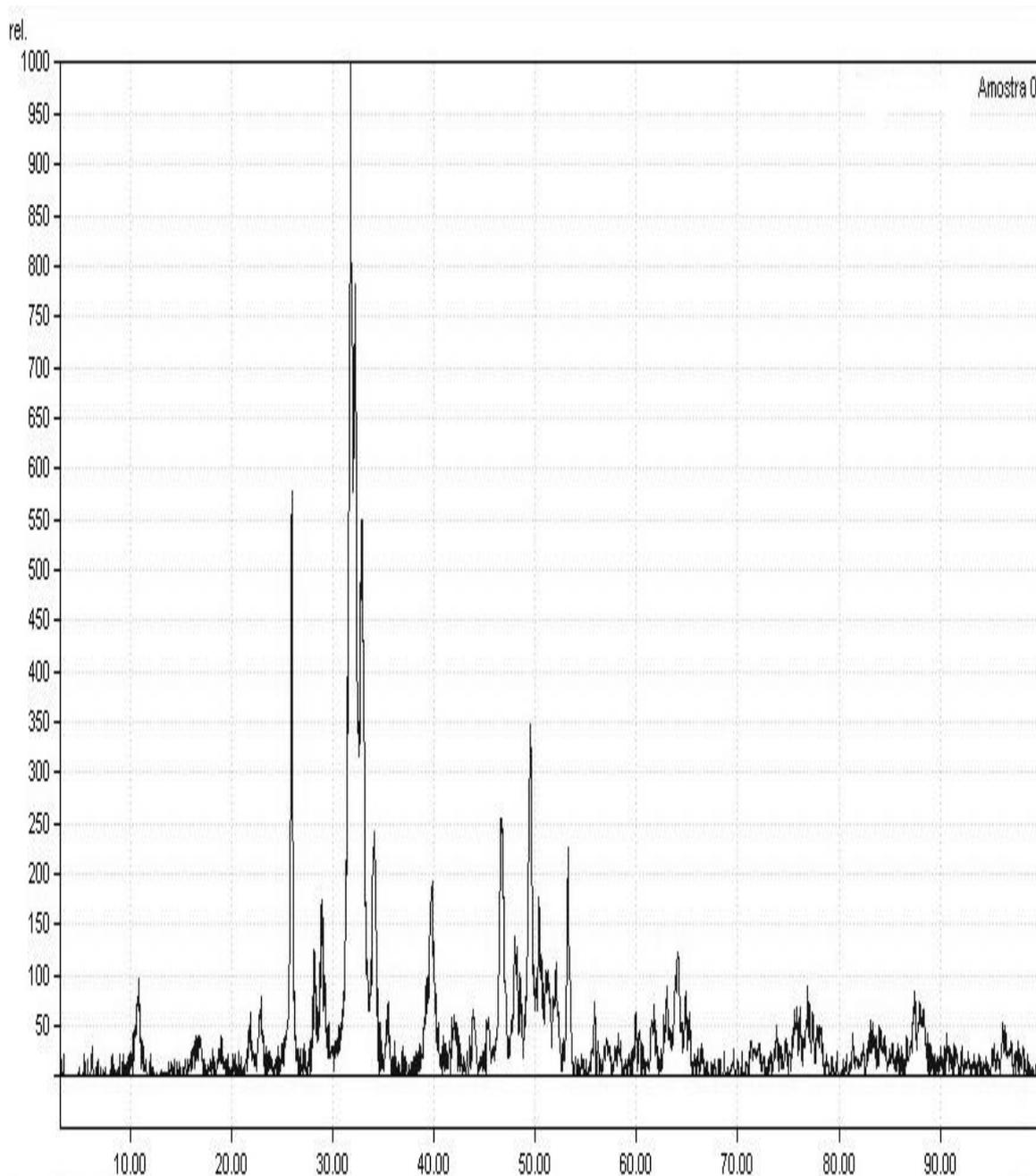
#### **4.3.1 DRX**

A análise por DRX foi realizada com o objetivo de determinar as fases presentes nas amostras obtidas.

##### **4.3.1.1 RESULTADOS PARA A DIFRAÇÃO RAIOS X PARA A AMOSTRA 0**

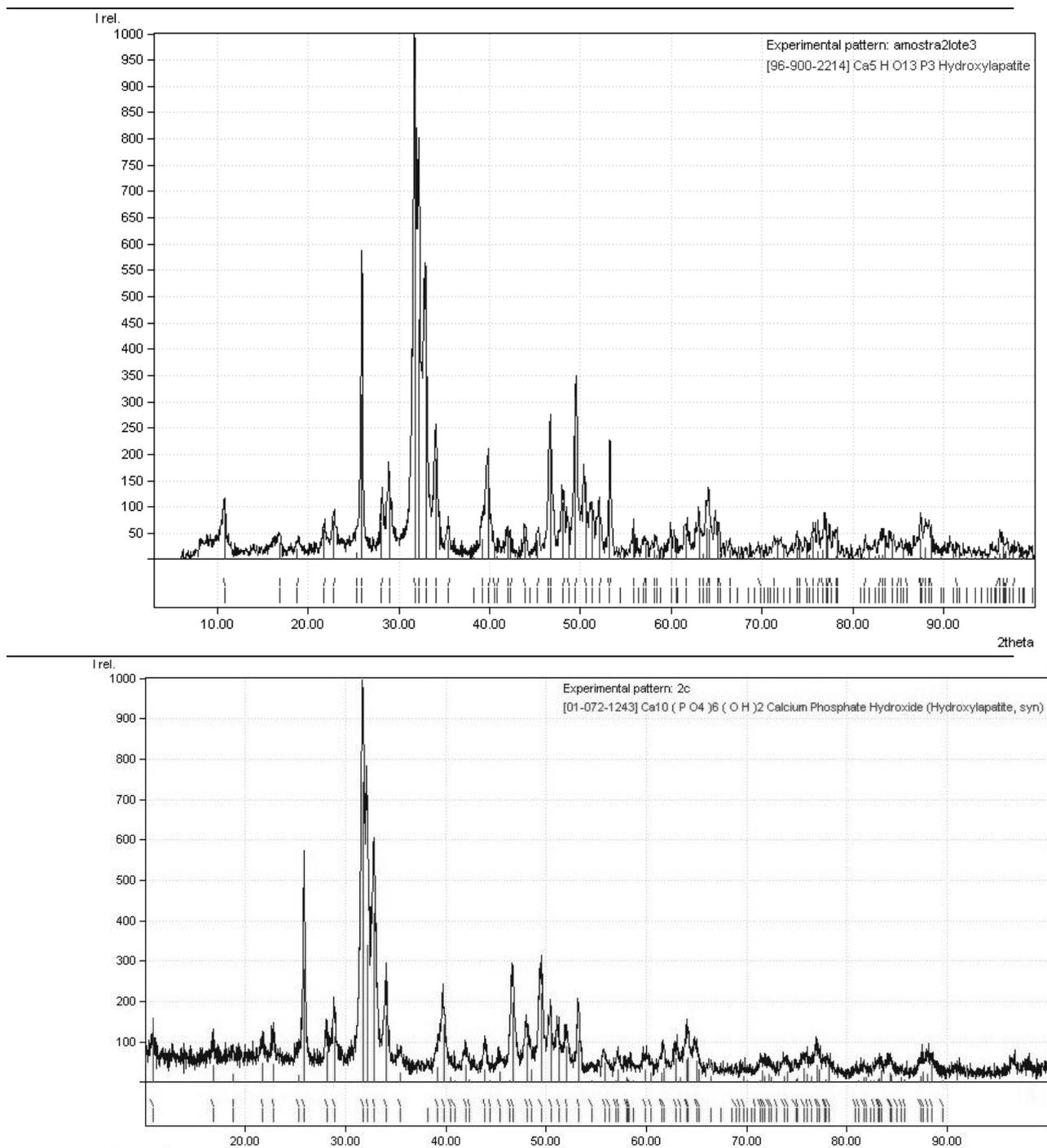
A primeira etapa para o uso da técnica de difração de raios X foi para identificar qualitativamente a formação de ortofosfatos de cálcio durante a síntese hidrotermal com especial atenção a obtenção da fase de hidroxiapatita.

A amostra 0 apresentou o difratograma da figura 59.

**FIGURA 59- DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 0**

Utilizando-se o banco de dados do International Center for Diffraction Data Powder Diffraction File (ICDD-PDF-2), e Crystallography Open Database (COD), a concordância com a maior figura de mérito (FOM) foram à ficha COD 96-900-2214 e PDF-2 01-072-1243 indicando a formação da fase de hidroxiapatita como fase principal como visto na figura 60.

**FIGURA 60- DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVOS DA AMOSTRA 0 COM PADRÕES  
COD 96-900-2214 E PDF-2 01-072-1243**



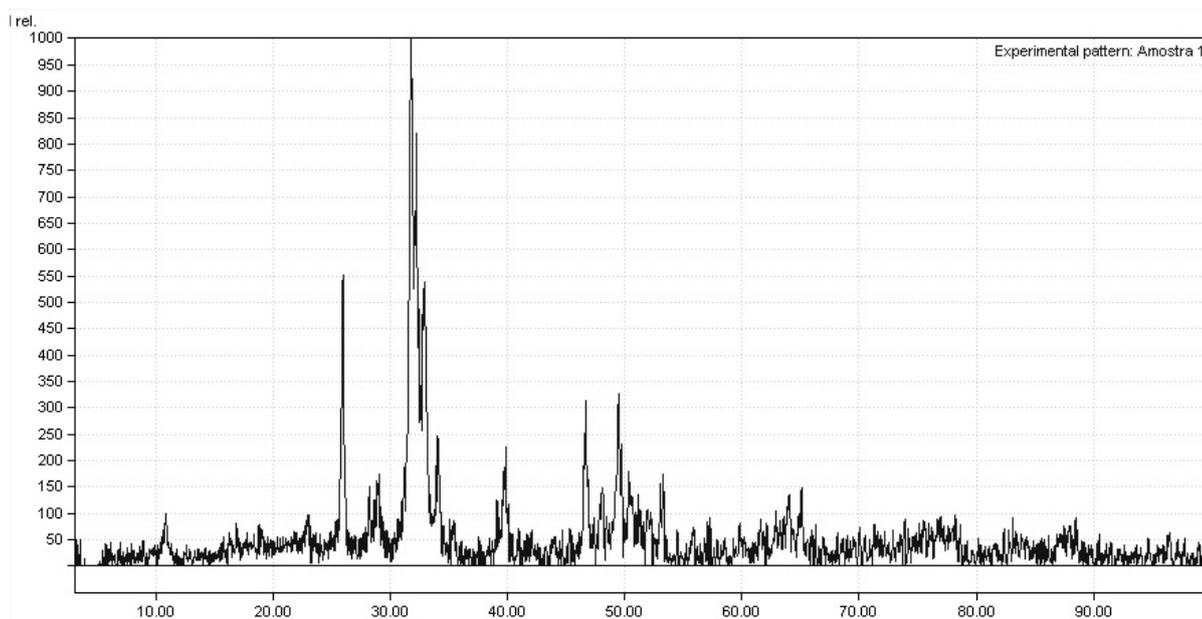
Nota-se nesta tabela a presença de algumas fases não estequiométricas que podem indicar a presença de substituições durante a síntese principalmente devido à presença de

carbonatos. Esta confirmação será discutida na análise por espectroscopia na região do infravermelho.

#### 4.3.1.2 RESULTADOS PARA A DIFRAÇÃO RAIOS X PARA A AMOSTRA 1

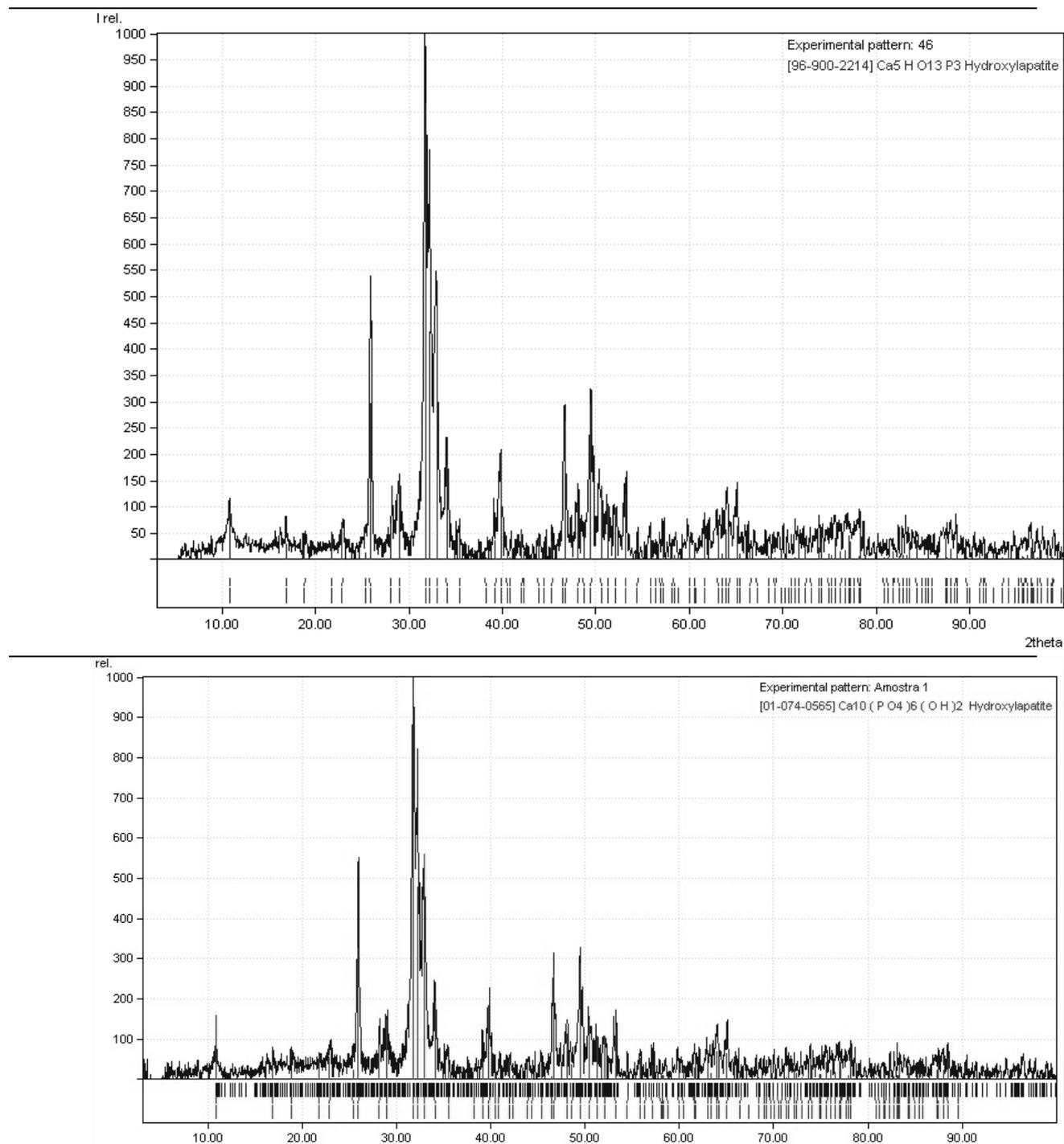
O difratograma da amostra 1 está representado na figura 61.

**FIGURA 61 – DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 1**



Comparando-se se utilizando o banco de dados PDF-2 e COD, a concordância com a maior figura de mérito (FOM) foram o padrão COD 96-900-2214 e PDF-2 01-074-0565 indicando a formação da fase de hidroxiapatita como fase principal como visto na figura 62.

**FIGURA 62-DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVO DA AMOSTRA 1 COM PADRÕES  
COD 96-900-2214 E PDF-2 01-074-0565**



Outros padrões relacionados à análise qualitativa e que estão concordantes ao difratograma obtido podem ser vistos no quadro 12.

**QUADRO 12**

RESULTADOS DAS FICHAS JCPDS PARA A AMOSTRA 1	
Fase –Fórmula Molecular	Ficha COD
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5 \text{H}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$	96-900-2215
Apatita-(CaOH) $\text{Ca}_5 \text{H}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$	96-901-0051
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5 \text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-901-1092
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5 \text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-901-1093
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5 \text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-901-1094
Ficha PDF-2	
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{9,868}(\text{PO}_4)_{5,586}(\text{OH})_{4,006}$	01-089-6438
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10,084}(\text{PO}_4)_{5,94}(\text{OH})_{3,39}$	01-089-6440
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$	01-074-0566
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{9,04}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$	01-086-1203
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	01-084-1998

FONTE:AUTOR,2013

#### 4.3.1.3 RESULTADOS PARA A DIFRAÇÃO RAIOS X PARA A AMOSTRA 5

A amostra 5 apresenta o difratograma da figura 63 e quando comparado com as bases de dados apresentou concordância com a ficha 96-900-2214 da base de dados COD e ficha PDF-2 01-084-1998 indicando a formação da fase de hidroxiapatita como fase principal como visto na figura 64.

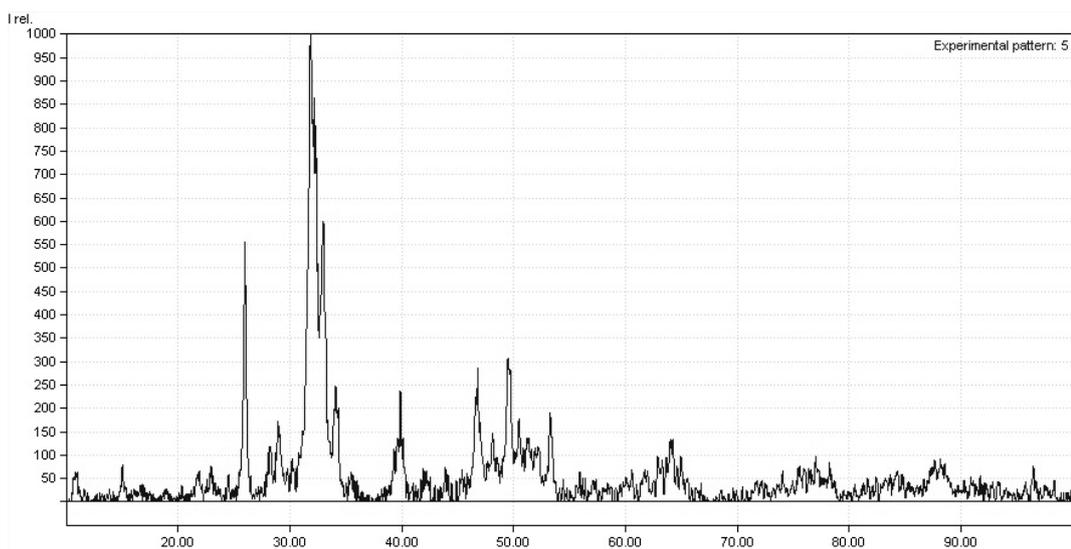
Outros padrões relacionados à análise qualitativa e que estão concordantes ao difratograma obtido podem ser vistos no quadro 13.

**QUADRO 13**

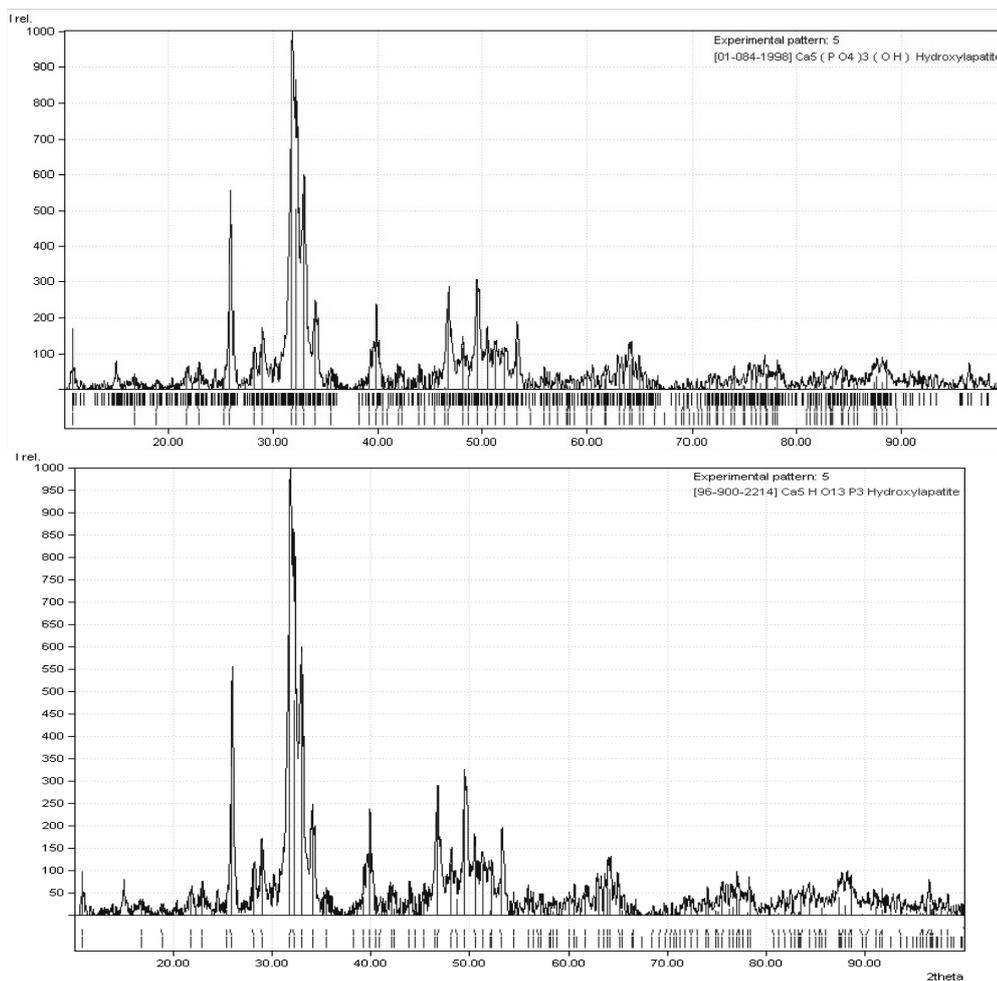
RESULTADOS DAS FICHAS JCPDS PARA A AMOSTRA 5	
Fase – Fórmula Molecular	Ficha COD
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-900-1234
Monetita $\text{Ca}_4\text{H}_4\text{O}_{16}\text{P}_4$	96-900-7620
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-900-2214
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-901-3628
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{H}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$	96-901-3628
Ficha PDF-2	
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{9.74}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2.08}$	01-086-1199
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10.042}(\text{PO}_4)_{5.952}(\text{OH})_{2.292}$	01-089-6437
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10.132}(\text{PO}_4)_{5.958}(\text{OH})_{3.258}$	01-089-6439
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{9.04}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1.68}$	01-086-1203
Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	01-072-1243

**Fonte: Autor,2013**

**FIGURA 63- DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 5**



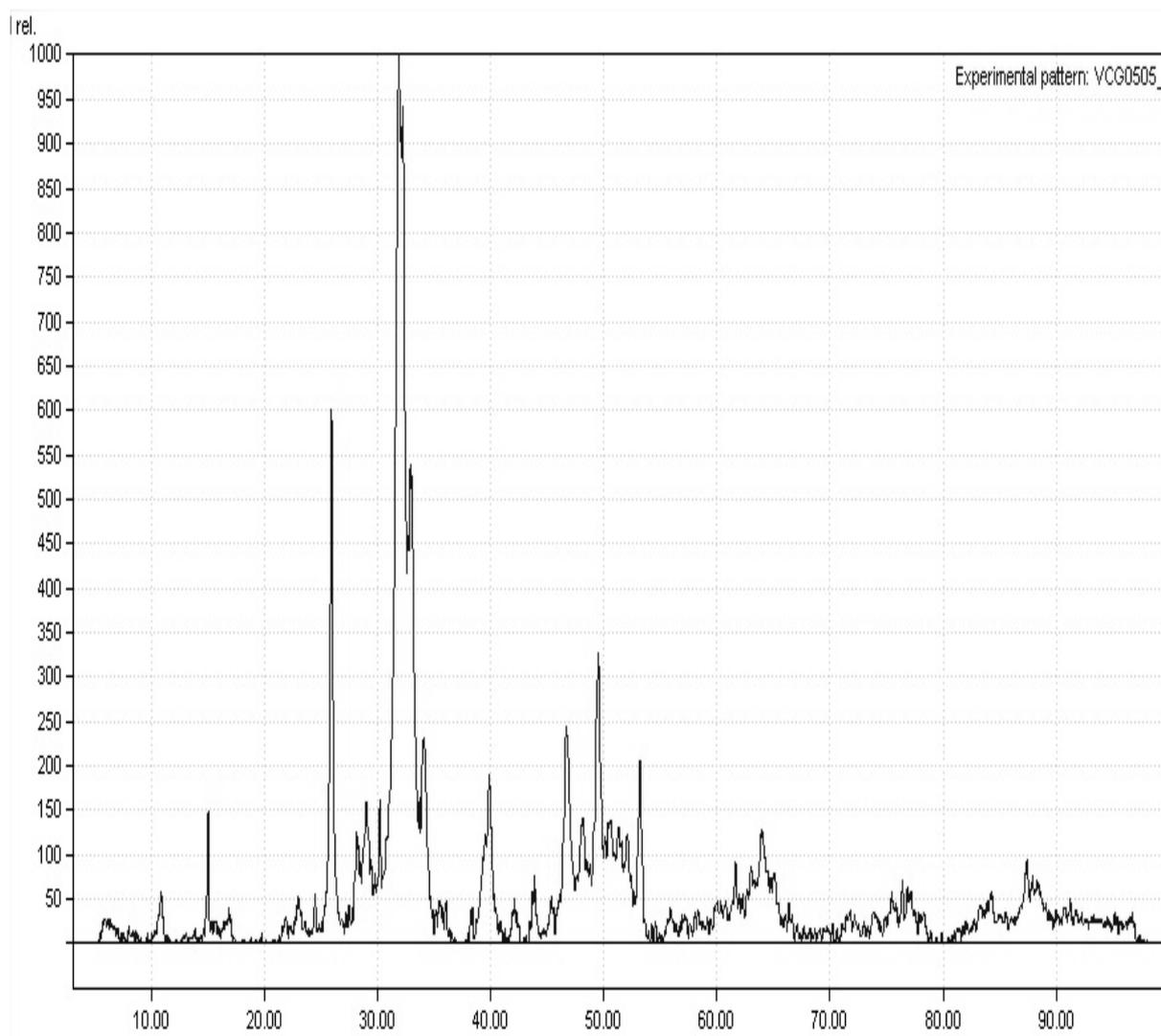
**FIGURA 64 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X COMPARATIVO DA AMOSTRA 5 COM PADRÕES  
COD 96-900-2214 E PDF-2 01-084-1998**



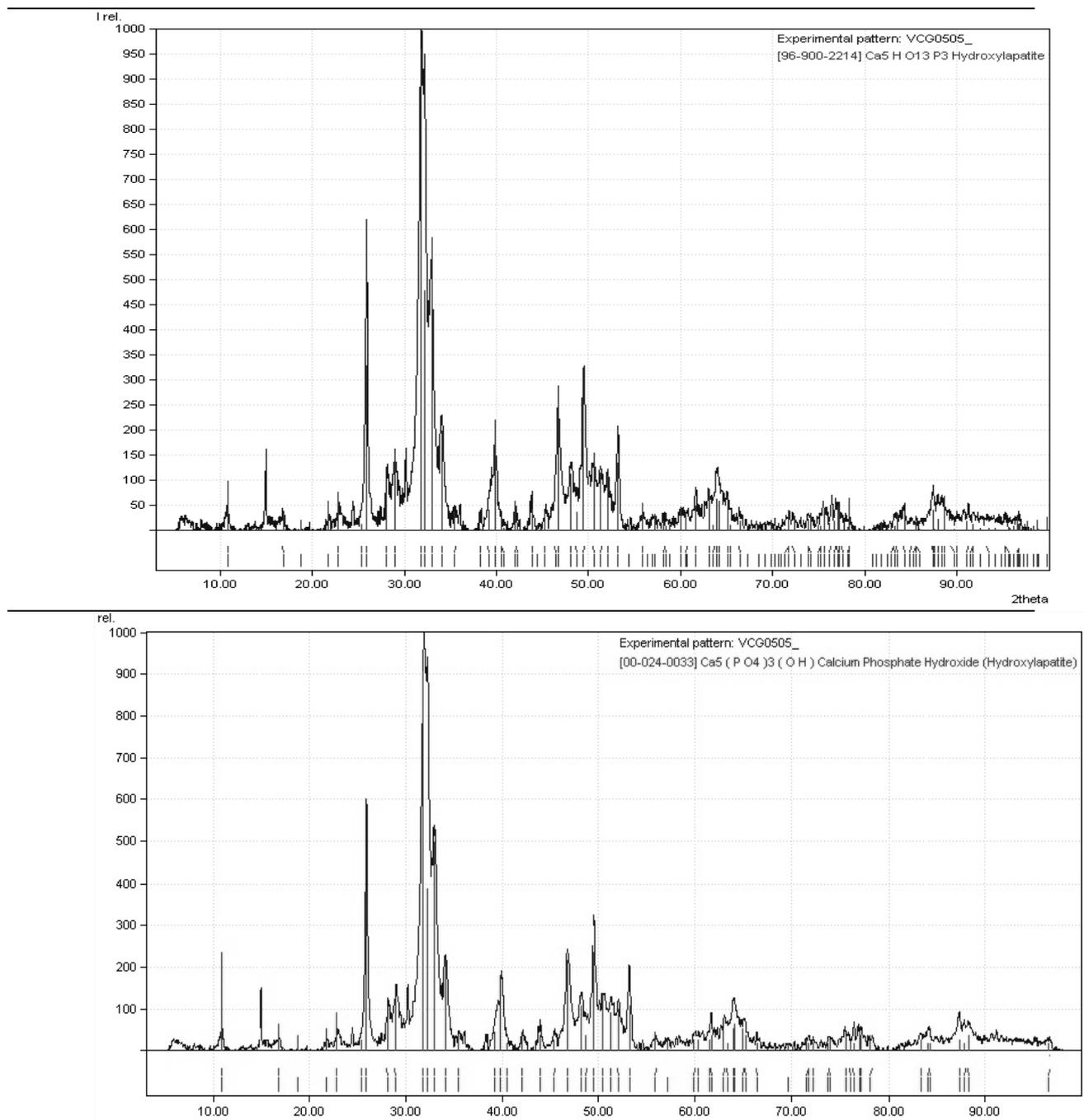
#### 4.4.1.4 RESULTADOS PARA A DIFRAÇÃO RAIOS X PARA A AMOSTRA 10-200

A amostra 10-200 apresenta concordância com a ficha COD 96-900-2214 e PDF-2 00-024-0033 indicando a formação da fase de hidroxiapatita como fase principal como visto na figura 65 e 66.

FIGURA 65- DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA AMOSTRA 10-200



**FIGURA 66 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 COM  
PADRÕES COD 96-900-2214 E PDF-2 00-024-0033**



Outros padrões relacionados à análise qualitativa e que estão concordantes ao difratograma obtido podem ser vistos no quadro 14.

QUADRO 14

RESULTADOS DAS FICHAS JCPDS PARA A AMOSTRA 10-200	
Fase-Fórmula Molecular	Ficha COD
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-101-1243
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{H}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$	96-900-2217
Apatita-(CaOH) $\text{Ca}_5\text{H}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$	96-901-0053
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$	96-901-3628
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5\text{H}_{1.44}\text{O}_{13.012}\text{P}_{2.928}$	96-900-3549
Ficha PDF-2	
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	01-076-0694
Hidroxiapatita $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$	00-046-0905
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	01-073-1731
Fosfato de Cálcio Hidratado $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	00-018-0303
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	00-009-0432

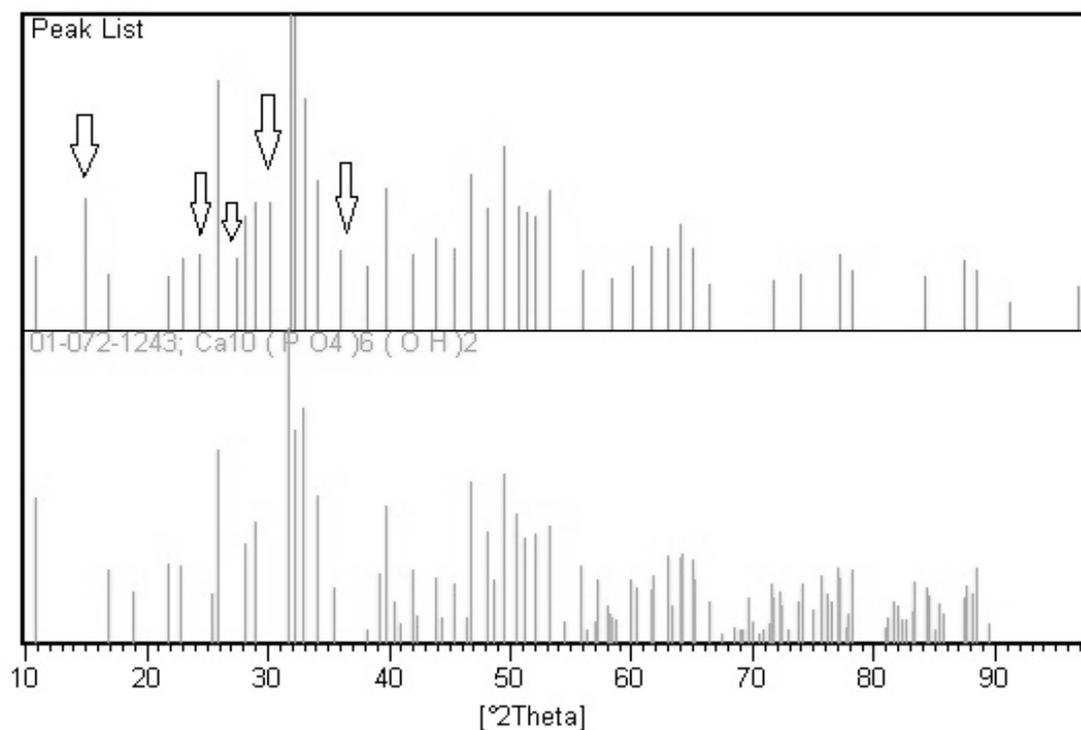
FONTE: AUTOR,2013

Entre as possíveis fases presentes na amostra 10-200, a análise do grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$  na espectroscopia no infravermelho não esteve presente e a presença dos grupos  $\text{OH}^-$  nas amostras descartam a fase de fosfato de cálcio hidratado.

Na segunda etapa da análise dos difratogramas foi avaliada a presença de fases secundárias especialmente aquelas relacionadas a compostos contendo nióbio.

Ao avaliar os difratogramas de raios X da amostra aditivada 10-200 com o precursor de nióbio podemos observar algumas diferenças nos picos formados à medida que se aumenta a concentração do precursor de nióbio, e sendo esta a amostra mais concentrada, nota-se a formação de algumas fases não concordantes (flechas na figura 67) com a ficha JCPDS 01-072-1243 utilizada e correlacionada com a fase de hidroxiapatita.

**FIGURA 67 – DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA 10-200 COMPARADOS COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELA FICHA PDF-2 01-072-1243 MOSTRANDO OS PICOS NÃO CORRELACIONADOS COM A FASE DE HIDROXIAPATITA DA AMOSTRA 10-200**

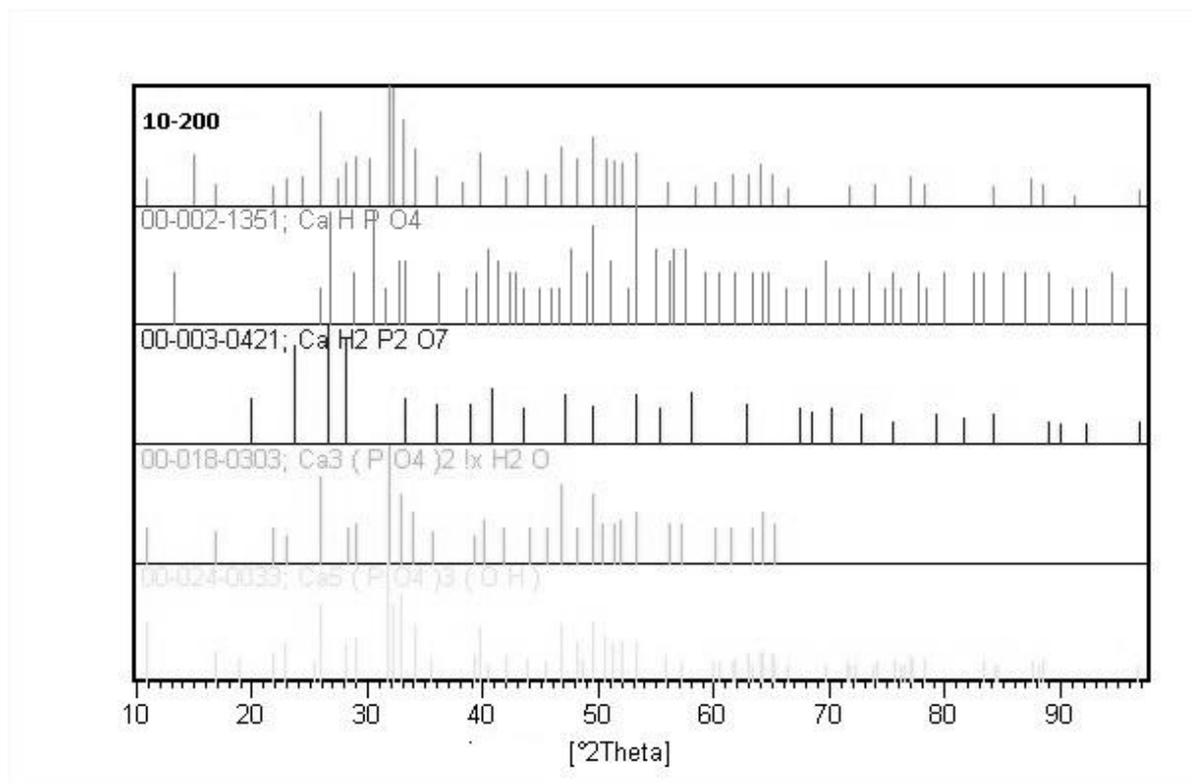


Os picos não identificados nas amostras foram comparados qualitativamente com outros padrões JCPDS de possíveis fases contendo cálcio, fósforo e nióbio a fim de tentar identificar estas fases.

Estes picos correspondem ao ângulo  $2\theta$  de  $14.9975^\circ$ ,  $24.4390^\circ$ ,  $27.4042^\circ$ ,  $30.1560^\circ$  e  $36.0377^\circ$ .

Inicialmente a comparação foi realizada com compostos contendo cálcio e fósforo conforme a figura 68 e utilizando a ficha PDF-2 00-024-0033 da hidroxiapatita.

**FIGURA 68 – DIFRATOGRAMA DE RAIOS X COMPARATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA 10-200 COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2: 00-002-1351,00-003-0421,00-018,0303 E 00-024-0033.**

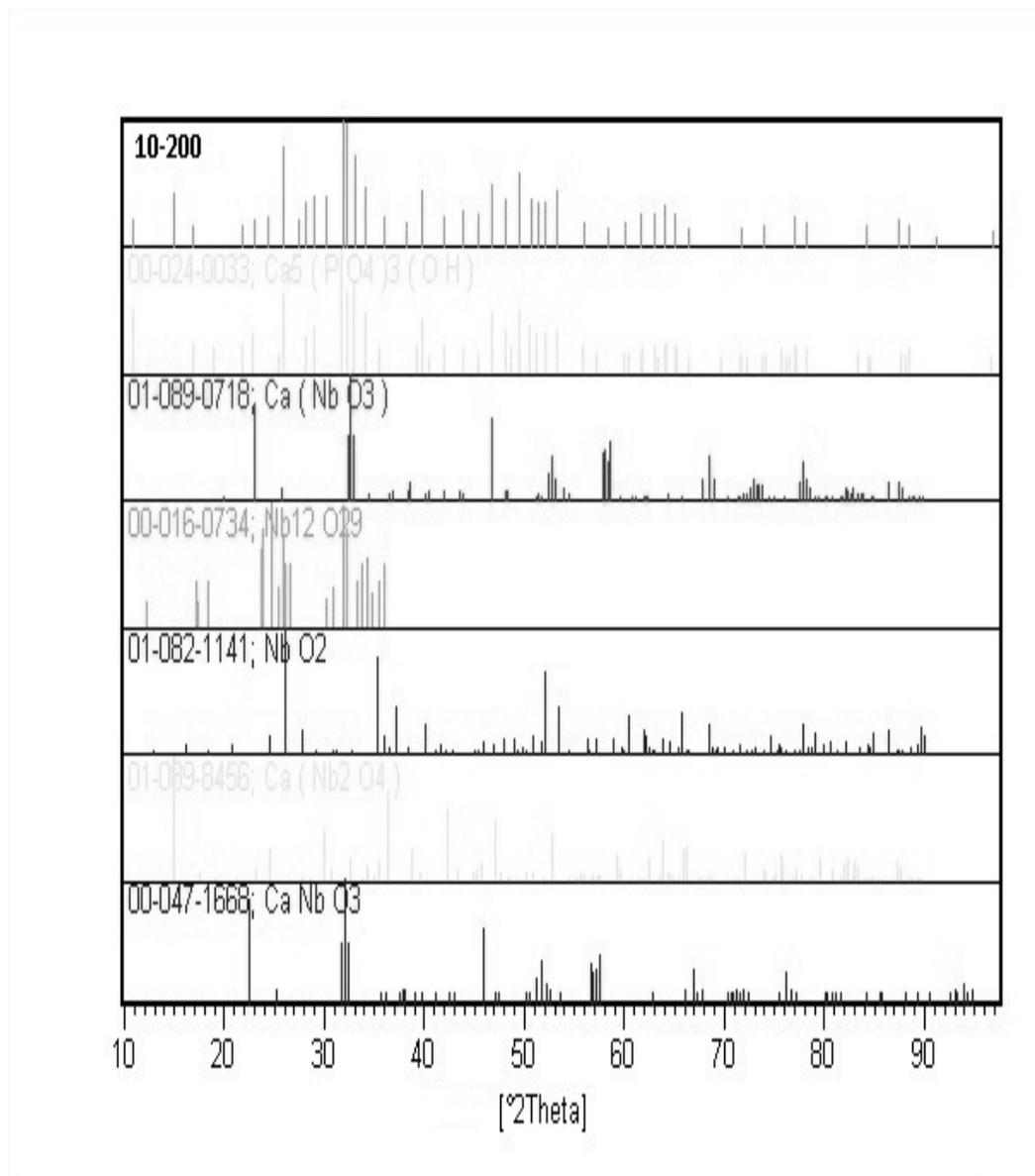


A correlação com os picos desconhecidos com os compostos  $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , ficha PDF-2 00-003-0421, pode ser descartada devido a não presença de grupos pirofosfato na análise por espectroscopia por infravermelho para esta amostra 10-200.

A formação do fosfato tricálcico  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , ficha PDF-2 00-018-0303, também não mostrou correlação enquanto a fase monetita mostra alguma correlação dos picos e isto pode ser possível devido ao mecanismo de formação da hidroxiapatita nesta síntese.

Em seguida nova comparação qualitativa agora com compostos relacionados ao nióbio e apesar de alguns mostrarem correlação com os picos procurados, todos estes compostos apresentam o nióbio(V) em outro estado de oxidação o que devido à composição da síntese hidrotermal torna pouco provável que tenha ocorrido à redução do nióbio (V).

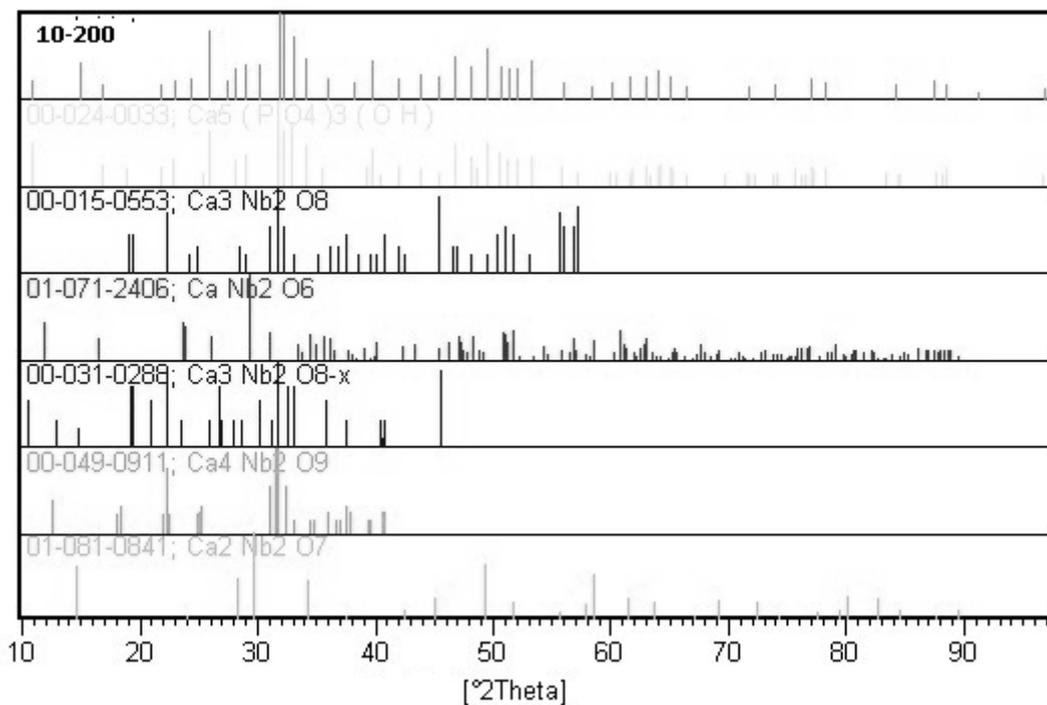
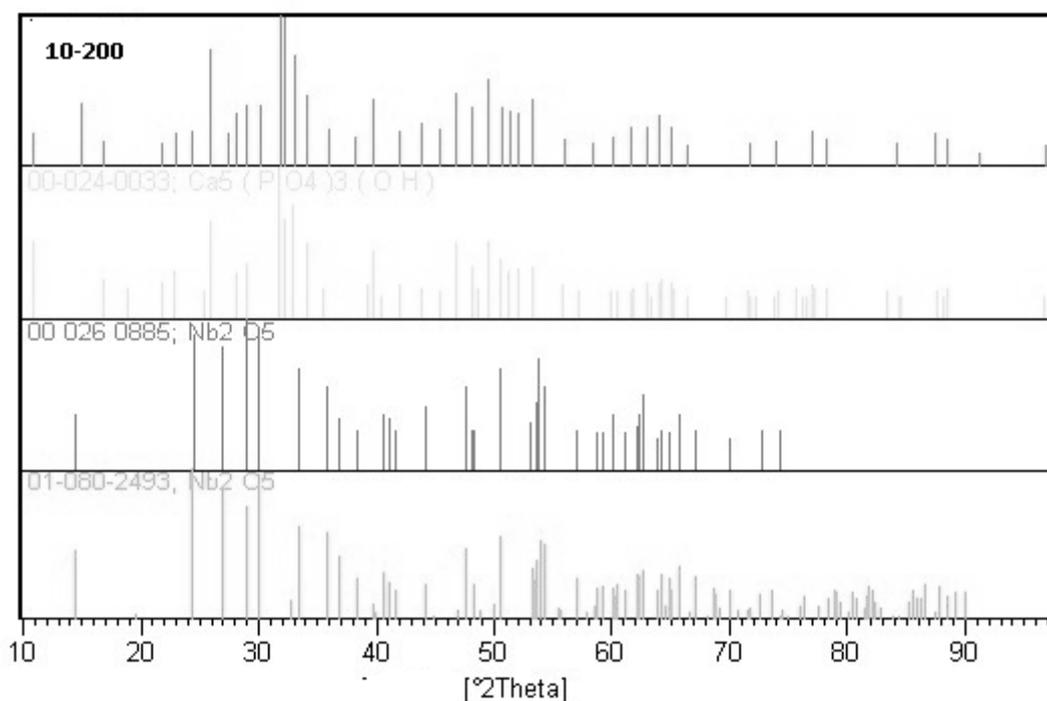
**FIGURA 69 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA 10-200 COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2 DA AMOSTRA 10-200 COM COMPOSTOS DE NIÓBIO: 00-024-0033,01-089-1718,00-016-0734,01-082-1141,01-089-8456 E 00-047-1668.**



A comparação seguinte foi realizada pesquisando os óxidos de nióbio conforme visto na (figura 70).

Pode-se verificar uma melhor aproximação com estas fases e os picos não identificados.

**FIGURA 70 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X COMPARATIVOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA 10-200 COM DIFRATOGRAMAS GERADOS PELAS FICHAS PDF-2 DA AMOSTRA 10-200 COM ÓXIDOS DE NIÓBIO: 00-024-0033,00-015-0553,01-071-2406,00-031-0228,00-049-0911 E 01-081-0841.**



O quadro 15 nos mostra um resumo das possíveis fases nestes picos não identificados com a fase de hidroxiapatita.

**QUADRO 15**

QUADRO 15- POSSÍVEIS FASES CORRELACIONADAS	
~2θ	Composto
14.99	01-078-1050 $\text{Ca}_{75}\text{Nb}_3\text{O}_6$ 01-089-8456 $\text{Ca}(\text{Nb}_2\text{O}_4)$ 00-031-0288 $\text{Ca}_3\text{Nb}_2\text{O}_{8-x}$
24.43	01-078-1415 $\text{CaNb}_2(\text{P}_4\text{O}_{13})(\text{P}_2\text{O}_7)\text{O}$ 00-015-0553 $\text{Ca}_3\text{Nb}_2\text{O}_8$ 00-016-0734 $\text{Nb}_{12}\text{O}_{29}$ 00-026-0885 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 01-082-1141 $\text{NbO}_2$ 01-080-2493 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 01-0898456 $\text{Ca}(\text{Nb}_2\text{O}_4)$
27.40	01-078-1415 $\text{CaNb}_2(\text{P}_4\text{O}_{13})(\text{P}_2\text{O}_7)\text{O}$ 01-081-0752 $\text{Ca}(\text{P}_2\text{Nb}_2\text{O}_{11})$ 01-078-1050 $\text{Ca}_{75}\text{Nb}_3\text{O}_6$ 01-089-8546 $\text{Ca}(\text{Nb}_2\text{O}_4)$
30.15	01-78-1415 $\text{CaNb}_2(\text{P}_4\text{O}_{13})(\text{P}_2\text{O}_7)\text{O}$ 00-002-1351 $\text{CaHPO}_4$ 00-016-0734 $\text{Nb}_{12}\text{O}_{29}$ 00-026-0885 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 01-080-2493 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 01-089-8456 $\text{Ca}(\text{Nb}_2\text{O}_4)$ 00-031-0288 $\text{Ca}_3\text{Nb}_2\text{O}_{8-x}$
36.03	01-081-0752 $\text{Ca}(\text{P}_2\text{Nb}_2\text{O}_{11})$ 00-002-1351 $\text{CaHPO}_4$ 00-003-0421 $\text{CaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 00-015-0553 $\text{Ca}_3\text{Nb}_2\text{O}_8$ 00-016-0734 $\text{Nb}_{12}\text{O}_{29}$ 00-026-0885 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 01-082-1141 $\text{NbO}_2$ 01-080-2493 $\text{Nb}_2\text{O}_5$ 01-089-8456 $\text{Ca}(\text{Nb}_2\text{O}_4)$ 01-071-2406 $\text{CaNb}_2\text{O}_6$ 00-031-0288 $\text{Ca}_3\text{Nb}_2\text{O}_{8-x}$ 00-049-0911 $\text{NbO}_2$ 00-039-0915 $\text{HCa}_2\text{Nb}_3\text{O}_{10} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$

A formação do pentóxido de nióbio,  $Nb_2O_5$ , está coerente com o trabalho de Jehgn e Wachs (1991), sobre o comportamento dos compostos de nióbio em solução aquosa em que as espécies iônicas de oxalato de nióbio formam o pentóxido de nióbio hidratado,  $Nb_2O_5 \cdot nH_2O$ , em soluções ácidas acima de 3.0, condições que são satisfeitas pelo uso do precursor e pelo pH da síntese.

Outros compostos possíveis em função dos grupos funcionais presentes na solução seriam o oxalato de cálcio,  $Ca_2CO_4$ , e que apresenta picos nestas regiões, mas a análise por espectroscopia no infravermelho não apresentou bandas características do grupo oxalato em torno de  $1680,1629\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu$  assimétrica (COO);  $1380, 1304\text{ cm}^{-1}$  para  $\nu$  simétrica (COO) e  $800-700\text{ cm}^{-1}$  para  $\delta$ (O-C-O) assim como o citrato de cálcio.

A dificuldade em se identificar compostos de nióbio requer às vezes para novos materiais que se utilize de informações relacionadas ao tântalo, elemento que possui similariedade com o nióbio, para a correta identificação do material obtido. Liu et.al (2010) trabalhando hidrotérmicamente com pentóxido de nióbio em meio alcalino com amônia obtiveram um material difícil de ser identificado, o  $H_2(H_2O)Nb_2O_6$  e para a identificação recorreram à ficha JCPDS No. 74-655 correspondente ao  $H_2(H_2O)Ta_2O_6$  visto que este material também possui picos de difração nestes ângulos  $2\theta$  assim como os obtidos neste trabalho.

Na seção sobre a análise do comportamento térmico das amostras, a amostra 10-200 foi submetida à sinterização em uma temperatura de  $1000^\circ\text{C}$  de modo a estabelecer uma tentativa em esclarecer os picos de difração não identificados e observou-se que alguns picos continuaram a aparecer especialmente na região de  $2\theta$  entre  $36-37^\circ$  e  $27-30^\circ$ . Analisando o quadro 14 os compostos  $Nb_2O_5$  e  $Ca_3Nb_2O_{8-x}$  aparecem como ser os mais viáveis como as fases não correspondentes aos picos.

#### **4.4.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS**

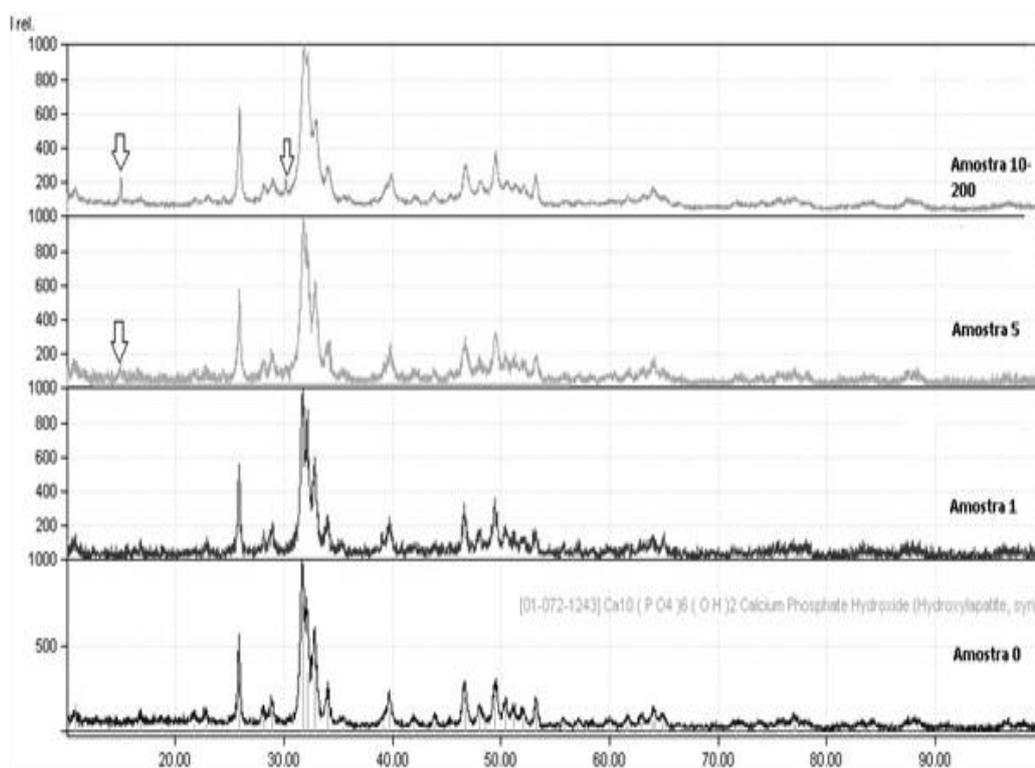
A técnica de difração de raios X permite obter dados que podem fornecer informações úteis a caracterização do material.

Como visto nos resultados posteriores à adição do precursor de íons nióbio (V) influencia na formação de fases visto que a amostra mais concentrada apresenta uma quantidade maior de fases não identificadas.

Na figura 71 correspondente aos difratogramas de raios X de todas as amostras pode-se visualizar os principais picos não identificados como fases de hidroxiapatita nas amostras 5 e 10-200 nas flechas indicativas.

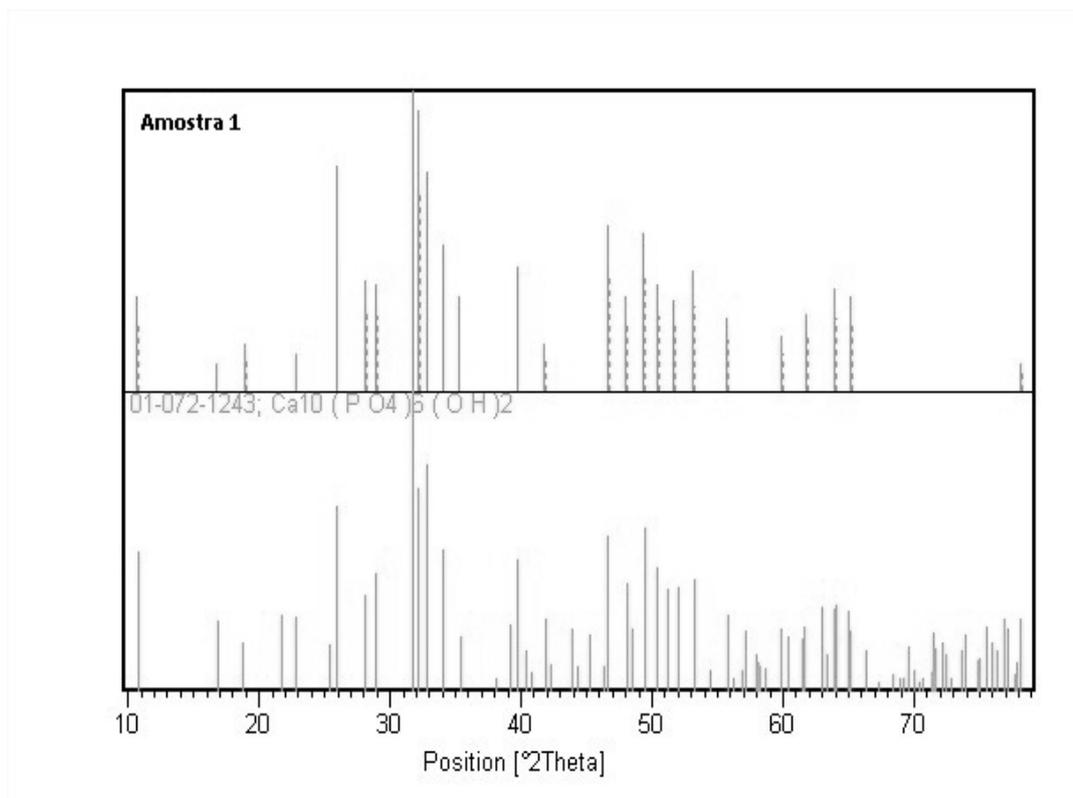
Com isso, podemos ter uma clara indicação que o aumento da aditivação tenha causado o surgimento de fases secundárias provavelmente de pentóxido de nióbio como visto na análise por difração de raios X.

**FIGURA 71- DIFRATOGRAMAS DAS AMOSTRAS OBTIDAS RELACIONANDO ALGUNS PICOS NÃO CORRESPONDENTES A FASE DE HIDROXIAPATITA: AMOSTRA 10-200 (PARTE SUPERIOR), AMOSTRA 5, AMOSTRA 1 E AMOSTRA 0 (PARTE INFERIOR)**



Na figura 72 a simulação do difratograma da amostra 1 com o padrão PDF-2 01-072-1243 pode-se observa-se a concordância dos picos e o não aparecimento de picos das fases da figura 71 o que sugere uma melhor incorporação dos íons nióbio (V) nesta amostra.

**FIGURA 72-DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA 1 COM DIFRATOGRAMA GERADO PELA FICHA PDF-2: 01-072-1243 E COMPARAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES DA AMOSTRA.**



A amostra 1 é a que possui a menor aditivção e é plausível que íons Nb(V) poderiam se incorporar na estrutura da hidroxiapatita em uma substituição intersticial sem a formação de compostos derivados do nióbio.

Tamai e Isama (2007), como já citado sugerem que o monômero aniônico  $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$  é mais favorável à incorporação substitucional na hidroxiapatita nas posições do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  devido à semelhança nos raios iônicos e a estabilidade eletrônica, mas levando-se em conta o pH da síntese utilizado neste trabalho e a literatura disponível também já citada, o  $[\text{NbO}_2(\text{OH})_4]^{-3}$  seria uma explicação plausível para uma possível substituição em grupos fosfatos assim como ocorre em substituições com grupos carbonato mas conforme a literatura citada neste trabalho a complexidade da química em solução aquosa dos íons nióbio com a possibilidade de diversas espécies químicas dificulta a interpretação dos resultados.

A partir dos difratogramas obtidos pode-se conseguir algumas informações sobre uma amostra além da confirmação das fases presentes.

Em relação ao efeito das substituições e incorporações iônicas na estrutura da hidroxiapatita, alguns autores costumam calcular o tamanho dos cristalitos em hidroxiapatitas substituídas usando a equação de Scherrer, e a partir dos dados obtidos nos difratogramas

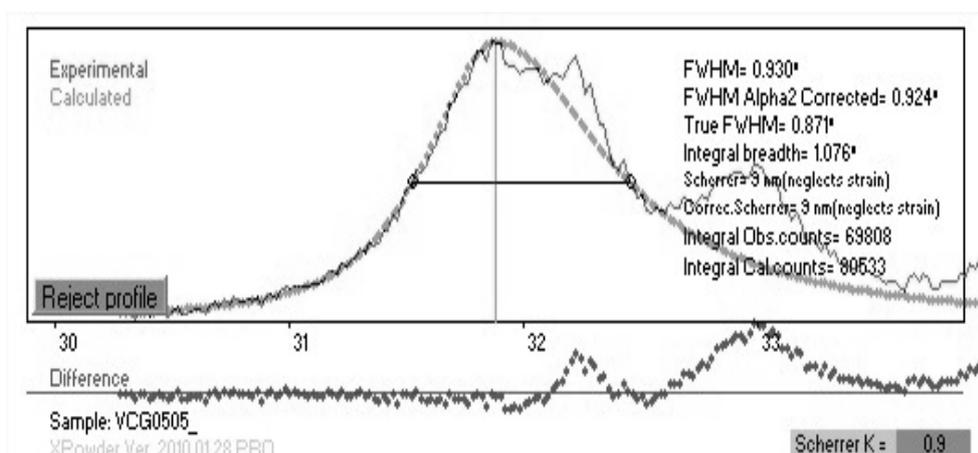
avaliar a influência do dopante, pois dependendo do raio atômico do elemento da dopagem, o tamanho do cristalito pode aumentar ou diminuir e demonstrar que o elemento de dopagem está influenciando no crescimento do cristal.

Xia et al. (2010), citam que o tamanho médio do cristalito diminui significativamente com a adição de estrôncio, flúor e silício na hidroxiapatita e justifica a importância de se analisar este parâmetro em hidroxiapatitas substituídas assim como os parâmetros da rede cristalina.

Os resultados do tamanho médio do cristalito para este trabalho estão tabulados na tabela 8.

Os cálculos foram realizados com auxílio do programa X Powder utilizando a função para cálculo do tamanho do cristalito, conforme exemplo mostrado na figura 73 para a amostra 10-200 e o pico de maior intensidade.

**FIGURA 73-ESTIMATIVA DO TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO UTILIZANDO O PROGRAMA XPOWDER**



**TABELA 8-TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO**

**TABELA 8 - RESULTADOS DO TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO**

Amostra	(L) Tamanho Médio Cristalito (nm)
0	10.6
1	10.6
5	10.3
10-200	9.6

**FONTE: AUTOR,2013**

Portanto não há praticamente uma diferença considerável no tamanho médio dos cristalitos em função da adição da dopagem com o precursor de nióbio (V) nas concentrações utilizadas nesta dissertação apesar da diminuição em 1 nm com a amostra mais aditivada, 10-200 em relação à amostra pura sendo necessário um aumento na concentração da aditivação para confirmar este efeito.

#### 4.3.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (IV-TF)

A análise espectroscópica IV-TF foi feita com objetivo de confirmar as fases identificadas na análise por DRX através da análise dos grupos funcionais identificados.

Os principais grupos funcionais presentes em ortofosfatos de cálcio e compostos de nióbio estão tabulados no quadro 16.

Estes valores serviram para a análise da caracterização por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier realizadas nas amostras.

**QUADRO 16**

QUADRO 16 – TABULAÇÃO DE DADOS DA LITERATURA DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO		
Ortofosfatos de Cálcio		
Grupo Funcional	Bandas	Referências <sup>[111,112,113,114,115]</sup>
PO <sub>4</sub> (v1) estiramento	960	(a) Aina et al. ( 2013)
	961-963	(b) Pandaet al. (2003)
PO <sub>4</sub> (v2) dobramento	430	(a)
	471	
PO <sub>4</sub> (v3) dobramento	~1050 ~1090 <sup>(a)</sup>	(a)
	1031-1038 e 1092-1096 <sup>(b)</sup>	
PO <sub>4</sub> (v4) dobramento	~570, ~610 e 630 <sup>(a)</sup>	(a)
	566,604 <sup>(b)</sup>	
CO <sub>3</sub> (v1)	~1050 ~1090	(a)
CO <sub>3</sub> (v2)	~870–880	(a)
CO <sub>3</sub> substituição tipo A	1544 e 879	(c) Yoshimura (2009)
CO <sub>3</sub> substituição tipo B	1451,1420 e 874	(c)
OH estiramento	3744	(b)
OH vibracional	635 633 632 633	(b)
OH estrutural	3431-3572	(d)Singh (2012)

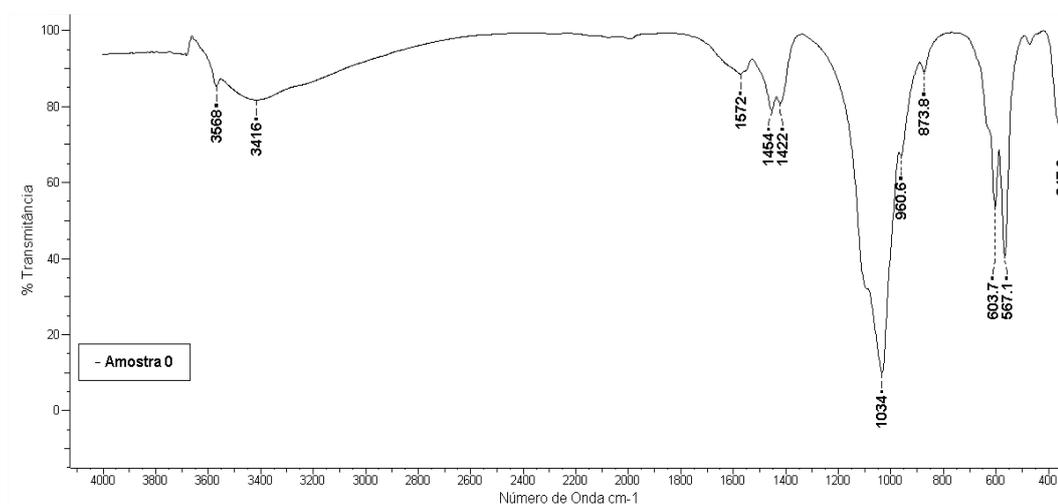
OH translacional	342	€Markovic (2004)
HPO <sub>4</sub>	875 larga e fraca	(e)
H <sub>2</sub> O adsorvida	3430-3440 e 1645-1650	(b)
Nióbio		
Nb=O, Nb-O do $\alpha$ -Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	478, 295	McDevit e Baun (1964)
Nb=O, Nb-O do $\Delta$ -Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	575, 455 (forte), 357	
Nb=O, Nb-O e O-C=O	$\nu$ (Nb=O) 889,886 $\delta$ (O-C=O) + $\nu$ (Nb-O) 479 $\nu$ (Nb-O) 540, 807, 826, 691,499	Medeiros et al.(2006)

Fonte:Autor,2013

#### 4.3.2.1 RESULTADOS DA ESPECTROCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A AMOSTRA 0

Os resultados da caracterização por espectroscopia de absorção do infravermelho da amostra não aditivada 0 mostrou os principais modos de absorção característicos da hidroxiapatita, representados pelas bandas com número de onda em 3568, 3416, 1572, 1454, 1422, 1034, 960.6, 873.8, 603.7, 567.1 e 347.2 cm<sup>-1</sup> conforme visto na figura 74.

**FIGURA 74- ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 0**



Estas bandas foram analisadas em função do quadro 16. A banda em 3568 cm<sup>-1</sup> foi atribuída ao grupo hidroxila OH<sup>-</sup> estrutural, 3416 cm<sup>-1</sup> a presença de H<sub>2</sub>O, 1572 cm<sup>-1</sup> a

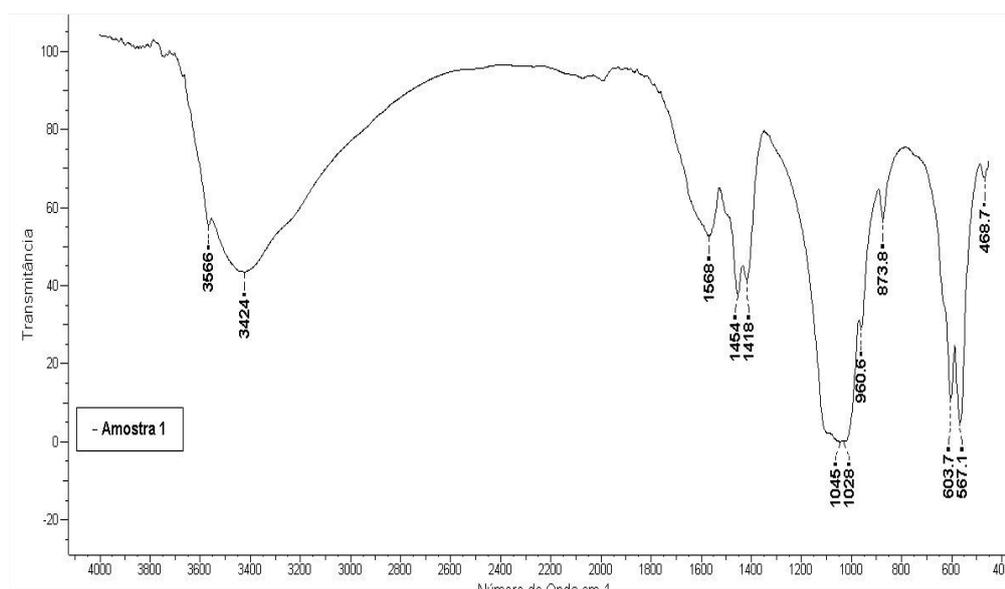
substituição do grupo  $\text{OH}^-$  por um grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ , 1454, 1422 e  $873.8 \text{ cm}^{-1}$  atribuído ao grupo carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$  que está provavelmente substituindo grupos fosfatos  $\text{PO}_4^{3-}$ , enquanto em  $1034 \text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  no modo dobramento v3, em  $960.6 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  estiramento v1, em  $603.7 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento v4, em  $567.1 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento v4 e a  $347.2 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo hidroxila.

#### **4.3.2.2 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A AMOSTRA 1**

Os resultados da caracterização por espectroscopia de infravermelho da amostra aditivada 1 mostrou os principais modos de absorção característicos da hidroxiapatita e praticamente o mesmo resultado que a amostra não aditivada 0 provavelmente devido à baixa quantidade de aditivação. Observou-se na figura 75 bandas com número de onda em 3566, 3424, 1568, 1454, 1418, 1045, 1028, 960.6, 873.8, 603,7, 567.1 e  $468.7 \text{ cm}^{-1}$ .

Estas bandas foram analisadas em função do quadro 16 sendo a banda em  $3566 \text{ cm}^{-1}$  assinalada ao grupo hidroxila  $\text{OH}^-$  estrutural,  $3424 \text{ cm}^{-1}$  a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ , 1454 e  $1418 \text{ cm}^{-1}$  atribuído à substituição tipo B do grupo carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$ , a 1045 e  $1028 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  no modo dobramento v3, em  $960.6 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  estiramento v1, em  $603.7 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento v4, em  $567.1 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento v4 e uma banda em  $472.6 \text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  (v2) dobramento.

Uma banda em  $1568 \text{ cm}^{-1}$  indica a substituição do grupo hidroxila  $\text{OH}^-$  pelo grupo carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$  de modo que provavelmente tenha ocorrido uma substituição do tipo AB na rede cristalina das amostras.

**FIGURA 75- ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 1**

A substituição do tipo AB provoca uma diminuição da cristalinidade das amostras e alterações nos parâmetros cristalinos da amostra. Xiao e et.al (2008) estudando hidroxiapatita nanocarbonatadas obtidas por síntese hidrotérmica, creditam ao íons carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$ , o aumento do parâmetro de rede  $a$  e a diminuição do parâmetro de rede  $c$  quando ocorre a substituição do tipo A e a diminuição do parâmetro de rede  $a$  e o aumento do parâmetro de rede  $c$  quando da substituição do tipo B pelo fato do comprimento da ligação P-O ser menor que o comprimento da ligação C-O.

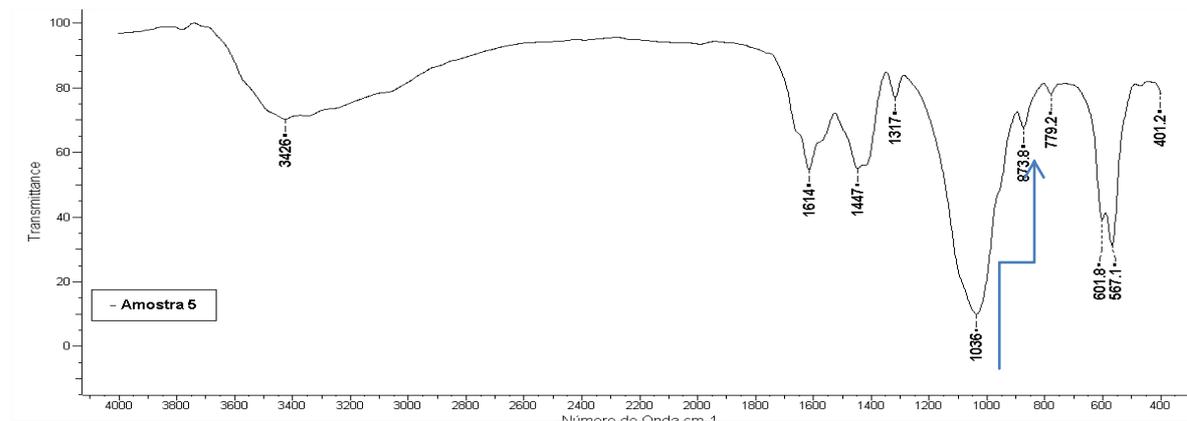
#### 4.3.2.3 RESULTADOS DA ESPECTROCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A AMOSTRA 5

Os resultados da caracterização por espectroscopia de absorção do infravermelho da amostra aditivada 05 mostrou os principais modos de absorção característicos da hidroxiapatita, representados pelas bandas com número de onda em 3426, 1614, 1447, 1317, 1036, 873.8, 779.2, 601.8, 567.1 e 401.2  $\text{cm}^{-1}$  conforme visto na figura 76.

Estas bandas foram analisadas em função da tabela. A banda em 3426  $\text{cm}^{-1}$  e a 1614  $\text{cm}^{-1}$  indicam água adsorvida na superfície, em 1447  $\text{cm}^{-1}$  atribuído à substituição tipo B do grupo carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$ , a 1036  $\text{cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  no modo dobramento ( $\nu_3$ ), em 601.8  $\text{cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento ( $\nu_4$ ), em 567.1  $\text{cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento ( $\nu_4$ ) e uma banda em 401.2  $\text{cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_2$ ) dobramento. As bandas em 873.6 e 1317  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup> são atribuídas ao grupo carbonato enquanto a ligação Nb-O é encontrada em  $779.2\text{ cm}^{-1}$  que não foi encontrada na amostra 1.

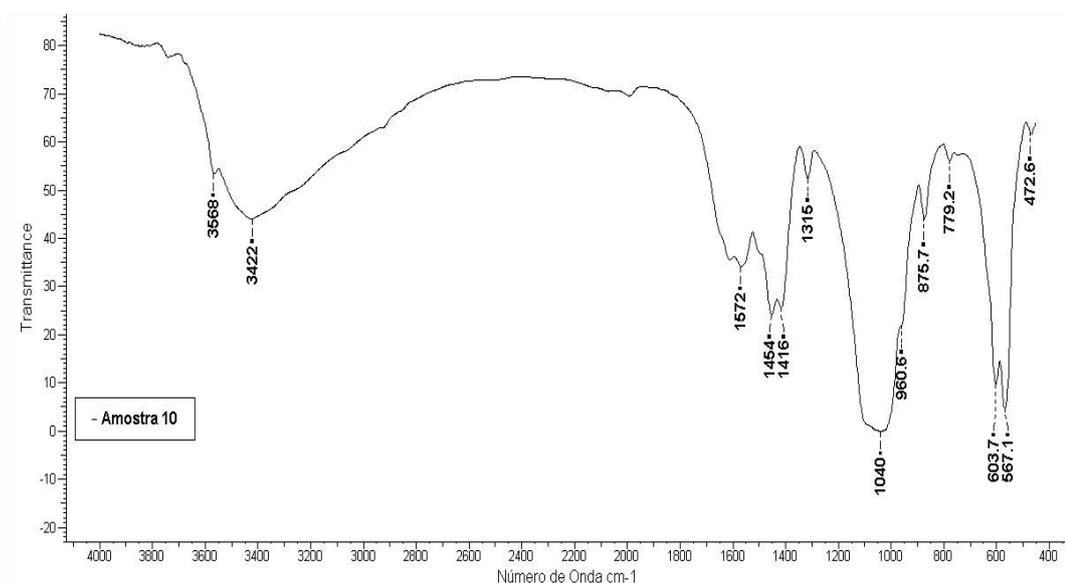
**FIGURA 76 - ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 5**



#### 4.3.2.4 RESULTADOS DA ESPECTROCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA A AMOSTRA 10-200

Os resultados da caracterização por espectroscopia de infravermelho da amostra aditivada 10-200, (figura 77), a mais concentrada com o precursor de nióbio, mostrou os principais modos de absorção característicos da hidroxiapatita, representados pelas bandas com número de onda em 3568, 3422, 1572, 1454, 1416, 1315, 1040, 960.5, 875.7, 779.2, 603.7, 567.1 e  $472.6\text{ cm}^{-1}$ .

FIGURA 77- ESPECTRO INFRAVERMELHO DA AMOSTRA 10-200



Estas bandas foram analisadas em função da tabela assinalando a banda em  $3568\text{ cm}^{-1}$  ao grupo hidroxila  $\text{OH}^-$  estrutural,  $3422\text{ cm}^{-1}$  a presença de  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $1454$  e  $1416\text{ cm}^{-1}$  atribuído à substituição tipo B do grupo carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$ , a  $1040\text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  no modo dobramento  $\nu_3$ , em  $960.5\text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  estiramento  $\nu_1$ , em  $603.7\text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento  $\nu_4$ , em  $567.1\text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  modo dobramento  $\nu_4$  e uma banda em  $472.6\text{ cm}^{-1}$  ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_2$ ) dobramento.

Outras bandas são assinaladas a substituição do grupo carbonato tipo A em  $1572\text{ cm}^{-1}$ , uma banda em  $1315\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação C-O provavelmente do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ .

A presença de grupos carbonatos e bandas características da substituição do tipo A e B indica que grupos hidroxila e fosfatos, respectivamente, estão sendo substituídos por grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  e este fato pode ser atribuído a decomposição da ureia e dos grupos citrato e oxalato.

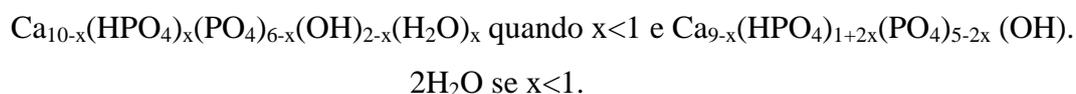
Devido a sua característica polimórfica o pentóxido de nióbio apresenta diversas estruturas cristalinas dependendo da temperatura sendo habitualmente designadas por letras. A banda na região de  $779\text{ cm}^{-1}$  começou a surgir a partir das amostras aditivadas 5 e 10-200 e não puderam ser assinaladas em função do quadro 16 mas no entanto Macek e Orel (1997), atribuíram a essa faixa de absorção à ligação Nb-O no modo estiramento do pentóxido de nióbio mas não distinguindo entre as fases cristalinas TT-, T- e H- do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

A fase amorfa é estável à temperatura ambiente entretanto a temperaturas acima de  $300^\circ\text{C}$  ocorre a transformação para a fase TT- e como a temperatura de síntese hidrotérmica adotada foi de  $160$  e  $200^\circ\text{C}$ , possivelmente tenha se obtido em virtude das condições

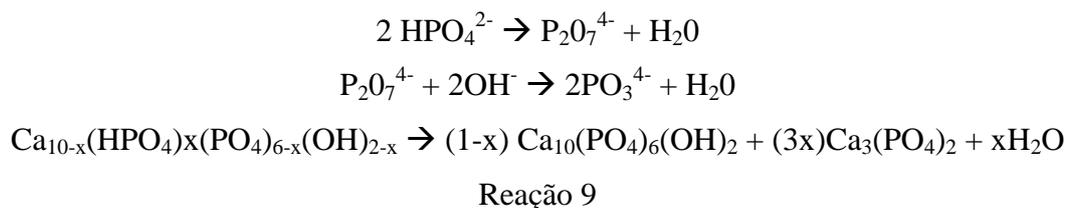
hidrotérmicas de pressão e temperatura, nas amostras 5 e 10-200, a formação da fase cristalina do pentóxido de nióbio.

Além disso, não foi possível assinalar bandas de absorção para a ligação Nb=O utilizando-se a comparação com os valores citados na literatura e isto pode ser possível devido ao fato das bandas destas regiões situarem-se na mesma região dos grupos fosfatos da hidroxiapatita.

As bandas de absorção próximas a  $875\text{ cm}^{-1}$  foram analisadas após o tratamento térmico das amostras pois sabe-se que a presença de grupos  $\text{HPO}_4^{2-}$  na estrutura poderá originar a hidroxiapatita deficiente em cálcio conhecida como fosfatos de cálcio amorfos (CDHA), sendo estes compostos metaestáveis em soluções aquosas que podem transformar-se em hidroxiapatita dependendo das condições da síntese empregada. As fórmulas estruturais são:



Quando submetidos a temperaturas acima de  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , os grupos  $\text{HPO}_4^{2-}$  transformam-se no grupo pirofosfato  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  e, além disto, a hidroxiapatita deficiente em cálcio sofre a transformação para fosfato tricálcico a  $650\text{ }^\circ\text{C}$  seguindo o mecanismo da reação 9:

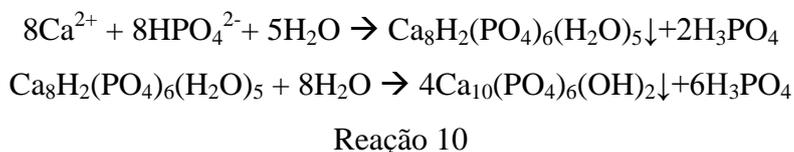


O uso do MAP como precursor de fósforo poderia originar fosfatos de cálcio como a CDHA devido à dissociação do sal em solução aquosa que libera os íons  $\text{HPO}_4$ .

Como visto nos espectrogramas a  $800$  e  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  comparados com a amostra mais aditivada 10-200 ainda há a presença da banda na região de  $873.8\text{ cm}^{-1}$  mesmo depois do tratamento térmico o que sugere a não presença dos grupos  $\text{HPO}_4$  e sua transformação para grupos pirofosfato  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  e assim evidencia-se a uma possível banda de carbonato  $(\text{CO}_3)^{2-}$  nesta banda de absorção.

Outra informação que se consegue extrair é a posição dos grupos fosfatos  $\text{PO}_4^{3-}$  próximos a  $960\text{ cm}^{-1}$  já que normalmente o fosfato de cálcio amorfo reduz para  $950\text{ cm}^{-1}$  a posição deste grupo, (figura 78).

A formação do fosfato de octacálcio (OCP),  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , também segue o mesmo raciocínio do exposto acima, sendo que Chen et.al (2010) trabalhando também com a decomposição da ureia para precipitação da hidroxiapatita citam as reações de transformação do OCP em hidroxiapatita:

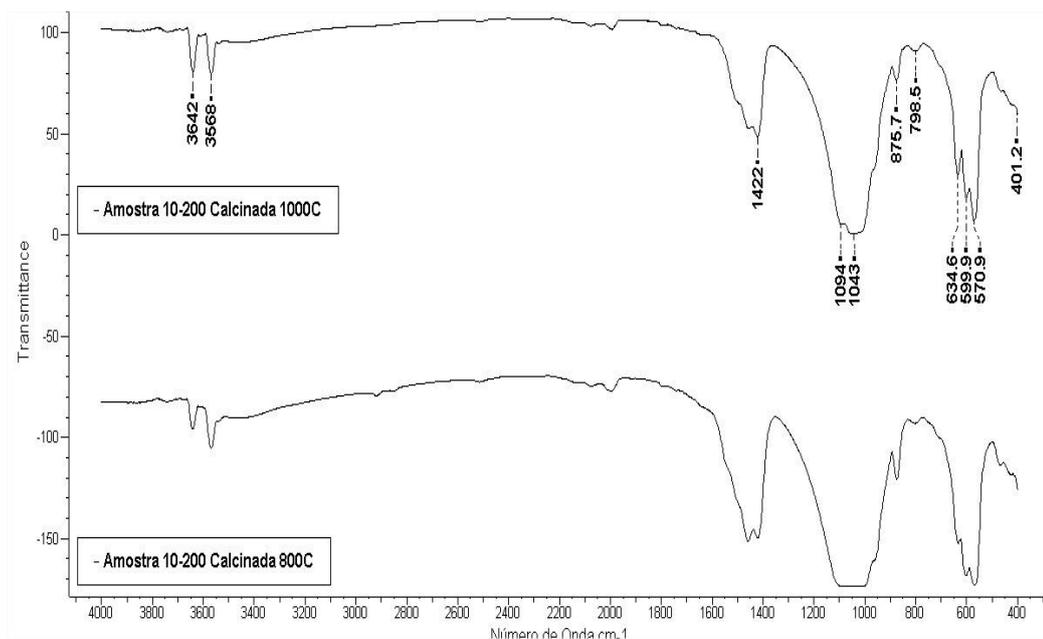


Isto sugere que se esta formação de compostos metaestáveis ocorreu durante a síntese hidrotermal, eles sofreram transformação completa para a fase de hidroxiapatita.

Outra informação obtida desta comparação é o aumento da cristalinidade das amostras tratadas termicamente observado pelo deslocamento da banda em  $958 \text{ cm}^{-1}$  para  $962 \text{ cm}^{-1}$  do grupo fosfato da amostra 10-200 submetida a calcinação a  $1000^\circ\text{C}$  além dos aumentos da resolução dos picos de hidroxila na região de  $3500\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ , o surgimento do triplete na região de  $570\text{-}635 \text{ cm}^{-1}$  e o deslocamento da banda da ligação Nb-O para  $798.5 \text{ cm}^{-1}$  como observado na figura 78.

A importância em se controlar a cristalinidade da amostra depende do tipo de aplicação, Sanosh et.al (2009) relatam que aplicações odontológicas exigem hidroxiapatitas mais cristalinas devido o aumento da resistência química as diferentes variações do pH na boca e a baixa reabsorbilidade enquanto amostras mais amorfas são mais adequadas quando há exigência de osteointegração como em implantes ortopédicos.

**FIGURA 78 - ESPECTRO INFRAVERMELHO COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA**



Observa-se que as bandas de absorção na região do infravermelho em 1422 e 875  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes aos grupos carbonato  $\text{CO}_3^{-2}$  diminuem após a calcinação nas temperaturas de 800 e 1000°C.

A presença de grupo carbonatos em todas as amostras pode ser considerada benéfica se considerarmos que a hidroxiapatita biológica possui de 2-8 % em peso em sua estrutura o que aumentaria a biocompatibilidade de amostras de hidroxiapatita carbonatadas mas também deve-se considerar que a presença de grupos carbonatados diminui a solubilidade da hidroxiapatita.

### 4.3.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A análise espectroscópica de espalhamento Raman foi realizada com o objetivo de confirmar as fases identificadas na análise por DRX através da análise dos grupos funcionais identificados nos espectrogramas Raman.

O espectro Raman característico da hidroxiapatita apresenta essencialmente quatro bandas de espalhamento sendo que a presença de um pico forte entre 960-963  $\text{cm}^{-1}$  está associada ao estiramento simétrico  $\nu_1$  do tetraedro  $\text{PO}_4^{-3}$  e caracteriza a presença da fase de hidroxiapatita.

O modo vibracional  $\nu_3$  é associado ao modo triplo degenerado do estiramento assimétrico e o modo vibracional de dobramento  $\nu_4$  é relacionado à tripla degeneração da ligação O-P-O enquanto o modo vibracional de dobramento  $\nu_2$  a dupla degeneração da ligação O-P-O enquanto picos entre 50 a 320  $\text{cm}^{-1}$  podem ser relacionados aos modos translacionais do íon  $\text{Ca}^{2+}$  e modos rotacionais e vibração da rede do  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Nos óxidos de nióbio (V) as bandas entre 900 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao modo de vibração de estiramento das ligações terminais de Nb=O. Na região de 850-880  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída as ligações Nb-O-Nb entre grupos  $\text{NbO}_6$  ligados pelo vértice.

A forma polimórfica B- $\text{Nb}_2\text{O}_5$  como visto na tabela apresenta a maior intensidade em 760  $\text{cm}^{-1}$  o que a difere de outros compostos de nióbio.

Para a análise dos picos apresentados na espectroscopia Raman, tabulou-se dados obtidos da literatura para a hidroxiapatita e compostos de nióbio que estão apresentados no quadro 17.

QUADRO 17

QUADRO 17- TABULAÇÃO DE DADOS DA LITERATURA DE ESPECTROSCOPIA RAMAN			
Material	Bandas (cm-1)	Grupo Funcional	Referência <sup>[57,121,122]</sup> [23]
Hidroxiapatita Biológica no Osso	422-454 568-617 957-962 1003-1005 1006-1055 1065-1071	$\text{PO}_4^{-3} \nu_2$ $\text{PO}_4^{-3} \nu_4$ $\text{PO}_4^{-3} \nu_1$ $\text{HPO}_4^{-3} \nu_3$ $\text{PO}_4^{-3} \nu_3$ $\text{CO}_3^{-2}$	Khan et al. (2013)
Soluções Aquosas de Oxalato de Nióbio	918- 932-943	Nb-O estiramento	Jehng e Wachs (1991)
Óxido de Nióbio (H-Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )  N-Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  B-Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	260 (duplete forte),232 (forte),204(médio),350,470,550 (fraco),625(duplete forte), 670(médio),850 (fraco),883 (duplete médio) e 995 (forte) 995 (forte), 885 (médio), 670(médio), 618 (forte), 550 (fraco), 485(fraco), 350 (fraco), 260 (forte), 220 (médio).  935 (forte). 760 (forte), 625 (médio), 605 (médio), 550 (forte), 475 (médio). 450 (médio), 370 (forte), 260 (duplete forte), 200 (forte).		Rao et.al. (1976)

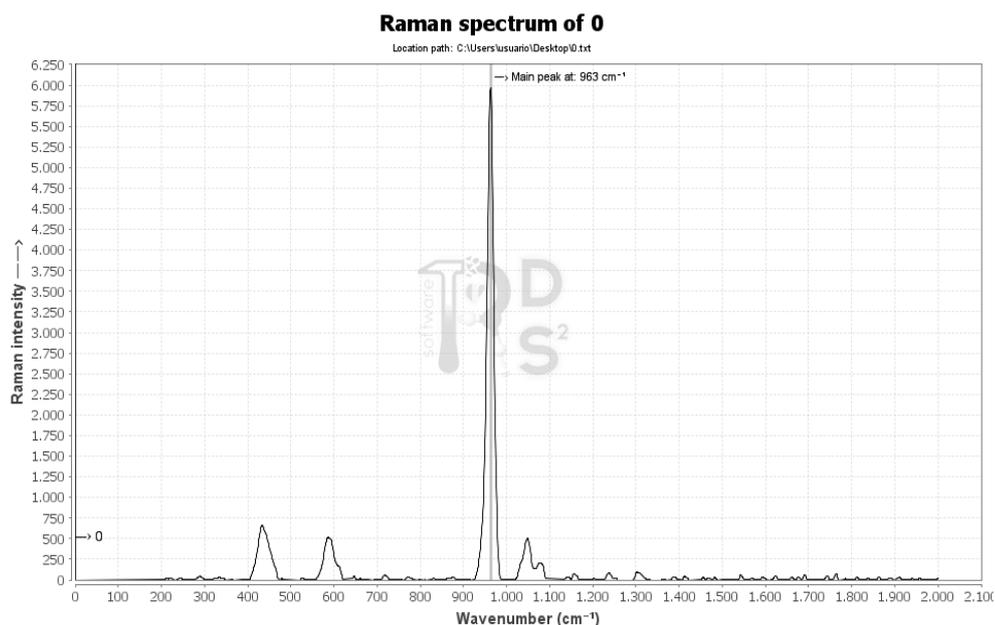
FONTE:AUTOR,2013

#### 4.3.3.1 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A AMOSTRA 0

A amostra 0 que é não aditivada apresentou picos principais em  $434\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_2$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ , em  $587\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_4$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $963\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_1$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $1048\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_3$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ .

O espectro obtido é mostrado na figura 79 sendo o pico de maior intensidade a  $963\text{ cm}^{-1}$  característico da hidroxiapatita.

FIGURA 79 - ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 0

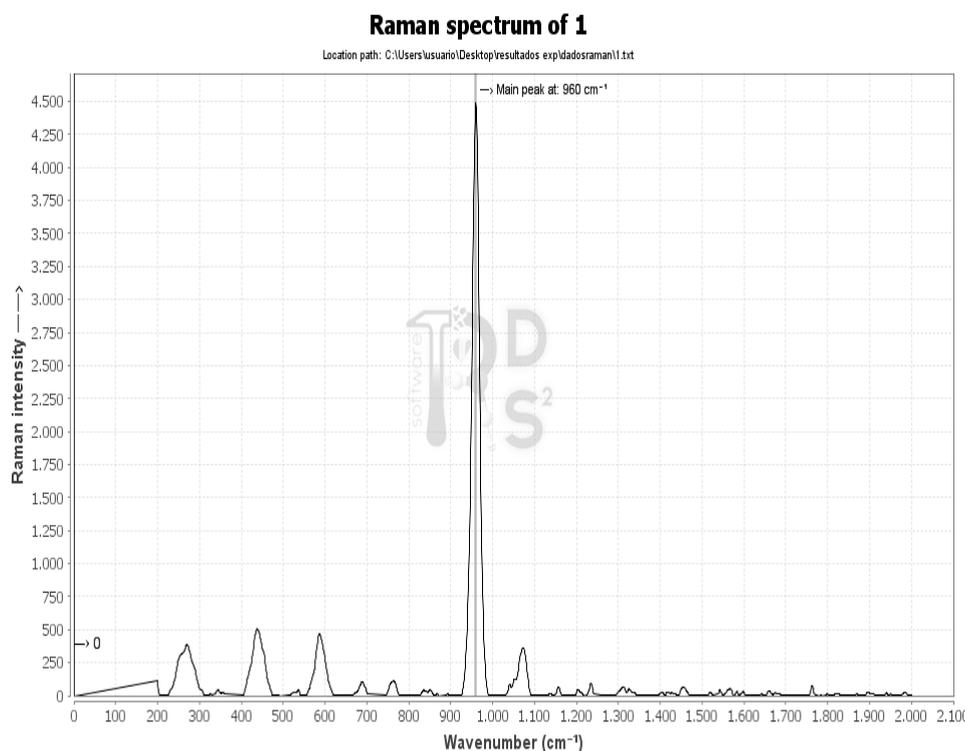


#### 4.3.3.2 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A AMOSTRA 1

A amostra 1 é a que apresenta a menor aditivação com o precursor de nióbio e teve picos identificados em 270, 438, 587, 960 e  $1073\text{ cm}^{-1}$  na figura 80. Levando em conta a tabela para análise pode-se associar o pico em  $438\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_2$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ , em  $587\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_4$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $960\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_1$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  sendo este o pico de maior intensidade o que caracteriza ainda a hidroxiapatita como fase principal. Em  $1073\text{ cm}^{-1}$  a literatura consultada indica a presença de carbonatos devido ao modo  $\nu_1$  do grupo  $\text{CO}_3^{-2}$  mas é possível também à presença de ligações do óxido de nióbio que podem ser deslocadas para intensidades de maior energia devido a distorções da

rede, pois a  $270\text{ cm}^{-1}$  podemos ter uma banda associada aos elementos metálicos como o nióbio ou o cálcio.

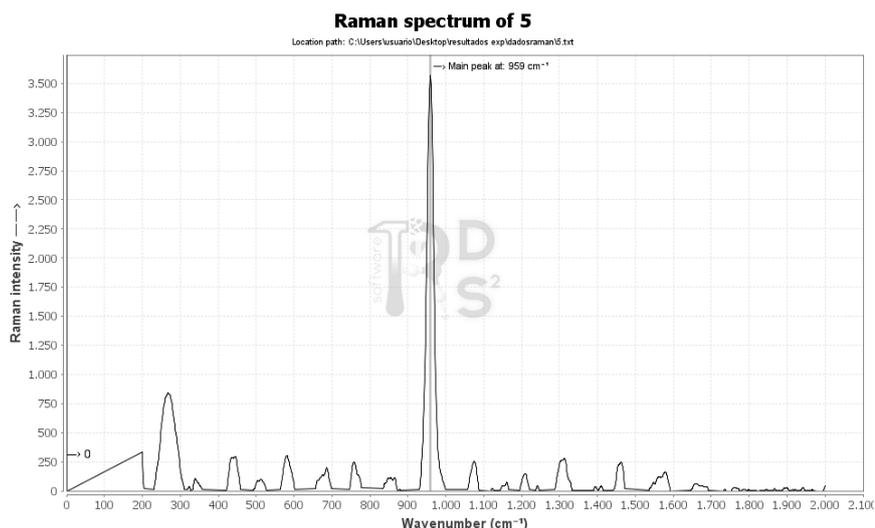
**FIGURA 80 - ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 1**



#### 4.3.3.3 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A AMOSTRA 5

A amostra 5 também apresenta bandas características da hidroxiapatita apresentou picos principais em  $444\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_2$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ , em  $581\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_4$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $959\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_1$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $1075\text{ cm}^{-1}$  devido ao modo  $\nu_3$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  na figura 81.

O espectro obtido é mostrado na figura sendo o pico de maior intensidade a  $959\text{ cm}^{-1}$  característico da hidroxiapatita. A amostra 5 apresenta diferentemente da amostra 1, o pico em  $268,686,758,846\text{ cm}^{-1}$  possivelmente relacionados às ligações nióbio e oxigênio.

**FIGURA 81 - ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 5**

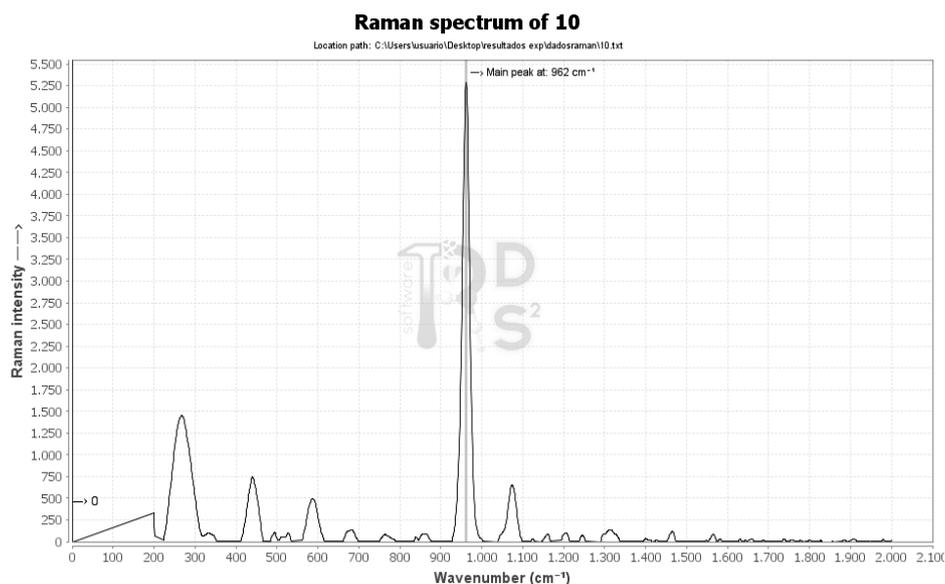
#### 4.3.3.4 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A AMOSTRA 10-200

A amostra 10-200 que é a de maior aditivaco apresentou as bandas principais da hidroxiapatita.

Em 440 cm<sup>-1</sup> devido ao modo  $\nu_2$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ , em 587 cm<sup>-1</sup> devido ao modo  $\nu_4$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ , 962 cm<sup>-1</sup> devido ao modo  $\nu_1$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  e 1074 cm<sup>-1</sup> devido ao modo  $\nu_3$  do grupo  $\text{PO}_4^{-3}$  na figura 82.

O espectro obtido é mostrado na figura sendo o pico de maior intensidade a 962 cm<sup>-1</sup> característico da hidroxiapatita. A amostra 10-200 apresenta picos aproximadamente em 268, 679, 760, 867 cm<sup>-1</sup> que podem estar relacionados às ligações nióbio e oxigênio. A banda a 679 cm<sup>-1</sup> pode ser atribuída a poliedros presentes no pentóxido de nióbio hidratado, a 867 a ligação Nb-O-Nb e em 760 cm<sup>-1</sup> a ligação Nb-O que estão em concordância com os resultados sugeridos por Braga (2007) no entanto maiores estudos são necessários para esta confirmação.

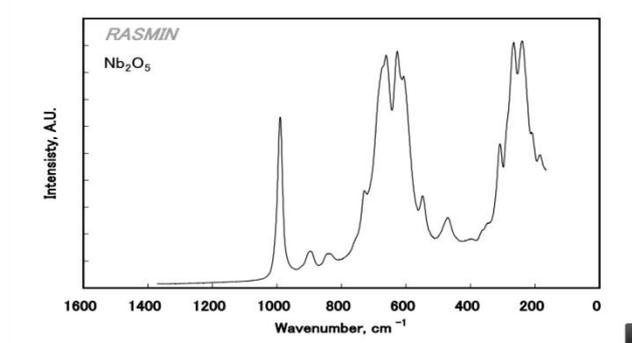
**FIGURA 82- ESPECTRO RAMAN DA AMOSTRA 10-200**



Não há bandas características do precursor complexo amoniacal de nióbio segundo o quadro 17 de consulta o que sugere a completa dissociação e transformação do precursor durante a síntese.

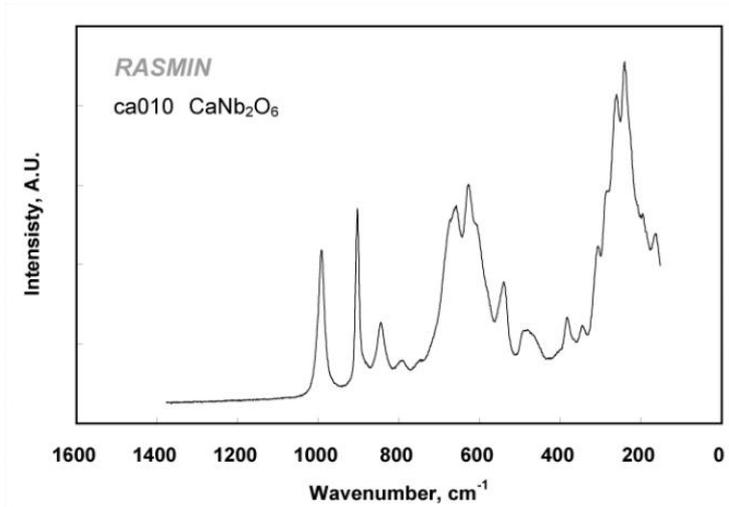
A consulta ao banco de dados RASMIN<sup>[120]</sup> (Raman Spectra Database of Minerals and Inorganic Minerals) pode-se encontrar um espectro do pentóxido de nióbio, (figura 83), e comparando-se ao espectrograma da amostra 10-200 pode-se notar aproximações entre eles e os picos não assinalados como hidroxiapatita, mas devido ao polimorfismo dos compostos de nióbio e a influência de parâmetros de síntese como a temperatura na formação destes compostos é muito difícil à comparação entre espectros pois não há citação da fase polimórfica

**FIGURA 83- ESPECTRO RAMAN DO ÓXIDO DE NIÓBIO**



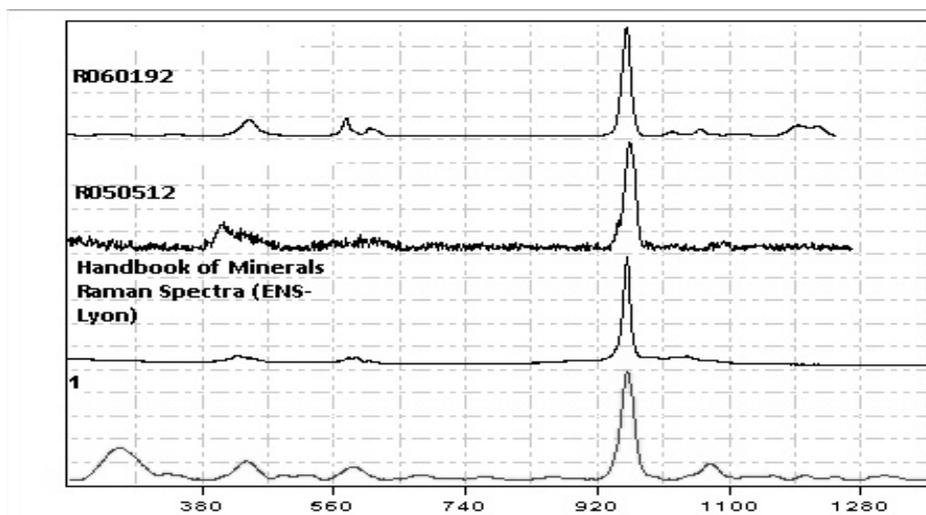
No mesmo banco de dados é possível encontrar um niobato de cálcio e também nos mostra uma correlação de picos.(figura 84)

**FIGURA 84- ESPECTRO RAMAN PARA O NIOBATO DE CÁLCIO**

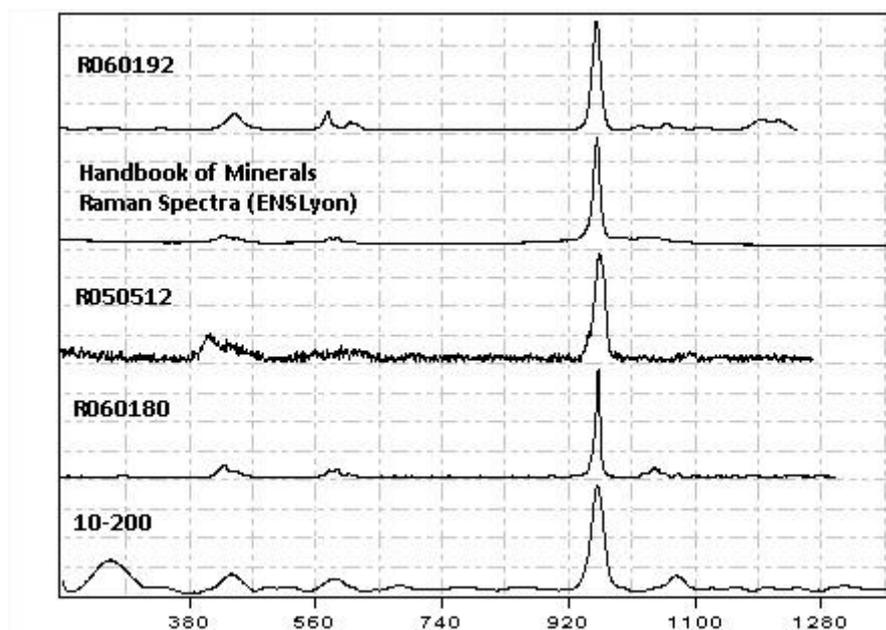


O emprego do programa gratuito Crystal Sleuth do projeto RRUFF Project e da American Mineralogist Crystal Structure Databases<sup>[124,125]</sup> permitiu visualizar e comparar os espectrogramas das amostras com padrões de banco de dados sendo estes padrões relacionados à fase de hidroxiapatita devido à falta de dados referentes à fase de columbita ou de óxido de nióbio. As figuras 85 e 86 apresentam estas comparações para as amostras 1 e 10-200.

**FIGURA 85- ESPECTRO RAMAN COMPARATIVO DA AMOSTRA 1 COM ESPECTROS DE REFERÊNCIA**



**FIGURA 86- ESPECTRO RAMAN COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 COM ESPECTROS DE REFERÊNCIAS**



Em ambas as amostras há uma alta correlação (indexação acima de 80%) com os padrões R060192 correspondentes a cloroapatita, R050512 e R060180 correspondente a hidroxiapatita e ao padrão encontrado no Handbook of Minerals Raman Spectra (ENS-Lyon) [124,125] que não possui codificação. A correspondência dos espectrogramas com o padrão Raman da cloroapatita pode indicar a formação de hidroxiapatitas substituídas de acordo com o pico principal na região de  $960\text{ cm}^{-1}$ .

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

### 4.4.1 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDX)

A análise EDX foi realizada com o objetivo de se identificar os elementos químicos presentes nas amostras.

#### 4.4.1.1 RESULTADOS DE EDX PARA A AMOSTRA 0

O resultado da espectroscopia de dispersão de raio X indicou para a amostra 0 a presença dos elementos Ca, P e O presentes na hidroxiapatita. As linhas espectrais de Ka destes elementos foram identificadas conforme visto na tabela 9.

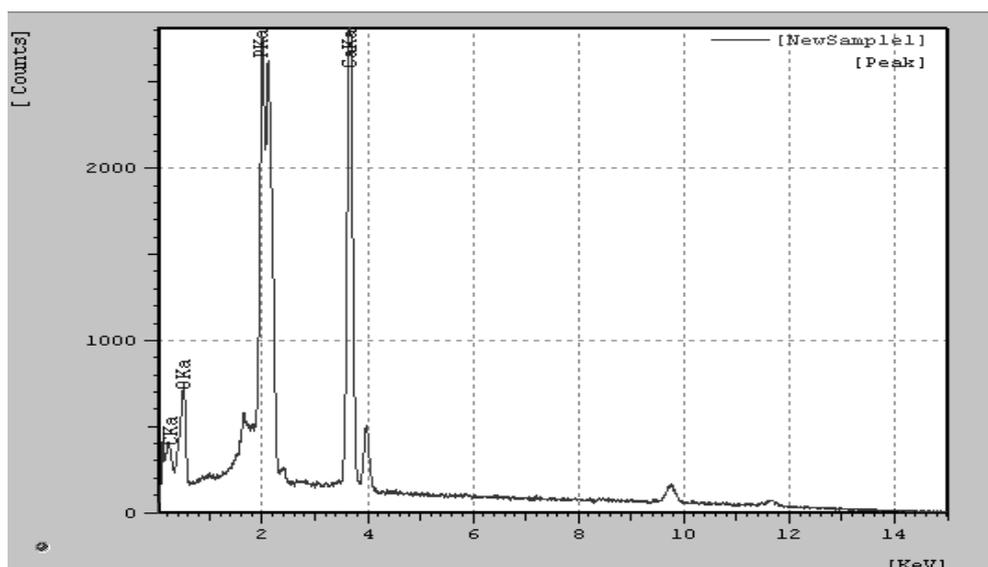
**TABELA 9-EDX PARA A AMOSTRA 0**

TABELA 9 – RESULTADOS DE EDX PARA A AMOSTRA 0		
Linha	keV	Intensidade (cps/nA)
CKa	0.26	2.333
OKa	0.53	4.272
PKa	2.00	17.915
PKb	2.13	1.111
CaKa	3.67	20.695
CaKb	3.98	2.676

**FONTE: AUTOR,2013**

Assim o espectrograma da figura 87 obtido demonstra a presença de cálcio, fósforo e oxigênio na amostra. Observa-se a presença de carbono, devido ao filme de carbono utilizado na preparação da amostra, porém, resíduos orgânicos e o carbono do grupo carbonato não podem ser desconsiderados.

FIGURA 87-ESPECTRO EDS DA AMOSTRA 0



A análise elementar realizada sem padrões apresentou como melhor resultado os dados obtidos na tabela 10.

TABELA 10-EDX DA AMOSTRA 0

TABELA 10 – RESULTADOS DE EDX PARA A AMOSTRA 0			
Elemento	Intensidade	%Peso	% Atômica
C	3.726	17.088	28.795
O	3.585	35.713	45.189
P	9.944	14.761	9.645
Ca	13.924	32.438	16.380
Total		100.000	

FONTE: AUTOR,2013

A razão estequiométrica atômica entre Ca/P calculada foi de 1.69, valor próxima a da hidroxiapatita estequiométrica que é de 1.67. Pode-se atribuir esta diferença ao erro experimental do equipamento, a quantificação de carbono e a presença de grupos carbonatos  $\text{CO}_3^{2-}$  substituindo grupos fosfatos  $\text{PO}_4^{3-}$  que elevam a razão estequiométrica e a falta da utilização de um padrão para a quantificação elementar.

#### 4.4.1.2 RESULTADOS DE EDX PARA A AMOSTRA 01

A amostra 01 apresentou as linhas espectrais Ka característica do nióbio conforme visto na tabela 11.

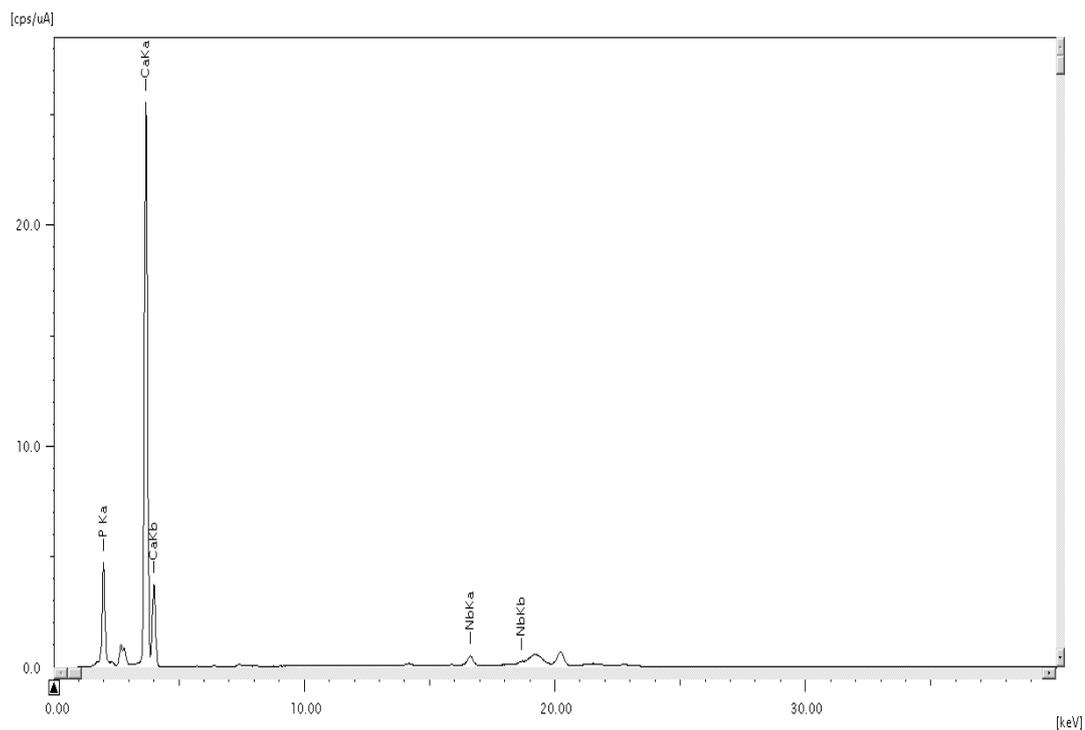
**TABELA 11-EDX DA AMOSTRA 1**

TABELA 11 – RESULTADOS DE EDX PARA A AMOSTRA 1		
Linha	keV	Intensidade
NbKa	16.62	5.5047
NbKb	18.68	1.1014

FONTE: AUTOR,2013

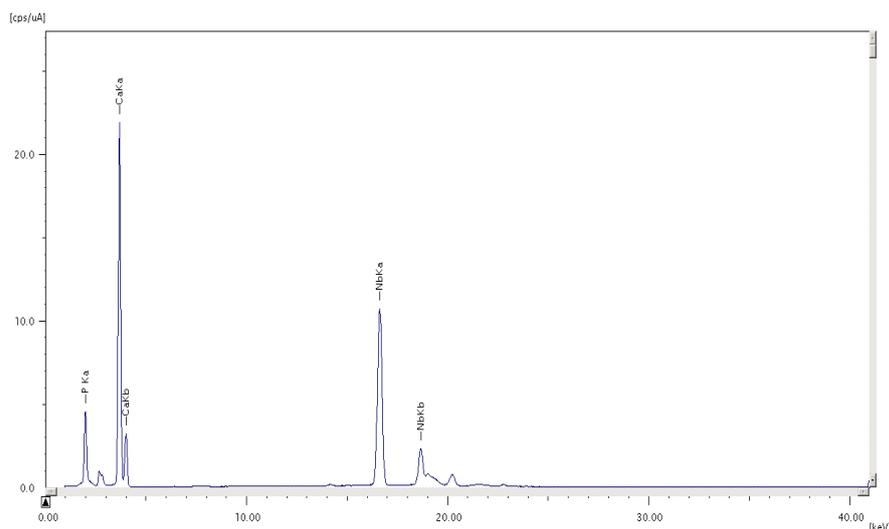
Nota-se a presença dos elementos cálcio e fósforo nesta amostra na figura 88.

**FIGURA 88-ESPECTRO EDS DA AMOSTRA 1**



#### 4.4.1.3 RESULTADOS DE EDX PARA A AMOSTRA 10-200

As amostras 10-200 apresentaram picos de maior intensidade de nióbio devido a sua concentração maior. Confirma-se também a presença de cálcio e fósforo nas amostras conforme visto na figura 89.

**FIGURA 89-ESPECTRO EDS PARA A AMOSTRA 10-200**

#### 4.4.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (FRX)

A análise FRX foi realizada para identificar e confirmar a presença de nióbio nas amostras obtidas.

##### 4.4.2.1 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (FRX) PARA AS AMOSTRAS 01 E 10-200

A análise química obtida através da fluorescência de raios X para as amostras 01 e 10-200 estão apresentadas na tabela 11.

**TABELA 11-RESULTADOS DE FRX DAS AMOSTRAS**

Óxido	1	1	10-200	10-200
	% em Peso	% Atômica	% em Peso	% Atômica
CaO	62 %	5.885	61,8 %	5.930
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	37,8 %	2.835	36,3 %	2.752
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,21 %	0.008	1,65 %	0.067
Impurezas	0,05 %		0,19 %	

FONTE: AUTOR,2013

A análise foi realizada de forma semi-quantitativa devido a pouca quantidade de amostra disponível e foi realizada sem padrões o que torna possível apenas a confirmação da presença do nióbio na amostra.

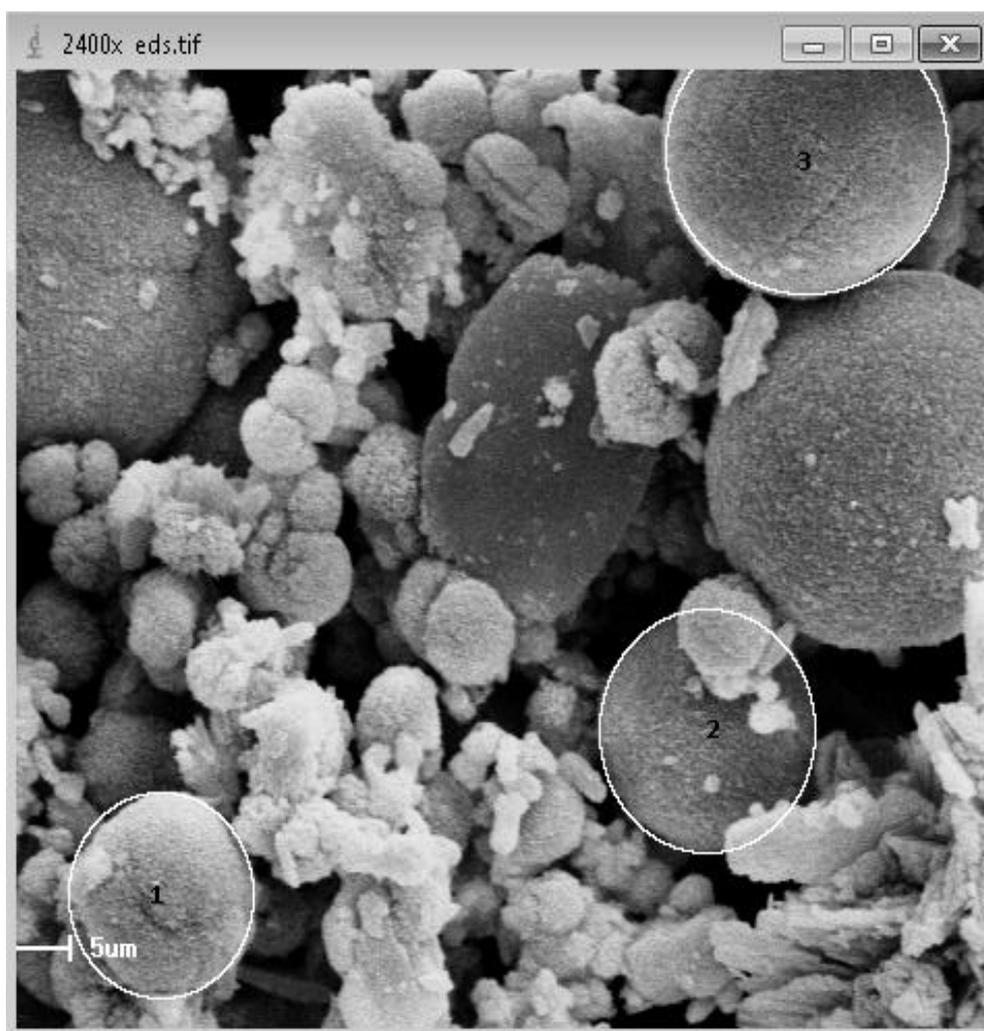
Observa-se a presença de nióbio nas amostras 01 e 10-200 o que confirma a presença deste elemento no material obtido e os resultados de difração de raios X e espectroscopia de energia dispersiva. As impurezas obtidas estão relacionadas ao grau de pureza dos precursores utilizados.

A relação teórica entre as amostras 01 e 10-200 é de 1:10, ou seja, a amostra 10-200 teve uma aditivação do precursor de nióbio 10 vezes maior e pelo resultado desta análise química observa-se que a amostra 10-200 possui uma quantidade experimental de nióbio aproximadamente 8 vezes maior que a amostra 01 o que evidencia um resultado concordante com o proposto.

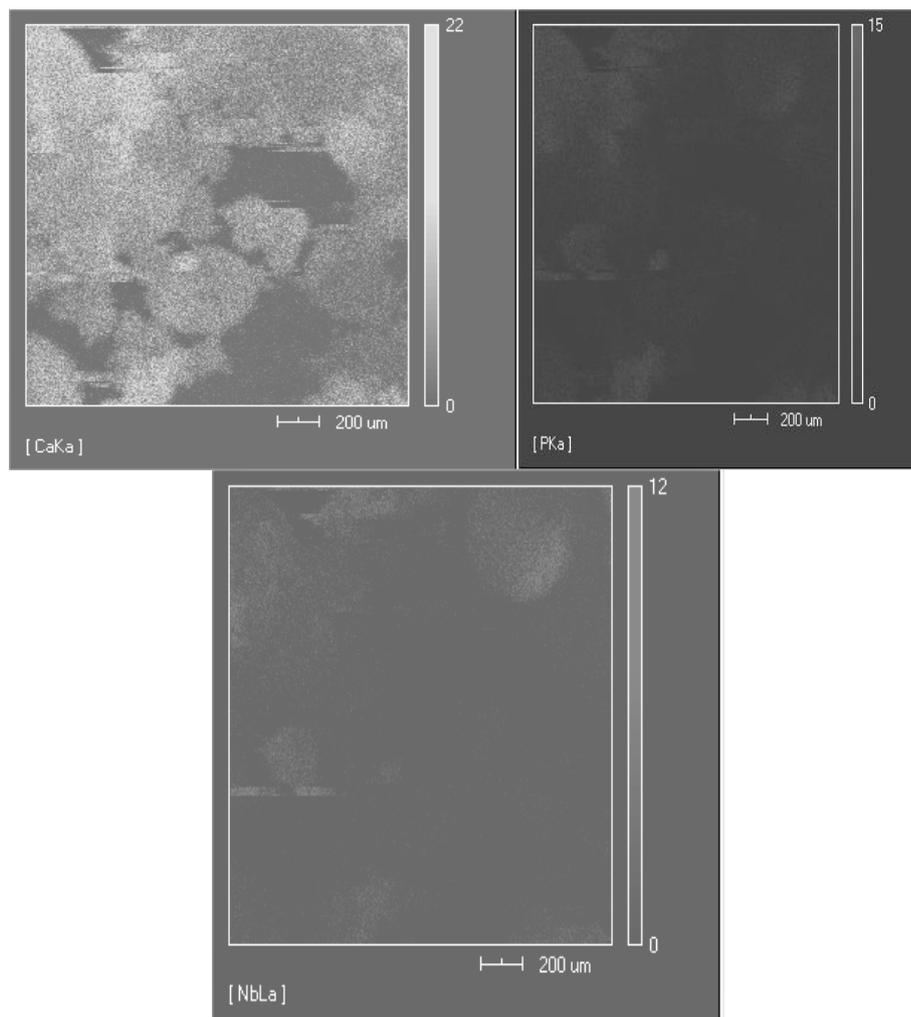
É possível a conversão da % de óxidos em quantidade elementar e assim verificar a razão  $Ca/P, Ca+(Nb/P)$  e  $Ca/(Nb+P)$  no entanto estes resultados podem provocar distorções na avaliação dos resultados devido as condições já citadas e para a amostra 10-200 estas razões atômicas situam-se em 2.1 que são resultados semelhantes a análise desta amostra por espectroscopia de energia dispersiva de raios X mas as variações das medidas especialmente de nióbio foram grandes o que torna a análise desta informação bastante dificultada.

A espectroscopia de energia dispersiva de raios X acoplada ao microscópio eletrônico de varredura possibilita o mapeamento de elementos presentes na amostra e a figura 90 foi a utilizada para a realização de um análise de mapeamento com uma amostra mais aditivada. O resultado do mapeamento dos elementos através da análise por espectroscopia de energia dispersiva pode ser visualizado na figura 90 e 91.

FIGURA 90- AMOSTRA 10-200 ANÁLISE DE MAPEAMENTO DE ELEMENTOS 2400X



**FIGURA 91-MAPEAMENTO DE ELEMENTOS DA ESQUERDA PARA DIREITA: CÁLCIO ,FÓSFORO E NIÓBIO**



Observa-se que a distribuição de cálcio e fósforo é homogênea nos aglomerados e verifica-se também que as regiões contendo nióbio e fósforo coincidem com o cálcio e há algumas regiões com maior concentração de nióbio.

A mescla das imagens utilizando-se a cor azul para o cálcio e a cor vermelha para os elementos cálcio e fósforo permite a confirmação destes resultados.(figura 92)

**FIGURA 92-RESULTADO DA MESCLA DOS MAPEAMENTOS DE ELEMENTOS EDS: CÁLCIO-FÓSFORO (ESQUERDA) CÁLCIO-NÍÓBIO (DIREITA)**



Esta concentração maior de nióbio em um dos aglomerados pode ser devido a formação de fases secundárias contendo nióbio nas amostras mais aditivadas,(10-200).

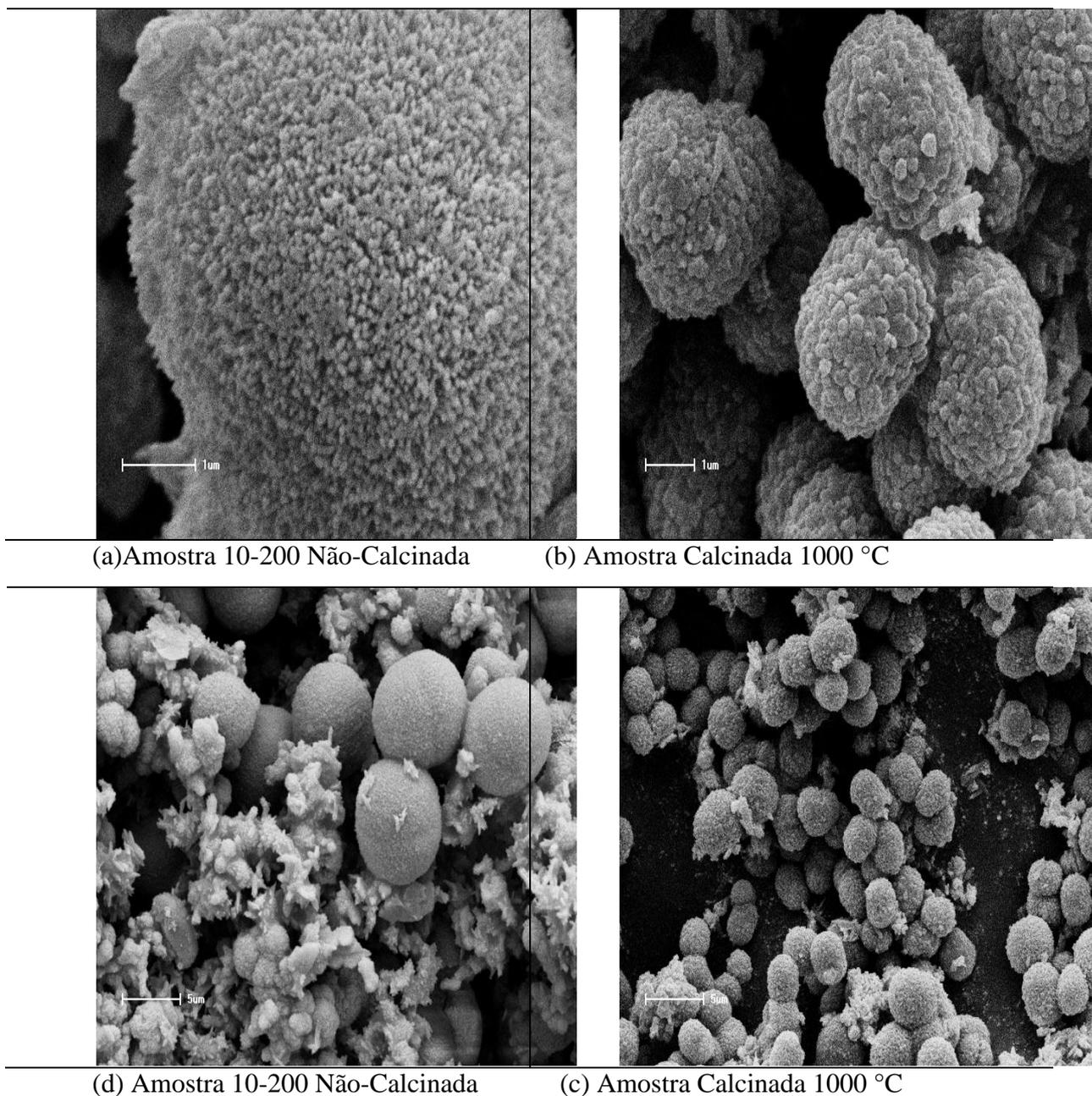
## 4.5 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA E TRATAMENTO TÉRMICO

Análises termogravimétricas por TG e ATD foram realizadas para verificar o comportamento térmico das amostras. Tratamentos térmicos foram realizadas afim de se observar as alterações morfológicas e de fases nas amostras.

### 4.5.1 TRATAMENTO TÉRMICO

A amostra 10-200 foi submetido a tratamento térmicos de sinterização entre 500 °C e 1000 °C. Quanto à morfologia observa-se que ocorreu uma densificação dos poros existentes devido ao crescimento das partículas na superfície dos aglomerados existentes quando calcinados a 1000 °C formando os aglomerados mais fechados como mostrados na figura 93.

**FIGURA 93-FOTOMICROGRAFIA COMPARATIVA ENTRE AS AMOSTRAS 10-200 CALCINADA E NÃO CALCINADA**

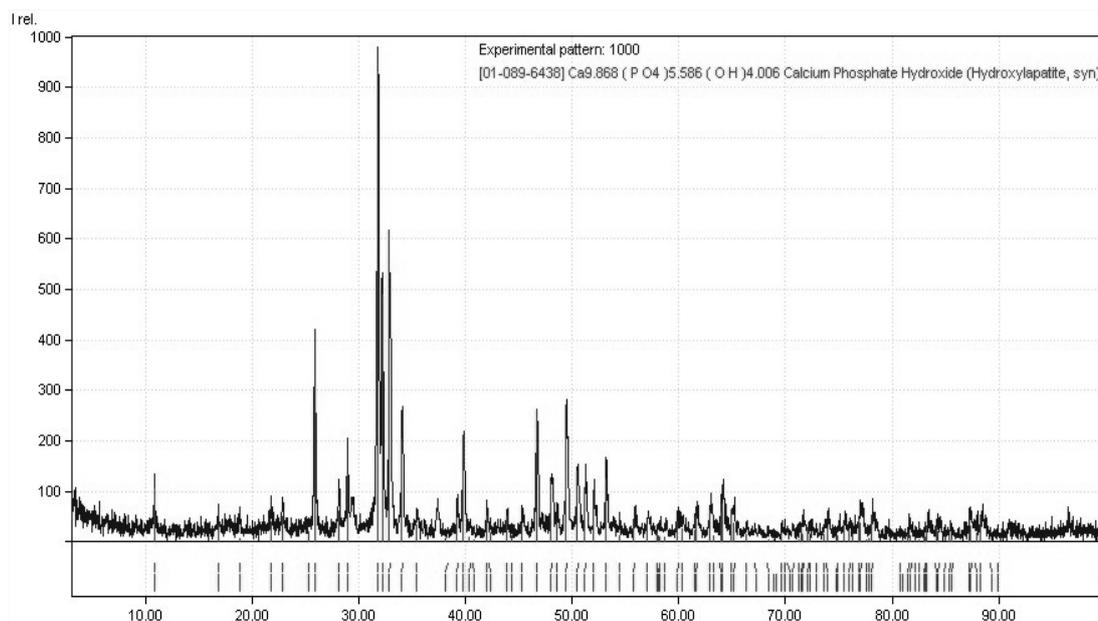


Outro aspecto observado é uma formação de uma morfologia mais homogênea e com tamanho dos aglomerados mais uniformes quando sinterizadas a 1000 °C.

Os resultados da difração de raios X para 1000 °C apresenta a fase principal de hidroxiapatita concordante com vários padrões JCPDS da hidroxiapatita.

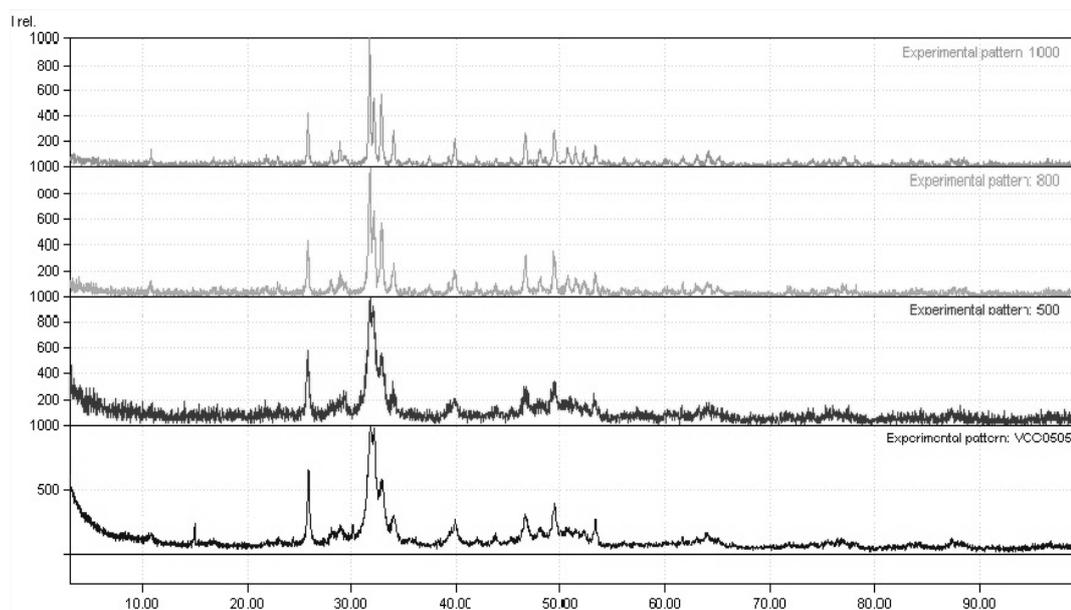
A comparação mostrada refere-se ao padrão JCPDS 01-089-6438, (figura 94).

**FIGURA 94-DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA 10-200 CALCINADA A 1000°C COMPARADA COM A FICHA PDF-2 01-089-6438 PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES**



O difratograma da figura 95 apresenta a comparação em diferentes temperaturas.

**FIGURA 95 – DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE CALCINAÇÃO: 1000°C (PARTE SUPERIOR), 800°C, 500°C E 200°C (PARTE INFERIOR)**



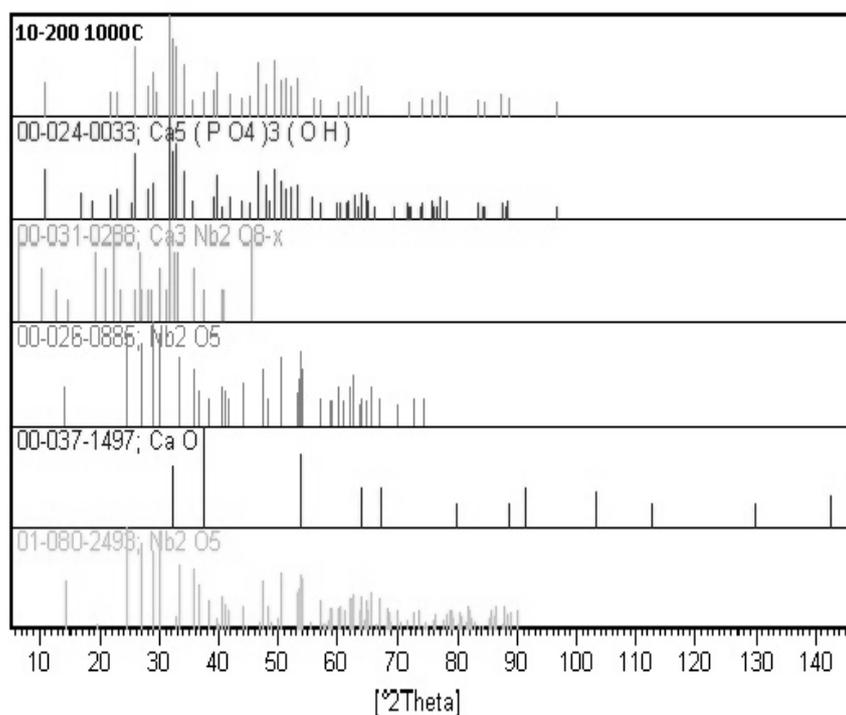
Nota-se que as fases na região de  $2\theta$  de 15° e 30° presentes na amostra 10-200 não são mais visualmente identificadas a partir de 800 °C e a diminuição da largura dos picos a partir

desta mesma temperatura evidenciando o aumento da cristalinidade indicado na análise térmica.

Uma análise mais detalhada dos picos da amostra 10-200 pode-se verificar na figura 96 que existem picos que ainda não correspondem a hidroxiapatita. A comparação nos mostra que os picos convergem para fases de niobato de cálcio sendo a ficha PDF-2 00-031-0288 a usada na comparação e para fases de pentóxido de nióbio correspondentes as fichas PDF-2 00-026-0885 e 01-080-2493.

Nesta amostra calcinada a 1000°C observa-se que uma maior correlação qualitativa com fichas de hidroxiapatita não estequiométricas o que pode sugerir que esteja ocorrendo alguma reação do estado sólido nesta temperatura. Provavelmente não há a formação de óxido de cálcio comparando-se com a intensidade e posição dos picos da ficha padrão 00-037-1497 com os picos da amostra o que indica a estabilidade da amostra que não sofre a transformação para a fase beta-tcp.

**FIGURA 96 – DIFRATOGRAMA COMPARATIVO DA AMOSTRA 10-200 CALCINADA A 1000°C E COMPARADA COM DIFRATOGRAMAS GERADOS A PARTIR DAS FICHAS PDF-2: 00-024-0033,00-031-0288,00-026-0885,00-037-1497 E 01-080-2498 PARA IDENTIFICAÇÃO DE FASES**



A influência da temperatura de calcinação no tamanho médio dos cristalitos também foi avaliada para a amostra 10-200<sup>[127]</sup>. Os resultados estão apresentados na tabela 12.

**TABELA 12-TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO X TEMPERATURA DE CALCINAÇÃO**

TABELA 12 – RESULTADOS DO TAMANHO MÉDIO DO CRISTALITO EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO	
Temperatura °C	Tamanho médio dos cristalitos nm
200	9.6
500	11.6
800	49.6
1000	77

**FONTE: AUTOR,2013**

Fica evidenciado que até 500 °C há pouca influencia no crescimento que se torna mais significativo a partir de 800 °C o que já era esperado em virtude dos benefícios do tratamento térmico no crescimento das partículas e aumento da cristalinidade durante a calcinação tornando a estrutura cristalina mais ordenada<sup>[128]</sup>.

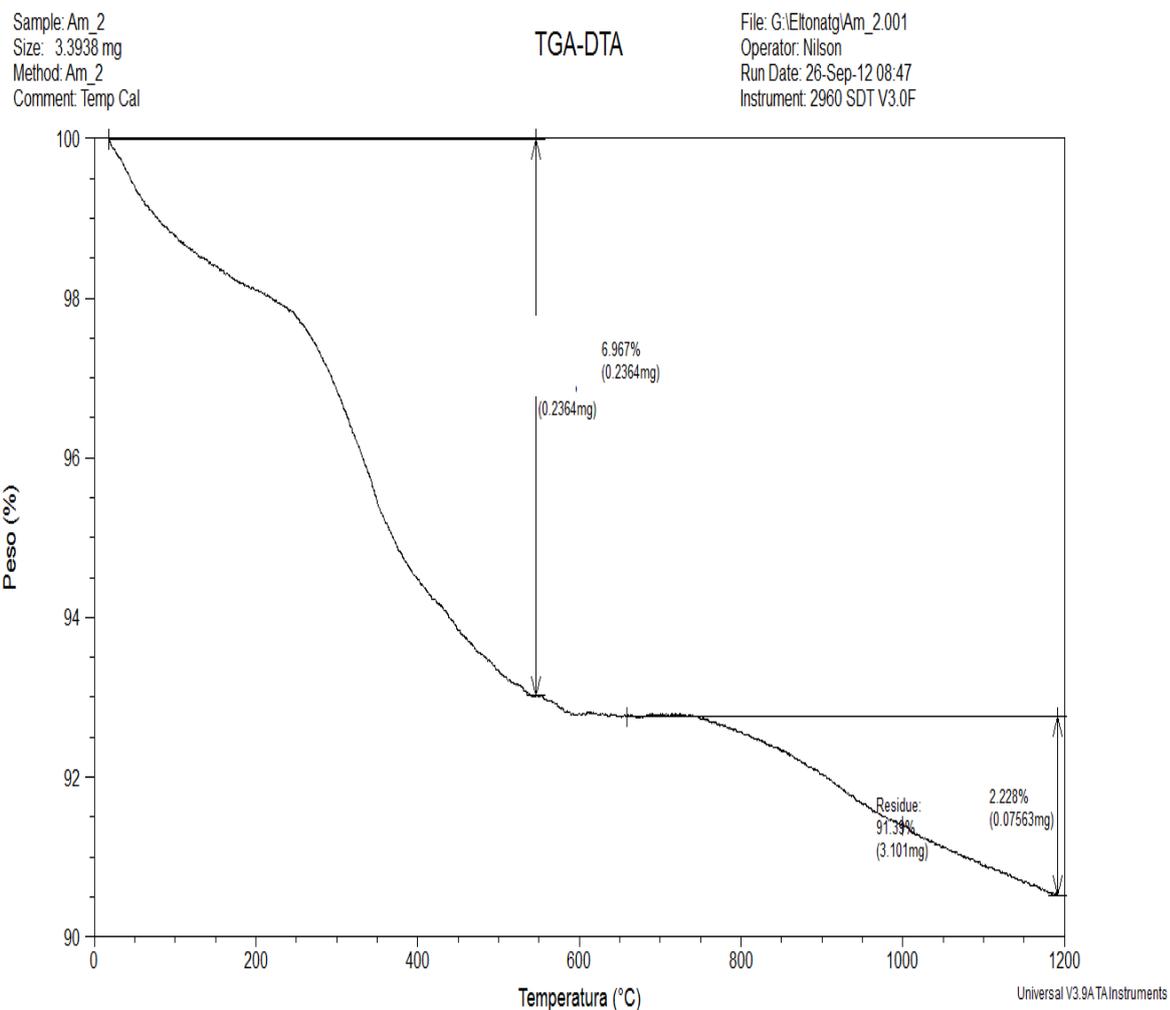
#### **4.5.2 ANÁLISE TÉRMICA**

As amostras 0 e 10-200 foram caracterizadas através da análise termogravimétrica e análise térmica diferencial, (figuras 97 até 100), até a temperatura de 1200 °C em atmosfera de ar a fim de verificar a estabilidade térmica destas amostras.

##### **4.5.2.1 RESULTADOS DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) PARA A AMOSTRA 0**

A perda de massa total após a queima até 1200 °C foi de 8.627 % que pode estar associada à perda de água de hidratação, decomposição de grupos carbonatos e a decomposição de matéria orgânica. A maior perda de massa (6.967%) ocorreu entre 18.57 °C e 546.45 °C e deve-se a perda de água e decomposição de impurezas orgânicas presentes que não puderam ser removidas na lavagem e secagem dos pós obtidos.

FIGURA 97 – CURVA TG DA AMOSTRA 0



A variação do peso da amostra em função da temperatura é mostrada na tabela 13.

TABELA 13-TG DA AMOSTRA 0

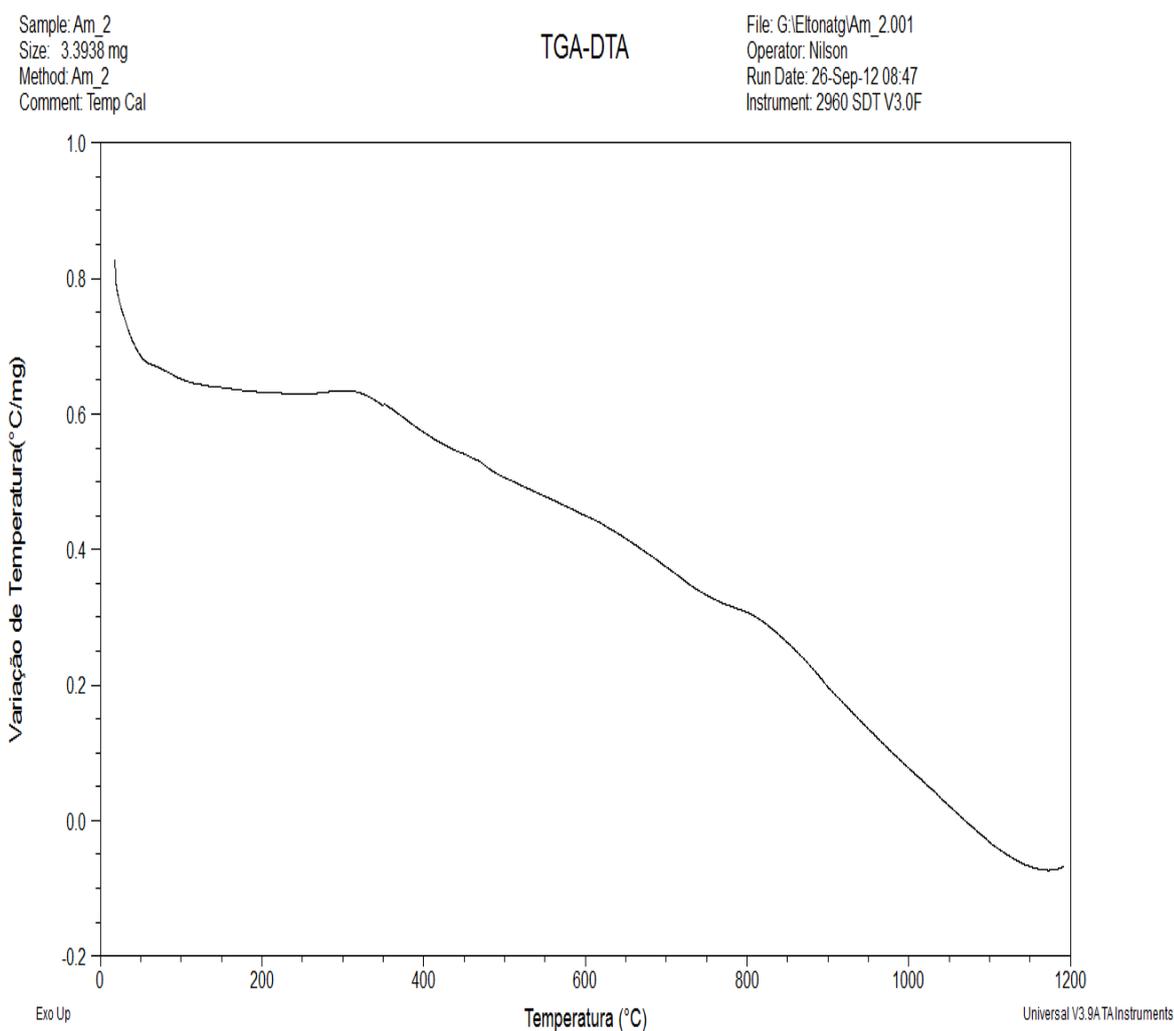
TABELA 13– RESULTADOS DE TG PARA A AMOSTRA 0			
Temperatura Inicial	Temperatura Final	Peso	Varição no Peso (%)
°C	°C	mg	%
18.57	546.45	0.2364	6.967
659.15	1191.52	0.07563	2.228

FONTE: AUTOR ,2013

#### 4.5.2.2 RESULTADOS DA ANÁLISE TERMODIFERENCIAL (ATD) PARA A AMOSTRA 0

A variação positiva a 200 °C indica a perda de água cristalizada na amostra. A variação negativa a partir de 1070 °C pode ser atribuída à cristalização da fase amorfa da hidroxiapatita devido à decomposição da hidroxiapatita carbonatada (tabela 14).

**FIGURA 98 – CURVA ATD DA AMOSTRA 0**



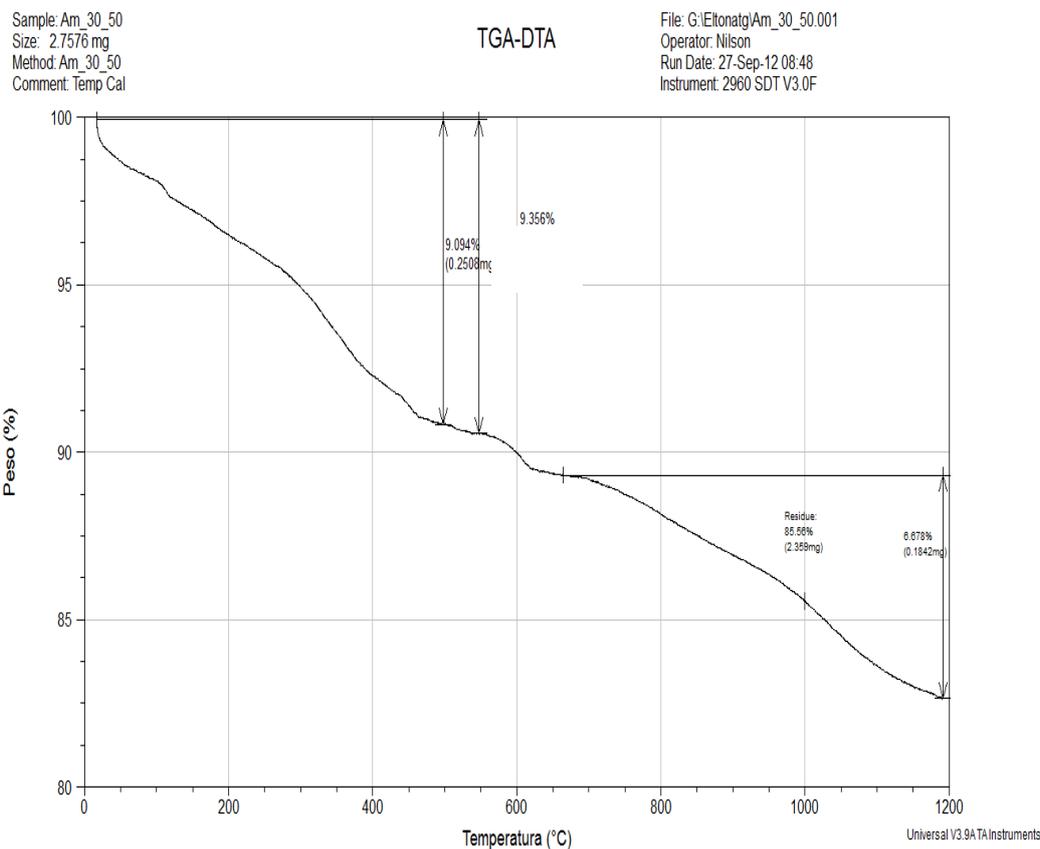
**TABELA 14-ATD DA AMOSTRA 0**

TABELA 14- RESULTADOS DE ATD PARA A AMOSTRA 0	
Temperatura	Varição de Temperatura
°C	°C/mg
0.00	
200.00	0.6319
700.00	0.3743
1060.00	0.01066
1070.00	-0.0005576
1190.00	-0.06880
1200.00	

**FONTE: AUTOR,2013**

#### **4.5.2.3 RESULTADOS DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) PARA A AMOSTRA 10-200**

A variação do peso da amostra em função da temperatura é mostrada na tabela 15.

**FIGURA 99 – CURVA TG DA AMOSTRA 10-200****TABELA 15-TG DA AMOSTRA 10-200****TABELA 15– RESULTADOS DE TG PARA A AMOSTRA 10-200**

Temperatura Inicial	Temperatura Final	Peso	Varição no Peso (%)
°C	°C	mg	%
16.94	497.69	0.2508	9.094
16.94	547.26	0.2508	9.356
663.88	1191.39	0.1842	6.678

**FONTE: AUTOR,2013**

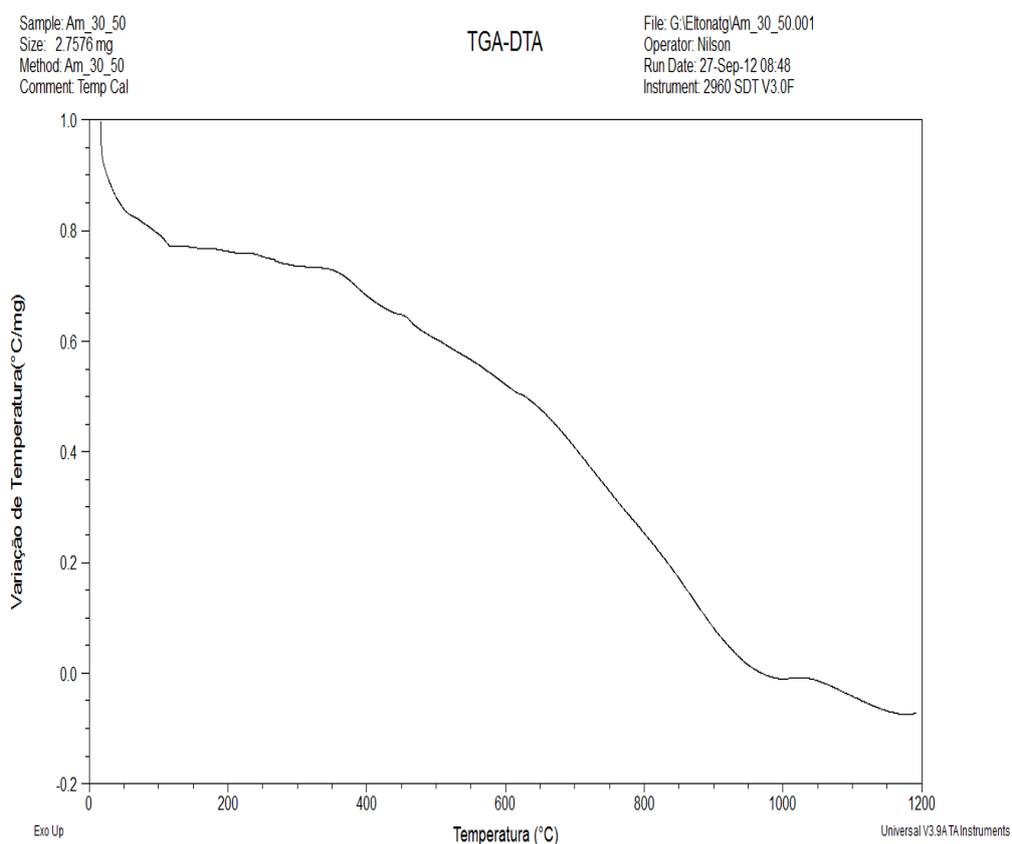
Até 547.26 °C a perda de massa total foi de 9,094% que pode corresponder à perda de água e decomposição de matéria orgânica sendo a perda total de massa de 14.490 %.

#### 4.5.2.4 RESULTADOS DA ANÁLISE TERMODIFERENCIAL (ATD) PARA A AMOSTRA 10-200

A variação positiva a 200 °C indica a perda de água de cristalização na amostra conforme visto na curva ATD e tabela 16.

A variação negativa a partir de 970 °C pode ser atribuída à cristalização da fase amorfa da hidroxiapatita devido à decomposição da hidroxiapatita carbonatada e/ou a decomposição e cristalização das fases não identificadas na amostra aditivada.

**FIGURA 100 – CURVA DA AMOSTRA 10-200**



**TABELA 16-ATD DA AMOSTRA 10-200**

TABELA 16– RESULTADOS DE ATD PARA A AMOSTRA 10-200	
Temperatura	Varição de Temperatura
°C	°C/mg
0.00	
200.00	0.7625
970.00	-0.0006971
1190.00	-0.07252
1200.00	

FONTE: AUTOR,2013

#### **4.6 CARACTERIZAÇÃO DA BIOCITOXICIDADE**

Foram realizados testes de biocitotoxicidade iniciais para avaliar a possibilidade de aplicação dos materiais sintetizados como biomateriais.

##### **4.6.1 RESULTADOS DO TESTE COM O CORANTE AZUL DE TRIPAN**

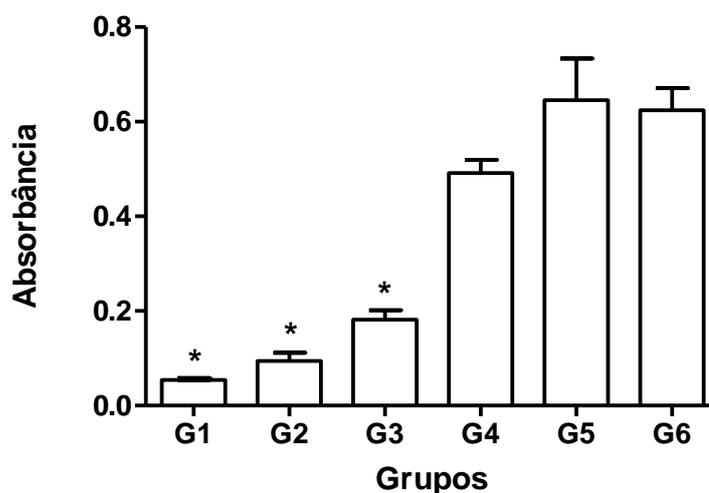
Todas as amostras passaram no ensaio da viabilidade e a quantificação da viabilidade celular com emprego do corante azul de Tripán de modo que as células não se apresentaram com uma coloração roxa, inchadas ou deformadas, permitindo que pudessem ser submetidas aos testes dos corantes MTT e vermelho neutro.

##### **4.6.2 RESULTADOS DO TESTE COM O CORANTE MTT**

Nos ensaios com o corante MTT um aumento da absorbância está relacionada com um aumento da atividade celular das células.

Estatisticamente com 24 horas de teste de aplicação as amostras com nióbio (1,5 e 10-200) que foram denominadas nestes ensaios de G4, G5 e G6 respectivamente, apresentaram uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) em relação à amostra 0 e as amostras de controle conforme visto no gráfico da figura 101.

**FIGURA 101 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS.**

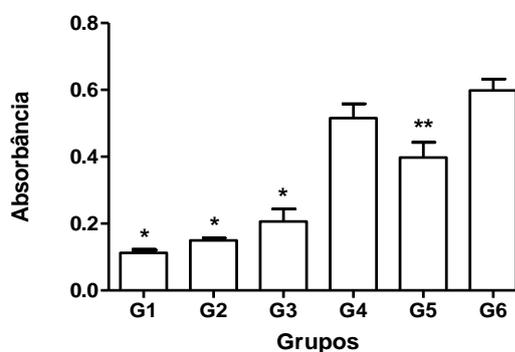


G1- Controle; G2- Biogran®; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita a 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita a 5% de nióbio; G6- Hidroxiapatita a 10% de nióbio. \*Diferença significativa com G4, G5 e G6 ( $p < 0,0001$ ).

ANOVA com pós-teste de Tukey.

Após 48 horas de teste, as diferenças das amostras com nióbio continuaram conforme visto no gráfico da figura 102 embora neste ponto ocorresse também uma diferença significativa das amostras com nióbio 5 e 10-200.

**FIGURA 102 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS.**

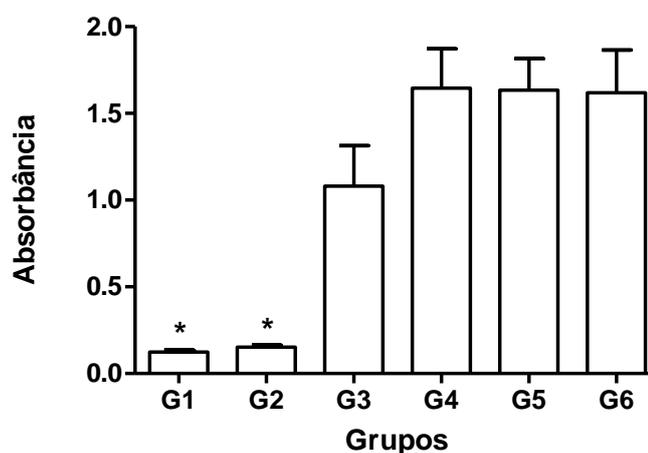


G1- Controle; G2- Biogran®; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita a 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita a 5% de nióbio; G6- Hidroxiapatita a 10% de nióbio. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ): (\*) com G4, G5 e G6 e

(\*\*) com G6. ANOVA com pós-teste de Tukey.

O ensaio a 72 horas demonstrou os resultados semelhantes a 24 horas visualizados no gráfico da figura 103. Observa-se que a amostra não aditivada começou a apresentar um aumento da proliferação celular em relação aos tempos de 24 e 48 horas.

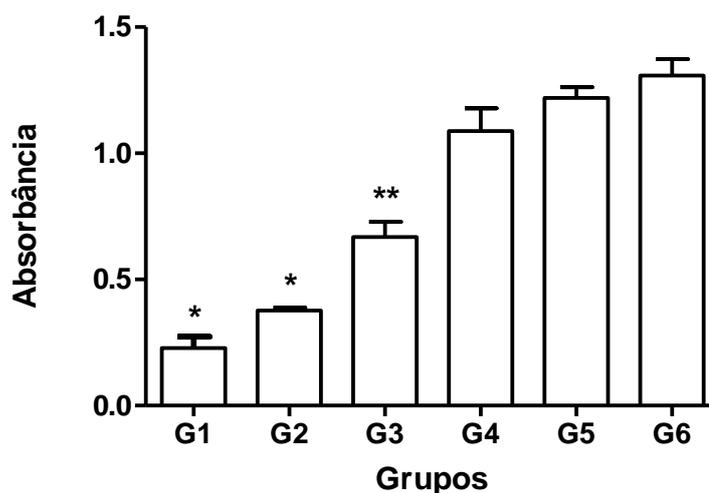
**FIGURA 103 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 72 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**



G1- Controle; G2- Biogran<sup>®</sup>; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita a 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita a 5% de nióbio; G6- Hidroxiapatita a 10% de nióbio. Diferença significativa: (\*) com todos ( $p < 0,05$ ). ANOVA com pós-teste de Tukey.

O resultado final a 96 horas apresentou diferenças significativas das amostras de controle com todas as amostras testadas (0, 1,5 e 10-200) e diferenças significativas da amostra 0 com as amostras aditivadas com nióbio de  $p < 0,0001$  o que demonstra a influência da dopagem com nióbio nos valores de absorbância do corante MTT com uma probabilidade de 0,1% que esta diferença tenha ocorrida ao acaso. Este resultado pode ser visto no gráfico da figura 104.

**FIGURA 104 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DE CORANTE MTT APÓS 96 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**



G1- Controle; G2- Biogran®; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita a 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita a 5% de nióbio; G6- Hidroxiapatita a 10% de nióbio. Diferença significativa: (\*) com todos ( $p < 0,05$ ) e (\*\*) com G4, G5 e G6 ( $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós-teste de Tukey.

O aumento da absorbância das amostras 1,5 e 10-200 indicam uma resposta positiva das células utilizadas a um fator externo, neste caso a aditivação com nióbio, e possibilita entender a proliferação celular, já que a redução do corante MTT é realizada por células ativas metabolicamente e visto que o princípio fundamental é que o corante penetre nas células e nas mitocôndrias ele é reduzido pela enzima e então uma redução do número destas células provocaria uma menor redução do corante MTT e, portanto uma diminuição da leitura da absorbância após a solubilização com álcool.

Nenhuma destas amostras apresentou redução significativa nos intervalos de tempo de 24 horas a 72 horas comparadas individualmente e com a amostra de controle negativo G1.

Um valor de absorbância menor que o de G1 indicaria a redução celular da quantidade de células ativas e, portanto a incompatibilidade da amostra com o meio celular.

A amostra não aditivada 0 também apresentou resultados positivos quanto à proliferação celular e a morfologia com alguns aglomerados com partículas pontiagudas não interferiu negativamente no resultado.

Tabulando os dados obtidos em função da taxa de crescimento relativo (RGR) que foram calculados em função das absorbâncias das amostras e do controle negativo conforme a metodologia empregada nos trabalhos de Palama et.al (2011), Duan et.al (2007) e Kong et al.

(2009) que utilizaram estes valores relativos para classificar as suas amostras em função do grau de citotoxicidade<sup>[129]</sup>.

Podemos observar que nenhuma das amostras obtidas neste trabalho pode ser enquadrada como citotóxica segundo a tabela 17 e 18.

Observa-se também que o RGR médio de 24 a 96 horas das amostras com nióbio é superior às demais enquanto a da amostra não aditivada pode ser comparada ao mesmo valor que a amostra comercial G2 que é o controle positivo.

**TABELA 17-CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS**

TABELA 17– RESULTADOS DE GRAU DE CITOTOXICIDADE

Amostra	RGR-24h	RGR- 48h	RGR- 72h	RGR- 96h	RGR Médio	Desvio-Padrão	Grau de Citotoxicidade
G1	1.0	1.0	1.0	1.0	1	0	0
G2	2.0	1.28	1.87	4.0	2.29	1.18	0
G3	3.6	1.71	1.37	1.2	1.97	1.11	0
G4	10.0	4.57	1.37	1.5	4.36	4.04	0
G5	13.3	3.42	2.69	1.5	5.23	5.44	0
G6	13.0	5.14	2.18	2.5	5.71	5.04	0

**TABELA 18-TABELA DE CITOTOXICIDADE I**

TABELA 18– TABELA DE CLASSIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE I

GRAU DE TOXICIDADE	RGR	DEFINIÇÃO
QUALITATIVA		
0	≥0.90	NÃO-CITOTOXICA
1	0.60–0.90	LEVEMENTE CITOTOXICA
2	0.30–0.59	MODERAMENTE CITOTOXICA
3	>0.30	FORTEMENTE CITOTOXICA

Duan et.al (2007) utilizam uma maior faixa de classificação para o grau de toxicidade baseado na norma ISO 10993 conforme a tabela 19.

**TABELA 19-TABELA DE CITOTOXICIDADE II**

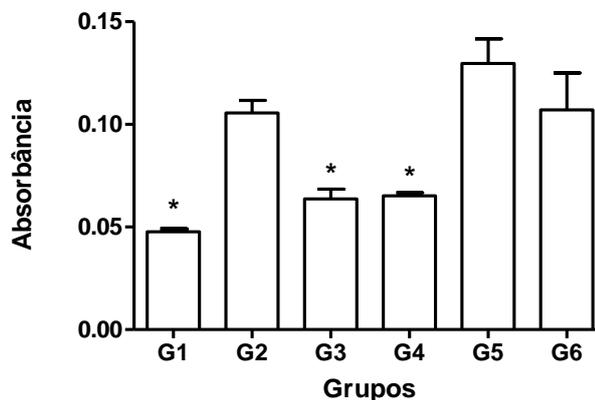
TABELA 19- TABELA DE CLASSIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE II		
GRAU DE TOXICIDADE	RGR DEFINIÇÃO QUALITATIVA	DEFINIÇÃO
<b>0</b>	$\geq 1$	QUALIFICADA
<b>1</b>	0.75-0.99	QUALIFICADA
<b>2</b>	0.50-0.74	MODERAMENTE CITOTOXICA
<b>3</b>	0.25-1.49	CITOTOXICA
<b>4</b>	0-0.24	CITOTOXICA
<b>5</b>	0	CITOTOXICA

Novamente os valores de RGR obtidos e analisados através desta tabela, não classificam as amostras como citotóxicas e não inibitórias celulares.

#### **4.6.3 RESULTADOS COM CORANTE VERMELHO NEUTRO**

Em nenhuma das amostras testadas a 24 horas (gráfico da figura 105) observou-se uma absorbância menor que a do controle G1. Como a absorção e liberação do corante vermelho neutro está relacionada à incorporação do corante por células viáveis nos lisossomos um valor menor indicaria a presença de células-mortas provocadas pela composição química da amostra que tornam estas incapazes de absorver o corante vermelho neutro e conseqüentemente provocaria uma diminuição da leitura de absorbância em relação à amostra G1.

**FIGURA 105 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**



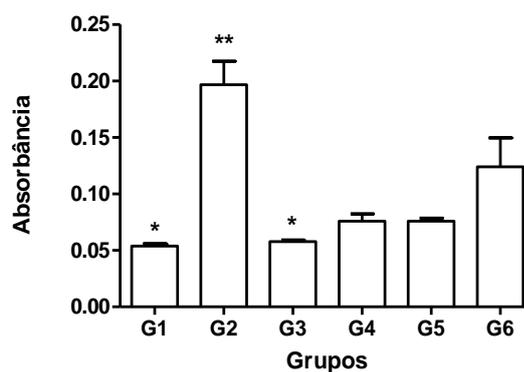
G1- Controle; G2- Biogran<sup>®</sup>; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita a 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita a 5% de nióbio; G6- Hidroxiapatita a 10% de nióbio. \*Diferença significativa com G2, G5 e G6 ( $p < 0,05$ ).

ANOVA com pós-teste de Tukey.

Nota-se que as amostras G1, G3 e G4 apresentam uma diferença significativa em relação às amostras com G2, G5 e G6 ( $p < 0,05$ ) e com o aumento do tempo do teste a diferença significativa das amostras G2 e G3 em relação às amostras aditivadas G4, G5 e G6 passam para  $p < 0,001$  indicando a influência da dopagem também neste ensaio.

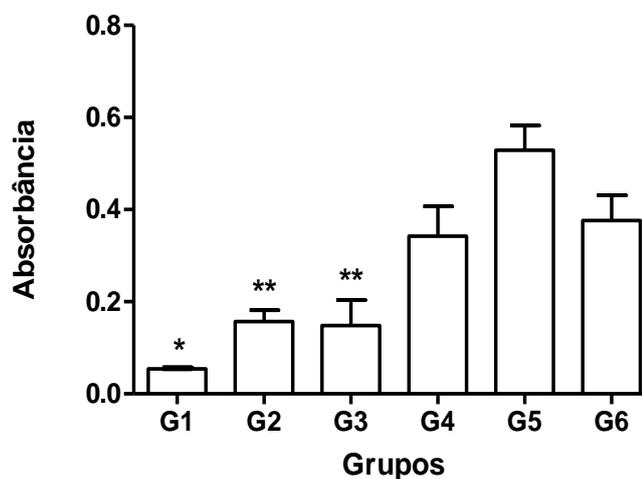
Os resultados a 48,72 e 96 horas são apresentados nos gráficos das figuras 106,107 e 108 respectivamente.

**FIGURA 106 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**



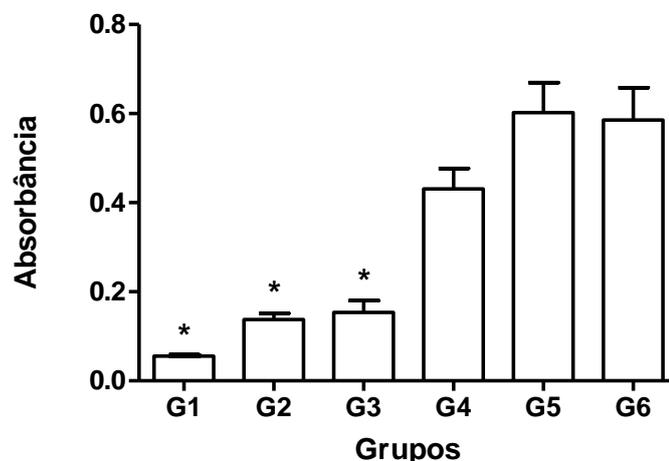
G1- Controle; G2- Biogran<sup>®</sup>; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita a 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita a 5% de nióbio; G6- Hidroxiapatita a 10% de nióbio. Diferença significativa: (\*) com G2 e G6 ( $p < 0,001$ ); (\*\*) com todos ( $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós-teste de Tukey.

**FIGURA 107 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 72 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**



G1- Controle; G2- Biogran<sup>®</sup>; G3- Hidroxiapatita; G4- Hidroxiapatita a 1% de nióbio; G5- Hidroxiapatita a 5% de nióbio; G6- Hidroxiapatita a 10% de nióbio. Diferença significativa: (\*) com G4, G5 e G6 ( $p < 0,001$ ); (\*\*) com G5 e G6 ( $p < 0,05$ ). ANOVA com pós-teste de Tukey.

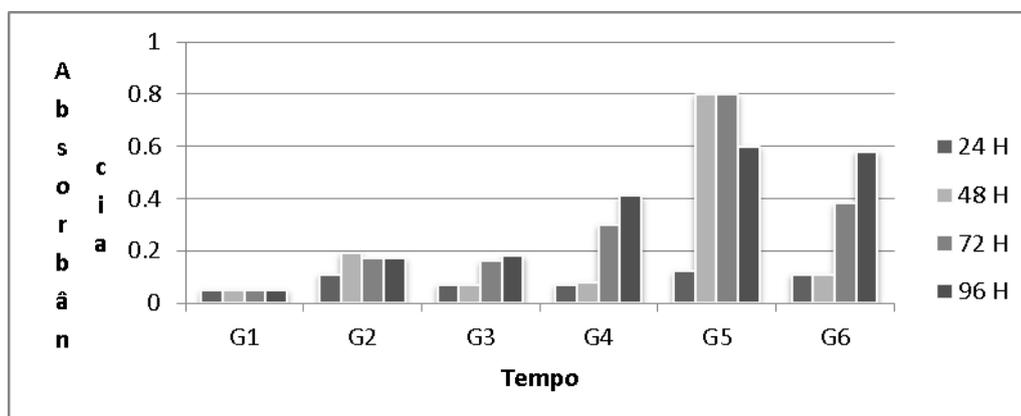
**FIGURA 108 - MÉDIA E ERRO PADRÃO DOS VALORES DE ABSORBÂNCIA DO CORANTE VERMELHO NEUTRO APÓS 96 H DE INCUBAÇÃO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS**



G1- CONTROLE; G2- BIOGRAN®; G3- HIDROXIAPATITA; G4- HIDROXIAPATITA A 1% DE NIÓBIO; G5- HIDROXIAPATITA A 5% DE NIÓBIO; G6- HIDROXIAPATITA A 10% DE NIÓBIO. DIFERENÇA SIGNIFICATIVA: (\*) COM G4, G5 E G6 (P<0,001). ANOVA COM PÓS-TESTE DE TUKEY.

Um resumo da evolução com o tempo do teste do corante vermelho pode ser visualizado no gráfico da figura 109.

**FIGURA 109 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE AS AMOSTRAS X TEMPO**



A amostra G2 que é o controle positivo mostrou valores de absorbância praticamente constantes com a variação do tempo. A amostra G3, que é a não aditivada apresenta um leve crescimento da absorbância chegando ao máximo em 96 horas.

As amostras aditivadas também tem maior leitura de absorbância nos testes com tempos maiores ou seja com exceção da amostra 5 todas as demais amostras tem um crescimento da absorbância em função do tempo.

Comparando-se todas as amostras com o controle negativo (G1) nenhuma das amostras teve valores menores que este controle o que indica a biocompatibilidade das amostras. Também se pode verificar que o efeito de inibição celular que é uma leve diminuição da absorbância da amostra em relação ao controle negativo não ocorreu.

De um modo geral, analisando-se os dois ensaios, pode-se verificar que a aditivação com o precursor de nióbio melhorou de forma positiva os resultados, mas fatores como a morfologia diferente da amostra pura em relação à amostra aditivada também podem ter influenciado nos resultados.

A presença de fases minoritárias não influenciou nos resultados da biocompatibilidade em nível de tornar as amostras citotóxicas.

Os resultados da citotoxicidade estão coerentes com os obtidos por Tamai e Isama (2007) que demonstraram que compostos de hidroxiapatita e beta-tcp com nióbio aumentam a calcificação dos osteoblastos humanos além de melhorar a atividade enzimática da fosfatase alcalina tornando compostos de fosfatos de cálcio e nióbio como candidatos no uso como material de reparo ósseo.

Estes ensaios de biocompatibilidade são preliminares, mas já indicam o potencial uso para estudo das amostras aditivadas como biomateriais referendadas por estes resultados e a literatura disponível sendo que ensaios com outros corantes que indicam outras alterações celulares e testes in-vitro ainda são necessários.

A amostra pura tem resultados comparáveis com a amostra de controle positivo que é uma amostra comercial e que provavelmente tenha passado por diversas etapas de beneficiamento como moagem e calcinação de modo que a amostra pura foi apenas submetida à operação de secagem para ser submetida a estes ensaios indicando uma vantagem da utilização do processo de síntese hidrotermal.

## 4 CONCLUSÃO

Neste trabalho a utilização do método de preparação hidrotérmica nas condições de síntese controladas (pH, temperatura, tempo e pressão de síntese, estequiometria dos precursores e concentrações dos reagentes e aditivos) para sintetizar ortofosfatos de cálcio aditivados com diferentes concentrações de nióbio (V) e após as amostras serem caracterizadas por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, espectroscopia de fluorescência de raios X, espectroscopia de energia dispersiva de raios X, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia Raman, análise de distribuição de tamanho de partícula por difração a laser e espalhamento de luz pode-se chegar as seguintes conclusões:

- Através da síntese hidrotérmica nas condições empregadas neste trabalho é possível obter hidroxiapatita como fase principal do material sintetizado conforme caracterizado na análise por DRX, FT-IV e Raman;
- É possível a utilização do complexo amoniacal de nióbio como precursor de íons nióbio (V) na síntese hidrotérmica de biomateriais sendo a presença do elemento químico detectado através da análise de fluorescência de raios X e espectroscopia de energia dispersiva de raios X;
- O pH da síntese hidrotérmica utilizando-se agentes de precipitação homogênea como a ureia é um parâmetro fundamental nas fases precipitadas;
- O tempo da síntese está intrinsecamente ligado à dissociação e hidrólise da ureia, sendo estas etapas dependentes da temperatura da síntese;
- O uso de temperaturas baixas, próximas da temperatura de hidrólise da ureia, requerem maiores tempos de síntese hidrotermal do que quando se usa temperaturas mais elevadas;
- O uso do complexo amoniacal de nióbio como agente precursor de íons nióbio (V) afeta a morfologia das partículas obtidas o que pode ser observado através da análise por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão;
- Morfologias do tipo flower também conhecidas como auto-estruturadas foram obtidas com as amostras sem aditivação e nas amostras aditivadas a adição do complexo amoniacal auxiliou na formação de aglomerados mais fechados e arredondados de modo que a aditivação influencia no crescimento das partículas;

- Os aglomerados arredondados apresentaram dimensões micrométricas na análise granulométrica por difração a laser, mas apresentou valores nanométricos na análise por espalhamento de luz possivelmente devido à formação dos aglomerados que são formados por aglomerados menores conforme visualizado na microscopia eletrônica de transmissão.
- Os resultados observados na microscopia eletrônica de transmissão e difração de raios X indicam a obtenção de materiais policristalinos apresentando cristalinidade;
- As amostras aditivadas apresentam estabilidade térmica até 1000°C conforme observado na análise térmica e difração de raios X sem apresentar a formação de outras fases de ortofosfatos de cálcio;
- À medida que se usou uma maior concentração do precursor de nióbio observou-se o surgimento de outras fases contendo nióbio de modo que a amostra 1 aparentemente é monofásica enquanto as amostras 5 e 10-200 apresentam possíveis fases de compostos de nióbio (V).
- A biocompatibilidade dos materiais pode ser comprovada pelos resultados nos ensaios in-vitro de citotoxicidade.

## 5.0 SUGESTÕES PARA FUTUROS DESENVOLVIMENTOS

- Realizar estudos in-vitro para as amostras 0,1 e 10-200.
- Realizar o refinamento e a solução da estrutura cristalina obtida nas amostras 0,1 e 10-200.
- Estudar a variação da razão atômica Ca/P com a aditivação de nióbio (V).
- Quantificar a razão atômica entre Ca(II),P(V) e Nb(V) nas amostras.
- Sintetizar outros ortofosfatos de cálcio como beta-TCP aditivado com o mesmo precursor de nióbio.
- Usar o método de síntese para produzir pós para outras aplicações.

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-DOROZHKIN,V.SERGEY. **Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates**. Acta Biomaterialia,v.8,p.963–977,2012.
- 2-**INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO**. Boletim de informações e de análises da economia mineral brasileira - 7<sup>a</sup> edição, 2012. <Disponível em: <http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002806.pdf>.>Acessado em: 25/05/2013.
- 3-**PERIÓDICOS CAPES: BASE DE DADOS**. Disponível em: <[www.periodicos.capes.gov.br/](http://www.periodicos.capes.gov.br/)>. Acesso em: 30 de julho de 2013.
- 4-RONGHAI ZHUA; RANBO, YU; JIANXI, YAO; DAN, WANG; JIAJUN, KE. **Morphology control of hydroxyapatite through hydrothermal process**. Journal of Alloys and Compounds,v.457,p.555–559,2008.
- 5- ASSUNÇÃO, FERNANDO COSME RIZZO. **Materiais avançados no Brasil 2010-2022**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos Brasília - DF, 2010.
- 6- **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Tábua de Vida Evolução da Mortalidade, IBGE, 2001.
- 7-COMPANYANDMARKETS.COM. **Brazil Biomaterial Market (2010–2015)**. <Disponível em: <http://www.companiesandmarkets.com/Market/Healthcare-and-Medical/Market-Research/Brazil-Biomaterial-Market-2010-2015/RPT944991>>>. Acessado em: 19 de julho de 2013.
- 8-DELFINO,C.S.;RIBEIRO,C.;VIEIRA,G.F.;BRESSIANI,A.H.A.;TURBINO,M.L. **The use of new materials for pulp capping (hydroxyapatite – HAp and tricalcium phosphate -  $\beta$ -TCP)**). Cerâmica, v.56, p.381-388,2010.

9-SHIRANEI, Y.HENRIQUE; ODAL, Y.DIOGO; PINHEIRO, C.THIAGO; CUNHA, R.MARCELO. **Implantes de Biomateriais em Falha Óssea Produzida na Fíbula de Ratos**. Revista Brasileira de Ortopedia, São Paulo, vol.45, n.5,2010.

10-ZHAO,QINFU. **Template-directed hydrothermal synthesis of hydroxyapatite as a drug delivery system for the poorly water-soluble drug carvedilol**. Applied surface science,v.257 fasc:23,p.10126 -10133,2011.

11- BOSE, S.; TARAFDER, S. **Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review**. Acta Biomaterialia, vol. 8, p. 1401–1421, 2012.

12-HEIMANN,B.ROBERT. **Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings**. Surface & Coatings Technology,(2012).

13- RIVERA MUÑOZ, E. **Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization**. Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Cidade do México, 2011.

14-GUASTALDI ANTONIO CARLOS; APARECIDA, ANAHI HERRERA. **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos**. Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n. 6, 2010.

15- OLIVEIRA, S.V. MEDEIROS, K.M. ARAÚJO, E.P. BRAGA, C.R.C. ARAÚJO, E.M. **Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.4.3, p.11-20, 2009.

16-LEVENTOURI,TH. **Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions**. Biomaterials ,v.27,p.3339–3342,2006.

17- IKOMA, TOSHIYUKI; YAMAZAKI, ATSUSHI. **Preparation and Structure Refinement of Monoclinic Hydroxyapatite**. Journal of Solid State Chemistry,v.144,p.272-276,1999.

18-USKOKOVIC',VUK;USKOKOVIC',P.DRAGAN. **Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents.** Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials,v. 96B, ed. 1,2010.

19-PORTAL DA PESQUISA CAPES. **Base de Dados Cristalográficos.**<disponível em: <http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites>>Acessado em: 19/07/2013.

20-MOSTAFA,N.Y;BROWN,P.W. **Computer simulation of stoichiometric hydroxyapatite: structure and substitutions.** Journal of Physics and Chemistry of Solids, v.68,p. 431-437,2007.

21-LEGEROS,R.Z. **Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates.** ClinOrthop Relat Res.,v. 395 ,p.81-98,2002.

22- TAS, A. C. **Monetite (CaHPO<sub>4</sub>) Synthesis in Ethanol at Room Temperature.** J Am CeramSoc, v.92, n.12, p.2907-12,2009.

23-MANDEL,S.; TAS,A.C. **Brushite (CaHPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O) to octacalcium phosphate (Ca<sub>8</sub>(HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O) transformation in DMEM solutions at 36.5 °C.** Materials Science and Engineering, v. 30,p. 245–254,2010.

24-NAKAHIRA ,A. et al. **Synthesis and Evaluation of Calcium-Deficient Hydroxyapatite with SiO<sub>2</sub>.** Materials Sciences and Applications,v.2, p.1194-1198,2011.

25-COMBES,C.;REY,C. **Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials.** Acta Biomaterialia ,v. 6 ,p. 3362–3378,2010.

26- KWON,S.H. et.al. **Synthesis and dissolution behavior of β-TCP and HA/ β-TCP composite powders.** Journal of the European Ceramic Society,v. 23,p. 1039–1045,2003.

27-ZHITAO,QI. et al. **Effects of β -TCP Ceramics on Osteoblast Cellular Proliferating, Mineralization and Osteocalcin Expression.** Journal of Wuhan University of Technology-Mater, Sci. Ed. Feb.,2012.

28-GROSS,K.A;BERNDT,C.C;GOLDSCHLAG,D.; IACONO V.J, **In Vitro Changes Of Hydroxyapatite Coatings**. International J. Oral & Maxillofacial Implants, v.12,p.589-597,1997.

29-ITO,ATSUO;ONUMA,KAZUO. **Growth of Hydroxyapatite Crystals**. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tissue Engineering.Japan.2010. chapter 16.

30-PALUSZKIEWICZ, CZESLAWA ;LÓŚARCZYK, S´ ANNA;PIJOCHA ,DAWID;SITARZ MACIEJ, BUC´KO MIROSLAW ,ZIMA ANETA, CHRÓŚ´CICKA ANNA, LEWANDOWSKA-SZUMIEL, MALGORZATA. **Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite**. Journal of Molecular Structure,v.976,p.301–309,2010.

31-LAURENCIN,DANIELLE;ALMORA-BARRIOS,NEYVIS;DE LEEUW, NORA H.;GERVAIS,CHRISTEL;BONHOMMEC,CHRISTIAN;MAURI,FRANCESCO;CHRZANOWSKI,WOJCIECH;KNOWLES, JONATHAN;NEWPORT,J. ROBERT ;WONG,ALAN;GAN,ZHEHONG;SMITH,E.MARK. **Magnesium incorporation into hydroxyapatite**.Biomaterials,v.32,p.1826-1837,2011.

32-STANIC,VOJISLAV;DIMITRIJEVIC,SUZANA;ANTIC-STANKOVIC, JELENA; MITRIC,MIODRAG;JOKIC,BOJAN; PLECASA, B.ILIJ; RAICEVICA,SLAVICA. **Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders**. Applied Surface Science,v.256,p.6083–6089,2010.

33-MA,JUN;WANG,YANHUA;ZHOU,LEI;ZHANG,SHENGMIN. **Preparation and characterization of selenite substituted hydroxyapatite**. Materials Science and Engineering C ,v.33,p.440–445,2013.

34-FLEET, M.E.;XIAOYANG LIU. **Carbonate apatite type A synthesized at high pressure: new space group (P3-)and orientation of channel carbonate ion primary**. Journal of Solid State Chemistry,v.174,p.412-417,2003.

35-FLEET, M.E.;XIAOYANG LIU. **Location of type B carbonate ion in type A-B carbonate apatite synthesized at high pressure.** Journal of Solid State Chemistry,v.177,p.3174-3182,2004.

36-TONEGAWA,TORU; TOSHIYUKI,IKOMA; TOMOHIKO,YOSHIOKA; HANAGATA; NOBUTAKA;TANAKA,JUNZO. **Crystal structure refinement of A-type carbonate apatite by X-ray powder diffraction.** J Mater Sci,v.45,p.2419–2426,2010.

37-THE COLORS OF CHEMICALS / COMPLEXES. <Disponível em:<http://lanthanumkchemistry.over-blog.com/article-the-colors-of-chemicals-complexes-104821449.html>>Acesso em:20/04/2013.

38-S. B. GABRIELA, J.V.P. PANAINOB, I.D. SANTOSC, L.S. ARAUJO, P.R. MEID, L.H. DE ALMEIDA, C.A. NUNES. **Characterization of a new beta titanium alloy, Ti–12Mo–3Nb, for biomedical applications.** Journal of Alloys and Compounds,536S,S208–S210,2012.

39-LEITUNE,V.C; COLLARES,F.M; TAKIMI,A;DELIMA,G.B ;PETZHOLD ,C.L; BERGMANN ,C.P; SAMUEL ,S.M. **Niobium pentoxide as a novel filler for dental adhesive resin.** J Dent. 2013,v.41(2),p.106-13,2013.

40-NASCIMENTO,W.J; BONADIO,T.G.M; FREITAS,V.F; WEINAND,W.R; BAESSO,M.L; LIMAW.M. **Nanostructured Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite.** Materials Chemistry and Physics,v.130,p.84– 89,2011.

41-HAIYAN,LUO,MINGDENG,WEI,KEMEI,WEI. **Synthesis of Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Nanorods by a Soft Chemical Process.** Journal of Nanomaterials.v.2009,2009.

42- MCQUEENA,T;XUB,Q;ANDERSENA,E.N;ZANDBERGENB,H.W;CAVAA,R.J. **Structures of the reduced niobium oxides Nb<sub>12</sub>O<sub>29</sub> and Nb<sub>22</sub>O<sub>54</sub>.** Journal of Solid State Chemistry,v.180,p.2864–2870,2007.

43-**ICDS**. Inorganic Crystal Structure Database.<Disponível em: <http://icsd.fiz-karlsruhe.de.w31001.dotlib.com.br/>>Acessado em 20/07/2013.

44- WOJCIECH L. SUCHANEK,RIMAN, RICHARD E. **Hydrothermal Synthesis of Advanced Ceramic Powders**. Advances in Science and Technology,v.45,p.184-193,2006.

45-BYUNG-DONG,HAHNA;JEONG-MIN,LEE;DONG-SOO,PARKA;JONG-JIN,CHOIA;JUNGHO,RYUA;WOON-HA,YOONA;JOON HWAN, CHOIA; BYOUNG-KUK,LEE;JONG-WOO,KIMA;HYOUN-EE,KIMB;SEONG-GON,KIMC. **Enhanced bioactivity and biocompatibility of nanostructured hydroxyapatite coating by hydrothermal annealing**. Thin Solid Films,v.519,ed.22,p.8085–8090,2011.

46-CHAO,QI;QI-LI,TANG; YING-JIE,ZHU; XIN-YU,ZHAO; FENG,CHEN. **Microwave-assisted hydrothermal rapid synthesis of hydroxyapatite nanowires using adenosine 5'-triphosphate disodium salt as phosphorus source**. Materials Letters,v.85,p.71–73,2012.

47-CHENA,CHUN-WEI; RIMANA,E.RICHARD; TENHUISENB,S.KEVOR; BROWNB,KELLY. **Mechanochemical–hydrothermal synthesis of hydroxyapatite from nonionic surfactant emulsion precursors**. Journal of Crystal Growth.v.270,ed.3–4,p.615–623,2004.

48-TOMOYO,GOTO;ILL YONG, KIM; KOICHI,KIKUTA; CHIKARA, OHTSUKI. **Hydroxyapatite formation by solvothermal treatment of a-tricalcium phosphate with water–ethanol solution**. Ceramics International,v.38,ed.2,p.1003–1010,2012.

49-NIKKISO.**Hydrothermal Synthesis System**.< Disponível em <http://www.nikkiso.com/products/industrial/highpress/ht.html>>Acessado em 20/07/2013.

50- **PARR INSTRUMENT COMPANY**. Non-Stirres Pressure Vessels.< Disponível em <http://www.parrinst.com/products/non-stirred-pressure-vessels/> em 20/07/2013.

51- VALENTINA, D.ROXANA; BARABÁS, REKA; CORMOS, M.ANA; BOGYA E.SÁRA,PAUL-SERBAN,AGACHI. **Growth Rate of Hydroxyapatite Crystals Obtained by Precipitation**. CHEMIA,v. 2, 2010.

52-RIMAN,E.RICHARD;WOJCIECH,L.,SUCHANEK;MALGORZATA,M.LENCKA.

**Hydrothermal Crystallization of Ceramics.** Ann. Chim. Sci. Mat.,v.27 (6), p. 15-36,2002.

53- LIU,X.Y. **Heterogeneous nucleation or homogeneous nucleation?.** Journal of Chemical Physics.v.112,ed.22,2000.

54-QIAO,ZHANG;SHU-JUAN,LIU;SHU-HONG,YU. **Recent advances in oriented attachment growth and synthesis of functional materials: concept, evidence, mechanism, and future.** Journal Materials Chemistry,v.19,pg.173–312,2009.

55-TAKA AKI,TANIGUCHI;TOMOAKI,WATANABE;KEN-ICHI, KATSUMATA;  
KIYOSHI,OKADA;NOBUHIRO,MATSUSHITA. **Synthesis of Amphipathic YVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> Nanophosphors by Oleate-Modified Nucleation/Hydrothermal-Growth Process.** J. Phys. Chem. C, v.114 (9), p.3763–3769,2010.

56-EPA. **Precipitation and Coprecipitation** <disponível em:[http://www.epa.gov/safewater/radionuclides/training/resources/MARLAP\\_14\\_8.pdf](http://www.epa.gov/safewater/radionuclides/training/resources/MARLAP_14_8.pdf)>Acesso em:20/07/2013.

57-JEHNG,JIH-MIRN; WACHS,ISRAEL E. **Niobium Oxide Solution Chemistry.** Journal of Raman Spectroscopy,v.22,p.83-89,1991.

58- BYRNE,H.ROBERT. **Inorganic speciation of dissolved elements in seawater: the influence of pH on concentration ratios.** Geochemical Transactions, p.3:11,2002.

59-KLEMPERER,G.WALTER,MAREK,A. KEITH. **An <sup>17</sup>(O) NMR Study of Hydrolyzed Nb(V) in Weakly Acidic and Basic Aqueous Solutions.** European Journal of Inorganic Chemistry,v.10-11, 2013.

60-CHANGSHENG,LIU;YUE,HUANG;WEI,SHEN;JINGHUA,CUI. **Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11.** Biomaterials,v.22,p.301-306,2001.

61-DOROZHKIN,V.SERGEY. **Bioceramics of calcium orthophosphates** .Biomaterials, v.31(7), p.1465-1485,2010.

62-GUODONG,ZHANGA; JINGDI,CHENA; SHEN,YANGA; QIFENG,YUA; ZHILI,WANGA; QIQING, ZHANGA. **Preparation of amino-acid-regulated hydroxyapatite particles by hydrothermal method**. Materials Letters,v.65, ed.3, p. 572–574,2011.

63-YONGSHENG,WANG;MEER,SAIFUL HASSAN;POERNOMO,GUNAWAN; RAYMOND,LAU; XIN, WANG; RONG,XU. **Polyelectrolyte mediated formation of hydroxyapatite microspheres of controlled size and hierarchical structure**. Journal of Colloid and Interface Science,v.339, ed.1,p.69–77,2009.

64-ZHANG,HAI-BIN;ZHOU,KE-CHAO;LI,ZHI-YOU;HUANG,SU-PING; ZHAO, YAN-ZHONG. **Morphologies of hydroxyapatite nanoparticles adjusted by organic additives in hydrothermal synthesis**. J. Cent. South Univ. Technol.,v.16:,p.0871-0875,2009.

65-NEIRA,S.INES; KOLENKO,V.YURY; LEBEDEV,I.OLEG; TENDELOO, VAN GUSTAAF;GUPTA,S.HIMADRI; GUITIA'N, FRANCISCO; YOSHIMURA, MASAHIRO. **An Effective Morphology Control of Hydroxyapatite Crystals via Hydrothermal Synthesis**. Crystal Growth & Design,v.9,p.466–474,2009.

66-YU-SHIANG,WU;YUAN-HAUN,LEE;HOU-CHENG,CHANG. **Preparation and characteristics of nanosized carbonated apatite by urea addition with coprecipitation method**. Materials Science and Engineering C,v,29,p.237–241,2009.

67-PARTHIBAN, S. PRAKASH; ILL YONG, KIM; KIKUTA,KOICHI ;OHTSUKI,CHIKARA. **Effect of urea on formation of hydroxyapatite through double-step hydrothermal processing**. Materials Science and Engineering: C,v,31,p.1383–1388,2011.

68-LEE,WING-HIN;LOO,CHING-YEE; ZAVGORODNIY,V.ALEXANDER; GHADIRI, MALIHEH; ROHANIZADEH,RAMIN. **A novel approach to enhance protein adsorption and cell proliferation on hydroxyapatite: citric acid treatment**. RSC Advances,v.12, 2013.

69-YAMAGUCHIA, ISAMU; IIZUKAA, SHUNSUKE; OSAKA, AKIYOSHI; MONMAD, HIDEKI; TANAKA, JUNZO. **The effect of citric acid addition on chitosan/hydroxyapatite composites.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v.214, p.111–118, 2003.

70-SHIMADZU . XRD-600.<Disponível em: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/xray/xrd-6000.pdf>> Acessado em 20/07/2013.

71- BUNACIU, A.ANDREI; HASSAN, Y.ABOUL-ENEIN; FLESCHEIN, SERBAN. **Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis.** Applied Spectroscopy Reviews, v.45, p.206–219, 2010.

72-LEITE, O.DIEGO, J.ROGERIO. **Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio (Infrared spectroscopy: a presentation for high school students).** Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 34, p.2504, 2012.

73-FATOBENE, J.THIAGO. **Espectroscopia Raman.** Perkin-Elmer. <Disponível em: [http://centauro.metalmat.ufrj.br/seminarios/PERkinElmer\\_Raman\\_AGO2008.PDF](http://centauro.metalmat.ufrj.br/seminarios/PERkinElmer_Raman_AGO2008.PDF)> Acessado em 20/07/2013.

74-RODRIGUES, D.G.ARIANO; GALZERANI, C.JOSÉ. **Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades (Infrared, Raman and photoluminescence spectroscopies: potentialities and complementarities).** Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 34, p.4309, 2012.

75-HORIBA SCIENTIFIC .Raman Academia .< Disponível em <http://www.horiba.com/scientific/products/raman-spectroscopy/tutorial-faqs/>> Acessado em 20/07/2013.

76-PRINCETON INSTRUMENTS .< Disponível em: <http://www.princetoninstruments.com/cms/index.php/library/11-knowledgebase-faqs>> Acessado em: 20/07/2013.

77-SIGLE,WILFRIED. **Analytical Transmission Electron Microscopy**. Annu. Rev. Mater., v.35,p.239–314,2005.

78-FEI INSTRUMENTS. **An Introduction to electron microscopy**. <Disponível em [http://www.fei.com/uploadedFiles/Documents/Content/Introduction\\_to\\_EM\\_booklet\\_July\\_10.pdf](http://www.fei.com/uploadedFiles/Documents/Content/Introduction_to_EM_booklet_July_10.pdf)>Acessado em 20/07/2013.

79-PARRY-VERNON,K.D. **Scanning Electron Microscopy: an introduction**.Ill-Vs Review,v.13,p.40-44,2000.

80-Bogner,A.;Jouneaua,P.H;Thollet,G;Basset,D.;Gauthier,C. **A history of scanning electron microscopy developments: Towards“wet-STEM”**. Imaging.Micron,v.38,p.390–401,2007.

81-PERKIN-ELMER. **Beginners Guide of Modern Thermogravimetry**. <Disponível em:[http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/4474556GDE\\_TGABeginnersGuide.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/4474556GDE_TGABeginnersGuide.pdf)>Acessado em 20/07/2013.

82-BLUMM,JÜRGEN. **Modern Thermogravimetry**.Netsch Equipaments.<Disponível em:[http://www.netzsch-thermal-analysis.com/uploads/tx\\_nxnetzschmedia/files/White\\_Paper\\_Modern\\_Thermogravimetry.pdf](http://www.netzsch-thermal-analysis.com/uploads/tx_nxnetzschmedia/files/White_Paper_Modern_Thermogravimetry.pdf)>Acessado em 20/07/2013.

83-KLANCNIK,GREGA;MEDVED,JOŽEF;MRVAR,PRIMOŽ. **Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation**. RMZ – Materials and Geoenvironment,v.57,p.127–142, 2010.

84-MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. **A Basic Guide to Particle Characterization**. Malvern Instruments,2012.

85-HORIBA. **A Guidebook to Particle Size Analysis**. <Disponível em: [http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA\\_Guidebook.pdf](http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA_Guidebook.pdf)>Acessado em 20/07/2013.

86- MALVERN INSTRUMENTS. **Dynamic Light Scattering:An Introduction in 30 Minutes.** DLS technical note.<Disponível em:[http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/\\$file/MRK656-01\\_An\\_Introduction\\_to\\_DLS.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf)>Acessado em 20/07/2013.

87-DUARTE,C.LAUREN; JUCHEM,L.PEDRO; PULZ,G.MARIA; DEVBRUM, T.M.TÂNIA; CHODUR,NELSON; LICCARDO,ANTÔNIO; FISCHER, C.ADRIANE; ACAUAN,B.ROBERTA. **Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros.** Pesquisas em Geociências, v.30(2),p.3-15, 2003.

88-YURUGI,TOSHIKAZU; ITO,SUKEHIRO; NUMATA,YOSHINORI; SYKES,KEYTH. **SEM/EDX-Integrated Analysis System SEMEDX Series.** Readout No.22,2001.<Disponível em: <http://www.horiba.com/uploads/media/RE02-04-014-600.pdf>>Acessado em 20/07/2013.

89-MARKOWICZ,A. **An overview of quantification methods in energy-dispersive X-ray fluorescence analysis.** J. Phys.,v.76,p.321-329,2011.

90-JALILI,NADER;KARTHIK,LAXMINARAYANA. **A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences.** Mechatronics,v.14 p.907–945,2004.

91-ARREBOLA,ARENCIBIA F.DANIEL ;FERNÁNDEZ,ROSARIO L.ALFREDO ; LAZARA,C. SÁNCHEZ DAYISELL. **Principal assays that to determine the citotoxicity of a substance, some considerations and their utility.** RETEL : Revista de Toxicología en Línea,v.19,p.40,2009.

92-MALMONGE, S.M.;ZAVAGLIA, C.A.C.;SANTOS.JR. A.R.;WADA, M.L.F. **Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo in vitro.** Revista Brasileira de Engenharia Biomédica,v.15, p.49-54,1999.

93-ROGERO,OTA SIZUE;LUGÃO,B.ADEMAR;IKEDA,I. TAMIKO;CRUZ,S. ÁUREA . **Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias.** Mat. Res.,v.6,p.317-320,2003.

94-PUBCHEM COMPOUNDS <disponível em:  
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5904246#x395>> Acessado em  
29/07/2013.

95-DIB, EDUARDO; RODRIGUES, B.EDUARDO; MAIA,MAURÍCIO; MEYER,  
H.CARTSEN; PENHA, MARCONDES; FURLANI, A.BRUNO; COSTA.P.F.ELAINE;  
FARAH,E.MICHEL. **Corantes vitais em cromovitrectomia**. Arq. Bras. Oftalmol. vol.72  
no.6 São Paulo,2009.

96-CHEMSPIDER DATABASE <Disponível em: [http://www.chemspider.com/Chemical-  
Structure.10624941.html](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10624941.html)> Acessado em 20/07/2013.

97-MOSMANN,TIM. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival:  
Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**. Journal of Immunological  
Methods,v.65,p.55-63,1983.

98-CIAPETTI,G.;CMNI,E.;PRATELLI,L.;PIZZOFERRATO,A. **In vitro evaluation of  
cell/biomaterial interaction by MTI assay**. Int J Nanomedicine,v.7: p;1781–1791,2012.

99-WEYERMANN,JORG;LOCHMANNA,DIRK;ZIMMERB,ANDREAS. **A practical note  
on the use of cytotoxicity assays**. International Journal of Pharmaceutics v.288,p.369–  
376,2005.

100-TAMAI,MASATO;ISAMA,KAZUO.J **Synthesis of a novel b-tricalcium  
phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and  
evaluation of its osteogenic properties**. Artif Organs,v,10,p.22–28,2007.

101-MA,MING-GUO. **Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal  
synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity**. Int J  
Nanomedicine,v.7,p.1781–1791,2012.

102-ZHANG,XING;VECCHIO,S.KENNETH. **Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite  
rods**. Journal of Crystal Growth,v.308,p.133–140,2008.

103-ROEDER,K.RYAN;CONVERSE,L.GABRIEL;LENG,HUIJIE;YUE,WEIMIN. **Kinetic Effects on Hydroxyapatite Whiskers Synthesized by the Chelate Decomposition Method.** J. Am. Ceram. Soc.,v.89 [7] p.2096–2104,2006.

104-LIANG, WEI; NIU, YUNFEI, GE, SHUHUA, SONG, SHAOJUN; SU, JIACAN; LUO,ZHUOJING. **Effects of hydrothermal treatment on the properties of nanoapatite crystals.** International Journal of Nanomedicine.,v.2012:7,p.5151-5158,2012.

105-WANG,YONG SHENG; HASSAN, S.MEER; GUNAWAN, POERNOMO; LAU, RAYMOND;WANG,XIN;XU,RONG. **Polyelectrolyte mediated formation of hydroxyapatite microspheres of controlled size and hierarchical structure.** Journal of Colloid and Interface Science,v.339,p.69–77,2009.

106-LI, LING; CROSBY, KYLE; SAWICKI, MONICA; SHAW, L.LEON; WANG, YONG. **Effects of Surface Roughness of Hydroxyapatite on Cell Attachment and Proliferation.** J Biotechnol Biomater,p.2:6,2012.

107-OSATHANON,THANAPHUM;BESPINYOWONG,KRITCHAI; ARKSORNNUKIT,MANSUANG;TAKAHASHI,HIDEKAZU. **Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness.** Journal of Oral Science, v.53,p.23-30,2011.

108-LIU,MEINAN;XUE,FENG DONG. **Large-scale fabrication of H<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Nb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> and Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> hollow microspheres.** Materials Research Bulletin,v.45,p. 333,2009.

109-LANDI,E;TAMPIERI,A.;CELOTTI,G.;SPRIO,S. **Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites.** Journal of the European Ceramic Society,v.20 , p.2377±2387,2000.

110-XIA, WEI; LINDAHL, CARL; PERSSON, CECILIA; THOMSEN, PETER; LAUSMAA,JUKKA;ENGQVIST,HAKAN. **Changes of Surface Composition and Morphology after Incorporation of Ions into Biomimetic Apatite Coatings.** Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology,v.1,p.7-16,2010.

111-AINA,V.et al. **Sr-containing hydroxyapatite : morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells.** Materials Science and Engineering C, v.33, p.1132–1142,2013.

112-PANDA,R.N et al. **FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique.** Journal of Physics and Chemistry of Solids v.64, p.193–199,2003.

113-YOSHIMURA,M. **Morphology Control of Hydroxyapatite Crystals.** Crystal Growth & Design,v.9,n.1,2009.

114-SINGH,A. **Hydroxyapatite, a biomaterial: Its chemical synthesis, characterization and study of biocompatibility prepared from shell of garden snail,Helix aspersa Bull. Mater. Sci., v.35,p.1031–1038,2012.**

115-MARKOVIC,M. **Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite.** Reference Material Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology,v.109,n.6,2004.

116-MCDEVITT,T.N.;BAUN,L.W.**Infrared absorption study of metal oxides in the low frequency region (700-240 cm<sup>-1</sup>).**SpectrochimActa,v.20,p.799-808,1964.

117-MEDEIROS,F.F.P.;MOURA,M.F.V.;SILVA,A.G.P.;SOUZA,C.P;GOMES K.K.P; GOMES,U.U. **THE THERMAL DECOMPOSITION OF MONOHYDRATED AMMONIUM OXOTRIS(OXALATE)NIOBATE.** Brazilian Journal of Chemical Engineering,v.23,p.531 - 538,2006.

118-XIAO,X.F.;LIU,F.R.;GAO,J.Y. **Hydrothermal preparation of nanocarbonated hydroxyapatite crystallites.** Materials Science and Technology,v.24,p.1199-1202,2008.

119- SANOSH,K.P.;MIN-CHEOL,CHU; BALAKRISHNAN,A.;LEE,YONG-JIN.; KIM,T.N.; SEONG,JAI CHO. **Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition.** Current Applied Physics ,v.9,p.459–1462,2009.

120-MACEK,M;OREL,B. **Electrochromism of Sol-gel Derived Niobium Oxide**

**Films.** Tr. J. of Chemistry, V.22, P.67-72, 1998.

121-KHAN, F.A; AWAIS, M; KHAN, S.A; TABASSUM, S; CHAUDHRY, A.A; REHMAN, U.I. **Raman Spectroscopy of Natural Bone and Synthetic Apatites.** Applied Spectroscopy Reviews, v.48:4, p.329-355, 2013.

122- RAO, J.S. et al. **Raman spectra of niobium oxides.** Spectrochim Acta, v. 32A, p. 1067 - 1076, 1976

123-HUANG, X.BILL; WANG, KANG; CHURCH, S.JEFREY; YING-SING, LI. **Characterization of oxides on niobium by raman and infrared spectroscopy.** Electrochimica Acta 44 2571-2577 1999

124-RASMIN. **Raman Spectra Database of Minerals and Inorganic Materials.** <Disponível em: [http://riodb.ibase.aist.go.jp/rasmin/E\\_intro.htm](http://riodb.ibase.aist.go.jp/rasmin/E_intro.htm)> Acessado em 27/07/2013.

125-ENS-LYON. **Handbook of Minerals Raman Spectra.** <Disponível em: <http://www.ens-lyon.fr/LST/Raman/index.php>> Acessado em 22/07/2013.

126-BRAGA, Valdeilson Souza. **Preparação e caracterização de catalisadores baseados em pentóxido de nióbio e óxido de cobre(II) aplicados em reações de esterificação e transesterificação.** 2007. 114 p. Tese (Doutorado em Química)-Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

127-MONSHI, AHMAD; FOROUGH, R. MOHAMMAD; MONSHI, R. MOHAMMAD. **Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD.** World Journal of Nano Science and Engineering, v.2, p.154-160, 2012.

128-CHEN, CHANGLIAN; HUANG, ZHILIANG; YUAN, WENJUAN, YUAN, LI, JIANQIU; CHENG, XIAOKUN; CHI, RU-NA. **Pressure effecting on morphology of hydroxyapatite crystals in homogeneous System.** CrystEngComm, v.13, p.1632-1637, 2011.

129-PALAMA, E. I.; COLUCCIA, A.M.L.; D'AMONE, S.; GIGLI, G. **Cell Uptake and Validation of Novel PECs for Biomedical Applications.** Journal of Drug Delivery, v.2011, 2011.