



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciência

Faculdade de Engenharia

Adilson Cláudio Quizunda

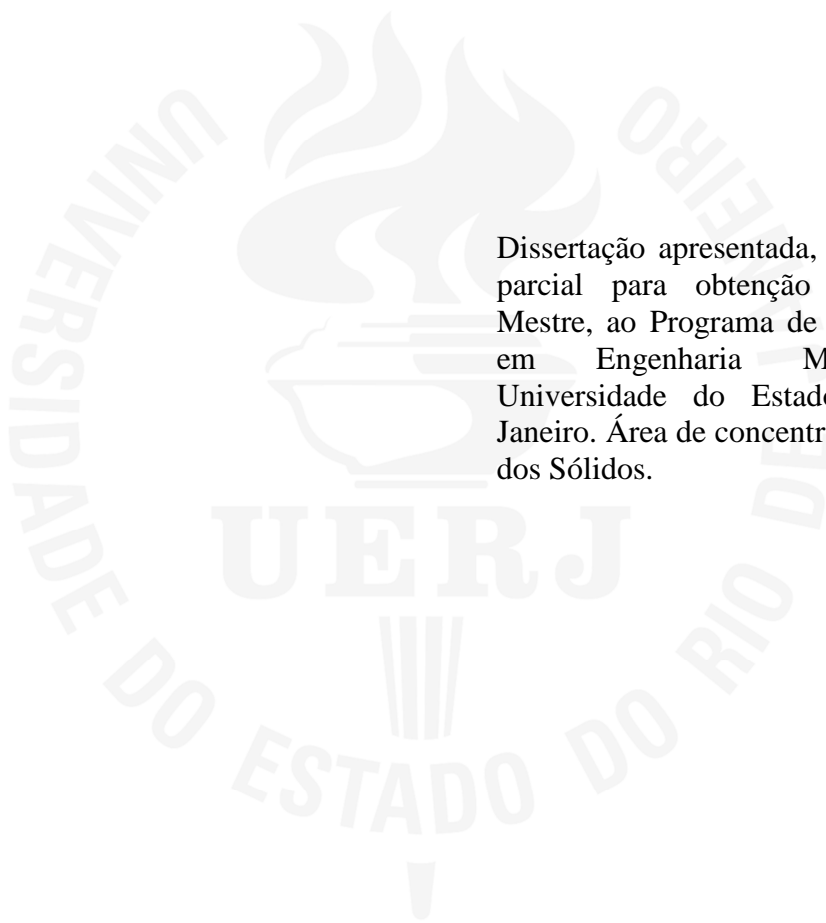
**Desenvolvimento de Metodologia para Caracterização de Hidroxiapatita  
pelas técnicas de MEV, MET e DRX**

Rio de Janeiro

2019

Adilson Cláudio Quizunda

**Desenvolvimento de Metodologia para Caracterização de Hidroxiapatita pelas técnicas de MEV, MET e DRX**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Mecânica dos Sólidos.

Orientador: Prof. Dr. José Brant de Campos

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

Q8 Quizunda, Adilson Cláudio.  
Desenvolvimento de metodologia para caracterização de hidroxiapatita pelas técnicas de MEV, MET e DRX / Adilson Cláudio Quizunda. – 2019.  
69f.

Orientador: José Brant de Campos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia mecânica - Teses. 2. Hidroxiapatita - Teses. 3. Raios X - Teses. 4. Microscopia eletrônica - Teses. 5. Cálcio - Teses. I. Campos, José Brant de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. III. Título.

CDU 537.533.35

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Adilson Cláudio Quizunda

**Desenvolvimento de Metodologia para Caracterização de Hidroxiapatita pelas técnicas de MEV, MET e DRX**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Mecânica dos Sólidos.

Aprovada em 28 de agosto de 2019.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. José Brant de Campos (Orientador)

Faculdade de Engenharia – UERJ

---

Prof. Dr. Marilza Sampaio

Faculdade Estácio de Sá – UNESA

---

Prof. Dr. Suzana Bottega Peripolli

Faculdade de Engenharia – UERJ

---

Prof. Dr. Francisco José Moura

Departamento de Engenharia Química e de Materiais – PUC

Rio de Janeiro

2019

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho em especial à minha mãe, pois ela não mediu esforços para que eu tivesse os melhores estudos, pelo incentivo que foi me dado e pela ajuda oferecida desde sempre.

## AGRADECIMENTOS

No decorrer deste projeto, algumas instituições e pessoas merecem um agradecimento especial, como seguem:

Primeiramente a Deus, porque ele é meu tudo.

Aos professores Brant e Marilza pela orientação eficiente, segura, pelo apoio e pelas valiosas sugestões.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização do curso de mestrado, e a todo o corpo docente.

À CAPES pelo financiamento da bolsa.

À minha igreja, que sempre apoiou meus sonhos.

Ao João, Lorena, à Ysena, Mãe (Edna) e ao meu Pai (Altamiro) pelo apoio incondicional em toda a minha trajetória.

Aos amigos que a UERJ me proporcionou, Vitor Ramos e Hirschel por todo apoio, ao INMETRO, CBPF e a Universidade Estácio por me permitirem usar todas as instalações.

Por mais que as coisas fujam ao nosso controle,  
elas continuam rigorosamente sob o controle de Deus.

*Hernandes Dias Lopes*

## RESUMO

QUIZUNDA, Adilson Cláudio. **Desenvolvimento de metodologia para caracterização de hidroxiapatita pelas técnicas de MEV, MET e DRX**. 2019. 69f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Os dentes e ossos possuem cerca de 30% a 70% de hidroxiapatita (HA) e tem uma grande importância na reserva de cálcio e fósforo dos vertebrados. A HA é considerada a fase mais estável em um ambiente fisiológico e possui propriedades de biocompatibilidade e bioatividade. Dessa maneira, ajuda no crescimento ósseo nos locais em que se encontra a osteocondutividade, estabelecendo as ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioatividade) e a proliferação das células ósseas (osteoblastos, fibroblastos e outras). A HA foi obtida a partir de reação de precipitação entre  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e ácido fosfórico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , onde foi utilizado o  $\text{NH}_4\text{OH}$  para correção do pH. Os produtos utilizados, com exceção do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , foram de grau analítico e aproveitados no tratamento adicional. Em vista a obtenção de HA por meio das cascas de ovos de galinha como fonte de íons de cálcio, levando em conta que a casca de ovo é um produto que é descartado, buscando reaproveita-lo, tem sido desenvolvidas varias maneiras de aproveitamento, um deles, é a obtenção da HA, foram utilizadas técnicas como Raios-X, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão para a caracterização do material. Esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de técnicas de preparação de amostras, para geração de imagens de boa resolução no Microscópio eletrônico de varredura, e imagens de alta resolução no Microscópio eletrônico de transmissão, com a metodologia de caracterização desenvolvida, variando o tempo de ultrassom, o tempo de secagem, estabelecendo padrões específicos de preparação de suportes (stubs), afim de obtermos resultados satisfatórios, que nos permitiram fazer uma caracterização da HA.

Palavras-chave:

Obtenção;

Hidroxiapatita;

Caracterização.



## ABSTRACT

QUIZUNDA, Adilson Cláudio. **Methodology development for characterization of hydroxyapatite by SEM, MET and XRD techniques**. 2019. 69f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Teeth and bones contain about 30% to 70% hydroxyapatite (HA) and are of great importance in the vertebrate calcium and phosphorus reserve. HA is considered the most stable phase in a physiological environment and has biocompatibility and bioactivity properties. In this way, it helps in bone growth where osteoconductivity is located, establishing the chemical links between it and bone tissue (bioactivity) and the proliferation of bone cells (osteoblasts, fibroblasts and others). The HA was obtained from precipitation reaction between  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and phosphoric acid,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , where  $\text{NH}_4\text{OH}$  was used for pH correction. The products used, except for  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , were of analytical grade and used in the additional treatment. In order to obtain HA through chicken egg shells as a source of calcium ions, considering that eggshell is a product that is discarded, seeking to reuse it, several ways of harnessing it have been developed. of these, is the obtaining of HA, techniques such as X-rays, Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy were used to characterize the material. The objective of this work was the development of sample preparation techniques for the generation of good resolution images in the scanning electron microscope and high resolution images in the transmission electron microscope, with the characterization methodology developed, varying the ultrasound time. , the drying time, establishing specific stub preparation standards, in order to obtain satisfactory results, which allowed us to characterize the HA.

Keywords: Obtaining; Hydroxyapatite; Characterization.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações, vantagens e desvantagens dos polímeros, metais, compósitos, cerâmicas e vidros utilizados como biomateriais .....	19
Tabela 2 - Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatitas.....	22
Tabela 3 - Principais características dos dois tipos de microscopia .....	43
Tabela 4 - resumo dos testes realizados.....	50
Tabela 5 - Resultados dos tamanhos de cristalitos, parâmetros de rede da célula unitária, a partir do refinamento de Rietveld, de cada amostra analisada .....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arranjo atômico da HA.....	23
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura cristalina da hidroxiapatita (azul: oxigênio; vermelho: cálcio; amarelo: fósforo; branco: hidrogênio).....	24
Figura 3 - Arranjo dos íons ao longo do eixo c na Hidroxiapatita. ....	25
Figura 4- Stubs de latão.....	30
Figura 5 - Fita fixadora de carbono.....	31
Figura 6 - Tinta adesiva de carbono.....	31
Figura 7 - (A) Grades de malha hexagonal de 3,05 mm (B) 3.05 grades <i>holey</i> com uma gama de tamanhos de poros individuais (C). ....	34
Figura 8 - Grelha de localização de 65 mm <sup>2</sup> para grandes microscópios de luz e espécimes de MEV. ....	34
Figura 9 - Esquema da Difração de Raios X.....	38
Figura 10 - Comparação entre as funções Lorentziana, Gaussiana e Pseudo-Voigh. ....	40
Figura 11 - Diversidade de sinais gerados a partir da interação de um feixe de elétrons de alta energia e uma amostra fina.....	45
Figura 12 - processo de condicionamento do stub (a) preparação metalografica (b) finalização do processo metalógrafo (c) imagem do MEV para avaliar o processo mag x3000.....	48
Figura 13 - pesagem da HA antes e depois.....	49
Figura 14 - Goniômetro do Difratorômetro (X'Pert PRO).....	51
Figura 15 – (a) HA sem secagem (natural) mag. x300.(b) HA com secagem de 120 °C mag x300. ....	54
Figura 16 –(a) HA sem secagem (natural) mag x2000. (b) HA com secagem de 120 °C mag x2000. ....	55
Figura 17 – (a) HA com secagem por 1h mag x300.(b) HA com secagem por 2h mag x300. (c) HA com secagem por 3h mag x300. ....	56
Figura 18 – (a) HA com secagem por 1h mag x2000.(b) HA com secagem por 2h mag x2000. (c) HA com secagem por 3h mag x2000. ....	56
Figura 19 – (a) HA usando <i>stub</i> condicionado mag x3.000 (b) HA usando tinta de carbono mag x30.000(c) HA usando fita de carbono mag x5.000.....	57

Figura 20 – (a) HA no <i>stub</i> condicionado 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> condicionado 20 minutos de ultrassom mag x 60.000 (c) HA no <i>stub</i> condicionado 30 minutos de ultrassom mag x60.000 .....	58
Figura 21 – (a) HA no <i>stub</i> tinta de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000(b) HA no <i>stub</i> tinta de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000(c) HA no <i>stub</i> tinta de carbono 30 minutos de ultrassom mag x 60.000 .....	58
Figura 22 – (a) HA no <i>stub</i> fita de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> fita de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no <i>stub</i> fita de carbono 30 minutos de ultrassom mag x60.000 .....	58
Figura 23 - (a) HA no <i>stub</i> espelhado 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> fita de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no <i>stub</i> com tinta de carbono 10 minutos de ultrassom usando éter como agente de dispersão mag x60.000.....	60
Figura 24 - (a) HA no <i>stub</i> espelhado 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> fita de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no <i>stub</i> com tinta de carbono 20 minutos de ultrassom usando éter como agente de dispersão mag x60.000.....	60
Figura 25 - (a) HA no <i>stub</i> espelhado 30 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> fita de carbono 30 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no <i>stub</i> com tinta de carbono 30 minutos de ultrassom usando éter como agente de dispersão mag x60.000.....	60
Figura 26 - (a) HA no <i>stub</i> espelhado 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> fita de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no <i>stub</i> com tinta de carbono 10 minutos de ultrassom usando álcool isopropílico como agente de dispersão mag x60.000	61
Figura 27 - (a) HA no <i>stub</i> espelhado 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> fita de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no <i>stub</i> com tinta de carbono 20 minutos de ultrassom usando álcool isopropílico como agente de dispersão mag x60.000.....	61
Figura 28 - (a) HA no <i>stub</i> espelhado 30 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no <i>stub</i> fita de carbono 30 minutos de Ultrassom mag x60.000 (c) HA no <i>stub</i> com tinta de carbono 30 minutos de ultrassom usando álcool isopropílico como agente de dispersão mag x60.000	61
Figura 29 - Espectros de difração de Raios-X: (a) envelhecida em temperatura ambiente; (b) HA 600 sintetizada em T = 600; (c) HA 800 sintetizada em T= 800; (d) HA 1000 sintetizada em T= 1000.....	63
Figura 30 - (a) Imagem do MEV da HA.600 grade 1;(b) Imagem MET Campo claro da HA.600. As setas em branco indicam a nanoporosidade no material. ....	65

Figura 31 – (a) Imagem do MEV da HA.600 no *stub* espelhado; (b) Imagem do MEV da HA.amb.sac.1.600 grade 3; (c) Imagem de MET Campo claro da HA.amb.sac.1.600. As setas indicam a nanoporosidade no material. .... 65

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 OBJETIVO</b> .....	<b>15</b>
1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 CLASSIFICAÇÃO DE TIPOS DE MATERIAIS USADOS EM AMOSTRAS</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 METAIS, LIGAS E MATERIAIS METÁLICOS .....	17
2.1.2 MATERIAIS DUROS, SECOS E INORGÂNICOS .....	17
2.1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE UMA CERÂMICA .....	17
2.1.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS ORGÂNICOS SINTÉTICOS.....	18
2.1.4 MATERIAIS DE ORGANISMOS BIOLÓGICOS .....	18
2.1.4.1 BIOMATERIAIS .....	18
2.1.5 MATERIAIS ORGÂNICOS NATURAIS DUROS OU SECOS - HA .....	20
<b>2.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA</b> .....	<b>22</b>
2.2.1.1 HIDROXIAPATITA NANOPARTICULADA .....	25
<b>2.3 APROVEITAMENTO DA CASCA DE OVO DE GALINHA PARA OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITA</b> .....	<b>27</b>
<b>3 METÓDOS E MATERIAIS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 FERRAMENTAS UTILIZADAS NA PREPARAÇÃO DA AMOSTRA</b> .....	<b>29</b>
3.1.1 TAMANHO DA AMOSTRA .....	29
3.1.2 FERRAMENTAS PARA MANUSEAR AMOSTRAS E PARA AJUDAR A LIMPAR AMOSTRAS .....	30
3.1.3 TIPOS DE FIXADORES PARA AMOSTRAS .....	31
<b>3.2 TIPOS DE SUPORTE DE AMOSTRA</b> .....	<b>31</b>
3.2.1 AUTO-SUPORTE.....	32
3.2.2 SUPORTE PRIMÁRIOS.....	32
3.2.3 SUPORTES SECUNDÁRIOS .....	33
3.2.4 FOLHAS DE METAL .....	33
3.2.5 GRADES DO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DA TRANSMISSÃO.....	33
<b>3.3 SOLVENTES PARA DISPERSÃO</b> .....	<b>35</b>
3.3.1 SOLVENTES POLARES .....	35
3.3.2 SOLVENTES APOLARES.....	36
<b>3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA</b> .....	<b>37</b>

3.4.1	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X .....	37
3.4.2	TAMANHO DE CRISTALITO .....	39
3.4.3	MÉTODO DE RIETVELD .....	41
3.4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	42
3.4.4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	43
3.4.4.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	44
<b>3.5</b>	<b>OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA POR MEIO DA CASCA DE OVO .....</b>	<b>46</b>
<b>3.6</b>	<b>CONDICIONAMENTO DO STUB .....</b>	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HA PARA O MEV .....</b>	<b>48</b>
3.7.1	PREPARAÇÃO DE AMOSTRA DE HA PURA .....	49
3.7.2	PREPARAÇÃO DE AMOSTRA DE HA USANDO REAGENTES (TOLUENO, ÉTER E ALCOOL ISOPROPILICO) .....	49
<b>3.8</b>	<b>PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HA PARA A DIFRAÇÃO DE RAIO – X.....</b>	<b>51</b>
<b>3.9</b>	<b>PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HA PARA O MET.....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>APERFEÇOAMENTO DOS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS A SEREM ANALISADAS NO MICROSCOPIO DE VARREDURA.....</b>	<b>54</b>
4.1.1	AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DIREITA DA AMOSTRA E COM TRATAMENTO PREVIO EM ESTUFA .....	54
4.1.2	ANÁLISE DO TEMPO DE SECAGEM .....	55
4.1.3	ANÁLISE QUANTO AO USO DA FITA, TINTA E O STUB CONDICIONADO SEM REAGENTES.....	56
4.1.4	ANÁLISE QUANTO DE REAGENTES DE DISPERSÃO.....	57
4.1.4.1	TOLUENO.....	57
4.1.4.2	ÉTER.....	59
4.1.4.3	ÁLCOOL ISOPROPÍLICO .....	61
4.1.5	RESULTADO DO DRX .....	62
4.1.6	RESULTADO DO MET .....	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os compostos derivados do fosfato de cálcio, sendo como um dos mais pesquisados a hidroxiapatita, têm sido objeto de muitas investigações como material de implante, todos os anos mais de 2,2 milhões de pessoas em todo o mundo necessitam realizar algum processo cirúrgico para reparar algum tipo de defeito ósseo, tanto relacionado a acidentes críticos quanto a traumas ou doenças degenerativas (como ressecção de tumores) fazendo uso de enxertos ou próteses (Javaid e Kaartinen, 2013), derivados do fosfato de cálcio também são usados como sistema de cobertura para superfícies de estruturas metálicas, como catalisador, suporte para catalisadores, fertilizantes, e no tratamento de água. Esta diversidade de aplicações à torna objeto de inúmeras pesquisas seja no desenvolvimento de novos materiais ou na melhoria da tecnologia da sua fabricação. Desta forma, diversos métodos de síntese de hidroxiapatita vêm sendo estudados, tais como: precipitação, técnica hidrotérmica, método de fluxo, eletro-cristalização, pirólise, liofilização, irradiação por micro-ondas e sol-gel. (Dourado 2006).

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio, cuja fórmula é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é um dos fosfatos mais estudados em função da sua ampla aplicação em diversas áreas. As propriedades físicas e químicas da hidroxiapatita são modificadas de acordo com o método, o precursor e as condições reacionais, através do qual ela foi sintetizada.

A obtenção de estruturas porosas de HA semelhante ao osso humano é ainda um desafio na área dos biomateriais, pois o controle da estrutura porosa é um ponto crítico. Alguns métodos de síntese utilizam agentes formadores de poros que são posteriormente eliminados após tratamento, formando assim estruturas porosas (Miculescu et al., 2017).

A utilização da casca do ovo de galinha para a obtenção de compostos fosfatos de cálcio apresenta-se como uma via alternativa ao desenvolvimento e produção de biomateriais de origem sintética com menores custos. As conchas também são podem fornecer grandes fontes de carbonato de cálcio, porém há uma desvantagem na sua utilização por possuírem vestígios de chumbo e outros elementos potencialmente tóxicos como alumínio, cádmio e mercúrio, encontrados em sua estrutura devido à alta capacidade de absorção do carbonato. No entanto, o carbonato da casca de ovo apresenta a vantagem de não conter esses elementos tóxicos (Murakami et al., 2007).



A utilização da casca do ovo está relacionada também a aspectos ambientais, visto que pode diminuir problemas de poluição ambiental para os casos destes materiais serem descartados inadequadamente, diretamente no meio ambiente, favorecendo o desenvolvimento de bactérias e fungos devido ao teor de matéria orgânica (Rivera et al., 1999), gerando consequências indesejáveis como mau cheiro e o aparecimento de vetores de doenças.

Quanto o controle ambiental, a hidroxiapatita vem sendo estudada como catalisador na decomposição de compostos orgânicos. Ela é empregada como catalisador essencial para desidratação e desidrogenação de álcoois primários para aldeídos e cetonas, a altas temperaturas (Dourado 2006). Permanecendo na área ambiental, a hidroxiapatita contém uma elevada capacidade de remover metais pesados, sendo usada em diversas áreas, como para o refino de petróleo, na remoção de impurezas presentes no petróleo, assim também como em águas e solos contaminados, como também de dejetos industriais. Esta aplicação tem sido objeto de grandes investigações devido ao alto grau de toxicidade proveniente desses metais, aliado ao fato da hidroxiapatita representar um material de baixo custo que poderia ser usado no controle da poluição ambiental (Costa, et al. 2010).

Apesar da importância da preparação de amostras, para análise e caracterização de algumas materiais, nesta área, contamos com uma bibliografia muito limitada, para este trabalho foi utilizado o livro de preparação (Echlin 2009) e poucos trabalhos ligados especificamente a preparação de amostras em pó (HA). Assim, este trabalho tem como proposta a síntese de hidroxiapatita pelo método de precipitação a partir da reação do ácido fosfórico com hidróxido de cálcio fazendo uso de materiais porogênicos, e desenvolver metodologias para uma preparação adequada, que nos possibilitará a fazer uma caracterização e análise da HA.

## **1.1 OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo, desenvolver de técnicas de preparação de amostras, para possibilitar um estudo da morfologia, tamanho das partículas de HA, bem como a utilização de diferentes reagentes de dispersão, para ajudar no estudo das partículas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) e microscópio eletrônico de transmissão (MET), comparação dos tamanhos pelas diferentes técnicas e a observação de nanoporos no MET.

### 1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conseguir uma dispersão da HA natural, utilizando pinceis procurando melhorar a forma que vem sendo usada, a deposição por meio de um palito;
- Conseguir uma preparação dos porta-amostras (stubs) que possibilite gerar imagens de boa qualidade no MEV;
- Selecionar o melhor reagente de dispersão (tolueno, éter e álcool isopropílico) para desaglomeração das partículas de HA no MEV e MET;
- Selecionar o melhor tempo de ultrassom (10, 20 e 30 minutos) para que não haja uma alteração das características morfológicas das partículas de HA;
- Selecionar o melhor tempo de secagem, afim de se retirar qualquer humidade presente na HA.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

### **2.1 CLASSIFICAÇÃO DE TIPOS DE MATERIAIS USADOS EM AMOSTRAS**

Os tipos de materiais utilizados para amostras estão divididos em cinco grupos e cada grupo possui características distintas, como consequência, pode exigir diferentes abordagens na preparação da amostra(Echlin 2009).

#### **2.1.1 METAIS, LIGAS E MATERIAIS METÁLICOS**

Esses tipos de materiais ocorrem naturalmente como metais ou minérios e também como componentes fabricados (nanofios, cabos, folhas) e estruturas complexas (automóveis e televisores). Estes materiais são quimicamente estáveis e resistentes ao dano de radiação do feixe de elétrons (Echlin 2009).

#### **2.1.2 MATERIAIS DUROS, SECOS E INORGÂNICOS**

Este importante grupo de materiais é quimicamente estável, mas são todos maus condutores elétricos. O tipo de material inclui cerâmicas, rochas, amostras geológicas, minerais, dispositivos microeletrônicos, sistemas de comunicação optoeletrônicas, circuitos integrados, dispositivos de embalagem e fibras (Echlin 2009).

##### **2.1.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE UMA CERÂMICA**

Os materiais cerâmicos são formados, em grande parte, por materiais inorgânicos não metálicos. Essa definição leva em conta matérias primas conformadas por ação de temperatura. Uma das características das cerâmicas é sua baixa tenacidade à fratura. Propriedades como condutividade térmica, resistência mecânica, condutividade elétrica estão diretamente relacionadas a características estruturais, microestruturais e eletrônicas (Echlin 2009).

As propriedades dos materiais cerâmicos são diretamente ligadas à sua estrutura, composição, ao tipo de ligação química e arranjo dos átomos que a compõem. Para cerâmicas cristalinas, os átomos conservam uma periodicidade espacial de longo alcance enquanto que o

tipo amorfo, essa periodicidade só é verificada localmente (vidros). As estruturas cristalinas dos materiais cerâmicos apresentam variações da estrutura cúbica de face centrada e da hexagonal fechada compacta e as ligações predominantes são a ligação iônica e a covalente.

A microestrutura dos materiais cerâmicos é dependente de fatores de preparação do material, tais como: composição de fases minerais, condições de compactação do material e tratamentos térmicos. O conhecimento da microestrutura de um material é de extrema importância, pois estes parâmetros afetam diretamente as propriedades físicas e mecânicas do material (Dourado 2006).

### 2.1.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS ORGÂNICOS SINTÉTICOS

Os materiais para estes polímeros sintéticos são óleo natural, gás e carvão, que são fornecidos por meio do carbono como etileno, metano, alquenos e compostos aromáticos. Eles são condutores muito pobres e são mais suscetíveis a danos por radiação do feixe de elétrons que o grupo anterior de amostras (Echlin 2009).

### 2.1.4 MATERIAIS DE ORGANISMOS BIOLÓGICOS

Esses grupos é composto de organismos vivos, sendo a água um componente essencial para as amostras biológicas, juntamente com macromoléculas orgânicas complexas, como proteínas, lipídios e carboidratos. Eles são suscetíveis à desidratação, destruição química e decadência biológica (Echlin 2009).

#### 2.1.4.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são classificados de acordo com o seu comportamento fisiológico em biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis. Os biotoleráveis são materiais moderadamente admitidos pelo tecido receptor, geralmente isolados dos tecidos adjacentes através de uma camada fibrosa. Os bioinertes são tolerados pelo organismo, que estão em contato direto com o tecido receptor, causam a formação de uma mínima camada fibrosa. Nos materiais bioativos acontecem ligações químicas entre a superfície do biomaterial e o tecido ósseo, fato conhecido como osteointegração. Reabsorvíveis ou bioreabsorvíveis são materiais que agem por um determinado período junto aos tecidos biológicos, e depois são

gradativamente substituídos pelo tecido receptor, solubilizado ou absorvido pelo organismo (Perea 2011).

A seleção dos materiais mais apropriados para o desenvolvimento de implantes exige cumprir alguns critérios, cujos os efeitos sobre o organismo devem ser os menores possíveis. Os fatores indispensáveis, que devem ser estudados detalhadamente, para a utilização de um determinado material em um implante são biocompatibilidade, biodegradabilidade e biorreabsorvibilidade, taxa de degradação, tamanho de poro e morfologia da superfície (Maia et al., 2010). Segundo (Kawachi 2000), os biomateriais precisam apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros. Os materiais sintéticos usados para esses fins podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros, como indicado na Tabela 1.

Tabela 1 - Aplicações, vantagens e desvantagens dos polímeros, metais, compósitos, cerâmicas e vidros utilizados como biomateriais

<b>BIOMATERIAL</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESvantagens</b>	<b>APLICAÇÕES</b>
Polímeros Polietileno PTFE Poliéster Poliuretano PMMA Silicona	Elasticidade, fácil fabricação e baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artérias veias; Maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); Cimento, tendão artificial; Oftalmologia

Fonte: Adaptado de (Kawachi 2000)

Tradicionalmente a cerâmica tem sua utilização restringida a poucas aplicações, devido a sua fragilidade, baixa resistência mecânica a tração, flexão e a sua baixa resistência ao impacto. A partir do final dos anos sessenta, foram desenvolvidas novas cerâmicas com propriedades melhores e a sua utilização aumentou consideravelmente. As cerâmicas oferecem alta resistência à compressão, boa aparência estética e alta inércia química, estes fatores fizeram com que as biocerâmicas começassem a serem utilizadas na odontologia, sobre tudo em coroas dentais. Depois sua utilização se estendeu como biomaterial para o sistema locomotor que são os implantes para mudança óssea (Rodrigues 2008).

As biocerâmicas mais reconhecidas são: fosfatos de cálcio, alumina, zircônia e titânia. As biocerâmicas podem ser classificadas em diversas formas:

- a) De acordo com a resposta do tecido, se dividem em:

- Bioinertes: Alumina ( $\alpha$ -  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), Zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) e os carbonos pirolíticos;
- Bioativas: Hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], biovidros e as vitrocerâmicas bioativas.
- Biodegradáveis e reabsorvíveis: Fosfato tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ].

b) De acordo com a aplicação que se destina:

- Estrutural: São cerâmicas de elevada resistência mecânica e geralmente bioinertes. Exemplos típicos são a alumina ( $\alpha$ -  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e a zircônia ( $\text{ZrO}_2$ );

- Não estrutural: São comumente biocerâmicas bioativas ou reabsorvíveis, densas ou porosas, com baixa resistência mecânica, já que não carecem grandes cargas. Exemplos peculiares, são a hidroxiapatita conhecida como HA [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] e o fosfato tricálcico conhecido como TCP [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ].

c) De acordo com as características do material:

- Biocerâmicas densas e inertes: são materiais que não possuem porosidade. Sua interação óssea é morfológica, se dá de três formas: por crescimento do tecido nas irregularidades superficiais do implante, por união por meio de um cimento acrílico ou por acoplamento do implante no defeito mediante pressão. Exemplo característico deste grupo é a alumina tanto monocristalina quanto policristalina.

- Biocerâmicas porosas e inertes: a interação com o osso é mecânica e a fixação biológica, já que a produção do crescimento ósseo se dá através dos poros do implante. A alumina policristalina porosa é também um bom exemplo deste grupo;

- Biocerâmicas densas reabsorvíveis: Este grupo se caracteriza pelo fato do implante ser lentamente substituído pelo osso. A este grupo pertencem o fosfato tricálcico (TCP) e outros fosfatos assim como o sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ ).

### 2.1.5 MATERIAIS ORGÂNICOS NATURAIS DUROS OU SECOS - HA

Esta categoria conta com materiais como polímeros de carboidratos, proteínas e gorduras derivadas de organismos vivos. Os tipos de amostras alocadas para este grupo

incluem seus produtos derivados, móveis e papel, sementes secas e seus pós manufaturados. Eles são maus condutores e estão suscetíveis a dano de radiação do feixe de elétrons. Neste grupo onde encontramos o percussor para obtenção da HA, usando a casaca de ovo da galinha, para extraímos o hidróxido de cálcio (Echlin 2009).

A HA é uma das cerâmicas mais biocompatíveis devido à similaridade com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos. Esse material tem sido sintetizado e usado para fabricação de diversas formas de implantes, tais como, blocos, grânulos ou recobrimentos, igualmente densos ou porosos.

Essa cerâmica é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa das ligações ósseas, desenvolvendo forte ligação química com o tecido ósseo. Visto que a HA porosa é mais reabsorvível e mais osteocondutiva, há um grande interesse no desenvolvimento de materiais para reposição óssea de HA porosa sintética para preenchimento de defeitos ósseos (Fook, Aparecida e Fook 2010).

A HA biológica é considerada o principal mineral do tecido ósseo do corpo humano, compondo 95% da fase mineral dos ossos e dentes. Essa matriz mineral ou inorgânica é formada predominantemente por Ca e P, na forma de cristais de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , constituindo aproximadamente 60 a 70% do peso do osso e sendo responsável pelas propriedades de rigidez e resistência à compressão. A HA sintética tem propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna um dos principais substituintes do osso humano em implantes e próteses, daí surge o grande interesse em sua produção. Estas propriedades adicionadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e sendo eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (Costa, et al. 2010).

HA é um fosfato de cálcio de maior solidez e menor solubilidade, de que a razão estequiométrica entre o cálcio e o fósforo (Ca/P) equivale à 1,67. Na família das apatitas esta razão varia de 0,5 à 2,0, contudo, razões próximas a 1,5 já afere estabilidade ao composto. A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. Todavia composições estáveis podem ter uma razão de aproximadamente 1,5. As possíveis relações Ca/P das apatitas, seus nomes e fórmulas estão apresentados na Tabela 2. (Costa, et al. 2010).

Tabela 2 - Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatitas.

Composto	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,00
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di- hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono -hidratado(MCPM)	$\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )(CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: adaptado (Fulmer, Martin e Brown 1992)

## 2.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA

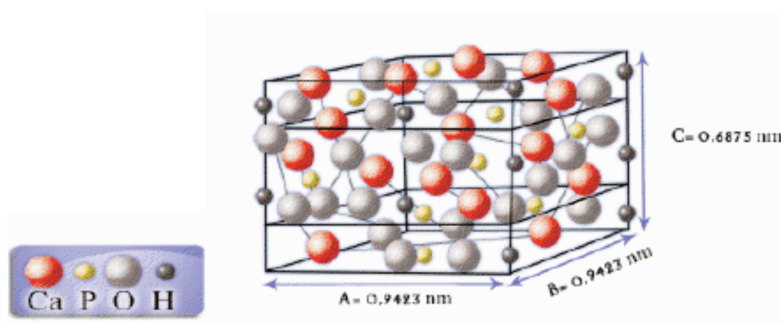
Nos últimos anos, um grande número de técnicas vem sendo desenvolvidas para a síntese do pó de hidroxiapatita, isso se deve ao aumento de suas aplicações. Um dos principais métodos, é o de precipitação, que compreende reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. O pó precipitado é calcinado em temperaturas mais elevadas, com a finalidade de conseguir uma estrutura de apatita estequiométrica. A precipitação rápida durante a titulação da solução de fosfato em solução de cálcio, induz a falta de conformidade química no produto final. A titulação lenta e as soluções diluídas precisam ser usadas para melhoramento da homogeneidade química e a estequiométrica da HA resultante. O cauteloso controle das condições da solução é crítico na



precipitação via úmida. Caso contrário, uma redução do pH da solução abaixo de 9, pode acarretar à formação da estrutura da HA deficiente em íons de Ca.

Atualmente, o uso do processo sol-gel para a síntese de HA tornou-se objeto importante de pesquisa. Este processo é um método químico via úmida, na qual dispensa a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas, sendo considerada um dos métodos mais flexíveis e promissores nos últimos tempos. É um método alternativo para a preparação de um pó puro devido à possibilidade de um controle dos parâmetros do processo, beneficiado por uma mistura em nível molecular dos íons cálcio e fósforo que é capaz de melhorar a homogeneidade química e física, resultando geralmente em uma microestrutura de granulação fina que contem uma mistura de cristais de tamanho *submicron* a nano sendo muito importante para melhorar a reação de contato e a estabilidade da interface osso artificial/natural (Costa, et al. 2010).

Figura 1 - Arranjo atômico da HA



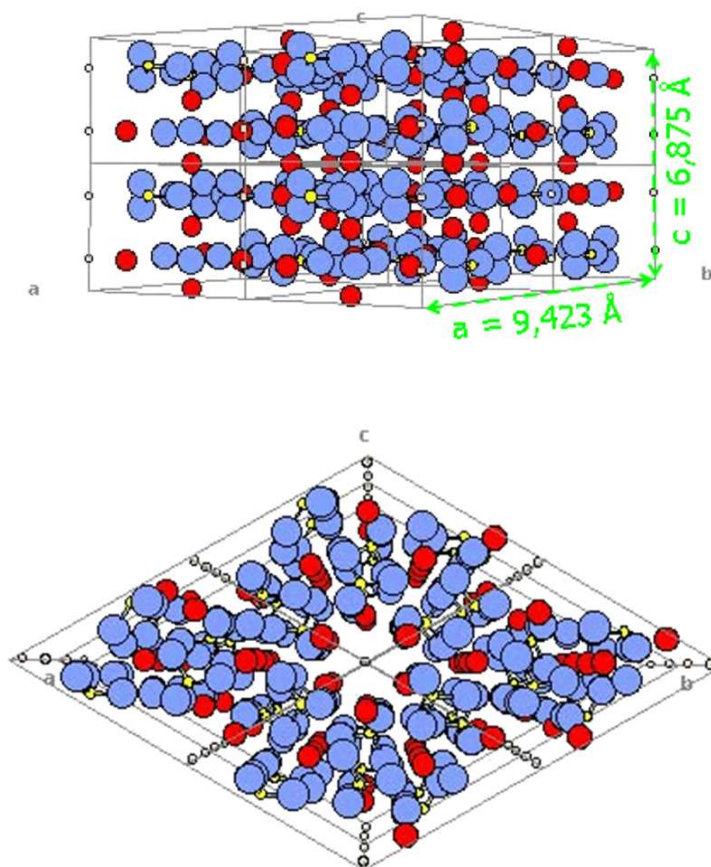
Fonte: Adaptado (Maia 2009)McGregor, 1998.

As células unitárias dos cristais de HA apresentam uma estrutura cristalográfica monoclinica, com quatro unidades da fórmula por célula unitária (Kay, Young e Posner 1964), como hexagonal (Elliot 1994).

No que se menciona no processo de cristalização, a hidroxiapatita pura, proporciona aspectos estruturais, até uma temperatura de 250 °C, cristaliza-se na forma monoclinica com grupo espacial P/b; porém, se analisarmos uma faixa de temperatura acima de 250 °C o material apresenta uma mudança alotrópica para a forma hexagonal, com grupo espacial P6<sub>3</sub>/m (caracterizado por um eixo C de 6 unidades perpendiculares a 3 eixos equivalentes mantendo um triângulo de 120°), P indica que é um sistema hexagonal primitivo. Entretanto,

algumas impurezas ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, se concretizam na forma hexagonal à temperatura ambiente. Motivo pela qual os monocristais naturais de hidroxiapatita geralmente mostram uma conformação hexagonal, que possui cela unitária com parâmetros de rede:  $a=b=9,423\text{Å}$   $c=6,875\text{Å}$ . A estrutura cristalina da hidroxiapatita é mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura cristalina da hidroxiapatita (azul: oxigênio; vermelho: cálcio; amarelo: fósforo; branco: hidrogênio).



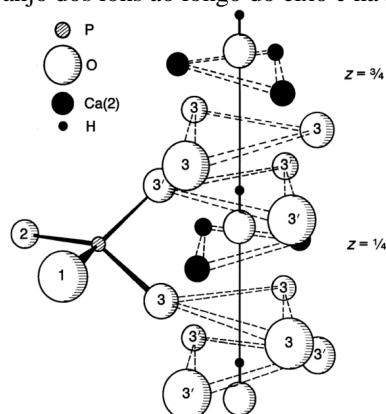
Fonte: adaptado (Elliot 1994)

Avaliando a estrutura da célula unitária dos cristais de HA, ela apresenta-se de duas formas. Segundo (Kay, Young e Posner 1964), uma estrutura cristalográfica monoclínica, com quatro unidades da fórmula por célula unitária (Kay, Young e Posner 1964); e como hexagonal, onde a transição de fase monoclínica para a estrutura hexagonal ocorre a  $370\text{ °C}$  (Calderín, Stott e Rubio 2003), (Aoki 1991).

A célula unitária hexagonal da HA contém 10 íons cálcio localizados em 2 sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca I) e seis no sítio II (Ca II). Os íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura (Santos 2014).

Estruturalmente, a HA é composta de um esqueleto de tetraedros do grupo  $(\text{PO}_4^{3-})$  com dois átomos de oxigênio no plano basal e outros dois alinhados com o eixo cristalográfico c. Os tetraedros do grupo  $(\text{PO}_4^{3-})$  estão organizados de tal forma que originam dois tipos de canais compostos por paredes de ânions de O, perpendiculares ao plano basal. Onde o primeiro canal é ocupado por íons de  $\text{Ca}^{2+}$  (cálcio 1), que estão localizados a 0 e 1/2 do parâmetro cristalino. (Kay, Young e Posner 1964). Já o segundo canal é ocupado por íons de  $\text{Ca}^{2+}$  (cálcio 2), localizados a 1/4 e 3/4 do parâmetro cristalino e compõem dois triângulos equiláteros defasados de  $60^\circ$  no plano perpendicular ao eixo cristalográfico c (Calderín, Stott e Rubio 2003), como pode ser observado na Figura 3. (Santos 2014)

Figura 3 - Arranjo dos íons ao longo do eixo c na Hidroxiapatita.



Fonte: adaptado (Calderín, Stott e Rubio 2003)

### 2.2.1.1 HIDROXIAPATITA NANOPARTICULADA

Nas últimas décadas, tem sido notado um aumento nas pesquisas envolvendo materiais nanoestruturados. Apesar disso, o uso destes materiais nanoestruturados já não é tão atual, como aparenta ser. É possível identificar a presença da nanotecnologia em tempos longínquos

da história da humanidade. Perto 4000 a.c. os alquimistas egípcios utilizavam partículas de ouro em suspensão com tamanho de 1-100nm para estimular a mente e restaurar a juventude. Embora não saber, há milênios, os chineses já aplicavam a nanotecnologia ao usarem nanopartículas de carvão em solução aquosa para a produção de tinta nanquim. Na Europa, o colorido dos vitrais de igrejas medievais era fruto da formulação do vidro com nanopartículas de ouro. Os romanos também fazem parte deste grupo de bandeirantes da nanotecnologia, o ilustre Cálice de Licurgo do século IV d.c. expunha uma cor verde quando a luz era refletida e vermelha quando a luz era transmitida, graças à presença de nanopartículas de ouro e prata no vidro de sua composição, já que a luz ao bater no vidro faz os metais ali contidos vibrarem de maneira diferente dependendo da posição do observador (Toma 2009). Mas somente no século XIX Michael Faraday descobriu a relação entre as alterações nas propriedades ópticas e o tamanho das partículas de ouro, observando que o tamanho das partículas influenciava na absorção de luz. Em sua forma natural o ouro mostra uma coloração amarela, entretanto, dependendo do tamanho das partículas, ele pode apresentar-se negro, rubi ou arroxeadado. Assim, é possível conseguir materiais baseados em ouro em diferentes cores, dependendo do tamanho das partículas (Alves 2004).

As nanopartículas, proporcionam propriedades diferentes dos materiais habituais, devido ao seu tamanho. A passagem de micro para nano leva a muitas mudanças nas propriedades eletrônicas, óticas e mecânicas do material, sem alterar a composição química. Um exemplo, é o caso dos materiais semicondutores podem torna-se isolantes quando se mostram em escala nanométrica. Assim, a abordagem das pesquisas em nanotecnologia tem sido controlar as propriedades dos materiais através de seu desenvolvimento dentro de uma escala de tamanho de 1 – 100nm (Barth JV 2005).

Os cristais de hidroxiapatita encontrados no corpo humano oferecem tamanho tão pequeno que podem ser considerados materiais nanoestruturados. Pois os cristais de hidroxiapatita encontrados fisiologicamente nos tecidos duros são nanoscópicos, em forma de pratos ou bastões e com poucos nanômetros de espessura e dezenas de nanômetros de comprimento, podemos crer que a hidroxiapatita nanoparticulada, idêntica ao mineral natural, é a melhor opção para substituição óssea e regeneração. Nas primeiras pesquisas efetuadas com hidroxiapatita, uma das principais preocupações era com o controle da estequiometria da hidroxiapatita sintetizada. Porém, atualmente, com o amadurecimento da nanotecnologia, existe um interesse para o controle não só da morfologia e também do tamanho (Gopi D 2008).

Hidroxiapatita nanoparticulada pode ser definida como hidroxiapatita que apresenta um tamanho do cristal de 1 - 100nm. As partículas nanométricas de hidroxiapatita têm propriedades mecânicas como dureza superior, quando comparadas às micropartículas. Além disso, elas também apresentam maior área superficial, porque os átomos presentes na camada mais superficial têm ligações insaturadas, fazendo com que a nano-hidroxiapatita apresente alta reatividade. Estudos têm comprovado que biomateriais à base de HA nanoparticulada são mais facilmente biodegradados e têm maior bioatividade quando comparados com as cerâmicas no tamanho “micro” (Ibuki 2014).

### **2.3 APROVEITAMENTO DA CASCA DE OVO DE GALINHA PARA OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITA**

A casca do ovo de galinha é um subproduto ainda pouco valorizado pela indústria e seu descarte inadequado pode causar problemas ambientais relacionados à proliferação microbiana devido à quantidade de matéria orgânica residual. De modo a reduzir o descarte desse material, buscam-se alternativas de uso para o reaproveitamento dos mesmos, que vão desde sua utilização como fertilizante de solos até matéria-prima de compostos de fosfatos de cálcio (Oliveira et al., 2009).

O principal constituinte mineral do ovo é a calcita, fase mais estável do carbonato de cálcio, sendo constituída também de quantidades muito baixas de fosfato de magnésio (1,9%) (Dupoirieux, 1999). A casca representa 11% do peso do ovo, sendo constituída majoritariamente por carbonato de cálcio (calcita), 94%, ( $\text{CaCO}_3$ ) (Rivera et al., 1999). A produção mundial de ovos gera em torno de 5,92 milhões de toneladas de resíduos anualmente.

Existe na literatura trabalhos promissores relacionados à utilização da casca de ovo de galinha. Vieira et al. (2014) utilizaram a casca como adsorvente de metais pesados em meio aquoso, tendo uma eficiência de 72% de absorção. Hsieh (2008) avaliou sua utilização na indústria de papel e celulose para ser utilizada no processo de branqueamento do papel e também a utilização da membrana para produção de aminoácidos e também para ser utilizada como suplemento na ração animal.

As cascas também podem ser utilizadas na alimentação humana e animal, mas na forma de nitrato de cálcio, uma vez que este é mais bem absorvido pelo organismo em relação ao carbonato de cálcio. Ao longo dos anos, foram desenvolvidos estudos relacionados à

utilização da casca de ovo como fonte de cálcio para a síntese de hidroxiapatita e outros compostos de fosfatos de cálcio (Sanosh et al., 2009; Nayar, Guha, 2009), os quais possuem inúmeras aplicações tecnológicas, como catalizadores de reações químicas, removedor de metais pesados, adsorvente em cromatografia líquida e como biomateriais em aplicações médicas e dentárias. Esses estudos possibilitam agregação de valor a esse resíduo, minimização problemas ambientais devido ao descarte inadequado e proporciona uma redução nos gastos com a síntese de biomateriais, além de ser um matéria prima abundante, representando um ciclo sustentável.

### **3 METÓDOS E MATERIAIS**

#### **3.1 FERRAMENTAS UTILIZADAS NA PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

Amostras destinadas a exame e análise para o MEV e MET vêm de duas fontes diferentes, natural e artificial. Muitas amostras são enviadas para laboratórios que, embora equipados com os equipamentos apropriados e projetados para o estudo de todos os aspectos de uma amostra específica, podem não ter as facilidades para fazer a microscopia e análise.

Existem dois tipos de laboratórios de preparação de amostras para o MEV, um que fornecem um serviço geral para qualquer tipo de amostra, e temos aqueles dedicados apenas ao estudo de um tipo particular de amostra. Neste trabalho, não entraremos nos detalhes das ferramentas, equipamentos e processos usados para lidar com todos os tipos de amostras. As amostras ao serem analisadas em um MEV ou MET, devem ser analisadas primeiramente em uma laboratório apropriado para estabelecer a natureza do problema; fazer uma avaliação preliminar em termos de tamanho, forma da amostra provavelmente; tamanho da amostra; e o mais importante de tudo, se deve determinar a maneira mais apropriada de fornecer informações durante a análise no MEV (Echlin 2009).

As amostras ao serem analisadas devem primeiro ser examinadas para:

- Estabelecer a natureza do problema;
- Fazer uma avaliação preliminar em termos de tamanho das partículas, formato da amostra provavelmente;
- Determinar a maneira mais apropriada de fornecer informações durante a análise no MEV.

##### **3.1.1 TAMANHO DA AMOSTRA**

É importante produzir amostras que caibam dentro de um MEV, MET e no Raio - X, por se tratar de um pó a ser estudado, e de tamanho nanométrico, não encontraremos dificuldades no que diz respeito ao tamanho da amostra. Alguns microscópios podem acomodar amostras grandes, usando grandes estágios de amostras e câmaras. A maioria deles são MEVs não especializados, embora possam manipular amostras de até 50 mm de diâmetro

e 20 mm de espessura, normalmente examinam amostras muito menores que podem caber no diâmetro de 12 mm, o chamado suporte ou *stub*, ou maior, 25,4 mm (1 polegada), abaixo temos uma imagem mostrando um conjunto de *stubs* utilizados no laboratório do Nanofab.

Figura 4- Stubs de latão



Fonte: O Autor, 2018.

### 3.1.2 FERRAMENTAS PARA MANUSEAR AMOSTRAS E PARA AJUDAR A LIMPAR AMOSTRAS

Existem varias ferramentas que nos ajudam a manusear amostras de forma segura e correta, no caso da preparação de pós, HA, utilizamos, pinças, estilete, pincel, pipetas, tesoura, entre outros, nos ajudaram no manuseio da amostra, para que se pudesse depositar a amostra de forma segura no porta amostra (Echlin 2009).

Os pinceis foram usados para depositar as partículas de HA nos portas amostra, que possibilita um maior espalhamento de aglomerados de HA, a tesoura foi utilizada para cortar a fita de carbono ou auxiliar no corte de lixas ou papeis usados na preparação metalografica dos porta amostra. As pipetas nos auxiliaram quando utilizamos os reagentes de dispersão, elas foram de grande utilidade, uma vez usadas, não podemos podemos voltar a reutiliza-las, devido ao risco de contaminação (Echlin 2009).



### 3.1.3 TIPOS DE FIXADORES PARA AMOSTRAS

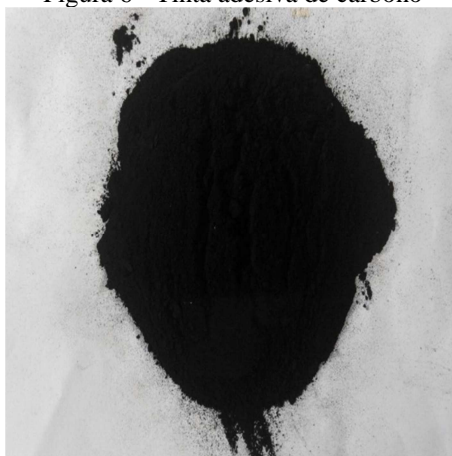
Geralmente para fixar amostras não condutoras, é necessário usar um fixador condutor para ajudar na análise por MEV, entre esses fixadores se destacam dois, a fita de carbono e a tinta adesiva de carbono, apresentados nas figuras Figura 5 e Figura 6.

Figura 5 - Fita fixadora de carbono



Fonte: Analítica, 2018

Figura 6 - Tinta adesiva de carbono



Fonte: nanofab, 2018

### 3.2 TIPOS DE SUPORTE DE AMOSTRA

Todas as amostras precisam ser apoiadas para serem examinados e analisados no MEV. O suporte serve para várias funções diferentes:

- Fornece estabilidade, então a amostra é mantida no lugar dentro do microscópio;
- Fornece um ambiente seguro para a amostra durante os vários estágios de preparação da amostra;
- Fornece uma forma adequada, para que a amostra possa ser movida através das diferentes fases da preparação da amostra;
- Fornece a melhor orientação e inclinação da amostra durante o exame e análise dentro do microscópio;
- Permite que a amostra seja removida do microscópio através dispositivo de armazenamento seguro.

É conveniente considerar os suportes de amostras em três tipos:

1. Suporte para uma amostra eletricamente condutora é autossustentável;
2. Suporte para amostra colocada em um suporte de metal primário;
3. Suporte para a amostra é colocada em um material não metálico secundário.

### 3.2.1 AUTO-SUPORTE

Algumas amostras metálicas podem ser colocadas diretamente no microscópio. Isso é satisfatório, desde que a amostra primeiro possa ser completamente limpa e, em seguida, fixada firmemente com um bom contato condutor. Essa abordagem aparentemente fácil às vezes é bastante difícil de se conseguir na prática (Echlin 2009).

### 3.2.2 SUPORTE PRIMÁRIOS

O suporte primário de metal, geralmente referido como *stub* de amostra, é usado para conter a amostra. A composição, a forma do *stub* é projetado para otimizar o desempenho do microscópio. Esses *stubs* metálicos também são os suportes mais convenientes para amostras que não precisam de preparação. Diferentes microscópios têm diferentes *stubs* para amostra, embora a maioria seja de 12 mm de diâmetro ou os maiores *stubs* de 25,4 mm (1 pol.) (Echlin 2009).

A maioria dos *stubs* de 12 e 25,4 mm são usinados a partir de alumínio ou duralumínio, uma liga de alumínio (90-92%), cobre (4%) e pequenas quantidades de magnésio e manganês. Os *stubs* também podem ser feitos de cobre puro, latão e aço inoxidável, *stubs* de berílio ou carbono são usados para estudos envolvendo microanálise de raios-x (Echlin 2009).

Os *stubs* de metal padrão podem ser modificados facilmente para diferentes tipos de amostras. Isso requer apenas uma pequena engenhosidade de oficina para alterar o *stub*, para um tipo particular de amostra. Por exemplo, as fibras podem ser facilmente colocadas através de um par de orifícios perfurados no *stub*; uma série de agulhas finas na superfície do *stub* pode ser usada para amostras macias (Echlin 2009).

### 3.2.3 SUPORTES SECUNDÁRIOS

A composição e a forma dos suportes secundários são projetadas para melhor se adequar ao tipo de amostra a ser estudada no microscópio. Os suportes secundários são feitos de uma ampla variedade de materiais condutores e não condutores.

### 3.2.4 FOLHAS DE METAL

As lâminas finas de metal são mais espessas do que as películas finas de metal usadas para revestir as amostras, dependendo do material, as folhas podem ser tão finas quanto 400 nm e tão grossas quanto 2  $\mu\text{m}$ . Uma ampla gama de materiais podem ser usados para suportes de amostras, as lâminas podem ser cortadas facilmente com uma tesoura, desde que tenham a espessura correta. Por exemplo, tanto folhas de cobre como de alumínio de 100-250 nm de espessura podem ser facilmente cortadas para se ajustarem à forma do esboço particular do MEV.

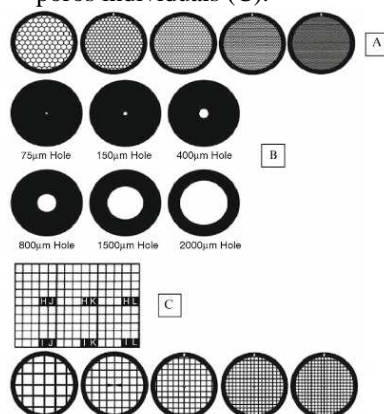
### 3.2.5 GRADES DO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DA TRANSMISSÃO

Os discos metálicos fino padrão de 3,05  $\mu\text{m}$  ou grades como são chamados, são usados no MET também podem ser usados para armazenar amostras para o MEV. Essas grades têm uma grande variedade de formas e configurações, são feitas de metais condutores, como cobre, ouro e platina; de metais baixos ou não magnéticos tais como níquel, ródio e aço

inoxidável; de elementos leves de metal, como berílio e alumínio, e materiais não metálicos, como carbono e alguns polímeros.

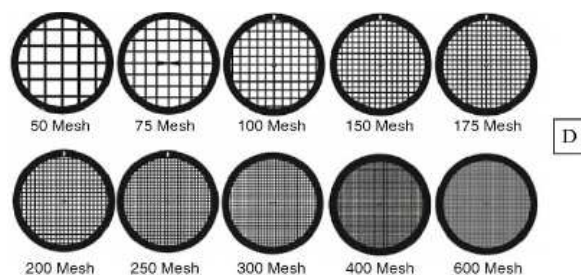
As grades de 3,05  $\mu\text{m}$  de diâmetro têm 50-100  $\mu\text{m}$  de espessura e as 2  $\mu\text{m}$  centrais são geralmente penetradas com buracos de uma ampla gama de formas e tamanhos de malha, ou permanecem intactos. As pequenas grades estão disponíveis em pacotes herméticos e são facilmente limpas, se necessário. Um tipo muito popular de grade de suporte para imagens de pequena amostra no MEV é a grade de cobre de malha 200, que tem 200 barras de malha por polegada. As grades MET oferecem uma ampla escolha de suportes para amostras com relação à composição química e ao tamanho da malha. O material para partículas grandes, pode ser colocado no topo de tecido nylon ou em um suporte de metal. Pequenas partículas e seções finas de material plástico e biológico podem ser suportadas em redes de malhas finas. O material não-magnético pode ser examinado usando aço inoxidável ou grades de carbono, amostras a serem estudadas por microanálise de raios-X, podem ser examinadas usando berílio ou grades de carbono. A figura mostra um pouco da ampla variedade de grades que podem ser usadas para apoiar a amostra durante análise no microscópio (Echlin 2009).

Figura 7 - (A) Grades de malha hexagonal de 3,05 mm (B) 3.05 grades *holey* com uma gama de tamanhos de poros individuais (C).



Fonte: Adaptado (Echlin 2009)

Figura 8 - Grelha de localização de 65 mm<sup>2</sup> para grandes microscópios de luz e espécimes de MEV.



Fonte: Adaptado (Echlin 2009)

### 3.3 SOLVENTES PARA DISPERSÃO

Para este trabalho serão utilizados alguns solventes para ajudar a dispersar as partículas de HA, entre eles os escolhidos para estudo são: Éter, tolueno e álcool isopropílico.

Solventes são substâncias adequadas para dispersar determinadas outras (solutos) em seu meio. Assim, numa solução, o estado físico final dependerá do solvente que estará a ser utilizado. Entretanto, as soluções sólidas e gasosas são diferenciadas porque tanto o solvente quanto o soluto estão, necessariamente, no mesmo estado de agregação (Martins\*, Andrade e Lopes 2013).

Os solventes líquidos são mais utilizados que qualquer outro, uma vez que uma solução líquida é de fácil manuseio e possui maior usabilidade. Assim, estão classificados de acordo com a natureza química de seletividade. De acordo com a teoria “semelhante dissolve semelhante”, os solventes polares são capazes de solubilizar os solutos também polares, assim como os apolares solubilizam solutos também apolares (Martins\*, Andrade e Lopes 2013).

#### 3.3.1 SOLVENTES POLARES

Os solventes polares são aqueles cujas moléculas constituintes apresentam regiões eletronicamente densas (assim, com maiores momentos dipolares e maiores constantes dielétricas), e que por isso têm facilidade em solvatar (criar uma camada sobre o soluto) quaisquer substâncias de características também polares (Martins\*, Andrade e Lopes 2013).

O Álcool isopropílico é um solventes polar, conhecido é também como isopropanol ou propano-2-ol, e possui fórmula  $C_3H_8O$ . Todos esses nomes são utilizados para denominar o álcool com uma cadeia de três carbonos e a hidroxila ligada ao carbono secundário. Esse álcool contém uma percentagem de água menor de 1%. Isso sucede devido sua cadeia maior, que permite que ele contenha menos semelhança com a água, tornando assim a sua separação

da água mais fácil. Lembrando que uma das suas características, ele não difere da maioria dos álcoois de cadeia relativamente curta, sendo um líquido incolor com odor característico de álcool e altamente inflamável. Os cuidados no seu manejo e estocagem são os mesmos que etanol e metanol (Martins\*, Andrade e Lopes 2013).

### 3.3.2 SOLVENTES APOLARES

Nessa categoria de solventes está o éter e o tolueno. Sendo qualificada pela ausência, ou baixa ocorrência, de regiões eletricamente densas nas moléculas constituintes. Muitos solventes apolares, hidrocarbonetos, em geral, são voláteis devido a estrutura da cadeia ou seja, quanto menor a cadeia carbônica, menor o ponto de ebulição, além das forças intra e intermoleculares mais fracas em relação aos compostos polares (Martins\*, Andrade e Lopes 2013).

Quando o hidrogênio da hidroxila de álcoois e fenóis é substituído por um grupo *alquil* ou *aril*, temos a classe dos éteres (função éter). Em resumo, éteres são compostos que possuem um átomo de oxigênio ligado a dois radicais orgânicos. Éteres são pouco polares e muito voláteis, sendo solúveis em água quando possuem mais de 4 carbonos por oxigênio (Martins\*, Andrade e Lopes 2013).

Os éteres são apolares e apresentam pouco reatividade e, em geral, sofrem basicamente reações de clivagem-quebra por ácidos, e devido a essa propriedade são muito usados como solventes para outros compostos orgânicos. Alguns exemplos de éteres que são solventes clássicos de laboratório são o *tetraidrofurano* (THF), o *dimetoxietano* (DME) e a *dioxana* (Martins\*, Andrade e Lopes 2013).

O outro solvente é o tolueno, que também é apolar, assim como o éter, este solvente é denominado metil benzeno, é um hidrocarboneto aromático, incolor e de odor característico. Sua fórmula é  $C_6H_5CH_3$  e possui peso molecular de 92,15. Esta substância sofre ebulição a  $110,6^\circ C$ ; sua pressão de vapor é de 22 mmHg a  $20^\circ C$ ; se auto inflama a  $480^\circ C$ ; e o limiar de odor dos vapores de tolueno ocorre entre 0,04 e 1 mg/l na água e  $8 \text{ mg/m}^3$  no ar (Forster, Tannhauser e L.Tannhauser 1994).

### 3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA

As técnicas de caracterização são feitas para explicar as características estruturais, superficiais, composição química e dissolução dos materiais, e com isso reunir as suas informações importantes. Entre as técnicas mais utilizadas são: Difração de Raios X (DRX) e a Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (EVIVTF) para análise de fases cristalinas presentes; microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) para análises de morfologia (Maia 2009). Dentre essas técnicas, três serão utilizadas neste trabalho (MEV, MET e DRX), que visa apresentar variados métodos de preparação de amostras, visto que existe uma carência nesta parte, onde que não encontramos trabalhos voltados para a preparação de amostras em pó.

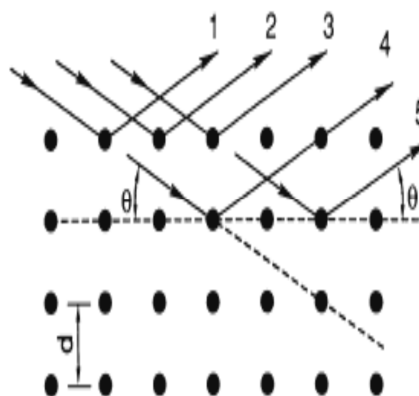
#### 3.4.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Para determinarmos a estrutura cristalina, tamanho do cristalito da HA, recorreremos a difração de Raios – X, onde encontramos algumas vantagens da técnica para a caracterização de fases minerais e cristalinas, sobressai a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos (porque o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases (Albers et al, 2002).

A técnica da difratometria dos Raios X, utiliza radiação com comprimento de onda da mesma ordem de grandeza das distâncias interplanares presentes nas células unitárias dos cristais; desta forma, portanto a radiação atravessa os retículos cristalinos, e ao atingir planos de reflexão paralelos, gerando uma figura de difração. Cada pico adquirido no difratograma é resultado da interação da radiação, sob um ângulo, determinado em relação ao feixe incidente e amostra, em um plano específico do cristal (Figura 9). Quanto maior o ângulo do feixe difratado em relação ao incidente, menor o espaçamento entre planos. O arranjo espacial dos átomos numa célula unitária define a estrutura cristalina e os planos cristalinos existentes. O número e a posição dos picos no difratograma de Raios X de uma amostra depende do tipo e dimensão da célula unitária. do tipo de célula unitária (corpo centrado, face centrada, cúbica), sistema cristalino de simetria (triclínico, monoclínico, tetragonal, hexagonal, ortorrômbico) (Bish & Reynolds, 1989) (Maia 2009). No presente trabalho, a técnica foi utilizada para

compararmos os resultados de vários tipos de HA, com a mesma preparação, mas variando o tamanho do grão das partículas.

Figura 9 - Esquema da Difração de Raios X



Fonte: adaptado Bish & Reynolds, 1989.

Podemos entender mais com a lei de Bragg datado em 1913, H. W. e W. L. Bragg perceberam que o arranjo regular dos átomos e/ou íons num cristal pode ser considerado como um arranjo de elementos de rede sobre planos paralelos de átomos. Quando expomos tal cristal a raios-X paralelos, admitindo que esses raios X têm natureza ondulatória, então cada elemento no plano de rede age como um "ponto de espalhamento", de modo que é formada uma onda esférica. De acordo com Huygens, essas ondas esféricas são sobrepostas para criar um frente de onda "refletido". Neste modelo, o comprimento de onda  $\lambda$  permanece inalterado com relação ao frente de onda incidente. Além disso, as direções da radiação incidente e refletida, que são perpendiculares às duas frentes de onda, obedecem à condição: "ângulo de incidência = ângulo de reflexão".

Entendendo que interferência construtiva ocorre quando as diferenças de caminho ( $\Delta$ ) entre raios refletidos pelos átomos da rede são múltiplos inteiros do comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação incidente:



$$\Delta = n\lambda, \text{ com } n = 1, 2, 3, \dots$$

Se tivermos dois planos de rede adjacentes com espaçamento  $d$ , pode-se dizer que as diferenças de caminho  $\Delta_1$  e  $\Delta_2$  dos raios incidente e refletido, com ângulo  $\theta$ , é dada por:

$$\Delta_1 = \Delta_2 = d \sin \theta$$

Logo, a diferença do caminho total é:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

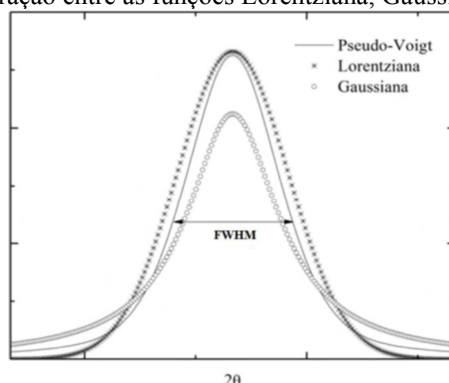
A equação (1) representa a lei de Bragg da reflexão, onde o ângulo  $\theta$  é conhecido como ângulo de Bragg. A partir da análise do padrão de difração é possível determinar os valores dos parâmetros da célula unitária de uma amostra desconhecida. Isto é feito utilizando programas específicos que refinam o padrão de difração experimental.

Os difratogramas de sistemas cristalinos são catalogados e os valores de angulo, planos e distância interplanar são indexados para cada fase cristalina existente, pelo *Joint Committee for Powder Diffraction Standards* (JCPDS) (Maia 2009).

### 3.4.2 TAMANHO DE CRISTALITO

O tamanho do cristalito pode ser calculado por meio da medida da largura a meia altura, ou FWHM (*Full Width at Half Maximum*), do pico de difração do difratograma; no entanto antes de extrair essa informação, necessita de um ajuste do perfil de uma função matemática definida. A literatura indica diversos tipos de funções nas quais o perfil de difração pode ser adaptado, como a Gaussiana, Lorentziana, a Pseudo-Voigh, dentre outras. A Figura 10 mostra uma comparação entre essas três funções citadas, sendo que uma análise deve ser feita para verificação da função que melhor se adapta ao perfil obtido, com base na melhor proximidade da linha da curva (Lopes 2014).

Figura 10 - Comparação entre as funções Lorentziana, Gaussiana e Pseudo-Voigh.



Fonte: Adaptado (Leite, 2012).

Ajustado o perfil, o tamanho do cristalito ( $T_c$ ) é calculado pela Equação de Scherrer, representada pela Equação 1.

$$T_c = \frac{k\lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (1)$$

Onde:  $k$  é uma constante de forma da partícula, sendo 0,9 para partículas esféricas;

$\lambda$  é o comprimento de onda da radiação aplicada;

$\theta$  é o ângulo de difração de Bragg;

$\beta$  é a largura à meia altura corrigida do pico mais intenso, conforme demonstrado na Figura 10. A correção do parâmetro  $\beta$  é dada pela Equação 1.

$$\beta = \sqrt{B - b} \quad (2)$$

Onde:  $B$  é largura a meia altura do pico mais intenso da amostra;

$b$  é largura a meia altura do pico mais intenso do padrão.

O tamanho do cristalito ( $T_c$ ) pode ainda ser relacionado com o ângulo de difração de Bragg e a largura à meia altura através da Equação 3.

$$\beta \cdot \cos\theta = \frac{k\lambda}{Tc} + \eta \cdot \sin\theta \quad (3)$$

Onde:  $\eta$  é a deformação da rede cristalina e os demais parâmetros são os mesmos relacionados na Equação de Bragg.

Considerando os picos relevantes do difratograma de uma amostra, a deformação  $\eta$  pode ser obtida pela regressão linear de  $(B \cdot \cos\theta)$  em relação a  $\sin\theta$ , onde os valores atribuídos a  $B$  são as larguras à meia altura de cada um desses picos e  $\theta$  é o ângulo de difração de Bragg correspondente (Lopes 2014).

### 3.4.3 MÉTODO DE RIETVELD

Rietveld (1969) desenvolveu um método para refinamento de estruturas, que foi estendido posteriormente para aplicação na análise quantitativa de fases e estudos de micro deformação. O *Método de Rietveld* é fundamentado na comparação entre um padrão de difração calculado e o padrão observado. O padrão calculado é alcançado empregando - se a célula unitária como base para a definição das posições dos picos, as posições atômicas e parâmetros térmicos para a definição das intensidades, uma função analítica variando com o ângulo de Bragg para descrever a forma e a largura dos picos, e a intensidade da radiação de fundo. Este padrão calculado é então comparado ao padrão observado, ponto por ponto e os parâmetros do modelo são ajustados pelo método dos mínimos quadrados.

O método apresenta como principal vantagem a obtenção de um padrão de difração por modelos matemáticos, eliminando a necessidade de preparação de amostras padrão para comparação das intensidades dos picos. A introdução de modelos matemáticos permite, também, a correção de efeitos de aberrações sistemáticas provenientes da estrutura da amostra e da geometria do difratômetro de raios X.

A construção de um padrão de difração é baseada no *Método de Rietveld*, calculado de acordo com o modelo estrutural. O cálculo das intensidades para definir um padrão calculado que melhor se ajuste ao padrão observado é dado pela equação segundo (Young, 1996) :

$$y_{ic} = S \sum_k^2 L_k |F_k|^2 \varphi(2\theta_i - 2\theta_k) P_k A S_r + y_{bi} \quad (4)$$

onde:

$S$  é o fator de escala

$K$  representa os índices de Miller

$L_k$  contém os fatores de Lorentz, polarização e multiplicidade

$\varphi$  é a função do perfil de reflexão

$P_k$  é a função de orientação preferencial  $A$  é um fator de absorção

$F_k$  é o fator de estrutura da  $k$ -ésima reflexão de Bragg

$S_r$  é o fator de rugosidade superficial

$y_{bi}$  é a intensidade da radiação de fundo no  $i$ -ésimo passo

A equação (4) contém os parâmetros variáveis necessários para o ajuste do padrão de difração observado. Os dados coletados a serem refinados pelo *Método de Rietveld* são registrados de forma digitalizada. Os valores das intensidades numéricas ( $y_i$ ) são registrados por um detector acoplado ao difratômetro, uma a uma, de acordo com o acréscimo dos passos ( $i$ ) escolhido para o padrão.

#### 3.4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Na análise e estudos dos materiais (HA), dois modelos de microscopia eletrônica são usados em grande extensão, fazendo uma grande contribuição, porque essas duas técnicas foram parte do estudo deste trabalho, que visa apresentar vários modelos de preparação de amostras tanto para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Lembramos que essas técnicas são complementares e cada uma delas tem seu campo de aplicação e a sua potencialidade específica (Tabela 3). Por esse motivo, podemos afirmar que a microscopia eletrônica de varredura, por denotar uma excelente profundidade de campo, permite a análise com enormes aumentos de superfícies irregulares, como superfícies de fratura, e que a microscopia eletrônica de transmissão permite a análise de defeitos e fases internas dos materiais, como as discordâncias, os defeitos de empilhamento e pequenas partículas de segunda fase (Goodhew et al., 2001).

Tabela 3 - Principais características dos dois tipos de microscopia

<b>Características</b>	<b>MEV</b>	<b>MET</b>
Tensão de aceleração (kV)	1 a 50	50 a 1.000
Faixa de aumento	10 a 100.000X	1.000 a 300.000X
Resolução (Å)	30Å	21Å
Profundidade de campo com 1.000X	100 µm	10 µm

Fonte: Adaptado (Goodhew et al., 2001)

#### 3.4.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura é usada em diversas áreas de conhecimento, incluindo a área biológica. A utilização desta técnica tem se tornando mais frequente por oferecer informações de detalhes da superfície do material, com aumentos de até 100.000 vezes, resultando assim em imagens com contraste de topografia e contraste de ultra violeta. O MEV é utilizado também na avaliação da superfície de amostras espessas, não transparentes aos elétrons (Kestenbach et al., 1989), é um equipamento versátil que possibilita a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas, ajudando de uma forma muito ampla para análise da superfície HA, basicamente a maior parte de investigação do presente trabalho, foi desenvolvida no MEV da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, modelo JSM -7100F, fabricado pela JEOL. A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons no material sob condições de vácuo.

Um feixe fino de elétrons de alta energia varre a superfície da amostra ponto a ponto onde, podendo ser refletido ou produzir elétrons secundários (SE), que correspondem a elétrons arrancados da amostra pelo feixe incidente. A intensidade dos elétrons refletidos ou dos secundários pode modular, ponto a ponto, a intensidade do sinal em um monitor, gerando uma imagem da superfície varrida. Os elétrons refletidos possuem energia aproximadamente igual à do feixe, sendo denominados retro espalhados (ERE) ou *back scattered* (EBS). Já os elétrons secundários possuem energia baixa (< 50 eV) e trazem informação da camada mais superficial da amostra, alguns nanômetros (1 a 2 nm).

Acontece também a emissão de Raios X que oferece a composição química elementar de um ponto ou região da superfície, permitindo a identificação de praticamente qualquer

elemento presente na amostra. O detector mais usado é denominado espectrômetro energia dispersiva (EDS) e fornece os picos de emissão de raios X da amostra bombardeada pelo feixe, numa faixa ampla de energia.

A imagem por elétrons secundários provém de interações inelásticas entre elétrons e amostra, levando a perda de energia do feixe, com pequena mudança de direção dos elétrons. A imagem por elétrons retro espalhados provém de relações elásticas entre elétrons e amostra ocorrendo a mudança de direção sem perda apreciável de energia. As imagens por elétrons secundários fornecem maior resolução de imagem, grande profundidade de campo, impressão tridimensional e fácil interpretação. As imagens por elétrons retro espalhados apresentam como principal característica o contraste de composição (Goodhew et al., 2001), pois o ângulo de desvio dos elétrons depende do quadrado do número atômico dos elementos presentes na amostra (Maia 2009).

A análise da amostra pelo MEV é mais simplificada, quando comparada ao MET, as imagens observadas são mais parecidas às imagens da microscopia de luz e geralmente é possível observar a associação entre a imagem observada com as características superficiais da amostra. Essa análise permite a descrição da morfologia dos biomateriais à base de fosfato de cálcio, porém é difícil a visualização dos cristais individuais (Maia 2009).

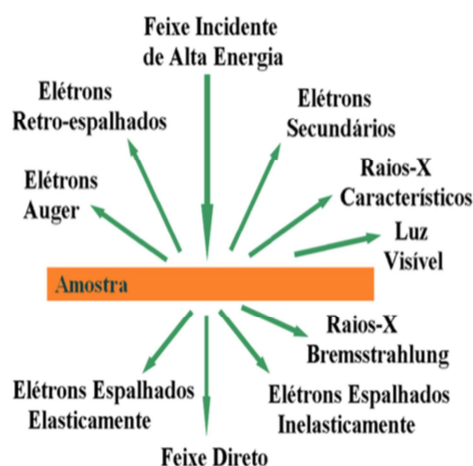
A Espectroscopia Energia Dispersiva tem como função de determinar qualitativamente a composição da amostra em um determinado ponto. Essa técnica oferece como característica a obtenção de um espectro rápido que oferece os picos característicos de Raios-X emitido em função da interação inelástica do feixe eletrônico com a amostra. Através da Espectrômetro de Energia Dispersiva notamos tanto os picos Ca específicos como a radiação contínua. Para esse tipo de avaliação as amostras devem ser sólidas, sem umidade e composta por material condutor, caso contrário, devemos recobrir com ouro ou carbono (Goldstein 2003).

#### 3.4.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para pesquisar a melhor preparação de amostra de HA para análise de aspectos estruturais no microscópio eletrônico de transmissão (MET) do INMETRO, modelo Titan 80-300, fabricado pela FEI, são considerados neste trabalho, estudos com microscopia eletrônica de transmissão e difração de elétrons. Esta técnica de caracterização consiste em utilizar um feixe de elétrons de alta energia tipicamente entre 100 e 300 *keV* para irradiar uma amostra fina, da ordem de 5 a 100 *nm* de espessura, e analisar os diversos sinais gerados.

Elétrons de alta energia constituem uma radiação ionizante, e uma das vantagens em usar este tipo de radiação é a variedade de sinais primários e secundários gerados como resultado da interação entre esta forma de radiação e a matéria. Todos estes sinais podem ser utilizados de alguma forma para estudar a amostra em questão. A Figura 11 ilustra os diversos sinais gerados a partir da interação de um feixe de elétrons de alta energia e uma fina amostra. Neste trabalho serão utilizados principalmente o feixe direto e elétrons elasticamente espalhados.

Figura 11 - Diversidade de sinais gerados a partir da interação de um feixe de elétrons de alta energia e uma amostra fina



Fonte: Adaptado (Isoppo 2015)

A resolução de um TEM possui diferentes significados para diferentes funcionalidades do instrumento. Se raciocinarmos na resolução de um TEM em termos clássicos usando o critério de Rayleigh para a microscopia de luz visível, temos:

$$\delta = \frac{0,6\lambda}{\mu \sin\beta} \quad (1)$$

Onde:  $\lambda$ : comprimento de onda da radiação utilizada;

$\mu$ : índice de refração do meio;

$\beta$ : semiângulo de convergência.

Partindo da equação de Lois de Broglie que relaciona o comprimento de onda associado aos elétrons com sua energia e sem considerar efeitos relativísticos temos:

$$\lambda = \frac{1,22}{E^{\frac{1}{2}}} \quad (2)$$

Onde:  $E$ : energia dos elétrons em unidades de  $eV$ ;

$\lambda$ : comprimento de onda resultante expresso em  $nm$ .

Um microscópio eletrônico de transmissão é constituído por um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, fechados em uma coluna com alto vácuo. Os elétrons saem da amostra com uma repartição de intensidades, energias e direção controladas principalmente pelas leis de difração estabelecidas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, a lente objetiva entra em ação, gerando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Depois este processo padrão da lente objetiva, que consiste em atuar no sentido de reduzir aberrações esféricas, as outras lentes servem apenas para aumentar a imagem ou o diagrama de difração para futuras observações na tela ou na filme fotográfico. O poder de resolução do microscópio de transmissão hoje atinge a faixa de 0,2 nm e possibilita a observação da morfologia como também da estrutura cristalina dos materiais. Essa técnica pode ser usada para comprovar a informação do tamanho e forma do cristal obtida pela difração de Raios X, investigar a presença de outras fases que não é a hidroxiapatita, e para demonstrar a formação de pequenos cristais na superfície dos implantes dentais recobertos por cerâmicas de fosfatos de cálcio (Maia 2009).

### 3.5 OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA POR MEIO DA CASCA DE OVO

A Hidroxiapatita que está sendo caracterizada, foi obtida a partir de reação de precipitação entre  $Ca(OH)_2$  e ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), utilizando  $NH_3OH$  quando necessário para correção do pH. Os produtos utilizados, com exceção do  $Ca(OH)_2$  foram de grau analítico e utilizados são tratamento adicional.



O trabalho teve como base a utilização de cascas de ovos de galinha como fonte de íons cálcio, sendo utilizadas apenas cascas de ovos brancas. As cascas utilizadas foram provenientes do consumo doméstico.

O tratamento das cascas consistiu em:

1. Lavá-las em água corrente e detergente, posteriormente fervidas em água destilada por 30 minutos;
2. Foram secas em estufa e por fim calcinadas à 1000°C por duas horas para conversão do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) em óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ ) e eliminação de toda a matéria orgânica presente;
3. Para a obtenção da solução  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , foi utilizado 3,089g de  $\text{CaO}$  para 25mL de água destilada;
4. A solução foi aquecida à 60°C sob constante agitação por 30 minutos de modo a garantir a completa formação de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ;
5. Como fonte de íons fosfatos foi utilizada 25mL de solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (20,25mL para 25mL de água destilada), o qual foi adicionado a solução de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a uma taxa de 3,33 mL/min. A reação ocorreu à 80°C, realizado em chapa de aquecimento, sob constante agitação e um bom controle de adição de ácido, mantendo-se o pH na faixa de 9-11, sendo adicionado hidróxido de amônia PA ( $\text{NH}_3\text{OH}$ ) para a correção do pH, quando necessário;
6. Finalizada a adição do ácido, o produto obtido foi envelhecido por 1 e 2 horas para avaliação desta variável nas características do material. Os precipitados obtidos foram filtrados e lavados com água destilada para remoção da amônia, secos a 300°C por duas horas (HA1s e HA2s) e calcinados à 1000°C por duas horas (HA1c e HA2c).

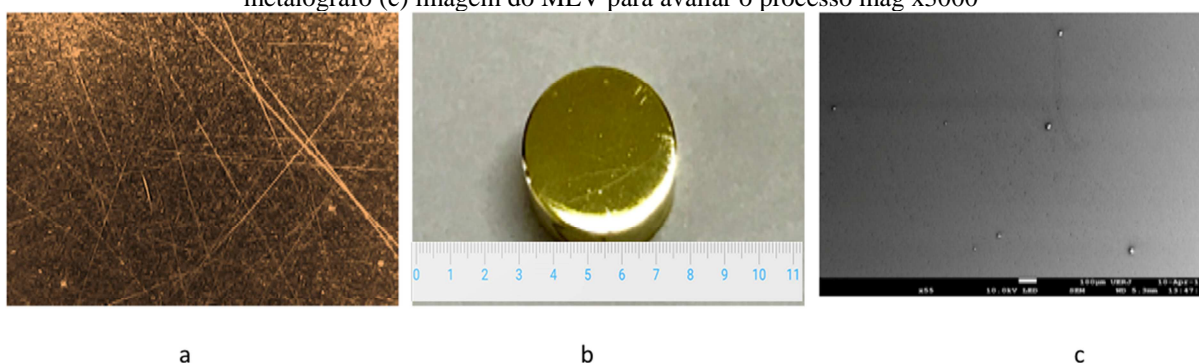
### 3.6 CONDICIONAMENTO DO STUB

Nesta etapa, o *stub* foi submetido ao processo de preparação metalografica, composto por lixamento e polimento, efetuado da seguinte maneira:

1. O lixamento do *stub* foi feito com uma lixa de granulometria de 8000 mexes, variando o seu posicionamento a 90°, cada 10 voltas;

2. Para o polimento do stub, foi efetuado utilizando pastas de diamante com 3 e 1 micrometro;
3. Na etapa final, logo após o polimento, o *stub* foi colocado no ultrassom em acetona PA, afim de retirar qualquer particulado de diamante impregnado no *stub*. Na figura 12, temos três imagens que ilustram o condicionamento do *stub*.

Figura 12 - processo de condicionamento do stub (a) preparação metalografica (b) finalização do processo metalógrafo (c) imagem do MEV para avaliar o processo mag x3000



Fonte: O autor, 2019.

### 3.7 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HA PARA O MEV

A preparação de amostras em pó, requer sempre um cuidado maior, e que apresenta vários obstáculos. Neste trabalho buscaremos apresentar algumas formas de preparação de amostras em pó, utilizando três portas amostras com diferentes configurações (espelhado, fita adesiva dupla-face e tinta de carbono) visando:

1. Conseguirmos uma preparação que melhora a qualidade de imagem com a maior magnificação e definição possível;
2. Obter mediante o preparo, uma melhor dispersão das partículas de HA, com a finalidade de podermos observar partículas individuais de HA;
3. Observar a morfologia das partículas de HA,, mediante ao tipo de preparação submetida.

Para que alcançássemos cada um desses itens citados acima, foram elaboradas algumas formas de preparação como:

1. Preparação de amostra de HA pura;
2. Preparação de amostra de HA usando reagentes (tolueno, éter e álcool isopropílico).

### 3.7.1 PREPARAÇÃO DE AMOSTRA DE HA PURA

Este processo consistiu em:

1. Pesagem antes e depois de serem aquecidas a uma temperatura de 120°C, em uma Balança de precisão 0.001g, TOLLEDO, modelo AB204, com a finalidade de retirar qualquer partícula de líquido que poderia estar impregnado na amostra, como mostrado nas figuras abaixo;

Figura 13 - pesagem da HA antes e depois



Fonte: O autor: 2019

2. O pó foi macerado previamente na tentativa de soltar as partículas, isso quando HA é utilizada naturalmente. Para a dispersão do pó sobre o *stub* com fita, tinta e espelho, foi utilizado um pincel estéreo.

### 3.7.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRA DE HA USANDO REAGENTES (TOLUENO, ÉTER E ALCOOL ISOPROPILICO)

A preparação das amostras de HA consistiu na pesagem antes e depois de serem aquecidas a uma temperatura de 120°C, durante 10, 20 e 30 minutos, respectivamente, colocadas no álcool isopropílico, éter e tolueno, submetidas a 10, 20 e 30 minutos de ultrassom para desaglomerar as partículas e na última etapa foi feita a preparação das amostras no *stubs* (espelho, com tinta e fita de carbono). Segue um detalhamento mais específico do processo abaixo:

1. A pesagem da HAP, foi feita em uma Balança de precisão 0.001g, TOLLEDO, modelo AB204, de 5 mg;
2. A amostra foi submetida a temperatura de 120°C para retirar qualquer unidade remanescentes na mesma. Para esse estudo foram aquecidas duas amostras por três tempos distintos, 10, 20 e 30 minutos;
3. Após o aquecimento, amostra foram separadas varias alíquotas contendo 5mg, em *ependorfs* de 2mL;
4. As amostras foram misturadas a 1,8mL de álcool isopropílico, éter e tolueno, e agitadas em ultrassom (BRANSON, 1800) por 10, 20 e 30 minutos;
5. Os *stubs* foram limpos com acetona (remover materiais orgânicos, plásticos) e, depois, com álcool isopropílico (garantir a retirada total de resíduos deixados pela acetona), antes de colocar a finta ou tinta ( dissolvida com agua destilada);
6. A fixação da amostra liquida no *stub* foi feita através de uma fita de carbono dupla face, e também por meio de uma tinta de carbono (o carbono é um dos materiais condutores que auxilia a condução dos elétrons que é amplamente utilizado no MEV) e em um *stub* que foi condicionado para este efeito;

Tabela 4 - resumo dos testes realizados

<b>Quantidade de Hidroxiapatita</b>	<b>Tempo de secagem</b>	<b>Tempo de ultrassom</b>	<b>Reagentes</b>
Não especificado	2h	Não	Não
Não especificado	2h	Não	Não
Não especificado	2h	Não	Não
5mg	10 min	10 min	Tolueno
5mg	20 min	20 min	Tolueno
5mg	30 min	30 min	Tolueno
5mg	10 min	10 min	Éter
5mg	20 min	20 min	Éter
5mg	30 min	30 min	Éter
5mg	10 min	10 min	Isopropílico

5mg	20 min	20 min	Isopropílico
5mg	30 min	30 min	Isopropílico

Fonte: O Autor, 2018.

A tabela 4 apresenta um resumo de todos os experimentos iniciais, para selecionar a quantidade e tempo ideal para a realização de cada etapa do estudo sobre preparação de amostras para o MEV.

### 3.8 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HA PARA A DIFRAÇÃO DE RAIOS – X

Normalmente a preparação de amostras para a difratometria em pó é simples e a amostra pode ser recuperada após a medida DRX, por tratar-se de uma técnica não destrutiva. Este estudo teve como objetivo preparar uma amostra de HA com finalidade de obtermos uma preparação ideal para facilitar a análise e quantificação de fases, tamanho de cristalito, micro deformação, utilizando um Difratômetro (X'Pert PRO) no centro brasileiro de pesquisas físicas (cbpf). O Difratômetro usado é composto por um tubo de Raios-X com ânodo de cobre, espelho intensificador (divergente-paralelo) no feixe incidente, fenda de incidência com  $\frac{1}{2}$  graus, porta amostras fixo, monocromador de grafite e detector pontual mini proporcional a gás Xenônio como podemos observar na figura Figura 14.

Figura 14 - Goniômetro do Difratômetro (X'Pert PRO)



Fonte: O Autor, 2019.

O processo de preparação da HA para ser analisada no difratômetro (X'Pert PRO) foi feita de forma a obtermos a melhor preparação possível, variando as amostras de HA. Com o objetivo de comparar resultados de diferentes temperaturas de calcinação foi gerado DRX de amostras calcinadas a 600°C, 800°C, 1000°C e sem calcinação. Etapas de preparação:

1. Limpou-se a porta amostra de alumínio com álcool etílico PA;
2. A amostra foi macerada e adicionada em porta-amostra com cavidade de aproximadamente 3 mm de profundidade e área de 20x15 mm<sup>2</sup>, a superfície é aplainada manualmente com auxílio de uma lamina de vidro, isso, para uma amostra de tamanho 400 mesh segundo Cullity,2013;
3. Amostra foi posicionada no difratômetro, onde foi aplicada a técnica de Bragg-Brentano com varredura  $2\theta$  (10° -100°) aplicando a potência de 40 kv e 40 mA e tempo por passo de 2.5 segundos.

### **3.9 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HA PARA O MET**

A análise por MET necessita de uma amostra suficientemente fina e ter partículas dispersadas de tamanho nanométrico em uma grade de MET. Por isso, a amostra é avaliada em um MEV antes de iniciar as micrografias em MET. A amostra é disposta entre a fonte de elétrons e um anteparo de três milímetros, onde a imagem ampliada é formada pela interação dos elétrons transmitidos e difratados com átomos da amostra. A imagem gerada é uma projeção bidimensional da amostra, em modo imagem campo claro ou escuro, ou ainda em modo de difração de elétrons, dependendo do modo de operação do equipamento. A preparação para o MET é simples e foi descrita pelas seguintes etapas:

1. Usamos aproximadamente 10 ml de álcool isopropílico para adicionarmos a HA, em um Becker;
2. Foi utilizado ultrassom para desaglomerar as partículas por durante 15 minutos;
3. Com o auxílio de uma pipeta descartável Pasteur, depositamos uma gota na grade e deixamos a secar naturalmente;

4. A amostra é guardada em uma caixa específica para grades de microscopia de transmissão.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nesta etapa serão apresentados e discutidos os resultados de todas as secções que foram realizadas no MEV, MET e DRX, visando o aperfeiçoamento dos métodos de preparação da HA.

### **4.1 APERFEÇOAMENTO DOS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS A SEREM ANALISADAS NO MICROSCOPIO DE VARREDURA**

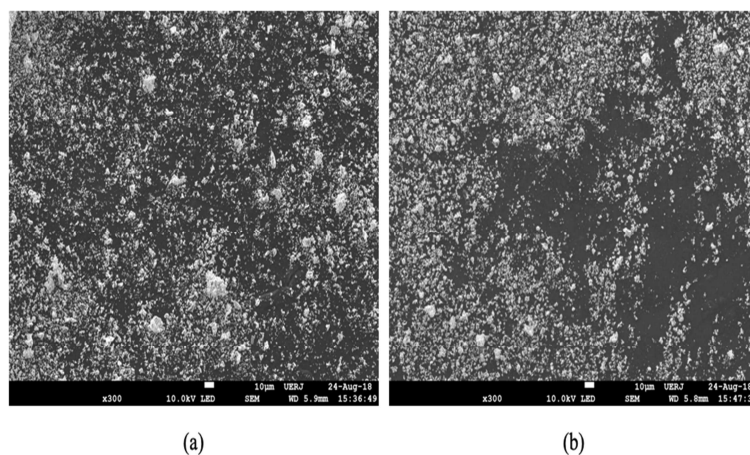
Nas pesquisas envolvendo materiais cerâmicos, alguns parâmetros devem ser obedecidos para a obtenção de bons resultados. O mais importante seria a preparação da amostra, que estaria relacionada diretamente com a qualidade das análises. Para cada tipo de amostra, um determinado tratamento deve ser aplicado. Para estudo observou-se que o principal problema em análise de amostras cerâmicas em pó no MEV, acontece quando a nossa amostra, tende a se aglomerar. Baseando-se nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo melhorar a preparação das amostras em pó, a fim de obtermos imagens do MEV com altas magnificações e boa qualidade de imagem. As imagens foram produzidas com voltagem de 10 kv e uma distancia de trabalho de 5 mm.

#### **4.1.1 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DIREITA DA AMOSTRA E COM TRATAMENTO PREVIO EM ESTUFA**

Nesta etapa foram utilizadas as imagens geradas pelo MEV, a fim de observar a dispersão das partículas. Na figura 15 é apresentada a imagem do MEV com magnificação de 300x natural e após secagem. Já na figura 16 é apresentada a imagem do MEV com magnificação 2000x natural e após secagem.

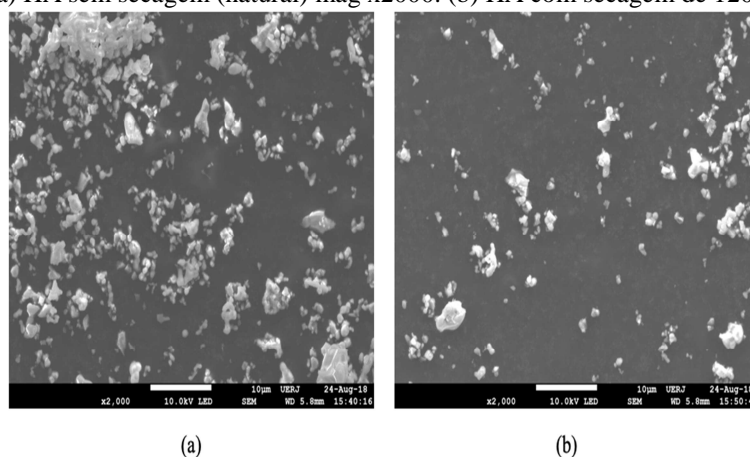
Figura 15 – (a) HA sem secagem (natural) mag. x300.(b) HA com secagem de 120 °C mag x300.





Fonte: O Autor, 2018.

Figura 16 –(a) HA sem secagem (natural) mag x2000. (b) HA com secagem de 120 °C mag x2000.



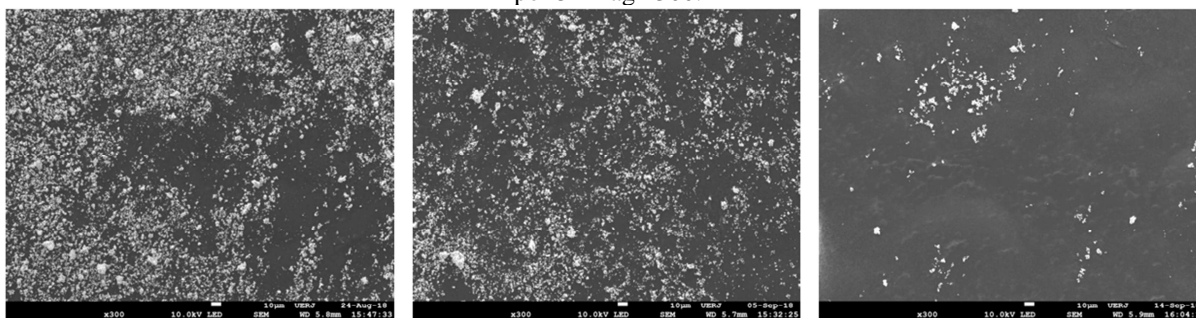
Fonte: O Autor, 2018.

Como podemos verificar nas figuras 15 e 16, algumas partículas se apresentam dispersas, mas observa-se aglomerados, porém partículas não estão posicionados homogeneamente, apresentando alguns espaços livres, apresentando também variação no tamanho das partículas aglomeradas.

#### 4.1.2 ANÁLISE DO TEMPO DE SECAGEM

O tempo de secagem consiste no tempo que a amostra foi submetida para a retirada da umidade ainda presente. Realizaram-se vários tempos de secagem de 1, 2 e 3h, a fim de observarmos se haverá alguma alteração, que serão observadas por meio das figuras 17 e 18, como a desaglomeração das partículas.

Figura 17 – (a) HA com secagem por 1h mag x300.(b) HA com secagem por 2h mag x300. (c) HA com secagem por 3h mag x300.



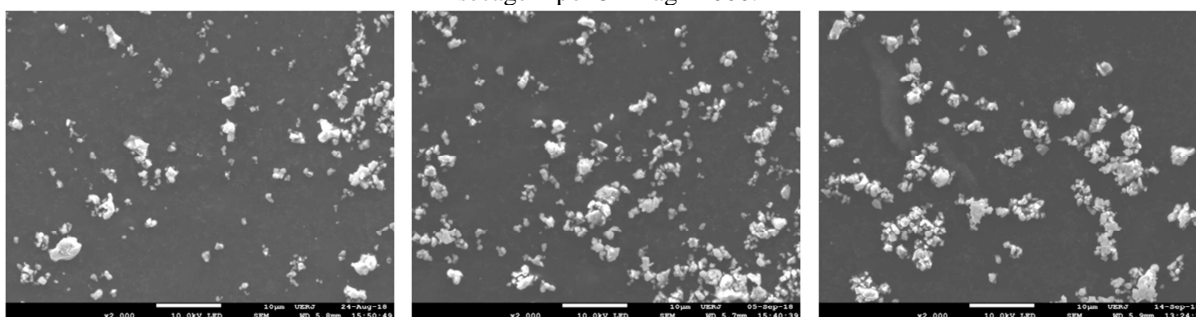
(a)

(b)

(c)

Fonte: O Autor, 2018.

Figura 18 – (a) HA com secagem por 1h mag x2000.(b) HA com secagem por 2h mag x2000. (c) HA com secagem por 3h mag x2000.



(a)

(b)

(c)

Fonte: O Autor, 2018.

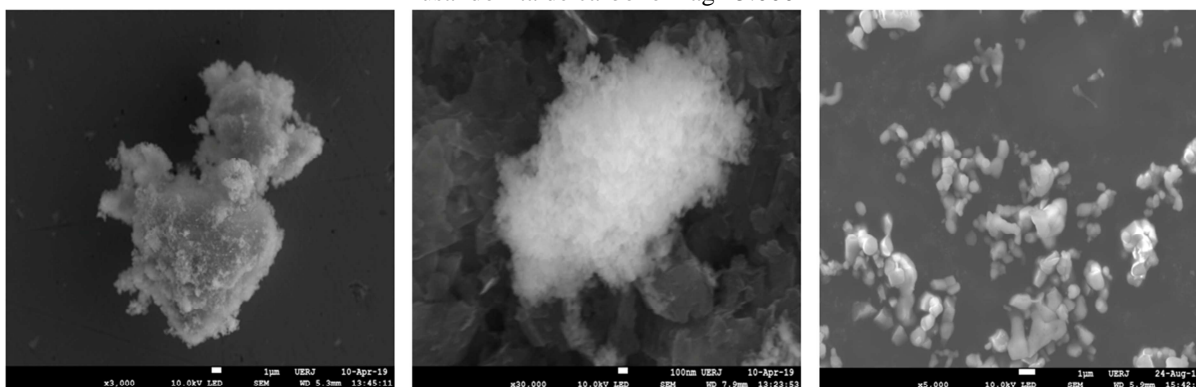
Todos os testes de secagem onde se variou o tempo em que foi submetida a estufa a 120°C, verifica-se que as amostras estão melhores dispersadas (desaglomerada), tendendo a uma maior separação entre partículas. Percebe-se que na amostra em que foi submetida a um maior tempo de secagem, as figuras 17 e 18, as partículas não estão homogêneas em todas as áreas, uma justificativa plausível seria devido ao uso do ar seco (amostras mais secas, tendem a ser mais leves). Convencionou-se para esse trabalho utilizar tempo de secagem de 2h.

#### 4.1.3 ANÁLISE QUANTO AO USO DA FITA, TINTA E O STUB CONDICIONADO SEM REAGENTES

Um dos fatores que pode influenciar diretamente nos resultados, quanto à qualidade de imagem gerada no MEV, durante o processo de preparação da amostra está ligado ao uso fita adesiva de carbono e a tinta, que em maior parte das preparações tem um impacto negativo.

Desta forma, adotamos o *stub* condicionado para tentarmos solucionar esse problema, como mostra a figura 19, que buscam fazer uma comparação entre essas três formas de fixador da amostra, utilizando a HA natural com diferentes magnificações de 3000x, 5000x e 10.000x.

Figura 19 – (a) HA usando *stub* condicionado mag x3.000 (b) HA usando tinta de carbono mag x30.000(c) HA usando fita de carbono mag x5.000



(a)

(b)

(c)

Fonte: O Autor, 2019.

Após testes de utilização da fita adesiva de carbono, tinta e *stub* condicionado para HA sem reagentes de dispersão, podemos afirmar que tanto a fita e o *stub* condicionado apresentaram resultados mais satisfatórios, quanto à sua aplicação para esta finalidade, gerando imagens com boa qualidade.

#### 4.1.4 ANÁLISE QUANTO DE REAGENTES DE DISPERSÃO

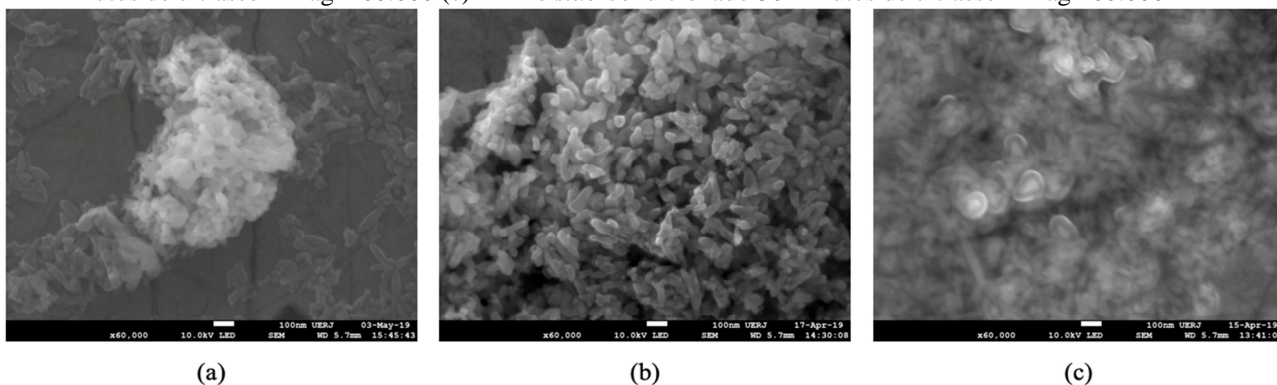
Nesta etapa do processo de desaglomeração das partículas de HA, se buscou com auxílio de três reagentes, éter, tolueno e álcool isopropílico, e o tempo de ultrassom (10, 20 e 30 minutos) alcançar a dispersão das partículas com finalidade de podermos analisar individualmente uma partícula de HA, sua morfologia, tamanho sem que o tempo de ultrassom e a utilização de reagentes possam alterar as suas características.

##### 4.1.4.1 TOLUENO

O primeiro reagente a ser usado para o processo de desaglomeração foi o tolueno (apolar), que é um produto que não reage com HA, mas querer cuidados no seu manuseio, por se tratar de um produto perigoso quando inalado, e é inflamável. A adição do reagente HA foi

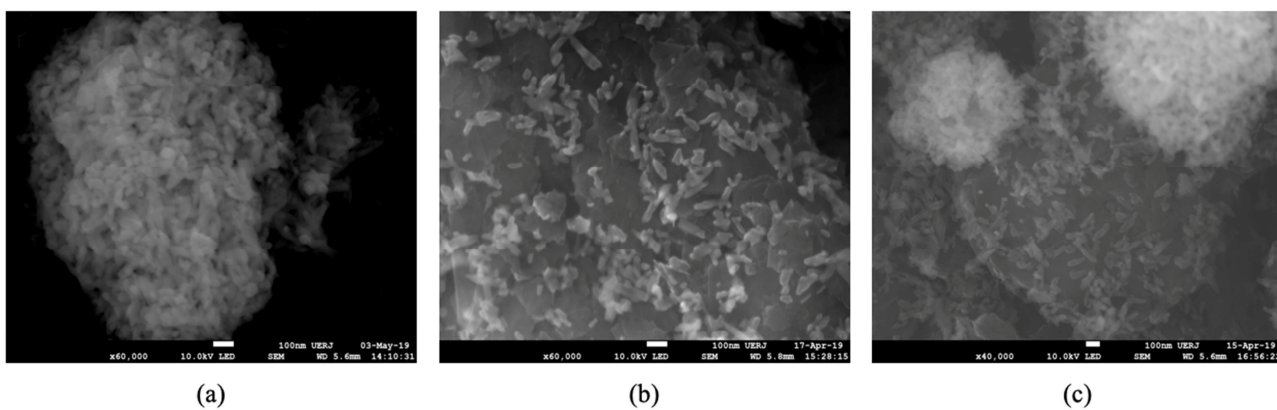
efetuada utilizando mascara e luvas. As figuras abaixo, nos ajudaram na analise dos efeitos do processo de desaglomeração, com a variação do tempo de ultrassom, mostrados nas figuras de 20 a 22.

Figura 20 – (a) HA no *stub* condicionado 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* condicionado 20 minutos de ultrassom mag x 60.000 (c) HA no *stub* condicionado 30 minutos de ultrassom mag x60.000



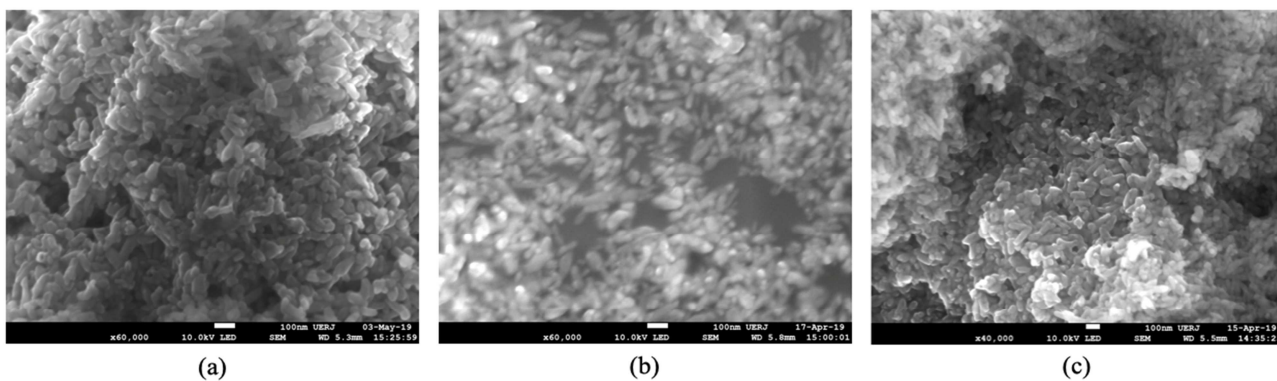
Fonte: O Autor, 2019.

Figura 21 – (a) HA no *stub* tinta de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000(b) HA no *stub* tinta de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000(c) HA no *stub* tinta de carbono 30 minutos de ultrassom mag x 60.000



Fonte: O Autor, 2019.

Figura 22 – (a) HA no *stub* fita de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* fita de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no *stub* fita de carbono 30 minutos de ultrassom mag x60.000



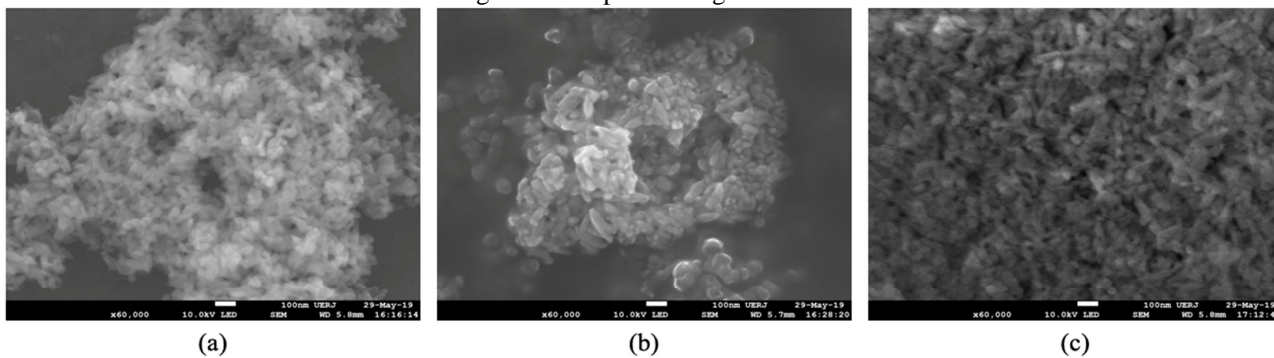
Fonte: O Autor, 2019.

Analisando as figuras acima, podemos verificar que houve desaglomeração das partículas de HA. A figura apresenta imagens desfocadas, isso acontece devido ao uso da fita de carbono, que contém uma cola adesiva que ao reagir com o reagente de dispersão, fazendo com que as partículas de HA, estejam embebidas nesta reação que se dá com a cola adesiva, apresentando desde já uma grande desvantagem quando utilizamos a fita de carbono.

#### 4.1.4.2 ÉTER

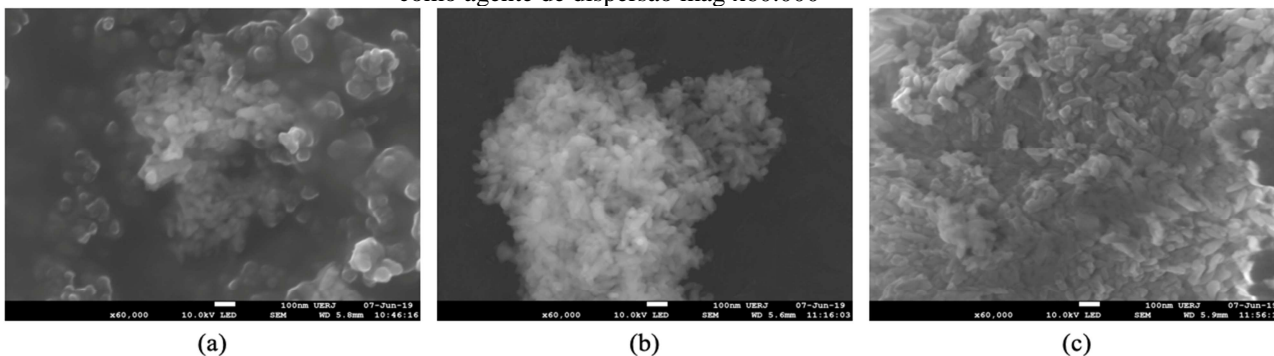
O éter foi o segundo reagente a ser utilizado para o processo de desaglomeração, apresentando uma desaglomeração em função do tamanho, assim como o tolueno, aqui temos uma dispersão com tamanhos maiores que no caso do tolueno, que apresenta uma desaglomeração de tamanhos de partículas nanométricas. As figuras abaixo, demonstram com bastante clareza que a dispersão, quando usamos o éter (apolar) será em função do tamanho das partículas (tamanhos maiores ou micrométricas).

Figura 23 - (a) HA no *stub* espelhado 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* fita de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no *stub* com tinta de carbono 10 minutos de ultrassom usando éter como agente de dispersão mag x60.000



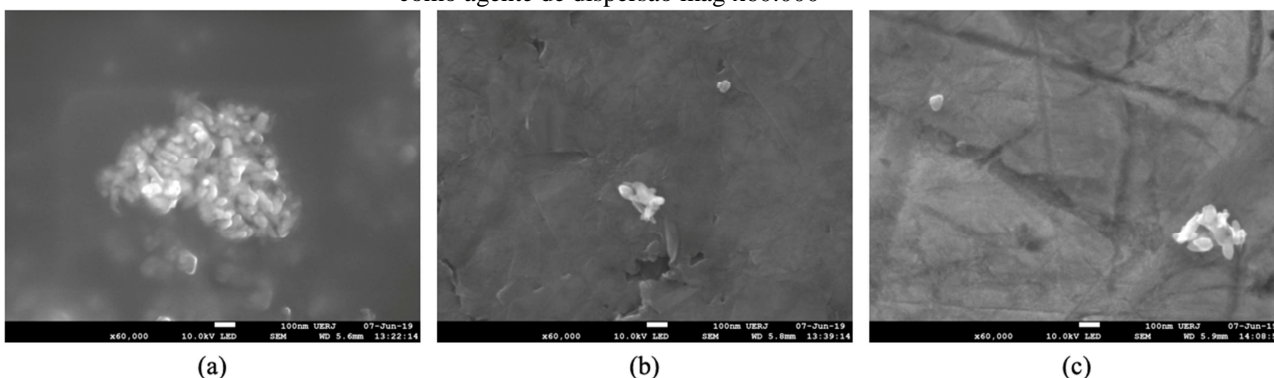
Fonte: O Autor, 2019.

Figura 24 - (a) HA no *stub* espelhado 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* fita de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no *stub* com tinta de carbono 20 minutos de ultrassom usando éter como agente de dispersão mag x60.000



Fonte: O Autor, 2019.

Figura 25 - (a) HA no *stub* espelhado 30 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* fita de carbono 30 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no *stub* com tinta de carbono 30 minutos de ultrassom usando éter como agente de dispersão mag x60.000



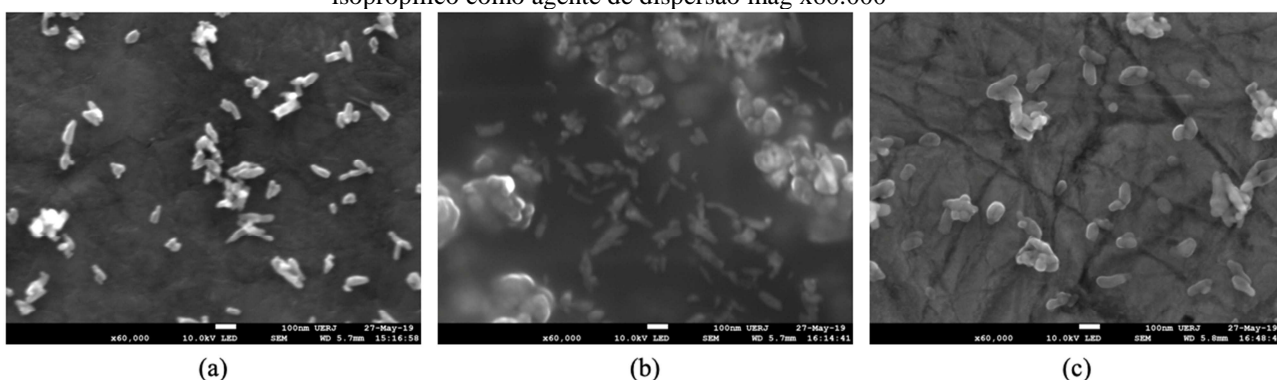
Fonte: O Autor, 2019.

Como se pode observar, as partículas não tem uma desaglomeração satisfatória, e nos stubs que se utilizou fita, não é possível observar alguma partícula de HA.

#### 4.1.4.3 ÁLCOOL ISOPROPÍLICO

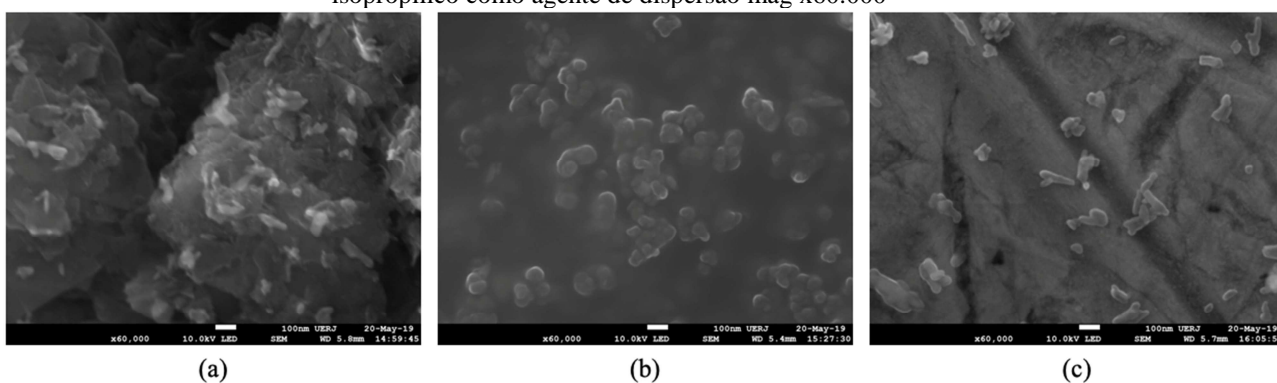
O último reagente de dispersão foi o álcool isopropílico, utilizado para o processo de desaglomeração, que apresentou uma desaglomeração em função da carga, porque o álcool isopropílico é polar, apresentando entre os três reagentes, melhor resultado quanto a dispersão como mostra as figuras abaixo.

Figura 26 - (a) HA no *stub* espelhado 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* fita de carbono 10 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no *stub* com tinta de carbono 10 minutos de ultrassom usando álcool isopropílico como agente de dispersão mag x60.000



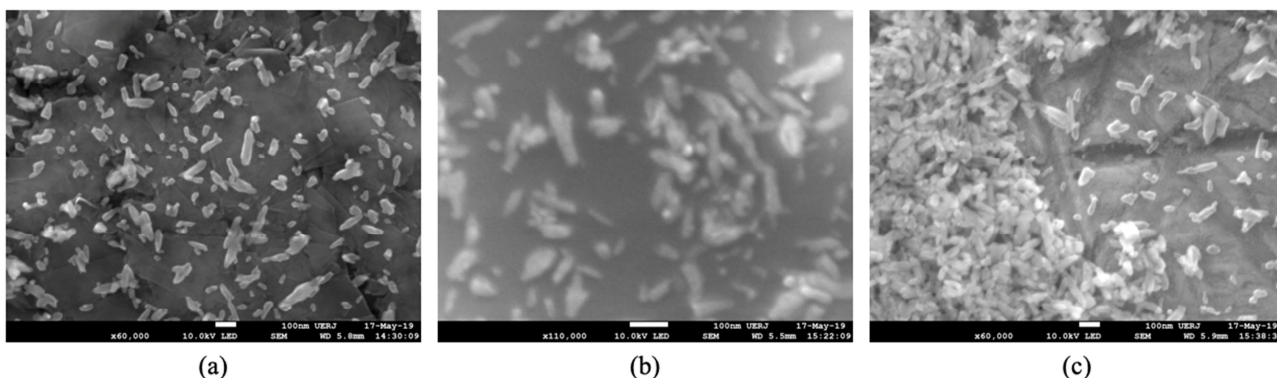
Fonte: O Autor, 2019.

Figura 27 - (a) HA no *stub* espelhado 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* fita de carbono 20 minutos de ultrassom mag x60.000 (c) HA no *stub* com tinta de carbono 20 minutos de ultrassom usando álcool isopropílico como agente de dispersão mag x60.000



Fonte: O Autor, 2019.

Figura 28 - (a) HA no *stub* espelhado 30 minutos de ultrassom mag x60.000 (b) HA no *stub* fita de carbono 30 minutos de Ultrassom mag x60.000 (c) HA no *stub* com tinta de carbono 30 minutos de ultrassom usando álcool isopropílico como agente de dispersão mag x60.000



Fonte: O Autor, 2019.

Comparando todos os resultados obtidos quanto ao tipo de reagente de dispersão e a preparação do *stub*, destacamos o álcool isopropílico e os stubs preparados, utilizando tinta de carbono e o *stub* espelhado, apresentaram os melhores resultados de longe quando comparados aos *stubs* que utilizamos a fita. Quanto ao reagente, o álcool isopropílico apresentou resultados satisfatórios. Podemos observar também, que em função do tempo de ultrassom as partículas sofrem um maior desgaste, isto é, quando o tempo ultrassom é maior, teremos um maior desgaste, e teremos um menor desgaste quando o tempo de ultrassom é menor, como podemos observar nas figuras acima.

#### 4.1.5 RESULTADO DO DRX

A técnica de difração de Raios-X é extremamente importante na análise de estruturas cristalinas de pós e permite a identificação do material. A análise se fundamenta na identificação das reflexões de Bragg e comparando-a com o banco de dados PDF (*Powder Diffraction File*), publicados no ICDD (*International Centre for Diffraction Data*), onde é possível identificar o material e determinar as possíveis fases formadas pelo mesmo.

A célula unitária simples da HA contém 44 átomos, com 10 átomos de cálcio (Ca), 6 íons de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), e 2 grupos OH<sup>-</sup> bem organizados na estrutura atômica hexagonal ou monoclinica (Brundavanam 2013). Os parâmetros de rede da HA foram obtidos a partir de medidas de difração de Raios-X para as quatro amostras conforme mostra a tabela Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos tamanhos de cristalitos, parâmetros de rede da célula unitária, a partir do refinamento de Rietveld, de cada amostra analisada

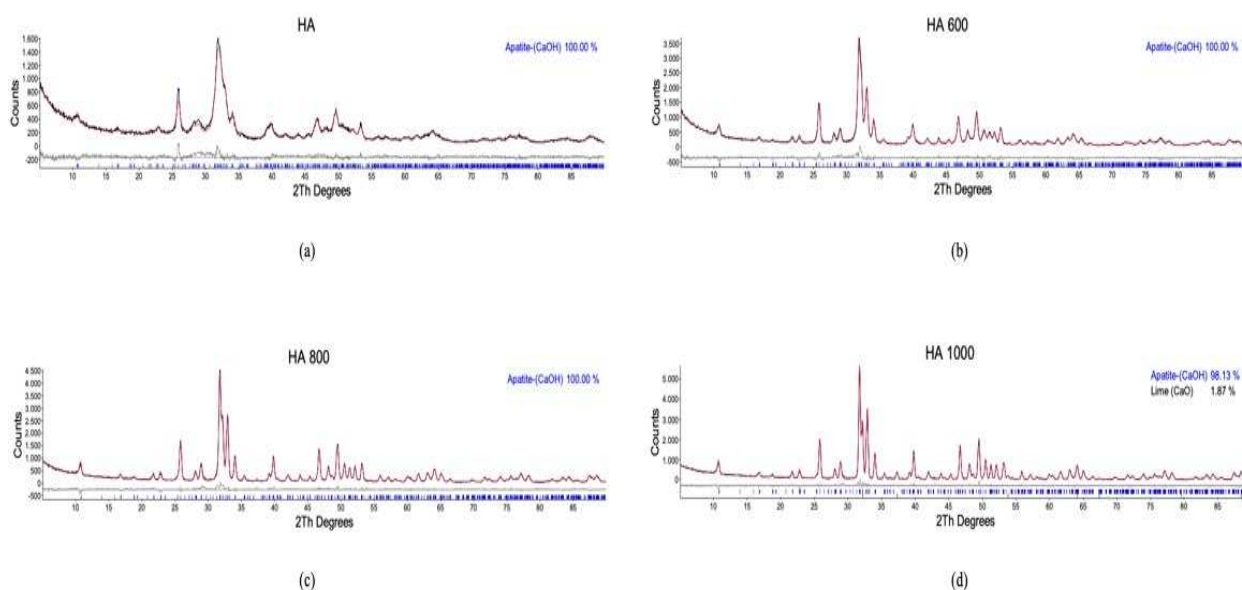


Amostra	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Tamanho do cristalito (nm)
Sem calcinação	9.397	18.966	6.870	15,1
HA 600	9.362	18.830	6.882	33,0
HA 800	9.419	18.820	6.884	69,6
HA 1000	9.424	18.842	6.882	297,1

Fonte: O Autor, 2019.

Conforme a tabela 5 (Franco, Silva e Borges 2010), se pode observar que os parâmetros de rede da célula de cada amostra não têm uma variação considerável, apresentando assim valores muito próximos. A figura Figura 29 mostra os espectros de difração obtidos por difração de Raios-X para as amostras sintetizadas neste trabalho.

Figura 29 - Espectros de difração de Raios-X: (a) envelhecida em temperatura ambiente; (b) HA 600 sintetizada em T = 600; (c) HA 800 sintetizada em T= 800; (d) HA 1000 sintetizada em T= 1000.



Fonte: O Autor, 2019.

#### 4.1.6 RESULTADO DO MET

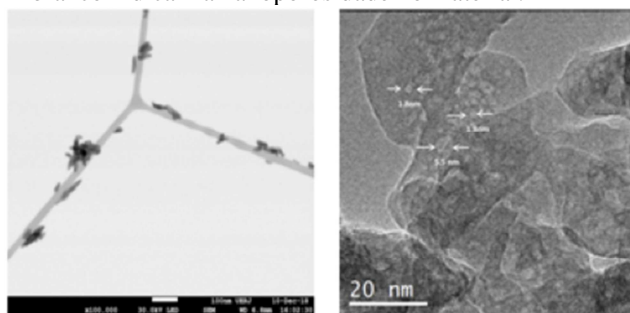
A formação de imagem no MET é uma projeção bidimensional da amostra, podendo haver sobreposição das linhas e áreas de interesse. A imagem final pode ser de campo claro ou campo escuro. Cada modo de imagem fornece informações complementares sobre a amostra.

No campo claro, uma abertura é ativada no plano focal inferior da lente objetiva que permite a passagem apenas dos feixes diretos, não difratados. As regiões da amostra (densa ou menos densa) que interagem, correspondentes a estes feixes surgem escuras na imagem, enquanto que regiões com nenhuma amostra no caminho do feixe aparecem mais claras na imagem. Na imagem de campo escuro, o feixe direto é bloqueado pela abertura do plano focal inferior enquanto que um ou mais feixes difratados passam pela lente objetiva e aparecem claros na imagem. As regiões cujos feixes refratados não foram coletados vão aparecer escuras na imagem. Os feixes difratados têm forte interação com a amostra, fornecendo importantes informações, como defeitos na estrutura e tamanho de partículas.

Os resultados apresentados por meio de imagens geradas no MET foram utilizados para avaliar o quanto uma preparação pode influenciar no resultado final, buscou-se também apresentar uma comparação dos resultados das técnicas do MEV e MET, onde se pode observar, que uma técnica completa a outra. O MEV nos apresenta informações da parte superficial da HA, já o MET apresenta informações com maiores magnificações e detalhes mais internos da partícula, o que permite revelar a porosidade dessas partículas, como é observado nas figuras Figura 30e Figura 31.

O uso das técnicas de MEV, MEV STEM e MET, são mais uma vez utilizadas para se fazer uma comparação da mesma amostra, mas usando técnicas diferentes. As amostras analisadas no MEV revelaram-se aglomeradas, as amostras foram preparadas em grades de transmissão e analisadas no MEV STEM. O STEM serve para inspecionar a qualidade da preparação da amostra (HA 600 e HA 800) nas grades a serem usadas no MET, que revelou-se com amostras menos aglomeradas e de tamanho nanométrico, o que permitiu MET. As figuras apresentam uma comparação das técnicas, mostrando que uma técnica completa a outra, isto é, o MEV STEM foi utilizado para observar se realmente as partículas de HA foram bem depositadas na grade 1 e grade 3.

Figura 30 - (a) Imagem do MEV da HA.600 grade 1;(b) Imagem MET Campo claro da HA.600. As setas em branco indicam a nanoporosidade no material.

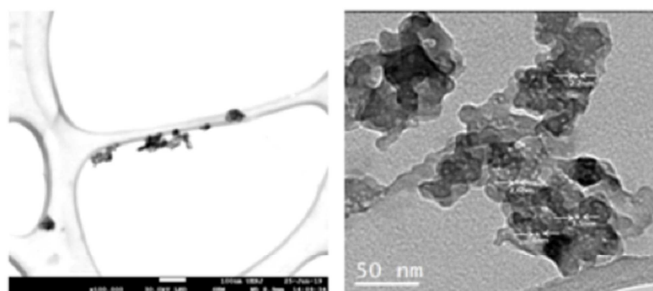


a

b

Fonte: O Autor, 2019.

Figura 31 – (a) Imagem do MEV da HA.600 no *stub* espelhado; (b) Imagem do MEV da HA.amb.sac.1.600 grade 3; (c) Imagem de MET Campo claro da HA.amb.sac.1.600. As setas indicam a nanoporosidade no material.



a

b

Fonte: O Autor, 2019.

Como se pode verificar nas figuras Figura 30 e Figura 31, as imagens do MET são completadas com auxílio do MET e STEM, que demonstra que a preparação possibilitou a melhor análise possível, ajudando a se observar a porosidade das partículas de HA, isto só é possível utilizando o MET.

## 5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados observados, concluímos que a busca por uma metodologia adequada para atender todos os objetivos deste trabalho, levou a vários experimentos a fim de alcançar as melhores técnicas de preparação de amostra de HA. Elas foram desenvolvidas para o MEV, tais como , a utilização de pinceis para a deposição de HA natural ao invés de palitos, apresentando uma melhora significativa; a preparação usando stub condicionado, fita de carbono ou tinta de carbono. A preparação usando a tinta de carbono e o stub condicionado apresentou melhor eficiência quando usamos o álcool isopropílico como agente de dispersão, o porta amostra condicionado para amostra em pó natural, se apresentou melhor que os outros métodos de preparação (fita adesiva e a tinta de carbono), isto quando utilizamos a HA natural. Para o DRX e MET não houve outros métodos de preparação, além dos descritos no trabalho, pois ela atendeu de maneira eficiente ao que se procurava estudar. Como sugestão de trabalho futuro pode ser a utilização de *stubs* de grafite e alumínio para que se analise o desempenho das técnicas de preparação apresentadas nesse trabalho.

## REFERÊNCIAS

- al, A. C. F. M. Costa e. “Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações.” *Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações*. Campina Grande, pernabumco, 18 de 11 de 2009. 10.
- Alves, OL. *Nanotecnologia, nanocência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. Parcerias Estratégicas*. Rio de Janeiro, 2004.
- Aoki, H. “Science and medical applications of hydroxyapatite.” *Japponese Association of Apatite Science*, 1991.
- Barth JV, Costantini G, Kern K. *Engineering atomic and molecular nanostructures at surfaces*. 2005.
- Brundavanam, R. K. “Modelling the Crystal Structure of a 30 nm Sized Particle based Hydroxyapatite Powder Synthesised under the Influence of Ultra- sound Irradiation from X-ray powder Diffraction Data.” *American Journal of Materials Science*, 2013: 84-90.
- Calderín, L., M. J. Stott, e A. Rubio. “Electronic and crystallographic structure of apatites.” *Physical Review B*, v. 67,, 2003.
- Costa, A.C. F. M., et al. “Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações.” 2010: 10.
- Dourado, Érico Rodrigues. “PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA DOPADA COM ESTRÔNCIO.” *Dissertação*, 2006: 128.
- Echlin, Patrick. “Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis.” Cambridge, Janeiro de 2009.
- Elliot, J. C. “Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates.” *Studies in inorganic chemistry*, 1994: 389 .
- Fook, A.C.B.M.I, A.H.II Aparecida, e M.V.L Fook. “Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea.” 2010.
- Forster, Letícia M.K., Mario Tannhauser, e Semíramis L.Tannhauser. “Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso.” *Revista de Saúde Publica*. Porto Alegre, Rio Grande do sul, 1994.

Franco, P. Q, J. C Silva, e J. P. Borges. *Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação*. Vol. 22. 2010.

Fulmer, M. T., R. I. Martin, e P. W Brown. "Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature.." *Materials in Medicine*, 1992, 299-305.

Goldstein, J. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Vol. 2. New York, 2003.

Gopi D, Govindaraju KM, Victor CA, Kavitha L, Rajendiran N. "Spectroscopic investigations of nanohydroxyapatite powders synthesized by conventional and ultrasonic coupled sol-gel routes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*" 2008.

Ibuki, Flávia Kazue. "Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário." Tese, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2014, 200.

Isoppo, Eduardo de Almeida. *Caracterização RA Estrutural de Filmes Finos de Azul da Prússia por Microscopia Eletronica de Transmissão*. Florianópolis, Santa catarina, 2015.

Kawachi, E. Y . et al. *Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar*. Vol. 23, em *Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar.*, por E. Y . et al KAWACHI, edição: Química Nova, 518 - 522. São Paulo, São Paulo: Química Nova, 2000.

Kay, M. I., R. A. Young, e A. S. Posner. "Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature*." Em *Nature*, v, por M. I. Kay, R. A. Young e A. S. Posner, 1050-1052. 1964.

Lopes, Gabriel do Lago. *Estudo da Obtenção de Tialita por Moagem de Alta Energia*. Poços de Caldas, Minas Gerais, 2014.

M. S. Aguilár, J. B. Campos, B. C. Di Lello, F. Queiroz, Campos N.C. "SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA COM O USO DE CARBONATO DE CÁLCIO DE ORIGEM BIOLÓGICA COMO PRECURSOR." *21o CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, 14 de 11 de 2014: 08.

Maia, Monica Diuna Calasans. "A Hidroxiapatita Contendo Zinco a 0,5% como Substituto Ósseo. Caracterização Físico-química e Análise Normatizada da Biocompatibilidade." Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2009, 240.

Martins\*, C. R., W. A. Andrade, e J. B. Lopes. “Solubilidade das substâncias orgânicas.” *Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador - BA, Brasil, 2013.*

Rodrigues, Leonardo Ribeiro. “Síntese e caracterização de hidroxiapatita e titânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos.” campinas, sao paulo, 2008. 100.

Santos, Wellington Cantanhede dos. “Síntese e Caracterização Estrutural, Magnética e Térmica da Hidroxiapatita Dopada com Ferro .” Dissertação, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte , Natal, 2014, 104.

Toma, HE. *O mundo nanométrico: a dimensão do novo século*. Vol. 2. São Paulo, São Paulo: São Paulo, 2009.