

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
SECRETARIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

PEDRO MARINS BEDÊ

**PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA
PRECIPITADA EM MICROESFERAS DE ALGINATO DE
CÁLCIO**

Rio de Janeiro

2017

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

PEDRO MARINS BEDÊ

**PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA
PRECIPITADA EM MICROESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C.

Giselle Nogueira Fontes – D.C.

Rio de Janeiro

2017

c2017

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmар ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

620.1 Bedê, Pedro Marins

B411p Produção de hidroxiapatita nanoestruturada precipitada em microesferas de alginato de cálcio / Pedro Marins Bedê; orientado por Marcelo Henrique Prado da Silva; Giselle Nogueira Fontes– Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2017.

92p.: il.

Tese (Doutorado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2017.

1. Curso de Ciência dos Materiais – teses e dissertações. 2. Hidroxiapatita. 3. Alginato. I. Silva, Marcelo Henrique Prado da. II. Fontes, Giselle Nogueira. III. Título. IV. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

PEDRO MARINS BEDÊ

**PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA
PRECIPITADA EM MICROESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências em Ciência dos Materiais.

Orientadores: Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C. do IME
Giselle Nogueira Fontes – D.C. do INMETRO

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017 pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva – D.C. do IME – Presidente

Pesq.^a Giselle Nogueira Fontes – D.C. do INMETRO

Pesq. Flávio James Humberto Tommasini Vieira Ramos – D.C.do IME

Prof. Ronaldo Sérgio de Biasi – Ph.D. do IME

Prof. André Ben-Hur da Silva Figueiredo – D.C. do IME

Prof. Sérgio Neves Monteiro – Ph.D. do IME

Prof.^a Priscilla Vanessa Finotelli – D.C. da UFRJ

Prof.^a Daniela de França da Silva Freitas – D.C. do IMA/UFRJ

Rio de Janeiro, 2017.

À Minha Esposa, Wanessa Carvalhal Santos Bedê

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Wanessa, por toda compreensão, força, carinho, incentivo, cumplicidade, amor, noites em claro me fazendo companhia, por fazer parte da minha vida e me deixar fazer parte da sua. Ah, pelo sorriso mais gostoso do mundo também!

A minha não-mais-tão-pequena filhota Lis, pelo carinho e amor, por me fazer rir nos momentos mais inesperados, pelo sorriso gostoso que puxou da mãe, e por me mostrar que se pode encontrar felicidade mesmo quando não se espera.

Aos Sr. Sebastião e Sra. Fátima *in memoriam*, por me estenderem as mãos e darem-me uma ajuda sem a qual, eu não sei se conseguiria terminar o curso. Por ensinar-me a ter força mesmo quando tudo parece perdido e lutar pela vida a cada respiração. Obrigado pelo exemplo que levarei pelo resto da vida.

Gostaria de agradecer aos meus pais Edgard e Rosângela por tudo o que eles deixaram de fazer por eles para fazer pelos filhos, de forma trabalhadora, honesta, sacrificada e exemplar. Por minha formação ética e moral, pelo zelo à minha educação e de meus irmãos.

Aos meus avós *in memoriam*, pelos exemplos de dedicação, bondade, amor ao próximo. Em especial ao meu avô Waldyr Bedê *in memoriam*, que foi o pilar principal da formação dos meus valores, companheiro para todas horas. Inesquecível.

À minha melhor amiga (e co-orientadora), Giselle Nogueira Fontes, pelos ensinamentos, pelo exemplo de honestidade e seriedade e por sempre acreditar no meu trabalho. Muito obrigado.

Ao meu orientador Prof. Marcelo Prado, por dar-me a oportunidade de trabalhar com ele mais uma vez, por puxar a orelha quando tinha que puxar e, acima de tudo, acreditar no meu trabalho. Muito obrigado

A todos que me ajudaram com as análises, sempre me atendendo com boa vontade e prazer. Esse agradecimento é em especial para meus grandes amigos Daniel Navarro e Rubens Marçal, do IME, Vânia, do INMETRO, Serginho, do INMETRO.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído, a começar por todas pessoas que de forma honesta pagam seus impostos, e que através deles meus estudos puderam ser custeados.

À CAPES, pelo financiamento através da bolsa de estudo.

Este trabalho é uma conquista não só minha, mas de todos vocês. É uma prova de que o investimento e a crença de vocês não foi em vão.

À todos vocês uma única palavra: **Obrigado!**

“Se você assume que não existe esperança, então você garante que não haverá esperança. Se você assume que existe um instinto em direção à liberdade, então existem oportunidades de mudar as coisas”

-Noam Chomsky-

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Considerações Gerais.....	18
1.2 Objetivos.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Biomateriais	22
2.1.1 Biocerâmicas.....	22
2.1.2 Fosfatos de Cálcio.....	23
2.1.3 Hidroxiapatita	24
2.1.4 Biopolímeros.....	26
2.1.5 Alginato	27
2.2 Técnicas de Caracterização.....	29
2.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão	29
2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	31
2.2.3 Microscopia de Força Atômica.....	32
2.2.3.1 Modos de Operação do AFM	37
2.2.3.2 Peakforce® Tapping	40
2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Obtenção de substâncias	42
3.1.1 Preparação de solução precursora.....	42
3.1.2 Preparação de solução de alginato de sódio.....	42
3.1.3 Preparação de solução de KOH	43
3.1.4 Preparação de esferas de alginato de cálcio.....	43
3.1.5 Precipitação de hidroxiapatita.....	43
3.2 Preparação de amostras para análise.....	44
3.2.1 Microscopia de Força Atômica.....	44

3.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	45
3.2.3	Corte Criogênico.....	45
3.2.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão	46
3.2.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
4.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	60
4.3	Microscopia de Força Atômica (AFM)	67
4.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	83
5	CONCLUSÕES.....	87
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	88
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE SIGLAS

IME	Instituto Militar de Engenharia
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
AFM	Microscopia de Força Atômica
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva

LISTA DE FIGURAS

FIG. 2.1	Arranjo cristalino do cristal de HA.	25
FIG. 2.2	Estrutura molecular do alginato de sódio e seus monômeros	27
FIG. 2.3	Processo de reticulação do alginato pela troca catiônica do Na ²⁺ pelo Ca ²⁺	28
FIG. 2.4	Detalhamento da estrutura do modelo “egg-box”	29
FIG. 2.5	Estrutura básica do MET.....	30
FIG. 2.6	Esquema simplificado de funcionamento do AFM.....	33
FIG. 2.7	Principais <i>cantilevers</i> e pontas utilizadas em AFM. (a) Sonda piramidal; (b) Sonda de alta relação de aspecto cônico para imagens de alta resolução; (c) Dois cantilevers em forma de V para o modo de imagem de contato; (d) <i>Chip</i> com série de hastes de diferentes comprimentos. Neste caso, as hastes são <i>tipless</i> (sem ponta) para permitir a montagem das partículas de interesse para medição de força.....	34
FIG. 2.8	Modelo para a obtenção de curvas de força no AFM, utilizadas para obtenção de propriedades mecânicas das amostras.....	35
FIG. 2.9	Relação de forças que atuam entre a sonda e a amostra em função da distância que as separa.....	36
FIG. 2.10	Curva de força-distância para a interação sonda-amostra.....	37
FIG. 2.11	Imagem de resolução atômica de uma superfície de ouro	38
FIG. 2.12	Principais modos de operação do AFM	39
FIG. 3.1	Nova rota para encapsulamento de HA em matriz de alginato de cálcio.....	44
FIG. 3.2	Película de formvar em grade para amostra de MET.....	46

FIG. 4.1	Micrografia (MEV) da seção transversal da esfera onde foram feitas as análises de MEV após o corte criogênico, sob diversos aumentos: (a) 245x, (b) 392x, (c) 1178x, (d) 4530x	48
FIG. 4.2	Micrografia (MEV) de aglomerados de esferas de alginato sob aumento de 6500x.....	49
FIG. 4.3	Inversão de contraste da FIG. 4.2.....	50
FIG. 4.4	Micrografia (MEV) da região da esfera com precipitados de HA nanoestruturada, sob diferentes aumentos: (a) 859x, (b) 2479x, (c) 4872x, (d) 17500x.....	51
FIG. 4.5	Micrografia (MEV) de HA nanoestruturada sob aumento de 5471x.....	52
FIG. 4.6	Micrografia (MEV) de agulhas de hidroxiapatita sob aumentos de (a) 9233x, (b) 18000x.....	53
FIG. 4.7	Micrografia (MEV) de agulhas de hidroxiapatita sob aumento de 50000x	54
FIG. 4.8	Micrografia (MEV) de agulhas de HA sob aumento de 85000x. As agulhas apresentaram comprimento médio de 1.2 μm	55
FIG. 4.9	Micrografia (MEV) de detalhes da morfologia da região onde a hidroxiapatita precipitou no interior da esfera.....	56
FIG. 4.10	Micrografia (MEV) de gelo observado no interior da esfera.....	57
FIG. 4.11	Micrografia (MEV) de HA na forma de placas.....	58
FIG. 4.12	EDS das agulhas na região indicada pela circunferência vermelha	59
FIG. 4.13	EDS das placas na região indicada pela circunferência vermelha	60
FIG. 4.14	Micrografia (MET) de Nanoesferas de alginato.	61
FIG. 4.15	Micrografia (MET) da região de aglomerados de nanoesferas de alginato.	61
FIG. 4.16	Inversão de contraste da FIG. 4.15.....	62

FIG. 4.17	Micrografia (MET) de possível cristal hexagonal de apatita.	63
FIG. 4.18	Micrografia (MET) de aglomerados de HA nanoestruturados.....	64
FIG. 4.19	Micrografia (MET) da região com agulhas de HA.	64
FIG. 4.20	Micrografia (MET) de diferente região com HA nanoestruturada.	65
FIG. 4.21	Micrografia (MET) da mesma região sob maior aumento.	65
FIG. 4.22	Micrografia (MET) de agulhas de HA nanoestruturada	66
FIG. 4.23	Micrografia (MET) de detalhe com maior aumento das agulhas de HA.	67
FIG. 4.24	Micrografia (AFM) com informação de altura das nanoesferas de alginato....	68
FIG. 4.25	Perfil de rugosidade das nanoesferas de alginato.	69
FIG. 4.26	Modelagem 3D da região contendo aglomerados de esferas de alginato.	69
FIG. 4.27	Micrografia (AFM) de cristais hexagonais e precipitados na forma de agulhas.	70
FIG. 4.28	Micrografia (AFM) de região com diferentes cristais hexagonais.....	71
FIG. 4.29	Simulação 3D da região mostrada na FIG. 4.27.	72
FIG. 4.30	Micrografia (AFM) de cristal hexagonal com camadas desemparelhadas.	73
FIG. 4.31	Micrografia (AFM) de amplitude do mesmo cristal hexagonal.	73
FIG. 4.32	Simulação 3D da imagem de altura do cristal.....	74
FIG. 4.33	Mapa qualitativo da dureza do cristal.	74
FIG. 4.34	Micrografia (AFM) de cristal hexagonal com grau de organização das camadas um pouco maior.....	75
FIG. 4.35	Micrografia (AFM) de amplitude desde mesmo cristal	76
FIG. 4.36	Mapa qualitativo de adesão do cristal.	77

FIG. 4.37	Mapa qualitativo de rigidez do cristal	77
FIG. 4.38	Micrografia (AFM) de cristal com alto grau de organização das suas camadas	78
FIG. 4.39	Micrografia (AFM) de amplitude deste mesmo cristal	79
FIG. 4.40	Simulação 3D da topografia do cristal	79
FIG. 4.41	Mapa qualitativo de adesão do cristal com menor grau de organização das camadas	80
FIG. 4.42	Mapa qualitativo de adesão do cristal com maior grau de organização das camadas	81
FIG. 4.43	Micrografia (MEV) de cristais destruídos pela energia do feixe	82
FIG. 4.44	Micrografia (MEV) de cristais completamente destruídos pelo feixe.	83
FIG. 4.45	Espectro de FTIR dos cristais de apatita na região 1.	85
FIG. 4.46	Espectro de FTIR dos cristais de apatita na região 2	85
FIG. 4.47	Espectro de FTIR dos cristais de apatita na região 3.	86
FIG. 4.48	Espectro de FTIR dos cristais de apatita na região 4	86

LISTA DE TABELAS

TAB. 2.1	Principais fases dos orto-fosfatos e suas propriedades.....	24
TAB 2.2	Bandas de absorção na região do infravermelho.....	41

RESUMO

Foram estudadas a precipitação e caracterização de hidroxiapatita em matriz de alginato de cálcio. Foi utilizada uma rota de precipitação de hidroxiapatita via solução precursora. As amostras foram preparadas para serem analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de força atômica (MFA) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. As medidas de microscopia eletrônica de varredura permitiram verificar a existência de precipitados de hidroxiapatita nanoestruturada, na forma de agulhas, no interior das microesferas de alginato. Foi realizado um corte criogênico nas esferas para garantir que o que estivesse sendo analisado fosse o interior das esferas. As agulhas apresentaram tamanho e forma variados, coerentes com a literatura. Também foi encontrada hidroxiapatita na forma de placas. Os espectros de energia dispersiva das regiões de aglomerados tanto agulhas quanto de placas confirmaram a presença de Ca e P. A análise de microscopia eletrônica de transmissão possibilitou observar nanoesferas de alginato de cálcio de diferentes diâmetros na amostra. Também foram visualizadas hidroxiapatitas nanoestruturadas na forma de agulhas, com tamanhos compatíveis com as encontradas nas análises de MEV. Os resultados de microscopia de força atômica permitiram estudar a topografia das amostras, assim como algumas propriedades mecânicas de forma qualitativa. Foram observadas nanoesferas de alginato de cálcio com diâmetros de até 80 nm. Também foram observados cristais hexagonais de apatita na fase de nucleação. Os cristais com maior grau de desorganização apresentaram altura média de 200 nm, enquanto os de maior grau de organização, 1,3 μm . Os cristais hexagonais apresentaram ângulos internos de 120°. Foram feitos mapas qualitativos de rigidez, dureza e adesão nos cristais. Com o objetivo de descobrir os grupos presentes nos cristais observados nas amostras de MFA, foram realizadas análises de espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier nas regiões onde eles se encontravam em maior concentração. Foram feitas análises em quatro regiões diferentes. Os espectros obtidos foram muito semelhantes aos da hidroxiapatita, porém com deslocamento das bandas. Estes deslocamentos estão previstos na literatura.

ABSTRACT

Precipitation and characterization of hydroxyapatite in a calcium alginate matrix have been studied. Precursor solution has been used as the route for hydroxyapatite precipitation. Samples have been prepared to be analyzed by four different techniques: scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Scanning electron microscopy measurements have allowed to verify the existence of nanostructured needle shaped hydroxyapatite precipitates inside alginate microspheres. Microspheres have been submitted to cryogenic cut to ensure that no debris from surface were to be found in the interior of the spheres. Needles have been found in different sizes, consistent with literature. Hydroxyapatite has also been found in the form of plaques. The energy dispersive spectroscopy measurements acquired from regions in both needle and plaque agglomerates have confirmed the presence of Ca and P. Transmission electron microscopy analysis has indicated the presence of different diameters for calcium alginate nanospheres in the sample. Nanostructured hydroxyapatites have also been found in the form of needles, with dimensions compatible to those found in SEM analyzes. AFM measurements have allowed to study the topography of samples, as well as some mechanical properties in a qualitative way. Calcium alginate nanospheres with diameters up to 80 nm have been observed. Hexagonal apatite crystals have been observed also in nucleation phase. Crystals with the highest degree of disorder have presented a mean height of about 200 nm, while those with a higher degree of order have presented a height of about 1.3 μm . Hexagonal crystals have displayed internal angles of 120° . Qualitative maps of stiffness, hardness and adhesion of the crystals have been acquired. With the aim to investigate groups present in the crystals, FTIR analyses have been performed in regions where crystals could be observed in highest concentrations. Analyses have been performed in four different regions. The results obtained were very similar to those from hydroxyapatite, but with band displacements. These displacements have been described before in the literature.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O advento da nanotecnologia permitiu grandes avanços na tecnologia de materiais. Pode-se afirmar que na última década houve maior progresso que nos últimos 100 anos de pesquisas. Hoje, as áreas de biomateriais e biomedicina despontam como maiores e mais promissoras áreas de aplicação nanotecnológica. Este trabalho concentra seus esforços na área de biomateriais, buscando uma nova rota de produção e a caracterização de um material promissor, que pode ser usado em pesquisas que gerem melhora na expectativa e qualidade de vida da população. O presente trabalho propõe uma nova rota de encapsulamento, em que a hidroxiapatita é sintetizada dentro das esferas de alginato, que são produzidas pelo gotejamento de solução rica em cátions cálcio e fosfato, solução esta precursora da hidroxiapatita.

O alginato é utilizado como material encapsulador em várias aplicações biomédicas, como por exemplo em tratamentos de câncer por hipertermia, que consiste em encapsular nanopartículas magnéticas, como a magnetita, por exemplo, e guia-las pelo corpo utilizando um campo magnético até a região do tumor. Então, é aplicado um campo magnético oscilante que, por efeito Joule, faz com que a região seja aquecida, destruindo as células tumorais. (YANG, 2006; ZHAO, 2006; LAURENT, 2011; CHEN, 2016).

Outra importante aplicação biomédica do alginato é no transporte e liberação controlada de fármacos em escala nanométrica. A estrutura do alginato permite que ele funcione como capsula de medicamentos e pode ser transportado sem riscos pelo corpo humano devido a sua biocompatibilidade. As vantagens de se trabalhar com liberação de fármacos nessa escala são o controle rigoroso da dose do medicamento que é liberada ao paciente, em casos de tratamento de câncer, a capacidade de se liberar o medicamento diretamente no tumor e, através do uso de marcadores, guiar as nanocapsulas para tecidos específicos do corpo. (WU, 2014; MORA-HUERTAS, 2012; AGUERO, 2017). Wu, J. (2014), utilizou o alginato para encapsular um coquetel quimioterápico e melhorar a eficiência na liberação do medicamento em tratamentos de câncer por quimioterapia. Maity, S. (2017) realizou testes de liberação controlada de naringenina em animais diabéticos, utilizando alginato/quitosana como matriz de

encapsulamento. Foram realizados teste *in vitro* e *in vivo* e os resultados foram muito satisfatórios. Illie, A. (2016) propôs um sistema composto de alginato e hidroxiapatita como potencial transportador e liberador de ácido ascórbico pelo corpo humano. O compósito alginato-hidroxiapatita foi escolhido pelas suas propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade.

A hidroxiapatita, por ser o principal constituinte da fase inorgânica do osso (KIM, 2015), tem sido muito estudada. Suas características químicas e estruturais possibilitam seu uso na área médica como material biocompatível em implantes e próteses. Na ortopedia existe um particular interesse em usá-la como revestimento de próteses metálicas para promover a ligação interfacial estável entre o material implantado e o tecido vivo (YUNAN, 2016). No tratamento de tumores, esse biomaterial vem sendo usado como suporte de ação prolongada. A introdução de drogas anticancerígenas em blocos de hidroxiapatita porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga no organismo (MAITY, 2017). Sob este aspecto essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor e neoformação do osso reabsorvido (LIU, 1997).

Na área odontológica a hidroxiapatita é utilizada para evitar perda óssea após extração de um ou vários elementos dentários, como também, recuperação de áreas com reabsorção ósseas. Pinos de titânio revestidos com hidroxiapatita são usados no implante para a substituição da raiz (MAVROPOULOS, 1997). As aplicações da hidroxiapatita sintética não se restringem à área biomédica. Devido à sua grande afinidade por proteínas, a HA tem sido aplicada como adsorvente. A capacidade de adsorção da HA está relacionada à estrutura do poro e à natureza físico-química da superfície do sólido. As aplicações da hidroxiapatita estendem-se desde a ortopedia e traumatologia; traumatismos raquimedulares e coluna cervical; tumores músculo-esquelético, entre outras aplicações e na odontologia, principalmente em implantes dentários.

Muitos estudos também têm focado na HA dopada com diferentes íons como HA dopada com Si (MARTINEZ, 2015), HA dopada com ZN (GHORBANI, 2015), HA dopada com Mg (LANDI, 2008; KULANTHAIVEL, 2015), HA dopada com Sr (KULANTHAIVEL, 2015), ou componentes extras como nanopartículas de prata (ANJANEYULU, 2016; ZHOU, 2015), nanotubos de carbono (LU, 2012; YANG, 2015), grafeno e óxido de grafeno (MA, 2012; NAIR, 2015) ou nanopartículas magnéticas, como Fe_3O_4 ou Fe_2O_3 (HEIDARI, 2015; MALEKI, 2016; ZHENG, 2012; YANG, 2015). Nanopartículas de HA dopadas com íons de Zn ou Si podem melhorar a biocompatibilidade dos compósitos resultantes (GHORBANI, 2015), e a dopagem com íons bivalentes apresentam melhor diferenciação osteogênica (LANDI, 2008;

KULANTHAIVEL, 2015; RAUCCI, 2015) e maior reabsorção de material (KULANTHAIVEL, 2015). A HA dopada com prata demonstra uma boa atividade antibacteriana contra diferentes tipos de bactérias e podem prevenir infecções bacterianas associadas à implantes ósseos.

A maioria dos implantes são feitos de titânio ou suas ligas devido às suas propriedades mecânicas, baixa densidade e boa estabilidade química em fluidos corporais. Apesar de possuírem ótimas propriedades mecânicas, os implantes metálicos apresentam baixa osteointegração e baixa biocompatibilidade. Para melhorar essas propriedades, a o estudo de hidroxiapatita como revestimento de implantes metálicos é extensivamente estudada, devido à sua ótima biocompatibilidade, osteoatividade e estabilidade química (YUNAN, 2016). É provado que tais revestimentos facilitam a osteointegração com tecidos próximos (SANDUKAS, 2011). Revestimentos de HA em implantes podem ser feitos a partir de diferentes técnicas: *spray* de plasma (MEJIAS, 2016), deposição por laser (DUTAA, 2013), deposição sol-gel (HE, 2014), *spin-coating* (YUNAN, 2016), técnicas de *sputtering* (HAO, 2011) e muitas outras técnicas.

É importante ressaltar que o encapsulamento de hidroxiapatita em matriz de alginato de cálcio não é algo recente e diversos autores já propuseram diferentes rotas para o processo, como Li, H., Jiang, F. (2016), Chen, J. (2015). Porém, todas as rotas propostas utilizam métodos similares, que consistem em primeiro produzir as partículas de hidroxiapatita e apenas depois encapsulá-las em matriz de alginato. O que é proposto neste trabalho é uma nova rota de encapsulamento, em que a hidroxiapatita é sintetizada já dentro das esferas de alginato, utilizando as próprias propriedades das substâncias para realizar o processo. É esperado um aumento da eficiência e uma diminuição do tempo de produção, além de um maior controle do quanto está sendo, de fato, encapsulado. É importante ressaltar que se trata de um estudo de base e, como tal, fornece substrato para que a pesquisa aplicada possa trabalhar. Além disso, ajuda-nos a compreender melhor os elementos e processos que nos rodeiam. Aqui se procura dominar a rota de produção do material, bem como conhecer melhor suas propriedades, pois tal conhecimento é fundamental para as devidas aplicações. Uma melhor descrição dos materiais utilizados nesta pesquisa será dada nos capítulos a seguir.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar uma nova rota de precipitação de hidroxiapatita nanoestruturada no interior de microesferas de alginato de cálcio contendo uma solução rica em Ca^{2+} e PO_4^{3-} .

Como objetivos secundários podem ser destacados:

- Aperfeiçoar a produção de esferas de alginato de cálcio (nano e micro);
- Caracterizar hidroxiapatita nanoestruturada precipitada em ambiente confinado;
- Aprofundar os processos de caracterização do material utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier;
- Avaliar, de forma qualitativa, a capacidade de encapsulamento das esferas de alginato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAIS

Materiais que são destinados a possuir interfaces com sistemas biológicos, com intenção de avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, sendo uma única substância ou uma mistura, são definidos como biomateriais. Essas misturas podem ser produzidas a partir de reações químicas ou interações físicas, sendo de origem natural ou sintética. (GALLETTI E BRECHER, 1962; EDMUNDS, 1985; RATNER ET AL., 2005; CHAN ET AL., 2009). Uma vez que os biomateriais estarão interagindo com sistemas biológicos (tanto ação do material sobre o meio fisiológico quanto do meio sobre o material), faz-se necessário que eles reajam apropriadamente a aplicações específicas, minimizando (ou evitando) reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas nesses sistemas. Essa propriedade é definida como biocompatibilidade. Um biomaterial deve ser compatível em uma aplicação específica. Sendo assim, faz-se necessário estarem incluídas as condições de utilização na especificação da biocompatibilidade do material. (EDMUNDS, 1985; RATNER ET AL., 2005; JALILI ET AL., 2009).

2.1.1 BIOCERÂMICAS

Biocerâmicas podem ser considerados os biomateriais ideais para uso em tecidos vivos devido à sua ótima biocompatibilidade e bioatividade, sendo os materiais mais similares aos componentes minerais dos ossos. A bioatividade pode ser definida como a capacidade do material em participar e estimular reações biológicas no organismo. Sua principal vantagem é sua alta reatividade química, sendo capazes de se ligar quimicamente ao tecido ósseo. Porém nem todas as biocerâmicas são bioativas, visto que materiais utilizados em cirurgias reconstrutivas podem ser bioinertes ou bioativas. Em 1920 foi proposta a utilização dos fosfatos de cálcio para aplicações biomédicas, e até hoje eles têm papel de destaque dentre as biocerâmicas devido à ausência de toxicidade local ou sistêmica no organismo, ausência de

inflamações e capacidade de ligar quimicamente ao tecido hospedeiro (BENS-NISSAN, B. ET. AL., 2002). Essas vantagens são possíveis porque esses materiais são basicamente formados por íons de cálcio e fosfato, participando assim ativamente do equilíbrio iônico entre a cerâmica e o fluido biológico (KAWASHI, E.Y., 1997). Os fosfatos de cálcio são convenientemente classificados através da razão molar Ca/P, variando de 0,5 a 2,0. Porém, a fase que se formará irá depender de fatores como temperatura, pH, concentração de íons, assim como da razão Ca/P citada anteriormente. (BROWN, P.W., 1999) Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio é sua solubilidade. À medida que a razão Ca/P aumenta, o produto de solubilidade diminui, ou ainda, reduz a razão de degradação desses materiais em sistemas biológicos. (BROWN, P.W., 1999). Dentre os fosfatos de cálcio, podemos destacar a hidroxiapatita que, diferentemente dos outros fosfatos de cálcio, é pouco solúvel em ambiente de pH neutro. Este fato favorece seu uso como substituto do osso, pois forma um elo químico direto com o osso subjacente sem a formação de tecido fibroso (HENCH, L. L., 1998).

2.1.2 FOSFATOS DE CÁLCIO

Por definição, os fosfatos de cálcio são constituídos por três elementos químicos principais: cálcio, fósforo e oxigênio. O hidrogênio também pode ser encontrado como constituinte de um ânion ácido (HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^-). Diferentes compostos podem ser obtidos de acordo com as combinações entre esses elementos. A classificação pode ocorrer de acordo com o ânion fosfato: Orto (PO_4^{3-}), Meta (PO_3^{3-}), Piro ($\text{P}_2\text{O}_7^{7-}$) e Poli [$(\text{PO}_3)^{n-}$]

A TAB. 2.1 contém as fases dos orto-fosfatos de cálcio e também suas principais propriedades, que diferem de acordo com a proporção de cálcio e fósforo (razão Ca/P). Quanto menor a razão Ca/P, mais solúvel em água e mais ácido é o composto.

TAB. 2.1 Principais fases dos orto-fosfatos de cálcio e suas propriedades (DOROZHKIN, SV, 2011).

Razão Ca/P	Fase do fosfato de cálcio	Fórmula química	Solubilidade a 25°C (g/L)
0,5	Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	~18
0,5	Fosfato monocálcico anidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	~17
1,0	Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	~0,088
1,0	Fosfato dicálcico anidro (DCPA)	CaHPO_4	~0,048
1,33	Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	~0,0081
1,5	α - Fosfato tricálcico (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0025
1,5	β -Fosfato tricálcico (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0005
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3-4,5 ; 15-20\% \text{H}_2\text{O}$	*
1,5-1,67	Hidroxiapatita carbonatada (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_6-x(\text{OH})_{2-x}$ $(0 < x < 1)$	~0,0094
1,67	Hidroxiapatita (HA ou HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	~0,0003
1,67	Fluorapatita (FA ou FAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$	~0,0002
1,67	Oxiapatita (OA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6$	~0,087
2,0	Fosfato tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	~0,0007

As fases ACP, DCPC, OCP e β -TCP são precursoras das apatitas. É foco de estudo determinar as condições nas quais ocorre tanto a precipitação quanto a transformação (“re-precipitação”) em uma nova fase. Os fatores que mais influenciam são o pH e a temperatura, além da razão Ca/P das soluções originais.

Em relação às suas aplicações, os fosfatos de cálcio apresentam grande interesse para a área de biomateriais, pois são os principais constituintes minerais de ossos e dentes e apresentam elevada biocompatibilidade.

2.1.3 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HA) possui fórmula molecular $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e uma razão molar Ca/P 1,67, é constituída de uma rede tridimensional de óxido de cálcio e poliedros de fosfato. Os grupos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- estão empacotados juntos em um arranjo que constitui a representação completa do cristal de apatita (ELLIOT, C., 1994). A FIG. 2.1 representa esse arranjo.

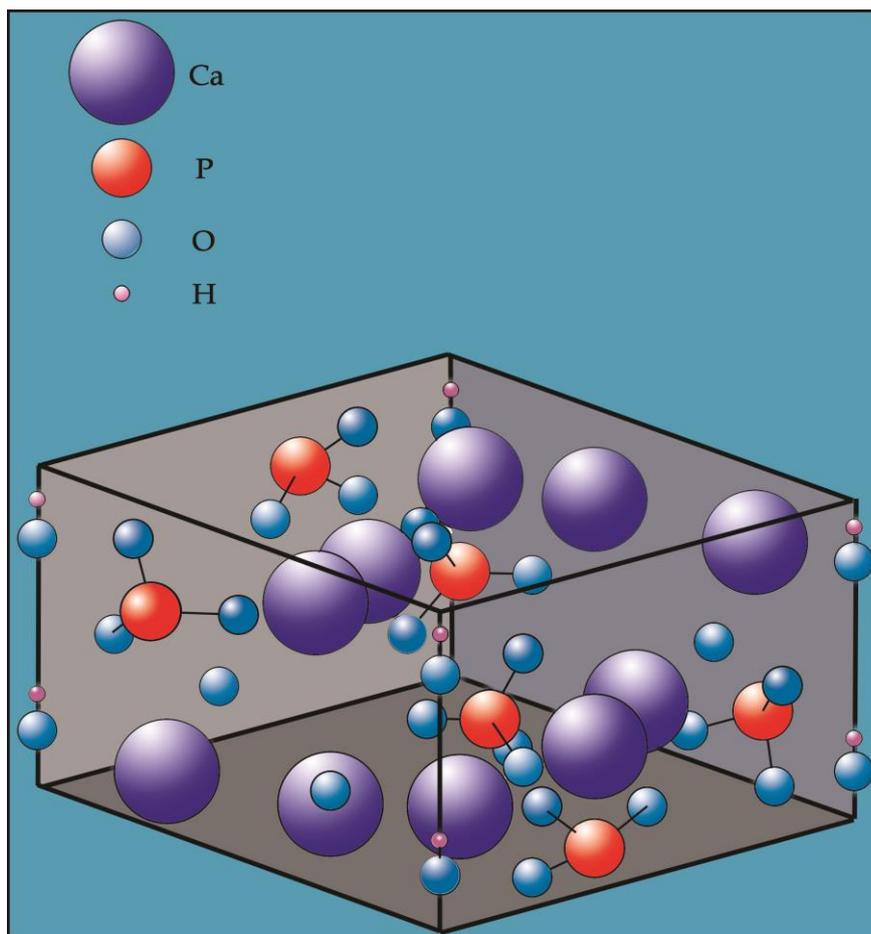


FIG. 2.1 Arranjo cristalino do cristal de HA (*elaboração própria*).

Essa estrutura da hidroxiapatita permite substituições iônicas com grande facilidade: o Ca^{2+} pode ser substituído por íons como Mg^{+2} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , entre outros; os grupos PO_4^{2-} podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos e, os grupos OH^- por carbonatos, fluoreto e cloreto. Tais substituições tem a capacidade de alterar as características da HA, como cristalinidade, tamanho do cristal, estabilidade, parâmetros de rede, biocompatibilidade, solubilidade, sem alterar significativamente a simetria hexagonal da estrutura. (HENCH, L. L.; WILSON, J., 1993). Em sistemas biológicos, a HA pode ser encontrada em tecidos mineralizados como dentina, osso e esmalte (ELLIOT, C., 1994). Como citado anteriormente, a HA possui alta similaridade com a matriz inorgânica dos tecidos ósseos, favorecendo assim o crescimento dos mesmos em sítios enxertados com HA, devido a ligações de natureza química entre a mesma e o tecido ósseo, permitindo a proliferação celular, dentre elas as células ósseas (MURUGAN E RAMAKRISHNA, 2005). Podem ser considerados dois tipos de hidroxiapatitas: as que são sintetizadas em altas temperaturas e, por consequência, apresentam cristais grandes e alta cristalinidade, e as que são sintetizadas em baixas temperaturas,

apresentando baixa cristalinidade e cristais pequenos. Estas últimas são similares às apatitas do tecido ósseo e dentário. Quando analisadas em escala nanométrica, as características da HA, como tamanho de grão, tamanho de poro e molhabilidade, podem controlar as interações com proteínas, além de modular a adesão de osteoblastos, bem como proliferação, síntese de fosfatase alcalina, deposição mineral de cálcio, e mineralização. (FERRAZ ET AL., 2004). Também é esperado que a HA nanométrica possua uma melhor bioatividade quando comparada a HA convencionais (KALITA ET AL., 2007). Isto ocorre porque a topografia e molhabilidade da superfície nessa escala promovem adsorção seletiva aumentada e afetam as conformações que aumentam as funções dos osteoblastos (MURUGAN E RAMAKRISHNA, 2005; FERRAZ ET AL., 2004; KALITA ET AL., 2007; BANERJEE ET AL., 2007).

2.1.4 BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros são produzidos por organismos vivos, como plantas e microrganismos. Celulose e amido, proteínas e peptídeos são exemplos de biopolímeros, no qual as unidades monoméricas são, respectivamente, açúcares, aminoácidos e nucleotídeos.

Os biopolímeros estão presentes em qualquer organismo, e na maioria desses organismos eles contribuem para a maior fração da matéria seca celular. Eles possuem uma ampla gama de funções essenciais ou benéficas para os organismos: conservação e expressão de informação genética, catálises de reações, armazenamento de carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes, armazenamento de energia, defesa e proteção contra-ataques de outras células, mediadores de aderência a superfícies de outros organismos ou de matéria não-viva, e muito mais. Além disso, muitos biopolímeros são componentes estruturais de células, tecidos ou organismos inteiros. Para cumprir todas essas funções, os biopolímeros precisam apresentar propriedades bastante diversificadas.

2.1.5 ALGINATO

O alginato é um polissacarídeo versátil produzido comercialmente a partir de algas marinhas. Ele afeta as propriedades de escoamento de uma solução, ou seja, afetam a reologia de soluções e suspensões. Essas propriedades são importantes na preparação de alimentos, formulações farmacêuticas e aplicações médicas especializadas, como encapsulamento celular. O alginato é um copolímero linear composto de ácido β -D-Manurônico (M) e ácido α -L-Gulurônico (G). Esses monômeros são arranjados em estrutura de blocos, sendo que sua composição e distribuição variam com a fonte do alginato (CHAN ET AL, 2002). Essa estrutura de blocos determina as propriedades físicas do polissacarídeo e particularmente o tipo de gel formado (FINOTELLI, 2006). A FIG 2.2 ilustra a estrutura molecular do alginato.

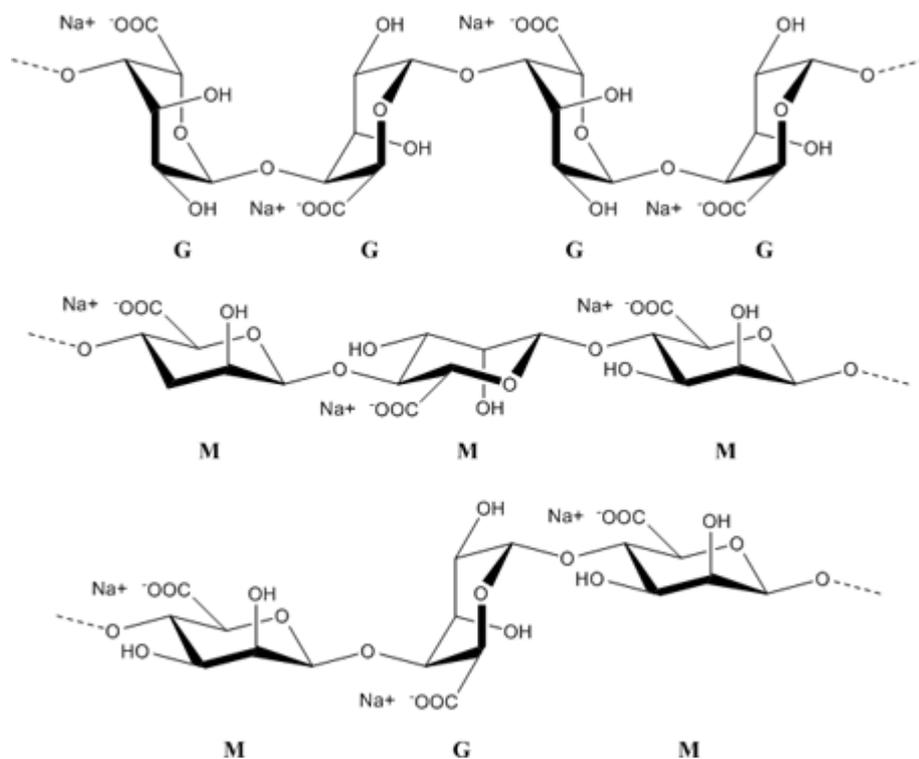


FIG. 2.2 Estrutura molecular do alginato de sódio e seus monômeros (RSC, 2010).

O alginato forma um forte gel na presença de cátions divalentes, principalmente o cálcio, por meio de ligações iônicas cruzadas entre as cadeias poliônicas do alginato (BOISSESON ET AL, 2004). Essa gelificação do alginato é convencionalmente descrita em termos do modelo de “egg box”, onde cátions divalentes são ligados coordenadamente aos carboxilatos dos ácidos

gulurônicos (ISKAKOV ET AL, 2002), como mostrado nas FIG. 2.3 e 2.4. A conformação do ácido gulurônico dá a distância adequada dos grupos carboxilas e hidroxilas dando um alto grau de coordenação com os íons de cálcio. O alginato também apresenta uma ótima biocompatibilidade.

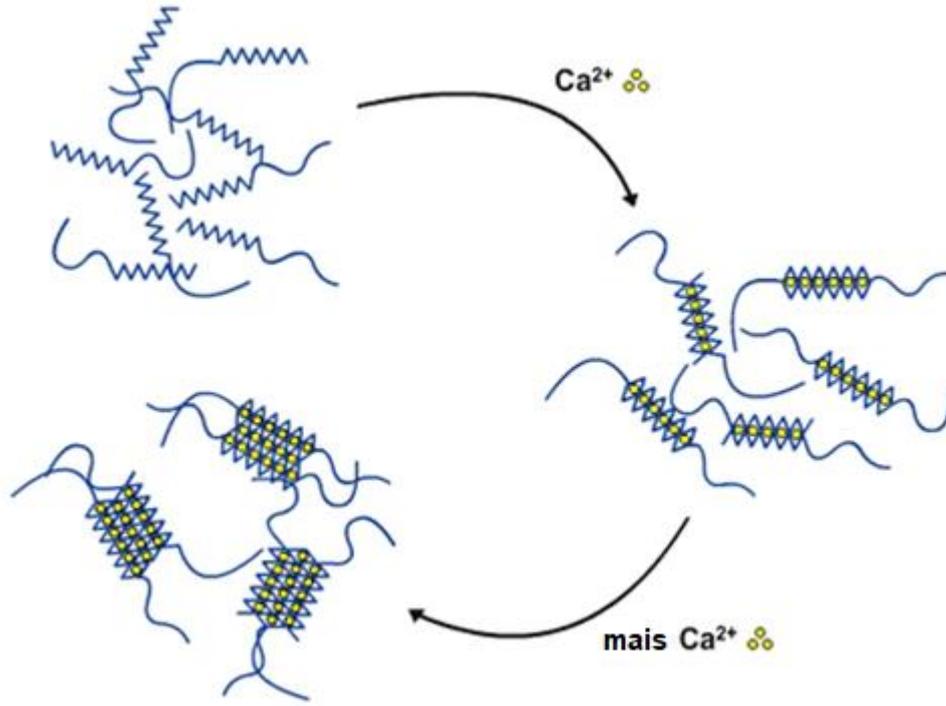


FIG. 2.3 Alginato sendo reticulado pela troca catiônica do Na²⁺ pelo Ca²⁺ (RSC, 2010)

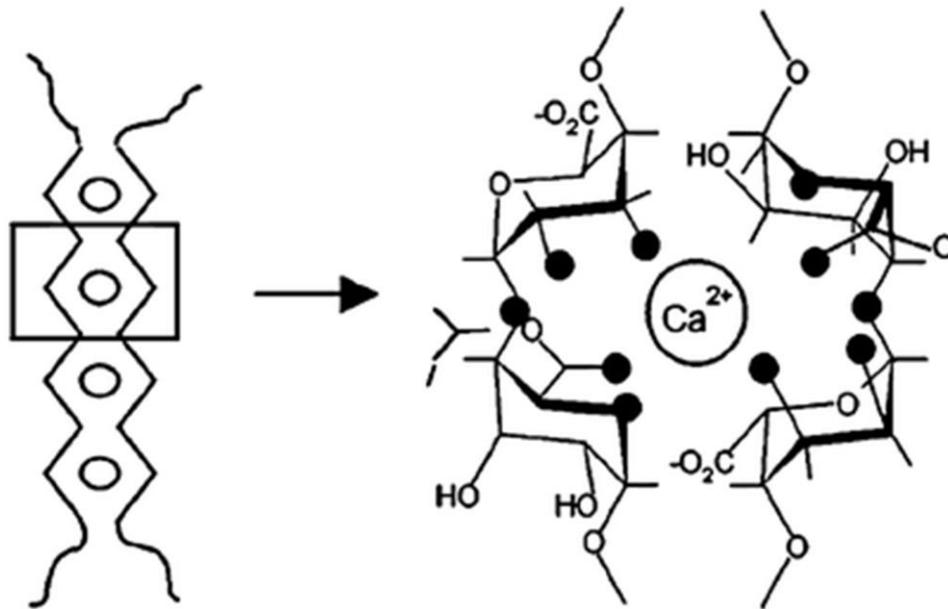


FIG. 2.4 Detalhamento da estrutura do modelo “egg-box” do alginato de cálcio (SHAO, F.*et. al.*, 2011).

2.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

2.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Dentre as técnicas de caracterização de materiais, talvez a microscopia eletrônica de transmissão (MET) seja a mais adequada quando se deseja obter imagens diretas de nanopartículas. No MET, uma amostra é irradiada com um feixe de elétrons de densidade de corrente uniforme, com a energia dos elétrons variando na faixa de 60~150 KeV. O feixe de elétrons pode ser gerado por fontes termo-iônicas, na qual há o aquecimento de um filamento de tungstênio ou hexaboreto de lantânio, ou por fontes de emissão de campo, onde há a geração de campos elétricos intensos em formas pontiagudas, como por exemplo, uma ponta de tungstênio com raio menor que 0,1 mm que, sob um potencial de 1 KeV, pode gerar um campo elétrico de 1010 V/m. Este campo é intenso o suficiente para diminuir significativamente a barreira de potencial e permitir assim o tunelamento dos elétrons para fora do tungstênio.

A estrutura básica de um microscópio eletrônico de transmissão consiste de uma fonte emissora de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que são utilizadas para controlar o feixe emitido. Estes elementos ficam contidos em uma coluna evacuada com uma pressão aproximada de 10⁻⁵ mmHg. A FIG. 2.5 ilustra a estrutura básica do MET.

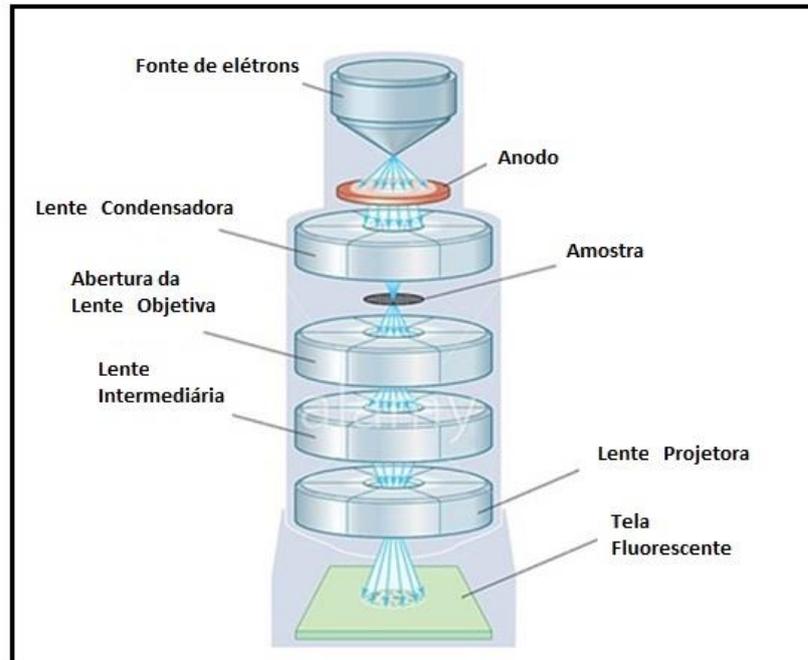


FIG. 2.5 Estrutura básica do MET (BRITANNICA, 2008 *adaptada*).

Os microscópios mais modernos possuem cinco ou seis lentes magnéticas, além de várias bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas localizadas ao longo do caminho do feixe eletrônico. Dentre estes componentes, destacam-se os três seguintes pela sua importância com respeito aos fenômenos de difração eletrônica: lente objetiva, abertura objetiva e abertura seletiva de difração. A função das lentes projetoras é apenas a produção de um feixe paralelo e intenso suficiente na incidência sobre a superfície da amostra (WILLIAMS, D.B., CARTER, C.B., 1996).

Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos da amostra. Em seguida, a lente objetiva é acionada, formando a primeira imagem desta distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após esse processo da lente objetiva, as lentes restantes servem apenas para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela ou na chapa fotográfica (WILLIAMS, D.B., CARTER, C.B., 1996).

A imagem observada é a projeção de uma determinada espessura do material, havendo diferença com relação ao observado numa superfície. Há uma projeção de linhas, áreas e

volumes de interesse, podendo ocorrer superposição (WILLIAMS, D.B., CARTER, C.B., 1996).

O contraste nas imagens formadas em MET tem diversas origens, tais como diferença de espessura, diferença de densidade ou de coeficiente de absorção de elétrons (contraste de massa), difração e campos elásticos de tensão. (WILLIAMS, D. B., CARTER, C. B., 1996).

2.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Com a finalidade de estudar a morfologia das microesferas, o MEV torna-se a ferramenta mais adequada devido a facilidade preparo de amostra em relação a grande quantidade de informações que podem ser extraídas da técnica. Ela torna-se especialmente importante devido à necessidade de se visualizar e entender como as nanoagulhas de HA estão precipitadas nas microesferas de alginato. A técnica tem como princípio fundamental a emissão de elétrons por uma fonte, que pode ser tanto por um filamento de tungstênio quanto por emissão de campo. O feixe de elétrons é acelerado à altas voltagens e atravessa um sistema de lentes eletromagnéticas e aberturas que produzem um feixe muito bem colimado. O controle de varredura do feixe de elétrons sobre a amostra é feito por um sistema de bobinas. A ação do feixe sobre a amostra estimula a mesma a emitir elétrons de diferentes origens, que são responsáveis por carregar diferentes informações sobre o material, e que são coletados por detectores posicionados próximos à amostra (REIMER, L., 1998).

Existem diferentes tipos de imagens que podem ser adquiridas na técnica de MEV. As duas mais comuns são as de elétrons secundários (SE) e de elétrons retroespalhados (BSE). A primeira é utilizada principalmente para se estudar a topografia da amostra e fornece uma imagem com alta resolução. A segunda, fornece uma imagem onde o contraste é gerado pela diferença de número atômico da amostra (ou de seus componentes, se a mesma for composta por diversos materiais). É em essência, um mapa de número atômico da superfície da amostra.

Uma técnica complementar à análise de elétrons é a espectroscopia por energia dispersiva (EDS), que permite identificar a composição do que é realizado na imagem do MEV. O EDS tem como princípio o fato de que o feixe de elétrons gera raios X na amostra, e que muitos destes têm energia característica dos elementos que os emitiram. Portanto, se é possível medir

a energia dos raios X, é possível conhecer os elementos presentes na amostra (REIMER, L., 1998).

2.2.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica (AFM) é uma dentre um conjunto de técnicas denominado “Microscopia de Varredura por Sonda” (em inglês *Scanning Probe Microscopy* – SPM), que utilizam uma sonda como método de interação com a amostra. Fazem parte deste conjunto também, dentre outras, a microscopia de tunelamento (*Scanning Tunneling Microscopy* – STM), a microscopia de força magnética (*Magnetic Force Microscopy* – MFM) e a microscopia de força eletrostática (*Electrostatic Force Microscopy* – EFM). Este trabalho concentra seus esforços nas medidas de AFM.

O microscópio de força atômica não utiliza lentes para focar a luz ou feixe de elétrons, como ocorre nos microscópios ópticos e eletrônicos. Ele tem como princípio de funcionamento a interação entre uma sonda, fixada a uma haste, e a superfície da amostra. A sonda realiza uma varredura da superfície da amostra e as forças de atração e repulsão entre os átomos da ponta da sonda e os da superfície da amostra fazem com que a haste que sustenta a sonda seja defletida. Essas deflexões são captadas por um computador dedicado, através de um laser que incide sobre a haste e é refletido em um fotodiodo. Através desses sinais, o computador constrói a imagem do mapeamento da superfície analisada da amostra. O esquema básico de funcionamento do microscópio de força atômica é mostrado na FIG. 2.6.

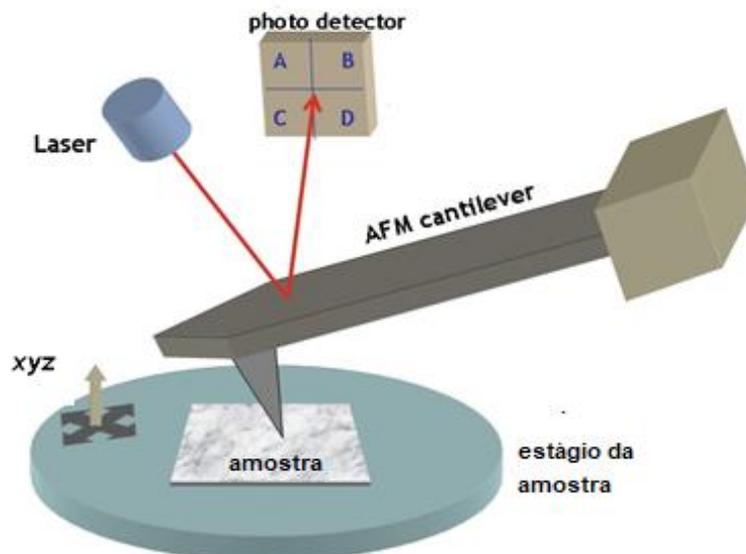


FIG. 2.6 Esquema simplificado do funcionamento do AFM (*Opensource*)

Devido à alta precisão da técnica, é possível obter um mapeamento topográfico em escala nanométrica e, sob determinadas condições, é possível realizar esse mapeamento em escala atômica ($\sim 1 \text{ \AA}$). O alto poder de resolução do AFM permite distinguir degraus de até um único átomo de espessura, tornando a técnica extremamente importante no estudo de materiais como grafeno e nanotubos de carbono (CAROZO, V. et al, 2013).

Entretanto, a técnica de AFM não se restringe apenas ao mapeamento da superfície: pode-se, com a utilização de sondas adequadas, extrair diversas propriedades do material, como por exemplo, adesão, dureza e curvas de força, em escala micro/nanométrica. Em virtude disso, o AFM torna-se importante para este trabalho, pois permite medir e mapear propriedades das esferas de alginato de cálcio. A FIG. 2.7 retrata os principais tipos de sondas utilizadas.

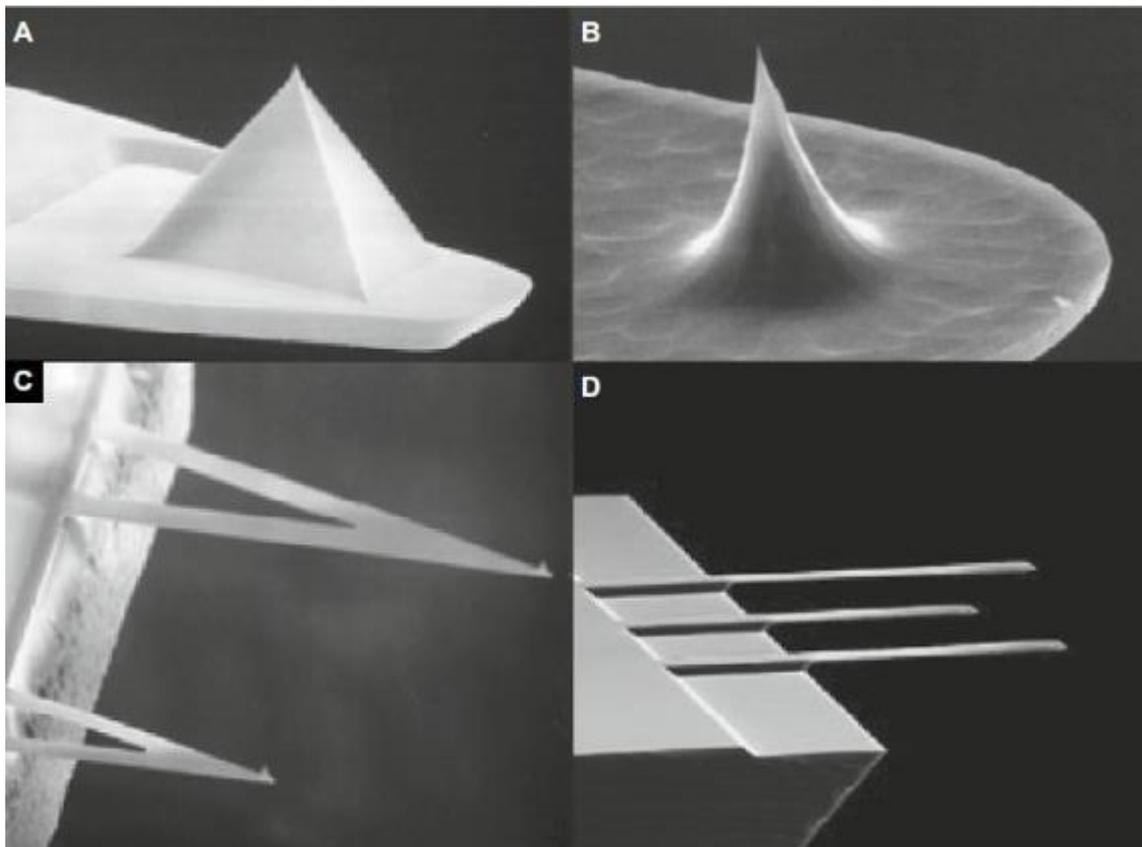


FIG. 2.7 Principais *cantilevers* e pontas utilizadas em AFM. (a) Sonda piramidal; (b) Sonda de alta relação de aspecto cônico para imagens de alta resolução; (c) Dois cantilevers em forma de V para o modo de imagem de contato; (d) *Chip* com série de hastes de diferentes comprimentos. Neste caso, as hastes são *tipless* (sem ponta) para permitir a montagem das partículas de interesse para medição de força (RICHARD, W., 2009).

O AFM também permite a funcionalização da sonda de diferentes maneiras, como por exemplo, fixando na haste (*cantilever*) o material que se deseja estudar a interação com as esferas, e realizando curvas de força para se verificar como as esferas irão se comportar em relação a essa sonda funcionalizada. A obtenção de curvas de força é explicada na FIG. 2.8.

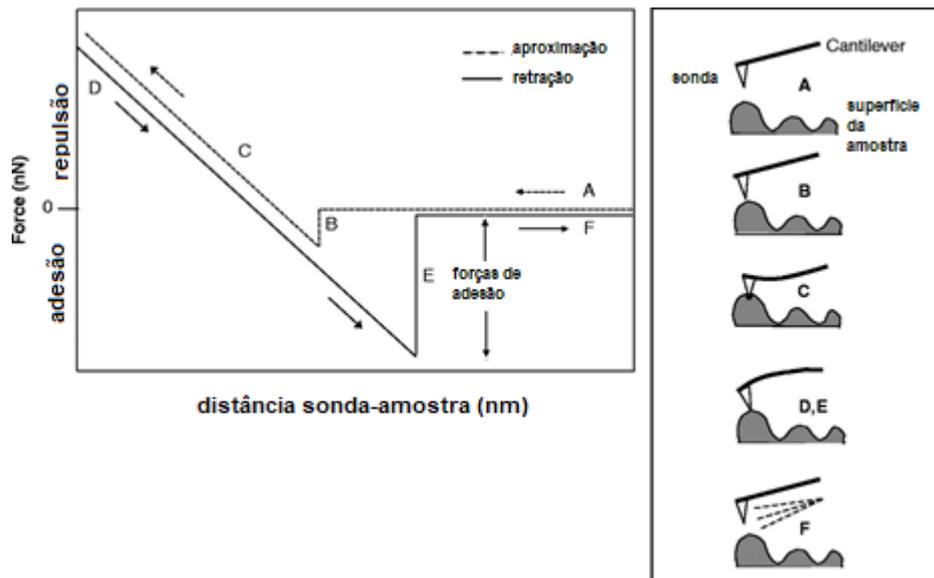


FIG. 2.8 Modelo para a obtenção de curvas de força no AFM, utilizadas para obtenção de propriedades mecânicas das amostras (SHAHIN, V., 2005)

O AFM possui três modos básicos de operação: modo contato, modo não-contato e modo de contato intermitente (*tapping mode*). Cada um destes modos determina o tipo de forças que estarão envolvidas na análise, gerando respostas diferentes da amostra e permitindo a medida de diferentes propriedades do material. Vários tipos de forças contribuem para a deflexão do *cantilever*. A FIG.2.9 ilustra, de maneira simplificada, as forças envolvidas, de acordo com a distância que separa a sonda da amostra.

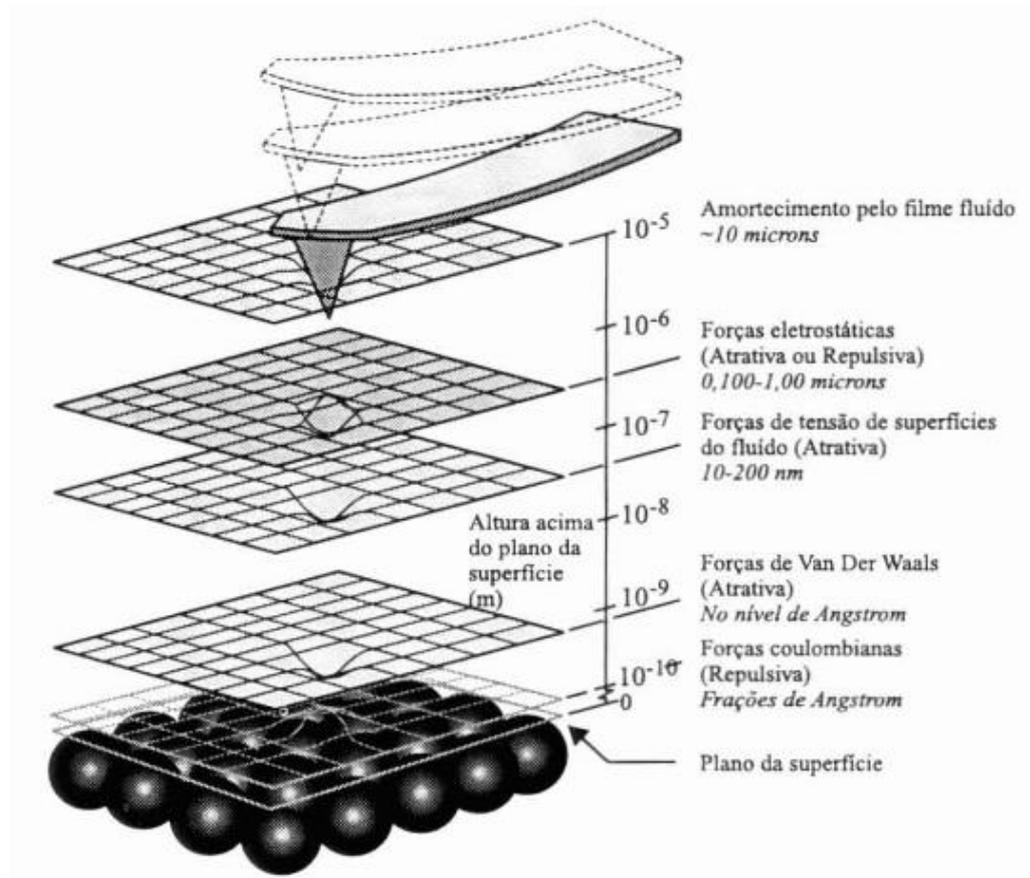


FIG. 2.9 Relação de forças que atuam entre a sonda e a amostra em função da distância que as separa (DIGITAL INSTRUMENTS).

Outra forma de avaliar esta interação é a através da curva de força em função da distância (ISRAELACHIVILI, J., 1992). Para dois corpos eletricamente neutros e não magnéticos por uma ou várias dezenas de nanômetros, pode-se dizer que as forças de van der Waals normalmente dominam a interação entre eles (WIESENDANGER, R., 1994). Estas forças são consideradas atrativas. Diminuindo a distância de separação entre os dois corpos, para alguns Angstroms, as forças que irão dominar serão as forças repulsivas. Isto se deve principalmente a componente de força coulombiana. Desta forma, a distância agulha-amostra determina o modo de operação do AFM. A curva de força é retratada na FIG. 2.10.

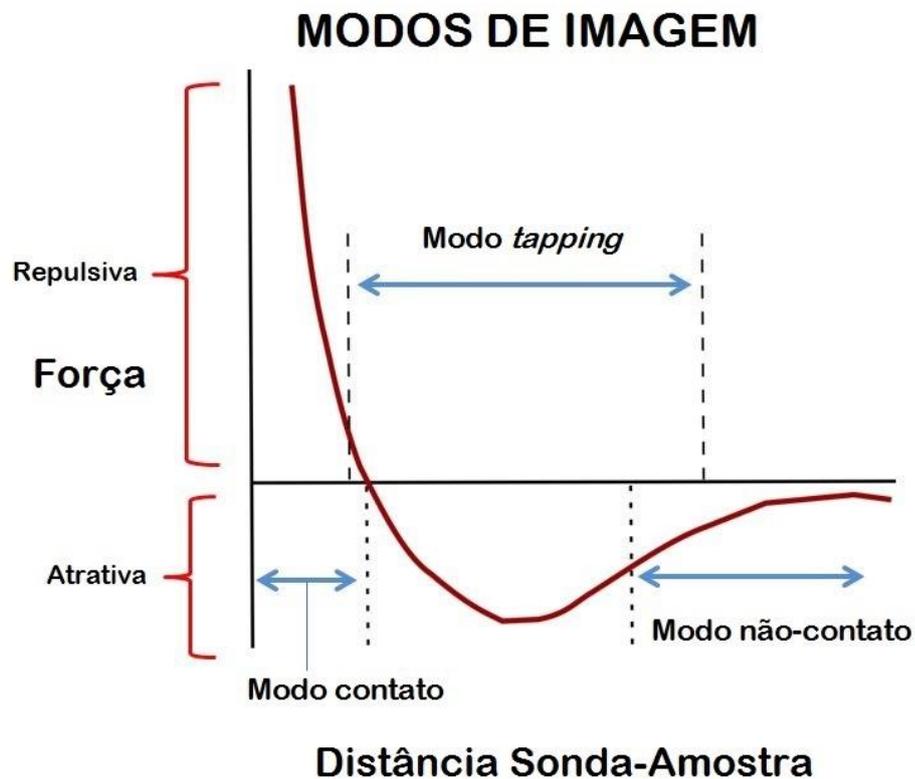


FIG. 2.10 Curva de força-distância para a interação sonda-amostra (*Figura de elaboração própria*).

2.2.3.1 MODOS DE OPERAÇÃO DO AFM

a) MODO CONTATO

O modo contato, ou modo de detecção dc, é o modo mais básico de operação do AFM. Neste caso, a sonda varre a amostra mantendo a menor distância possível, na faixa das distâncias interatômicas. As forças envolvidas são forças de repulsão, sendo necessário um cuidado especial para que a sonda não danifique a amostra. Através deste modo de operação é possível medir, quantitativamente, propriedades mecânicas em escala nanométrica, e também obter imagens em resolução atômica. A FIG.2.11 retrata a estrutura de rede de uma superfície de ouro.

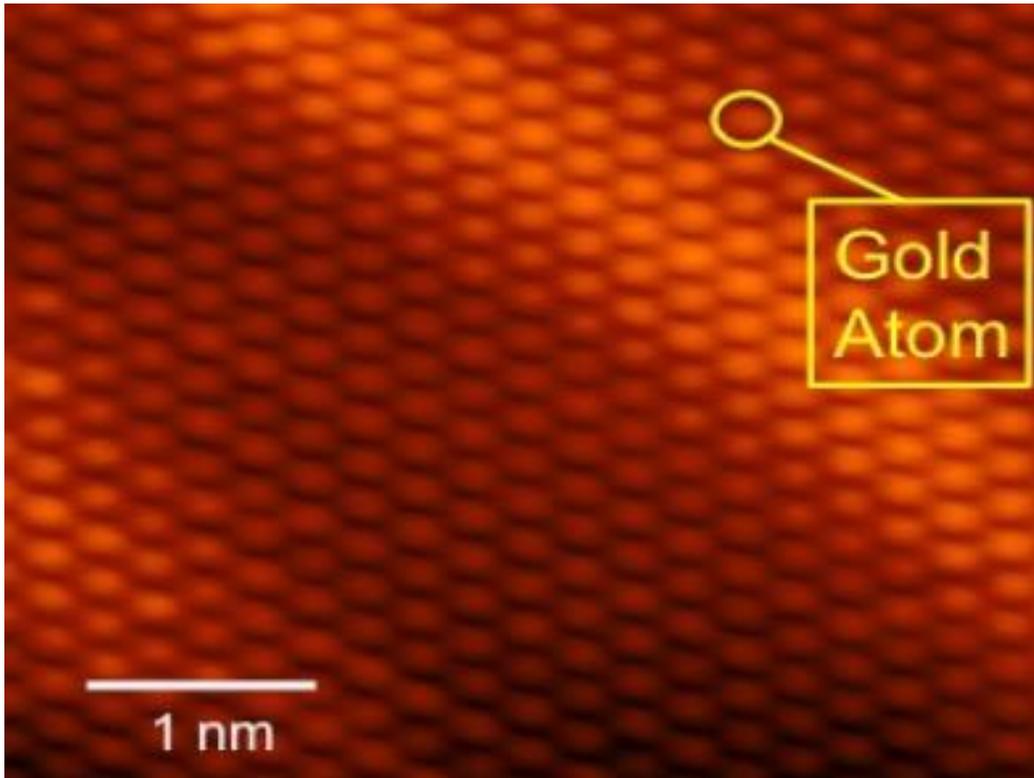


FIG. 2.11 Imagem de resolução atômica de uma superfície de ouro (VIRGINIATECH, Physics Department Showcase)

b) MODO NÃO-CONTATO

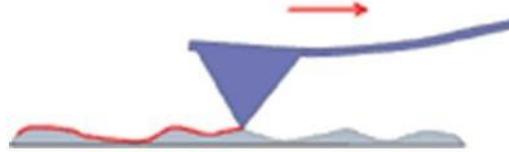
No modo não-contato, a sonda não entra em contato com a amostra. A técnica explora outros níveis de interação de força e, neste caso, somente forças de longo alcance (van der Waals, eletrostática, e magnética) interagirão.

c) MODO DE CONTATO INTERMITENTE (*TAPPING*)

O princípio de funcionamento do modo *tapping* é similar ao modo não-contato: o cantilever vibra, através de um sistema piezoelétrico, próximo a sua frequência de ressonância. Mudanças na frequência de ressonância ocorrem devido às forças de interação sonda-amostra. Neste modo de operação, a sonda toque levemente a amostra, num movimento de “tatear” a sua superfície. Na FIG.2.12 é retratado, de maneira simplificada, a interação sonda amostra nos três modos básicos de operação do AFM.

MODOS DE OPERAÇÃO

1. Modo Contato



2. Modo não-contato



3. Modo *Tapping*

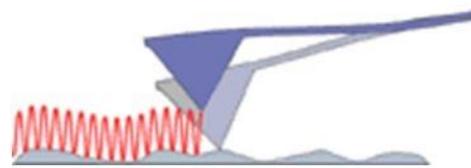


FIG. 2.12 Principais modos de operação do AFM: Contato, não-contato e *tapping*
(*Opensource, adaptado pelo autor*)

O modo *tapping* permite obter imagens topográficas com boa resolução e também permite a construção de um mapa de interações da sonda-amostra. Em outras palavras, é construída uma imagem onde é possível mapear diferentes forças agindo sobre a amostra. Existem três canais principais de imagens gerados pelo modo *tapping*: topografia, amplitude e fase. A imagem topográfica é a mais comum de ser apresentada e fornece com muita precisão e de maneira quantitativa, uma medida da topografia do material. O canal de amplitude contém a informação da deflexão da sonda, fornecendo uma melhor e mais detalhada imagem topografia da amostra, porém de maneira qualitativa (a escala em Z neste canal é completamente sem sentido em termos de estrutura da amostra). Por fim, o canal de fase mostra o quanto a fase de oscilação do cantilever se altera devido às interações com a superfície da amostra. O sentido físico deste sinal é complicado de interpretar, devido ao grande número de interações sonda-amostra. Porém, adição a imagem topográfica, a imagem de fase pode

fornecer informações sobre a dureza do material, bem como sua rigidez, adesão e até mesmo estrutura química da amostra.

2.2.3.2 *PEAKFORCE® TAPPING*

Neste trabalho foi utilizado um modo de varredura exclusivo desenvolvido pela empresa Bruker. Este modo, denominado *peakforce® tapping*, permite controlar com precisão a interação sonda-amostra, possibilitando imagens das menores forças de interação. A sensibilidade de forças detectadas pelo *peakforce®* chega a escala de pico-newton (pN), possibilitando imagens de alta resolução e mapeamento direto de propriedades mecânicas como rigidez, adesão, em escala nanométrica.

No modo *peakforce® tapping*, de modo similar ao modo *tapping*, a amostra e a sonda interagem de forma intermitente. Entretanto, neste modo o scanner piezoelétrico é agitado numa frequência entre 1 e 10 kHz de modo que durante todo o tempo, informações sobre adesão, módulo de Young, curvas de força, além da própria topografia podem ser adquiridas.

2.2.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

É um método de caracterização utilizado para análises qualitativas e nas determinações quantitativas de traços de elementos químicos em um material. É utilizada desde a década de 40 por cientistas russos, mas só a partir da década de 50 foi popularizada, devido a comercialização dos primeiros espectrômetros dispersivos.

A FTIR tem como princípio físico fundamental a diferença no modo de vibração de diferentes moléculas: átomos que formam as moléculas de um determinado material têm frequências de vibração muito bem estabelecidas. Essas frequências estão relacionadas aos níveis de energia vibracionais da molécula e podem variar de acordo com a estrutura, a

composição e o modo de vibração do material. Para se mapear essas frequências utiliza-se ondas eletromagnéticas na região do infravermelho. (CHIA, S. RICKETTS, 1984)

É importante ressaltar que nem todo material é capaz de produzir um espectro infravermelho. Para reagir com a radiação na região do infravermelho, a molécula deve possuir um momento dipolar permanente e deve vibra sobre uma ligação química (mudando o comprimento ou ângulo de ligação, ou mesmo rotacionar sobre um eixo perpendicular à ligação.

O FTIR é normalmente baseado no arranjo experimental do interferômetro de Michelson. O sinal adquirido pelo espectrômetro recebe o nome de interferograma. Após o interferograma ser coletado, ele precisa ser traduzido na forma de um espectro (seja de emissão, absorção, transmissão, etc). Esse processo de conversão é realizado através da aplicação de um algoritmo da Transformada de Fourier. Este método foi criado por J.W. Cooley e J.W. Turkey em 1965.

A análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para verificar a eficácia do processo de obtenção dos pós de fosfatos de cálcio identificando suas bandas características. A análise dos espectros na região do infravermelho é uma ferramenta importante para uma avaliação qualitativa da presença de grupos inorgânicos (fosfatos). A TAB. 2 traz um resumo das absorções observadas no espectro para compostos inorgânicos.

TAB. 2.2 Bandas de absorção na região do infrevermelho.

Região de Absorção (cm ⁻¹)	Designação
3580	ν_5 estiramento OH de hidroxila
3400	ν_5 estiramento OH de H ₂ O
1645	deformação H-O-H de H ₂ O
1470-1420	ν_1 estiramento simétrico de CO ₃ ²⁻
1128	ν_6 estiramento PO ₃ ⁻ em HPO ₄ ²⁻
1100, 1093, 1047	ν_3 estiramento assimétrico de PO ₄ ³⁻ ou ν_6 estiramento PO ₃ em HPO ₄ ²⁻
965	ν_1 estiramento simétrico PO ₄ ³⁻
918	ν_3 estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻
884	ν_2 estiramento antissimétrico de CO ₃ ²⁻
650	vibrações OH de hidroxila
616, 581	ν_4 deformação O-P-O em PO ₄ ³⁻ ou ν_4 deformação O-P-O em HPO ₄ ²⁻
535	ν_7 estiramento P-OH em HPO ₄ ²⁻

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

3.1.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PRECURSORA

Reagentes: Hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) – 0,5 M; Ácido fosfórico (H_3PO_4) – 0,3 M; ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)– 1,0 M.

Para 750ml de solução:

Inicialmente são preparadas três soluções: uma solução 0,5 M Ca(OH)_2 , uma solução 0,3 M H_3PO_4 e uma solução 0,1 M $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$. As soluções são deixadas sob agitação magnética durante 1h. A solução ácida é então adicionada à solução de Ca(OH)_2 via gotejamento lento. A solução de ácido fosfórico é então gotejada lentamente à solução de $\text{Ca(OH)}_2 + \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$. A solução final, denominada solução precursora, é mantida sob agitação mecânica por 24h. Essa solução possui pH em torno de 3,7.

3.1.2 PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE ALGINATO DE SÓDIO

A solução utiliza concentração de 0,05 M. Essa concentração ideal foi obtida após diversos testes com outras concentrações. Foram preparados 20 ml de solução utilizando água ultrapura. O alginato foi misturado à água com auxílio de um agitador magnético e aquecimento médio de 40 °C.

3.1.3 PREPARO DE SOLUÇÃO DE KOH

A solução de KOH foi preparada utilizando-se a concentração de 1,0 M. Para 250 ml de água ultrapura foram utilizados 14,02 g de KOH na forma de pastilhas.

3.1.4 PRODUÇÃO DE ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

A rota comum para o encapsulamento de hidroxiapatita (HA) em matriz de alginato de cálcio consiste em produzir esferas de alginato de cálcio gotejando-se alginato de sódio em solução de CaCl_2 + HA nanoestruturada para que, durante a reticulação do polímero, ele encapsule as nanopartículas de hidroxiapatita (KIM, H. L. et. al., 2015).

Neste trabalho, uma nova rota de síntese de HA, no interior de microesferas de alginato de cálcio contendo solução precursora, foi proposta. Nessa rota, a troca catiônica do alginato ocorre com íons Ca^{2+} da própria solução precursora, que troca seus cátions Ca^{2+} pelos cátion Na^+ do alginato de sódio, obtendo-se esferas de alginato de cálcio e solução precursora. Como mencionado anteriormente, busca-se aqui uma maior eficiência do processo e também a eliminação de uma das etapas de encapsulamento, uma vez que a hidroxiapatita é sintetizada dentro da esfera.

3.1.5 PRECIPITAÇÃO DE HIDROXIAPATITA

A precipitação de hidroxiapatita no interior das microesferas foi obtida através da imersão das microesferas em uma solução 1,0 M KOH. Após a imersão, as esferas foram lavadas em água ultrapura para remoção do excesso de KOH. Ao final do processo, obtiveram-se microesferas de alginato de cálcio com hidroxiapatita nanoestruturada em seu interior. A FIG. 3.1 ilustra o processo.

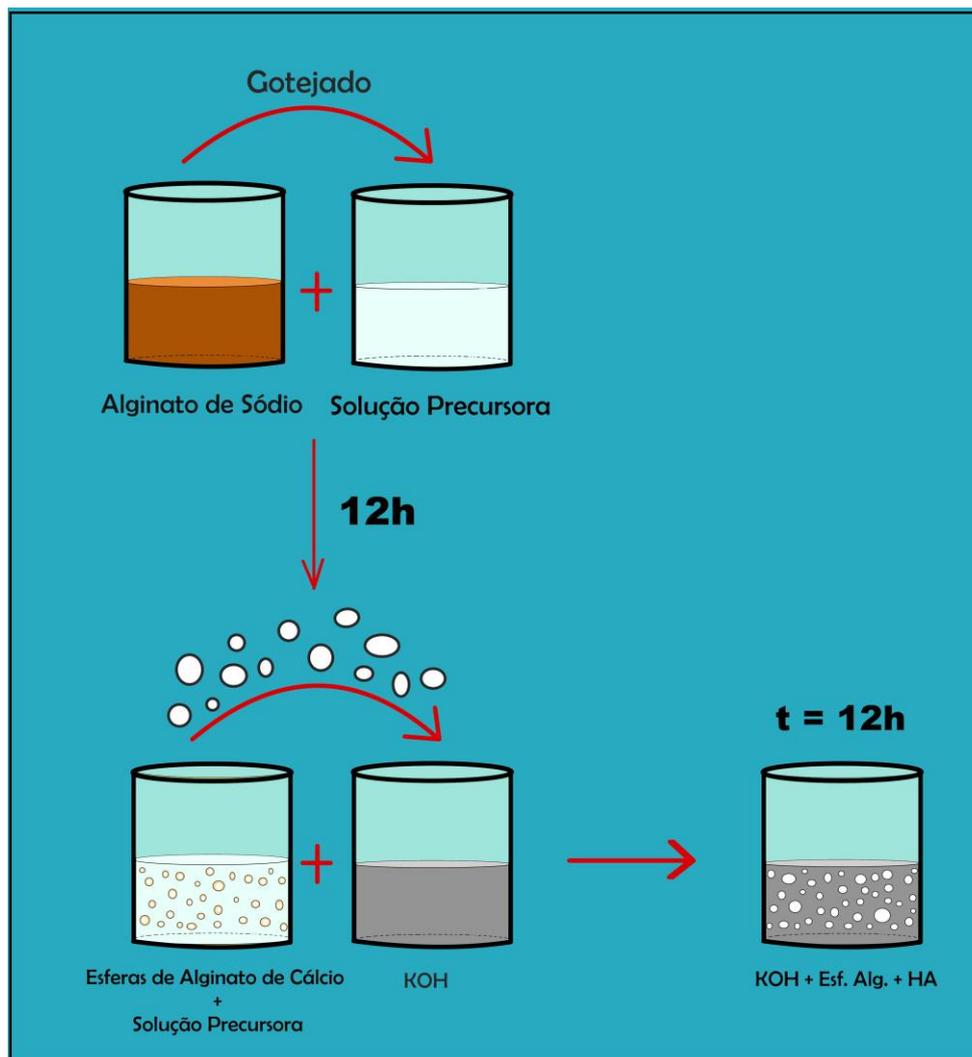


FIG. 3.1 Nova rota de encapsulamento de HA em matriz de alginato de cálcio (*figura elaboração própria*).

3.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES

3.2.1 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As análises de microscopia de força atômica foram realizadas em um microscópio de força atômica da marca Bruker, modelo Bioscope Catalyst, no modo Peakforce® com sondas de

constante de mola 3 N/m. A preparação das amostras para análise em AFM consistiu em levar as esferas de alginato de cálcio com solução precursora encapsulada para imersão em KOH e, posteriormente, lavadas em água ultrapura. Foram preparadas duas amostras para análise: com 4 e 12h de tempo de absorção de solução precursora seguido de imersão em KOH por 4 e 12h. Após a lavagem em água ultrapura, as amostras foram tratadas em ultrassom de ponteira, com 60% de potência, por 15 min, para que as microesferas de alginato fossem separadas em nanoesferas. É necessário que, durante o processo por ultrassom, a amostra permaneça em banho de gelo para evitar que o aquecimento a comprometa. Feito isso, a solução foi gotejada em substrato de mica e levada ao microscópio de força atômica.

3.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise da morfologia das amostras foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo (Field Emission Gun, MEV-FEG, da marca FEI, modelos: QUANTA FEG 450 e 250) A preparação das amostras seguiu o método descrito na seção anterior. Foram preparadas duas amostras: com 4 e 12h de imersão em KOH.

3.2.3 CORTE CRIOGÊNICO

O corte criogênico das microesferas de alginato de cálcio foi realizado no crio ultramicrotomo, da empresa Leica. A fim de garantir que a análise de MEV fosse feita na seção transversal das esferas de alginato de cálcio, foi necessário realizar um corte criogênico nas mesmas. Para tanto, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido à -87°C e cortadas com uma lâmina de diamante. O corte foi realizado a 2/3 do diâmetro das esferas.

3.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As análises de MET foram realizadas no microscópio Tecnai Spirit Biotwin, 120kV. A preparação de amostras para MET foi similar à preparação das amostras de AFM, exceto que a solução resultante foi gotejada em uma grade recoberta com *Formvar*®, como mostra a FIG. 3.2.

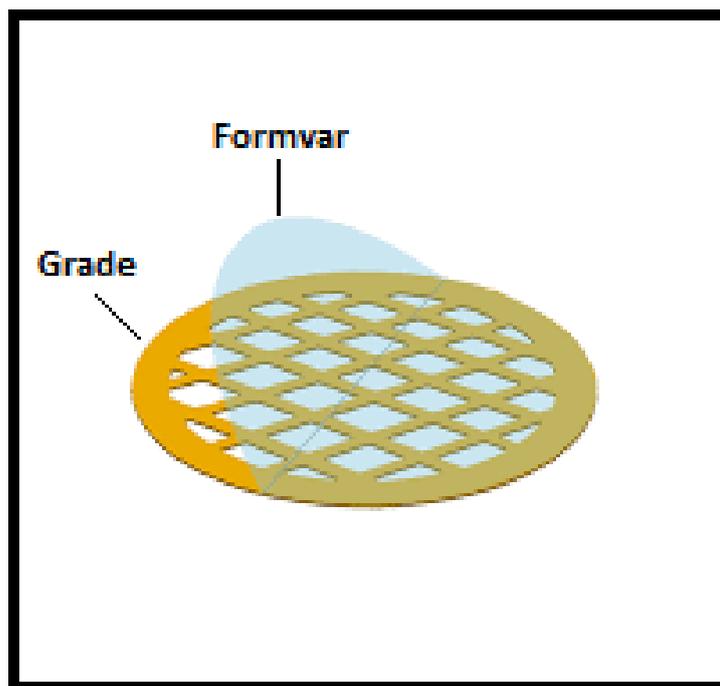


FIG. 3.2 Película de Formvar em grade de amostra para MET (*Agar Scientific Ltd.*, 2016)

3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier foi realizada no equipamento FT-IR Prestige-21, da empresa Shimadzu. Os espectros foram obtidos na faixa de 3500 a 500 cm^{-1} e 128 varreduras. As amostras utilizadas para análise em FTIR foram as mesmas utilizadas nas análises de AFM. Para garantir que as regiões de coleta dos espectros fossem as desejadas, foi utilizado o microscópio óptico acoplado ao equipamento, com lente de 50x. Foram analisadas quatro regiões diferentes da amostra, que foi a mesma utilizada em AFM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Das amostras analisadas, o conjunto que ficou 4h em imersão em KOH não apresentou precipitação visível de hidroxiapatita. Os resultados mostrados a seguir são referentes às amostras que ficaram 12 horas em imersão em KOH. A FIG 4.1 mostra a parte da seção transversal da microesfera de alginato, na qual foi realizada a análise, sob diferentes aumentos. Percebe-se que a esfera de alginato é constituída por aglomerados de esferas menores, que por sua vez são constituídas de aglomerados de esferas menores ainda.

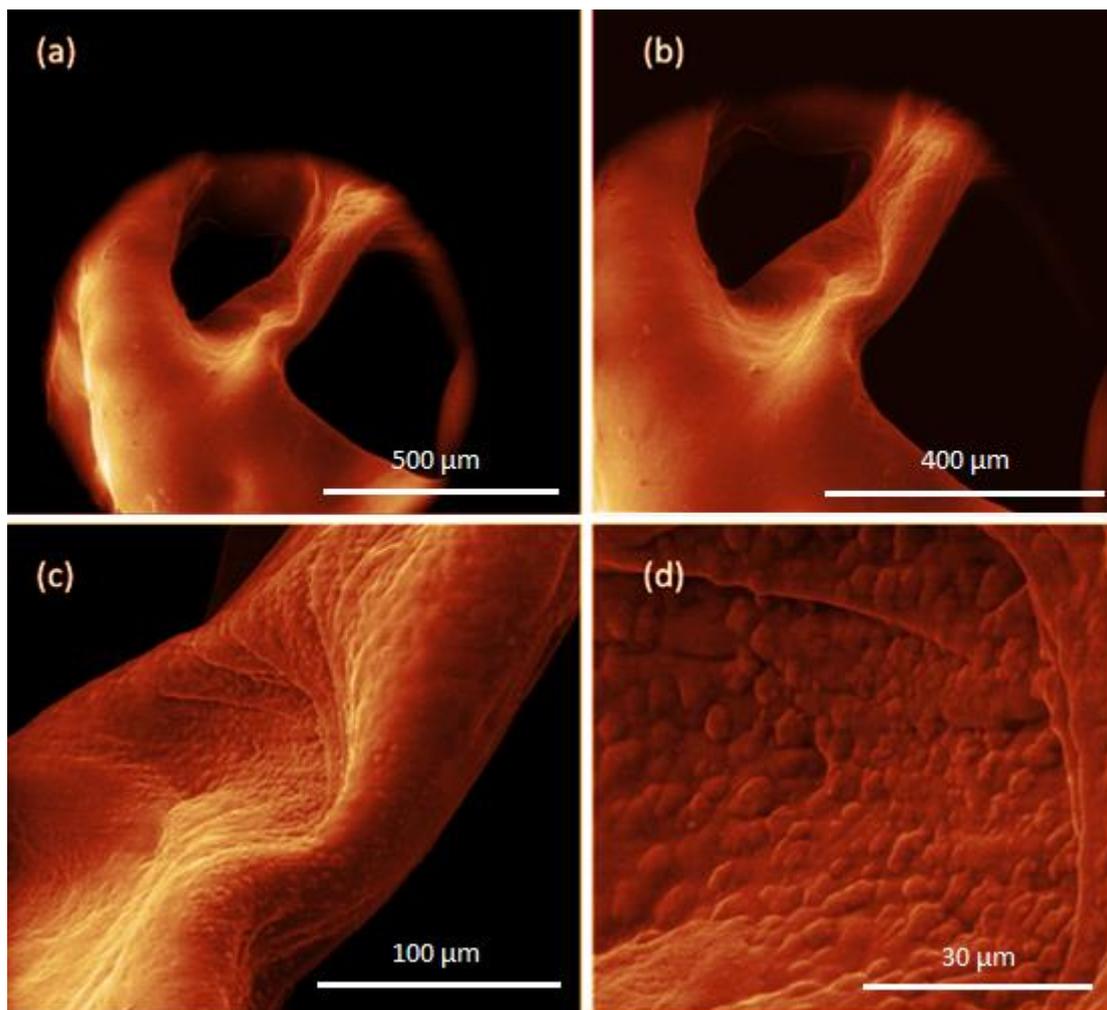


FIG. 4.1 Micrografia (MEV) da seção transversal da microesfera onde foram realizadas as análises de MEV após o corte criogênico, sob diferentes aumentos. (a) 245x, (b) 392x, (c) 1178x e (d) 4530x.

A FIG. 4.2 revela esses aglomerados e permite a medida de esferas com diâmetros variando de algumas centenas de nanômetros até $\sim 10\mu\text{m}$, como indicam as setas. A estrutura observada e os tamanhos medidos são coerentes com os encontrados por Finotelli, P. *et al*, 2010.

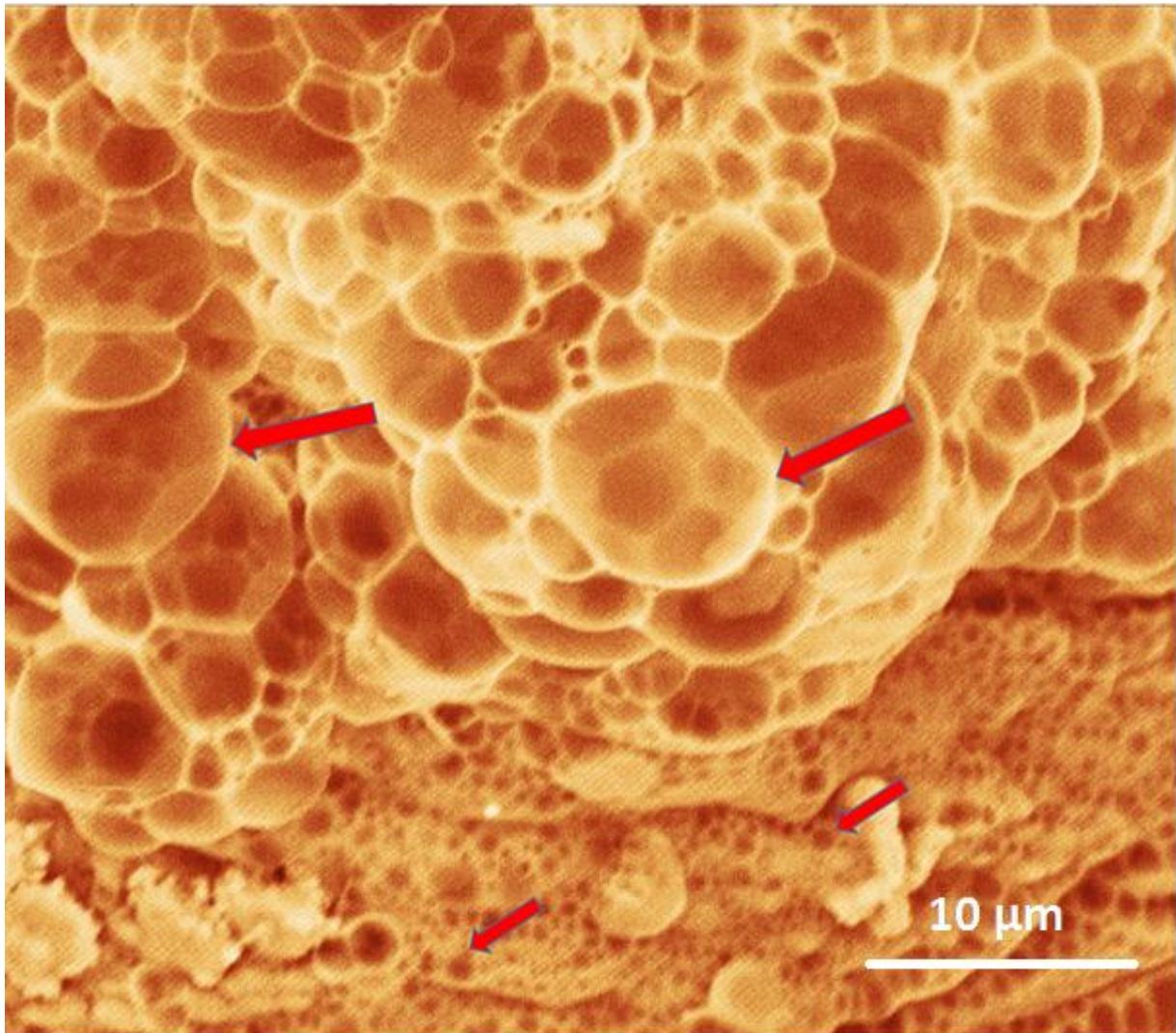


FIG. 4.2 Micrografia (MEV) de aglomerados de esferas de alginato no interior da microesfera, sob aumento de 6500x.

A partir de uma inversão de contrastes na mesma micrografia, as esferas são reveladas de forma muito mais perceptível nos aglomerados (FIG. 4.3). O esquema de cor utilizado é específico para auxiliar e intensificar a ideia de profundidade nas micrografias, melhorando a compreensão topográfica da amostra.

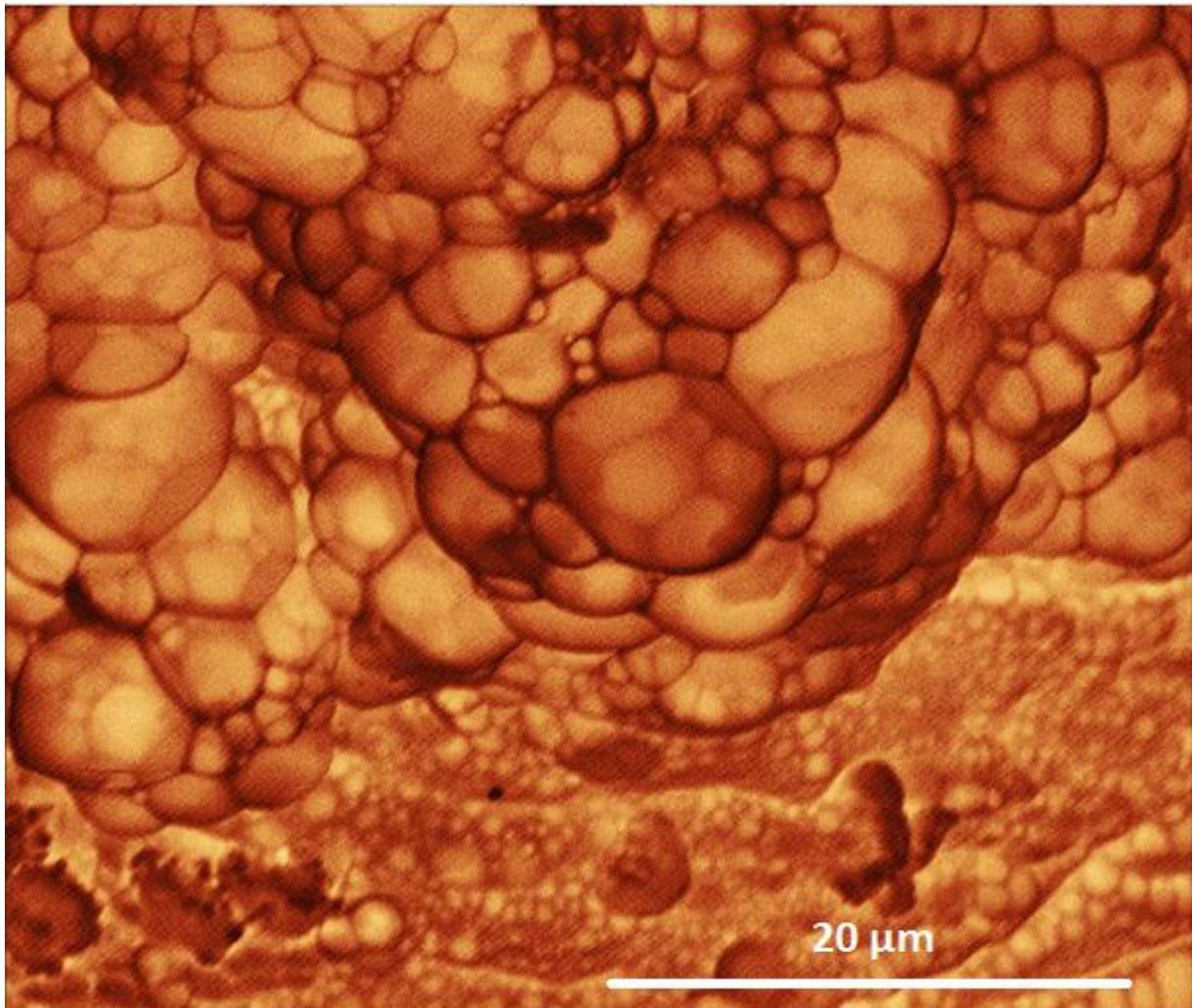


FIG. 4.3 Inversão de contraste da FIG. 4.2

Após varreduras na seção transversal da esfera, foi possível encontrar regiões com precipitados de hidroxiapatita na forma de agulhas (FIG. 4.4 a FIG. 4.7). As agulhas apresentaram comprimento médio de 1,2 μm (FIG. 4.8). Devido ao tempo em imersão das esferas na solução de KOH ser de 12h (metade do tempo utilizado para precipitação de HA nanoestruturada), é possível que estas agulhas estejam no início do processo de crescimento e estruturação, uma vez que é necessário que a esfera absorva o KOH para que este entre em contato com a solução precursora em seu interior. Em outras regiões da amostra também foi possível observar os precipitados de hidroxiapatita. A quantidade de precipitados pode estar relacionada com a quantidade de solução precursora absorvida durante a reticulação do alginato. As esferas apresentaram um limite máximo de imersão em solução precursora de aproximadamente 12h, por conta da acidez da solução. Com tempo superior a este, a estrutura

egg-box começa a se desfazer e torna impossível sua imersão em KOH e posterior análise. As FIG. 4.8-FIG. 4.9 mostram com detalhes a morfologia da hidroxiapatita nanoestruturada na forma de agulhas, sob diferentes aumentos.

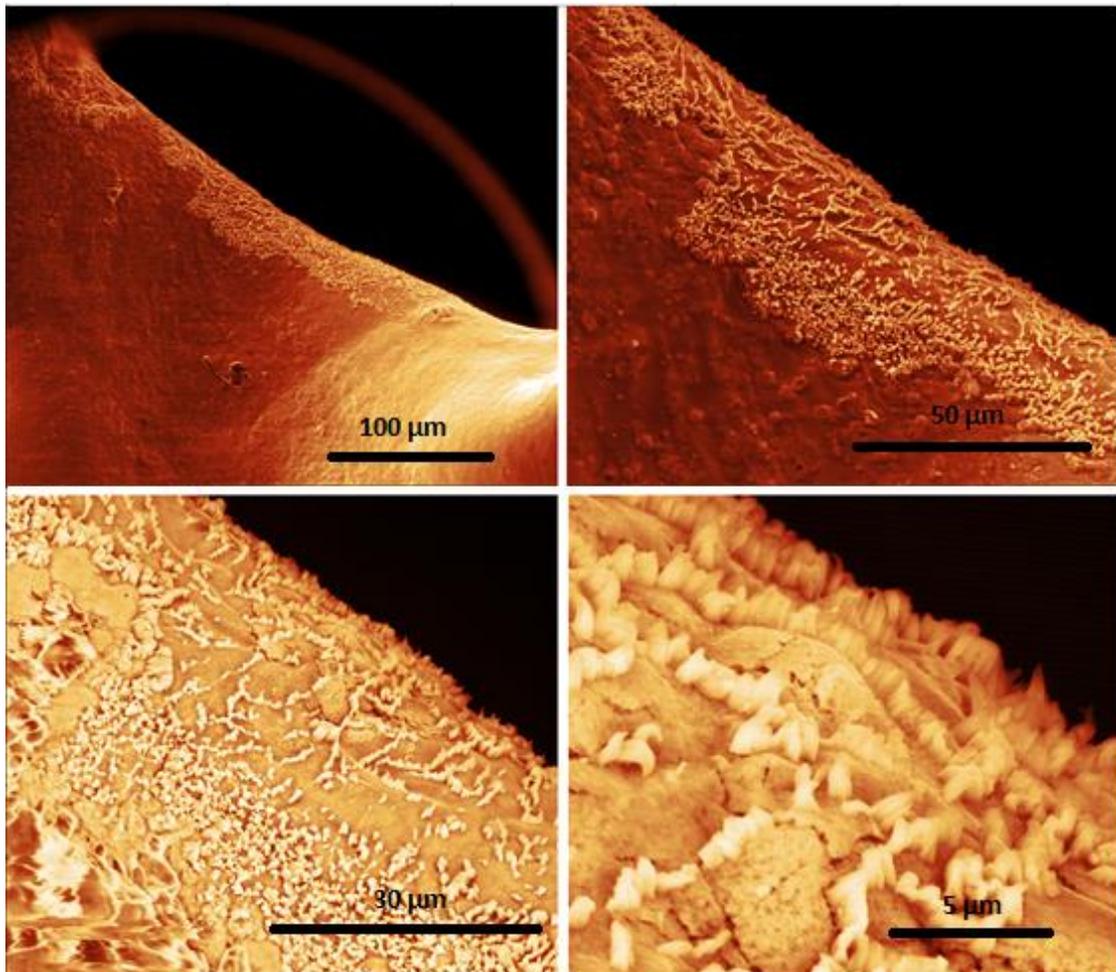


FIG. 4.4 Micrografia (MEV) da região da esfera com precipitados de HA nanoestruturada, sob diferentes aumentos: (a) 859x, (b) 2479x, (c) 4872x, e (d) 17500x.

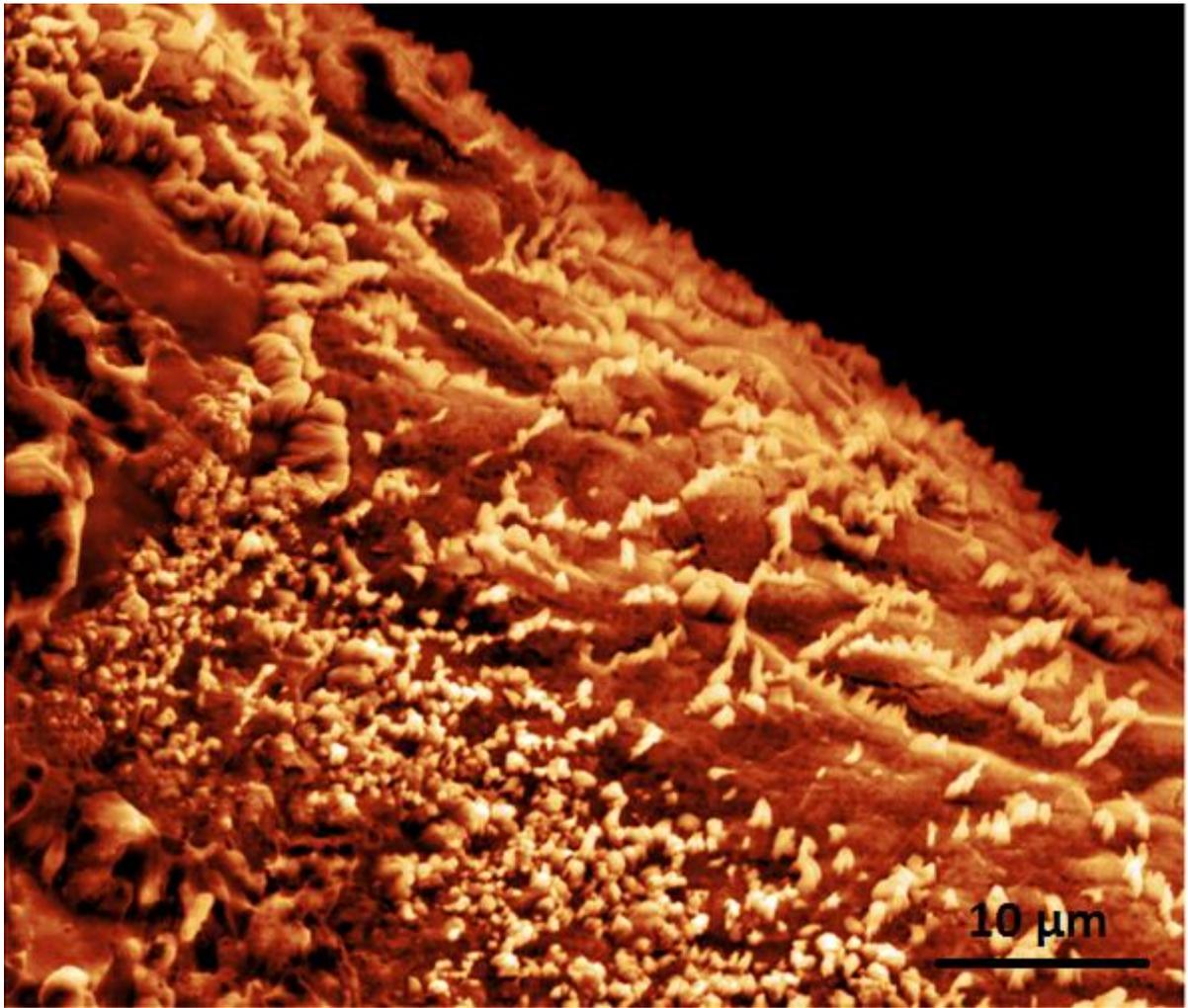


FIG. 4.5 Micrografia (MEV) de HA nanoestruturada sob aumento de 5471x

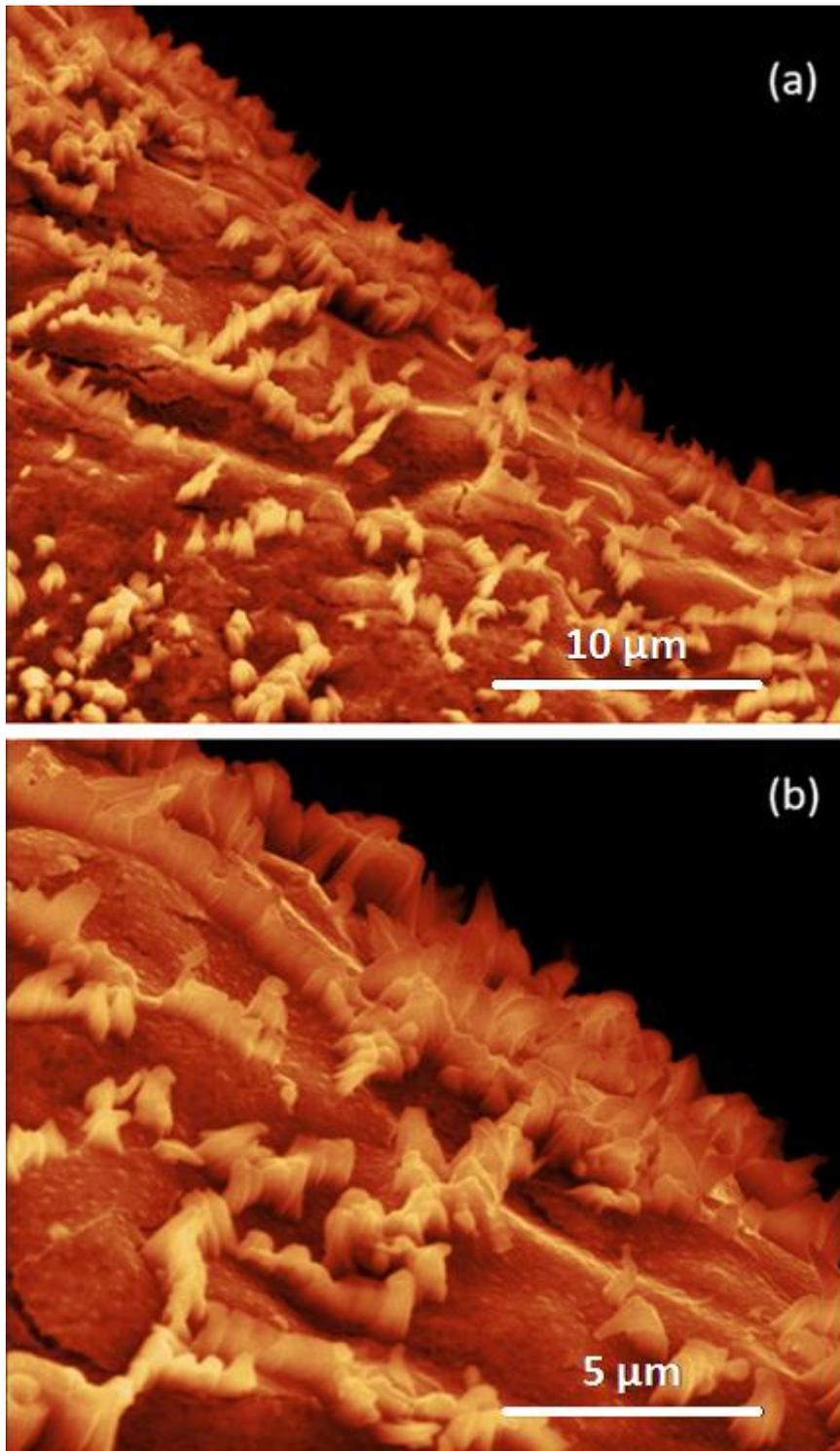


FIG. 4.6 Micrografia (MEV) de agulhas de hidroxiapatita, sob aumentos de (a) 9233x e (b) 18000x.

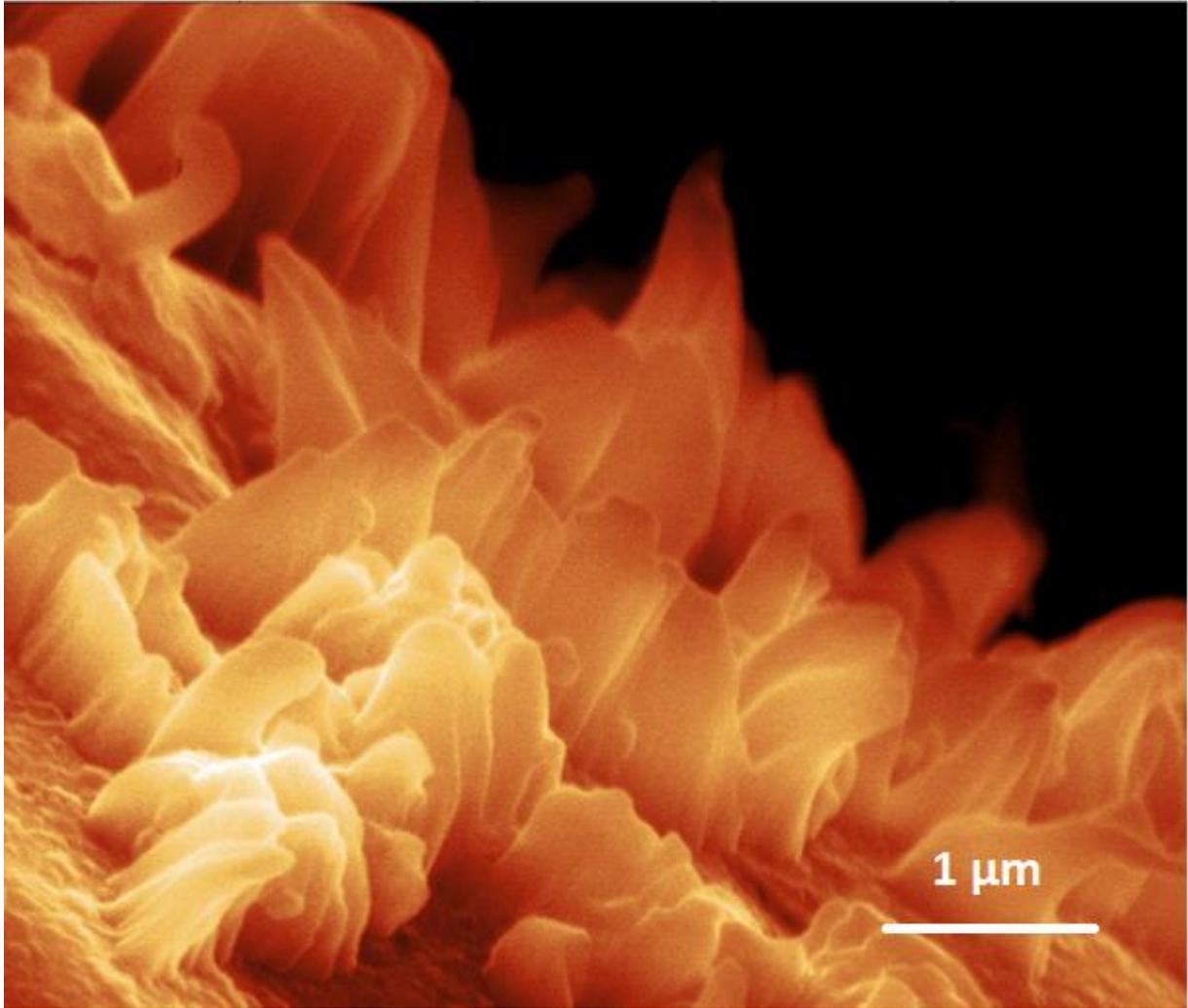


FIG. 4.7 Micrografia (MEV) de agulhas de hidroxiapatita sob aumento de 50000x.

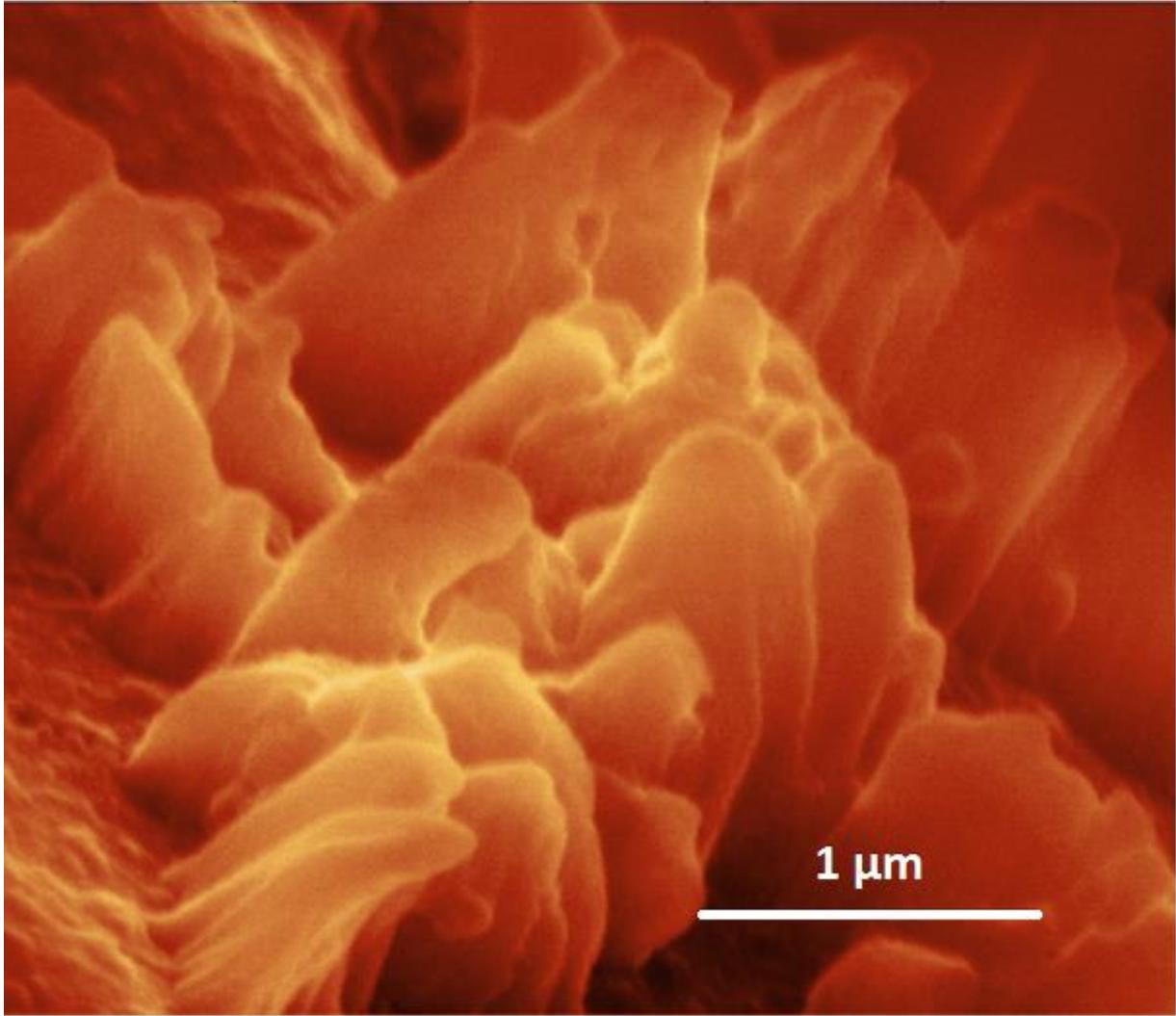


FIG. 4.8 Micrografia (MEV) de agulhas de HA sob aumento de 85000x. As agulhas apresentaram comprimento médio de 1.2 µm.

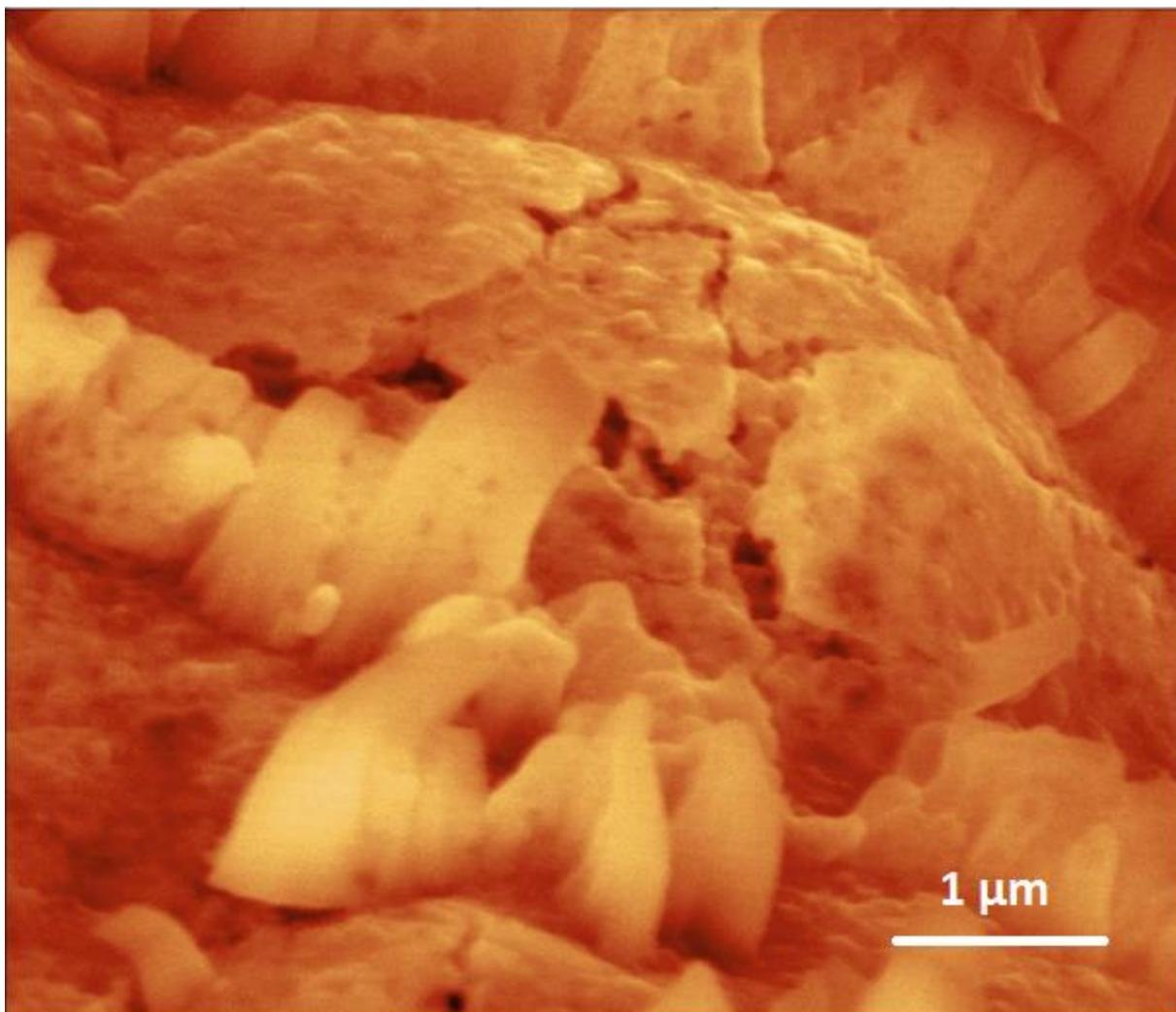


FIG. 4.9 Micrografia (MEV) de detalhes da morfologia da região onde a hidroxiapatita precipitou no interior da esfera.

A FIG. 4.10 mostra que também foi possível observar gelo no interior da esfera. Isto foi possível pois, no interior da esfera, além de solução precursora encapsulada, havia também água, e esta foi congelada pelo nitrogênio líquido.

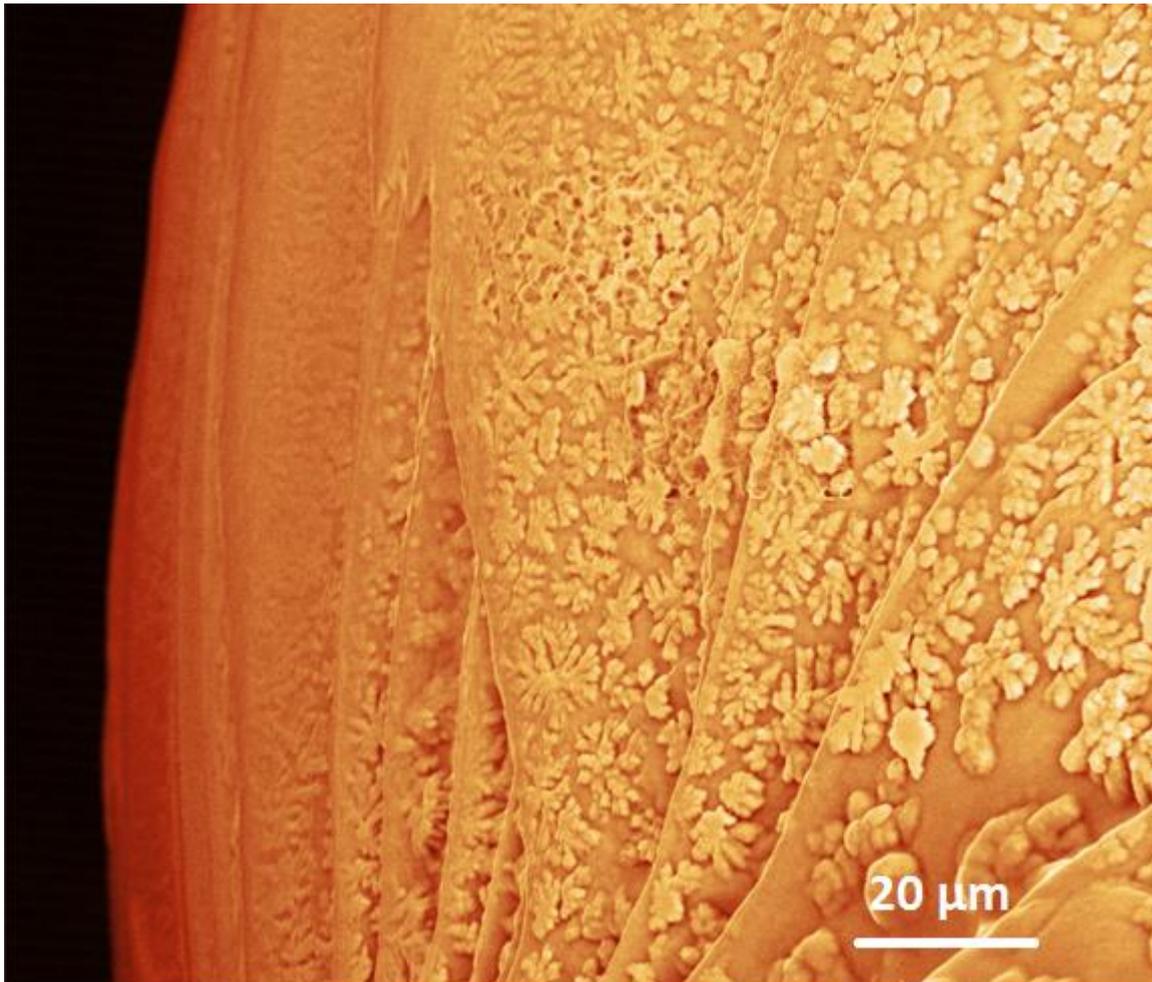


FIG. 4.10 Micrografia (MEV) de gelo observado no interior da esfera.

Além da hidroxiapatita precipitada na forma de agulhas, também foi possível observar aglomerados de cristais de HA na forma de placas (FIG. 4.11). As variações de dimensões das placas observadas indicam que a hidroxiapatita poderia estar ainda no estágio de nucleação e/ou crescimento. É possível fazer uma estimativa da porcentagem de HA precipitada no interior de uma microesfera de alginato de cálcio.

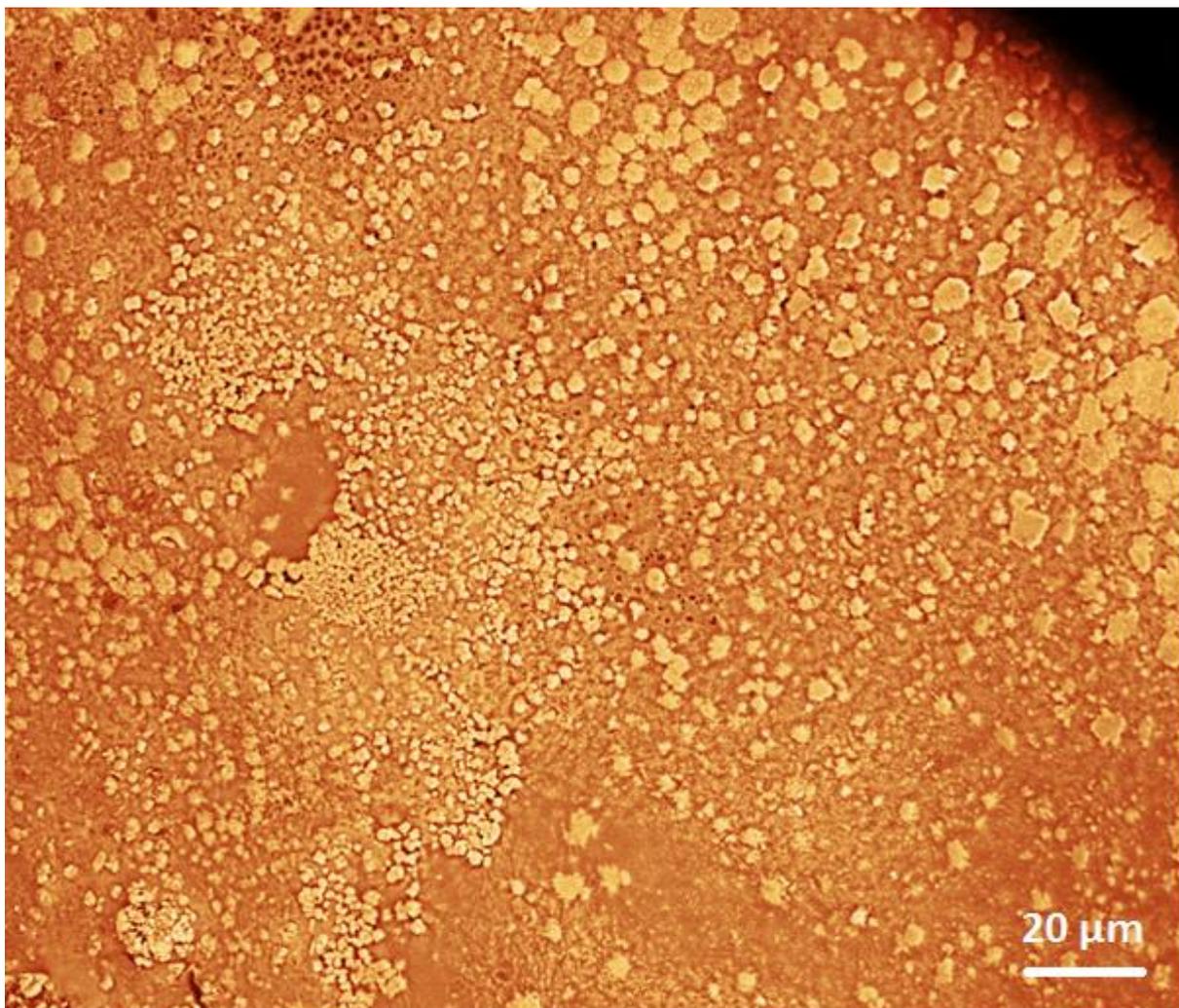


FIG. 4.11 Micrografia (MEV) de HA na forma de placas.

É possível fazer uma estimativa do percentual de hidróxiapatita na esfera de alginato. Utilizando como referência a FIG. 4.1 (a), estima-se que a área da seção transversal possui área $785.000 \mu\text{m}^2$ (isso sem levar em consideração os vazios (“buracos”) na superfície). Levando em consideração os vazios, uma vez que a esfera de alginato de cálcio não é maciça, a área da seção transversal passa a ser de $392.500 \mu\text{m}^2$. A área estimada ocupada por HA na seção (agulhas + placas) foi de $85.000 \mu\text{m}^2$. Esse valor representa aproximadamente 11% da área da seção da microesfera de alginato quando não se leva em consideração os vazios. Quando estes são considerados, esse percentual fica próximo de 22% da área.

Foram realizadas medidas de EDS nas regiões de aglomerados de precipitados de tanto na forma de agulhas quanto na forma de placas. Os espectros são mostrados nas FIG. 4.12 E FIG. 4.13, e confirmam a presença intensa de fósforo e cálcio na região dos precipitados. A presença de

potássio se deve ao fato de que, mesmo lavando as esferas após a imersão em solução de hidróxido de potássio, ainda há KOH absorvido pelo alginato.

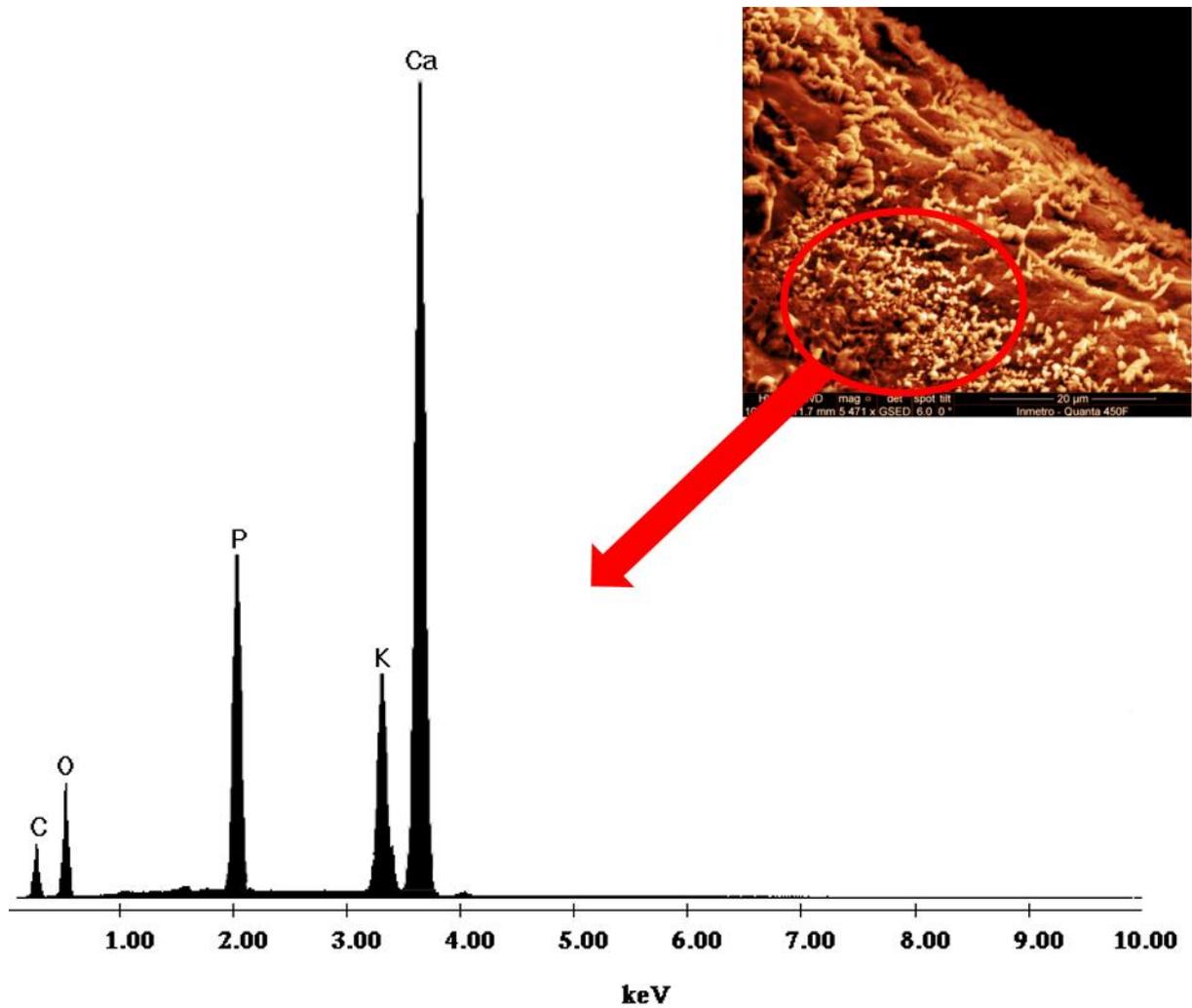


FIG. 4.12 Espectro de EDS das agulhas na região indicada pela circunferência vermelho.

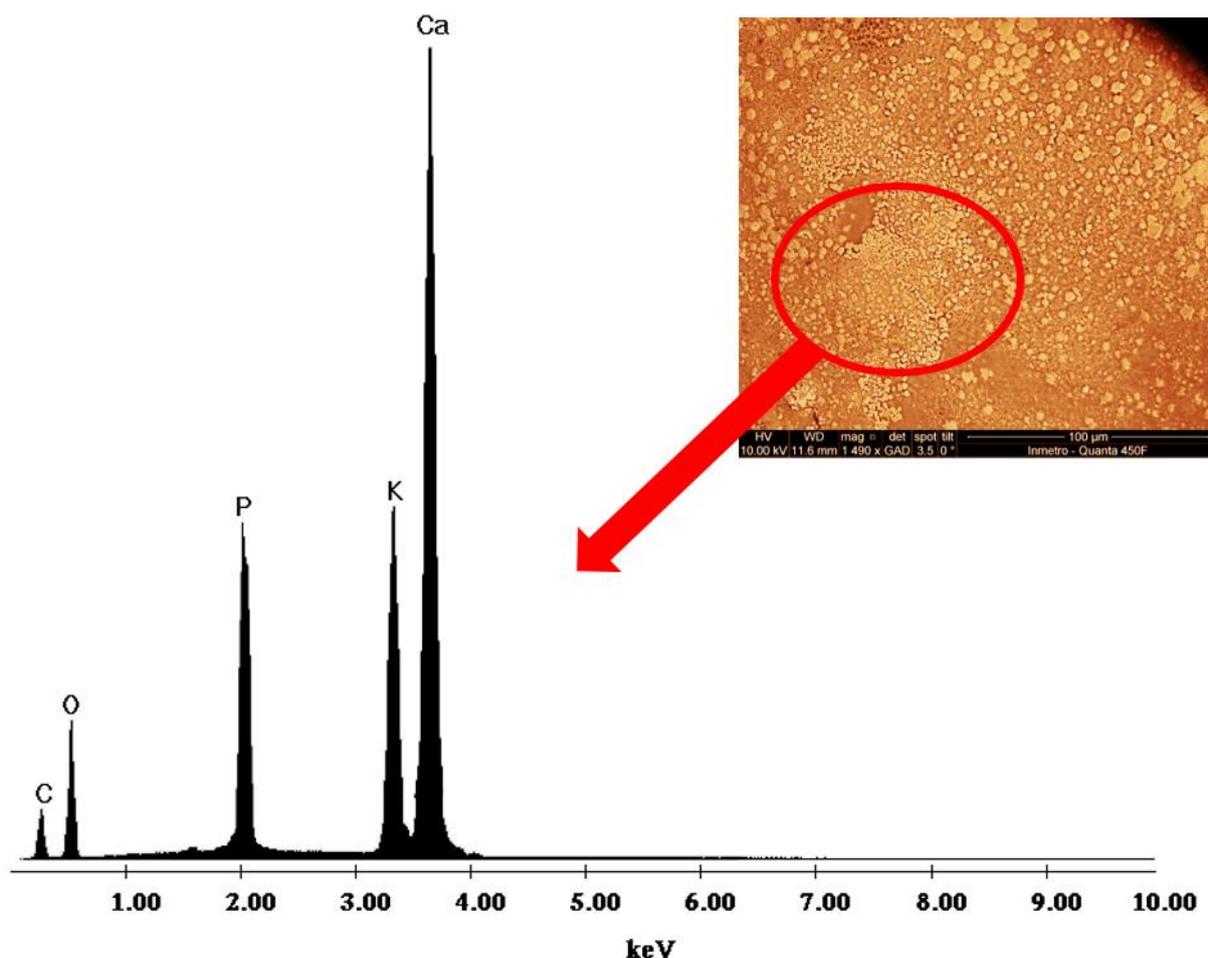


FIG. 4.13 Espectro de EDS das placas de HA na região indicada pela circunferência vermelha.

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

É possível observar nas FIG. 4.14 e FIG.4.15, nanoesferas de alginato de cálcio com dimensões variando de aproximadamente 10 até 200 nm. Este resultado reforça a hipótese de que as esferas de alginato são formadas de aglomerados de esferas menores. A desaglomeração das esferas pode ser associada ao próprio processo de preparação das amostra para análise em MET, onde solução contendo as microesferas é colocada em agitação no ultrassom de ponteira. O diâmetro obtido é coerente com os valores encontrados na literatura, nas quais as nanoesfera de alginato são produzidas por outras rotas.

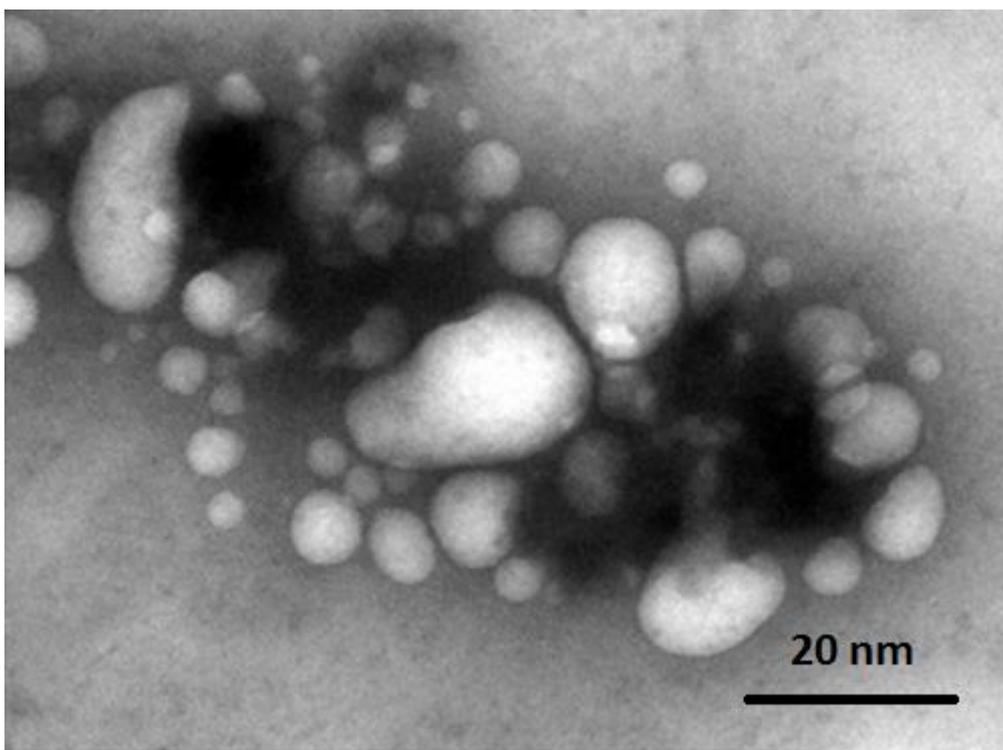


FIG. 4.14 Micrografia (MET) de nanoesferas de alginato

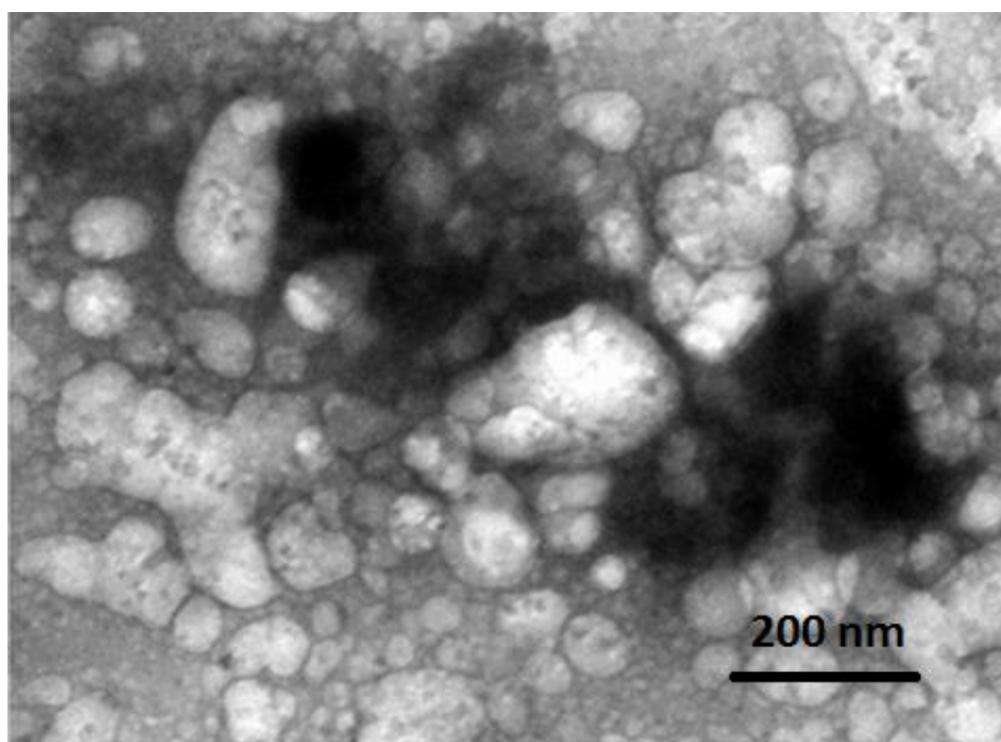


FIG. 4.15 Micrografia (MET) da região com aglomerados de nanoesferas de alginato.

Invertendo o contraste da FIG. 4.15, é possível ver e medir claramente o diâmetro das nanoesferas de alginato de cálcio (FIG. 4.16).

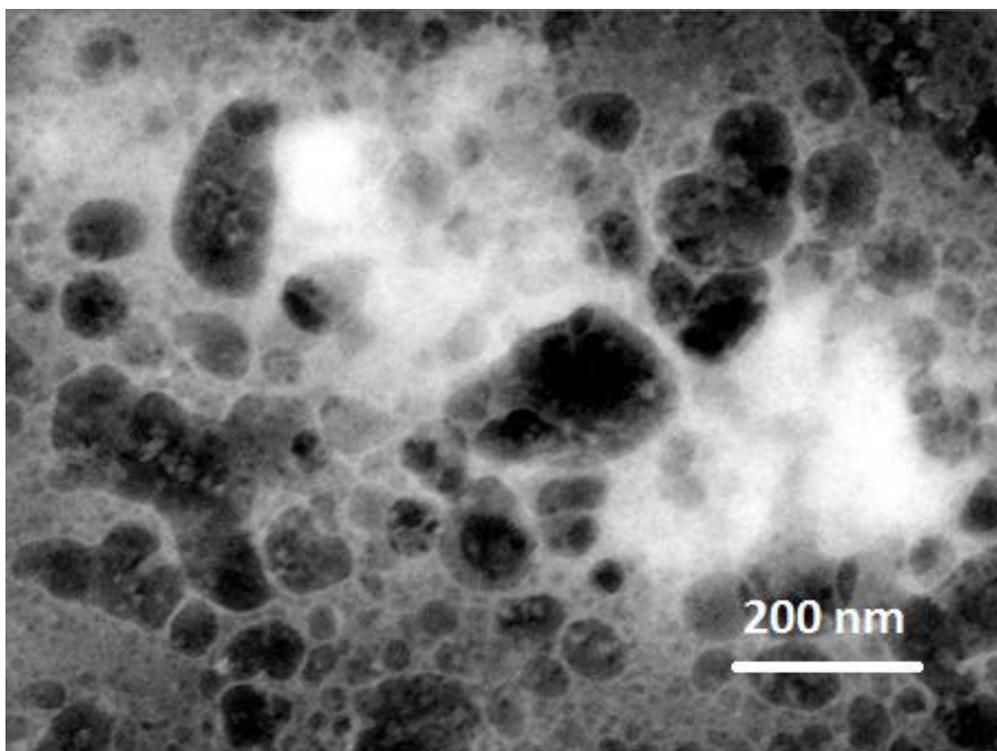


FIG. 4.16 Inversão de contraste da FIG. 4.15.

Durante a análise da amostra foi possível observar possíveis cristais hexagonais (FIG. 4.17) semelhantes aos encontrados nas análises de AFM, que serão mostrados mais à frente.

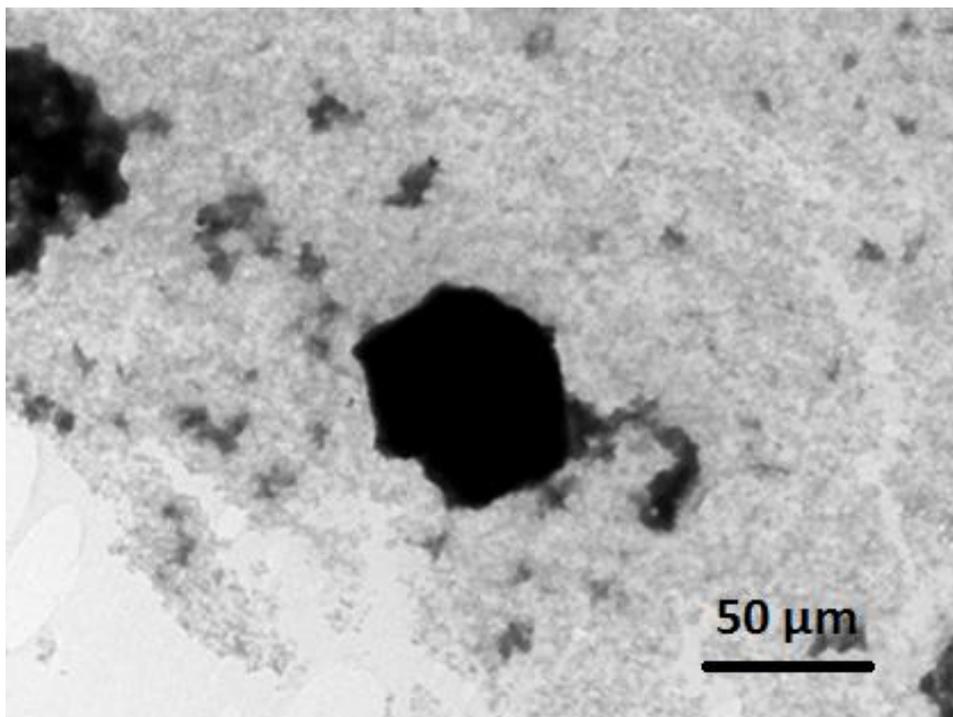


FIG. 4.17 Micrografia (MET) de possível cristal hexagonal de apatita.

Também foi possível observar aglomerados de precipitados hidroxiapatita na forma de agulhas, como mostrado nas FIG. 4.18 - FIG. 4.23, em diferentes aumentos. O tamanho e a forma das agulhas obtidas na análise de MET é muito semelhante e reforça o resultado obtido na análise de MEV. Os resultados de MET são coerentes com resultados encontrados na literatura, como nos trabalhos de Kim, H. L., 2015 e Shi Z, 2008.

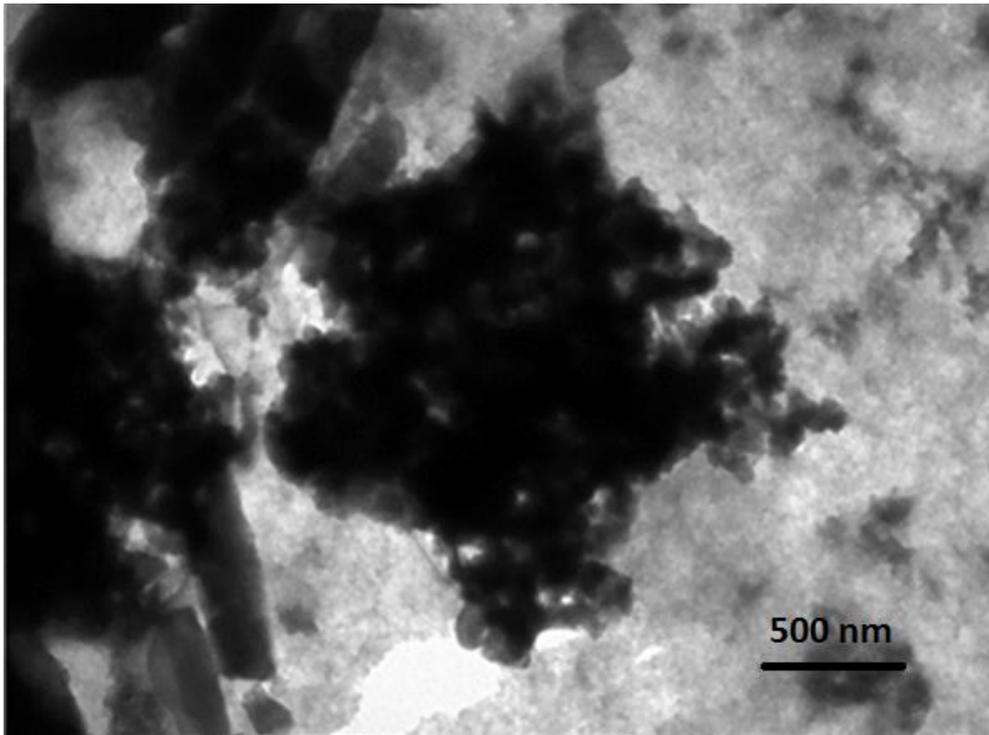


FIG. 4.18 Micrografia (MET) de aglomerados de HA nanoestruturada

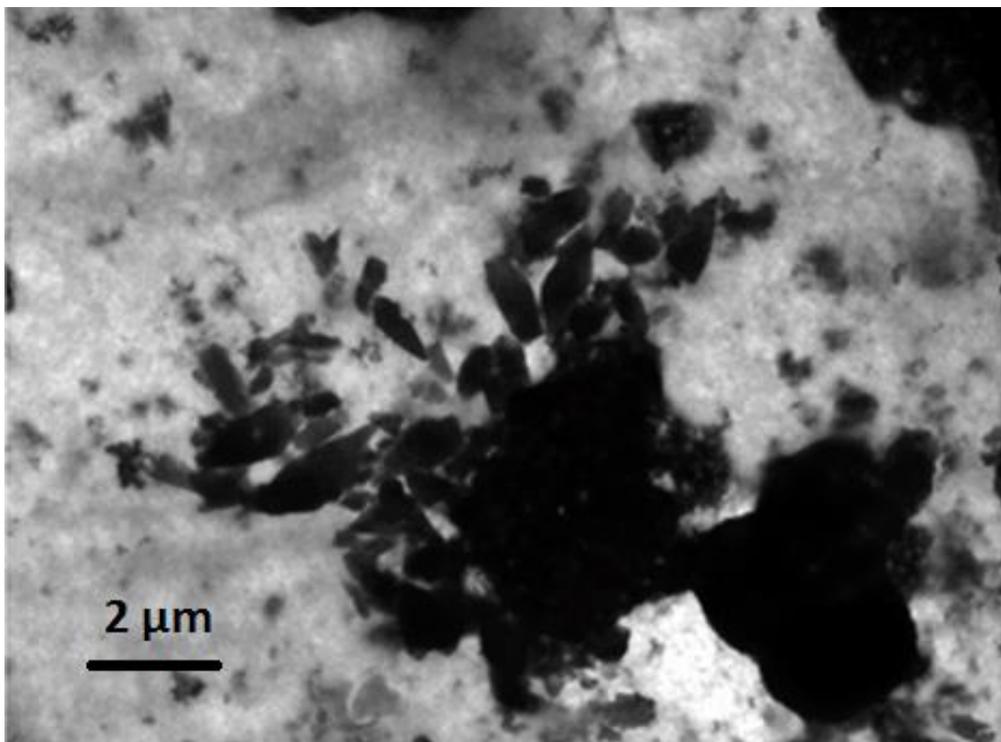


FIG. 4.19 Micrografia (MET) da região com agulhas de HA.

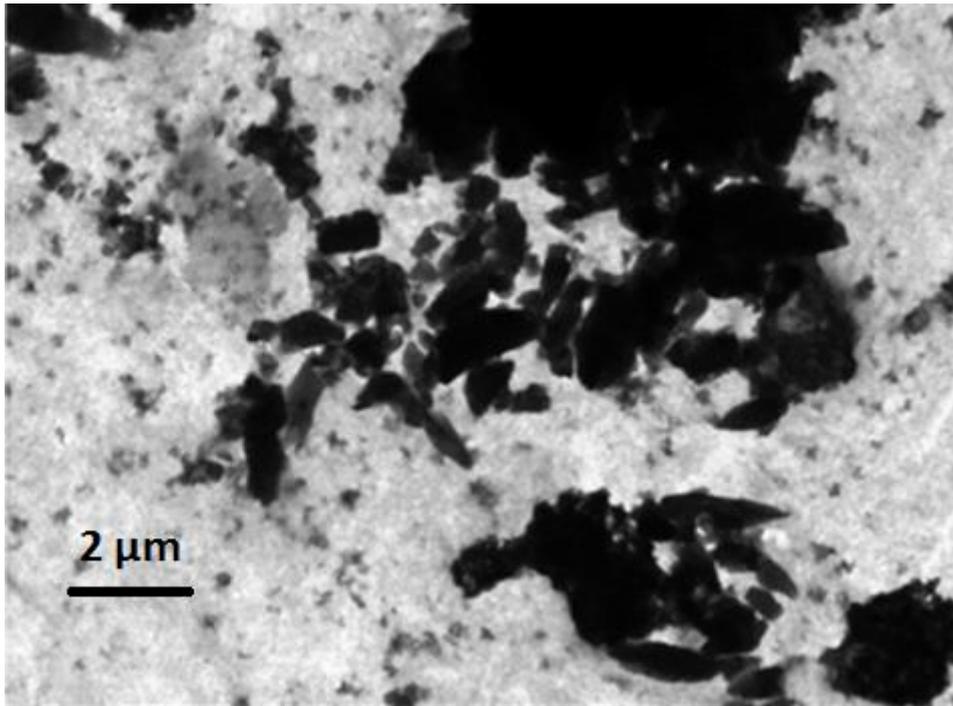


FIG. 4.20 Micrografia (MET) de diferente região com precipitados de HA nanoestruturada

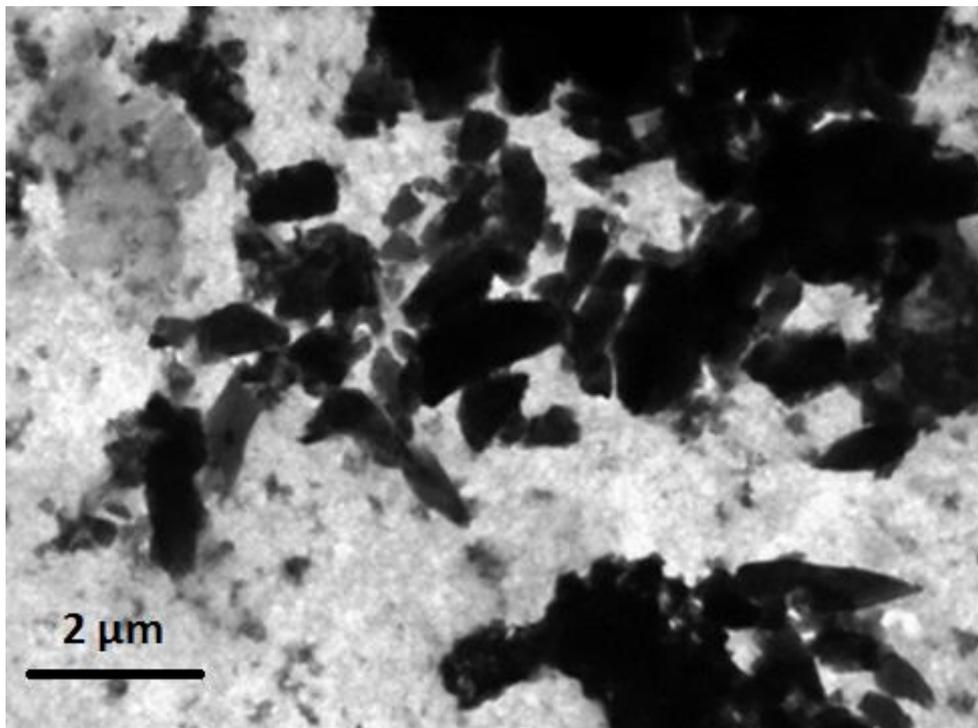


FIG. 4.21 Micrografia (MET) da mesma região da FIG. 20, porém sob maior aumento.

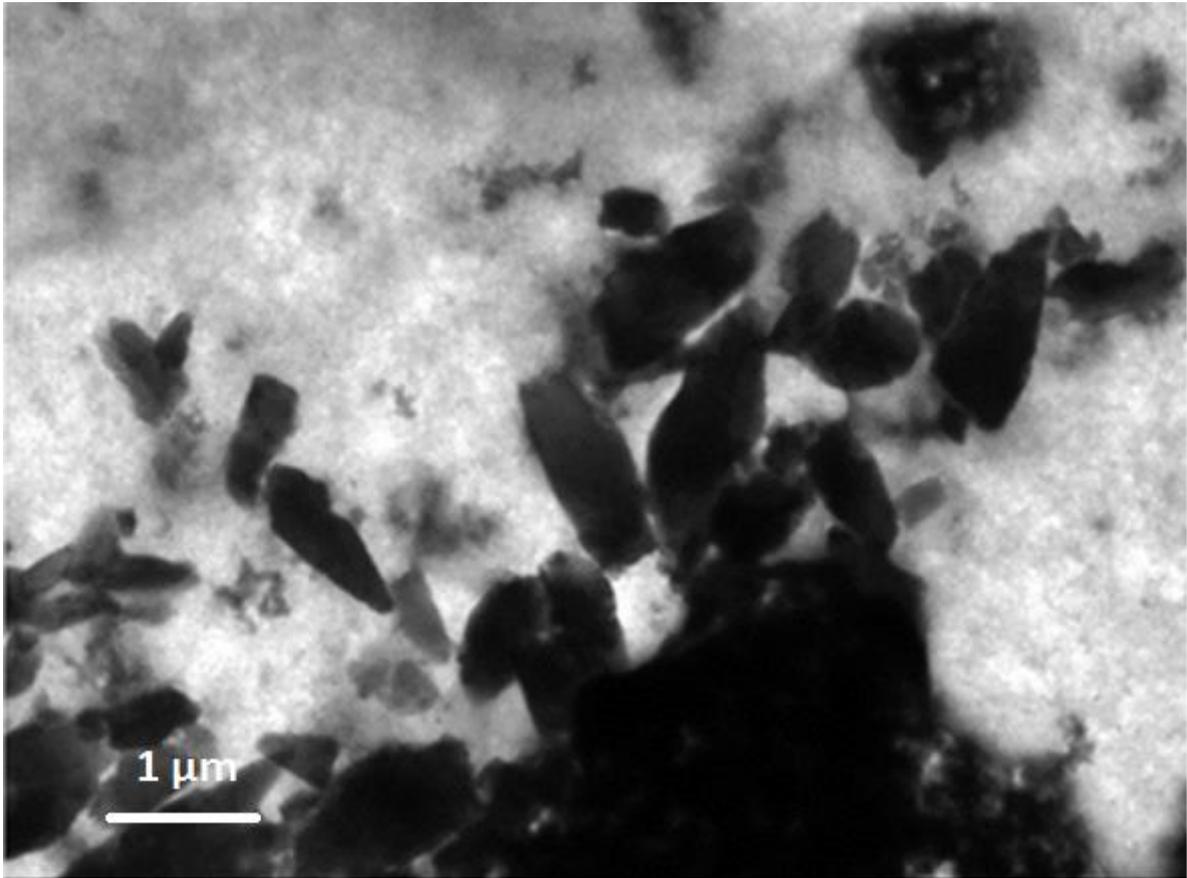


FIG. 4.22 Micrografia (MET) de agulhas de HA nanoestruturada

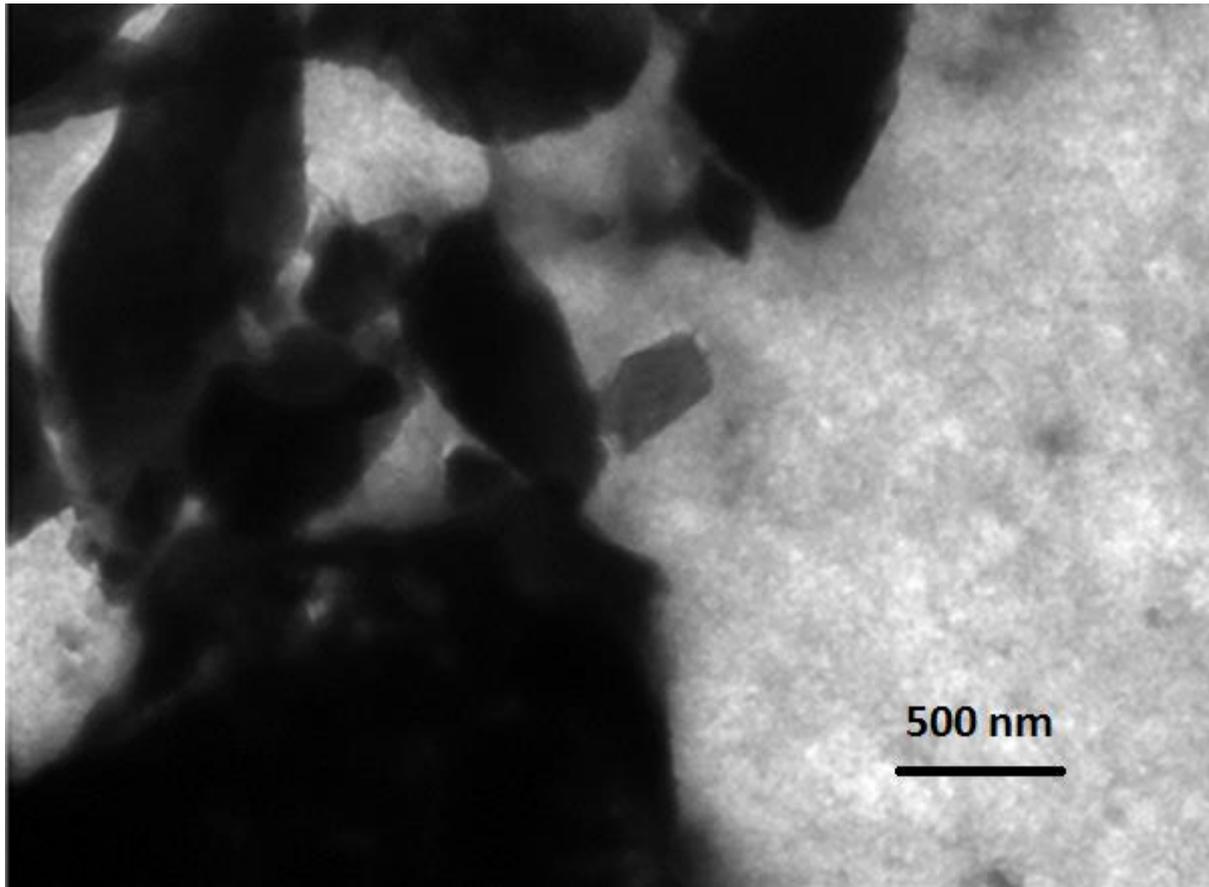


FIG. 4.23 Micrografia (MET) de detalhe com maior aumento das agulhas de hidroxiapatita.

4.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A análise de AFM foi realizada em *peakforce*®. A FIG. 4.24 representa uma imagem de topografia (altura) da amostra. A imagem de altura é construída a partir de uma escala de contraste entre as regiões com maior deflexão (tanto para cima quanto para baixo) da sonda enquanto ela varre a amostra. As regiões mais escuras representam as partes mais baixas da amostra, enquanto as regiões mais claras, as partes mais altas. Através da análise da imagem é possível afirmar que as nanoesferas de alginato apresentaram diâmetro médio entre 30 e 50 nm. É possível que as regiões de maiores alturas (60 ~80 nm) estejam associadas tanto a esferas com maiores diâmetros quanto a aglomerados de esferas menores esferas. A rugosidade média

ficou em torno de 5 nm. O perfil de rugosidade é mostrado na FIG 4.25. O valor é coerente com os encontrados na literatura para nanoesferas de alginato (LI, P. *et al*, 2008).

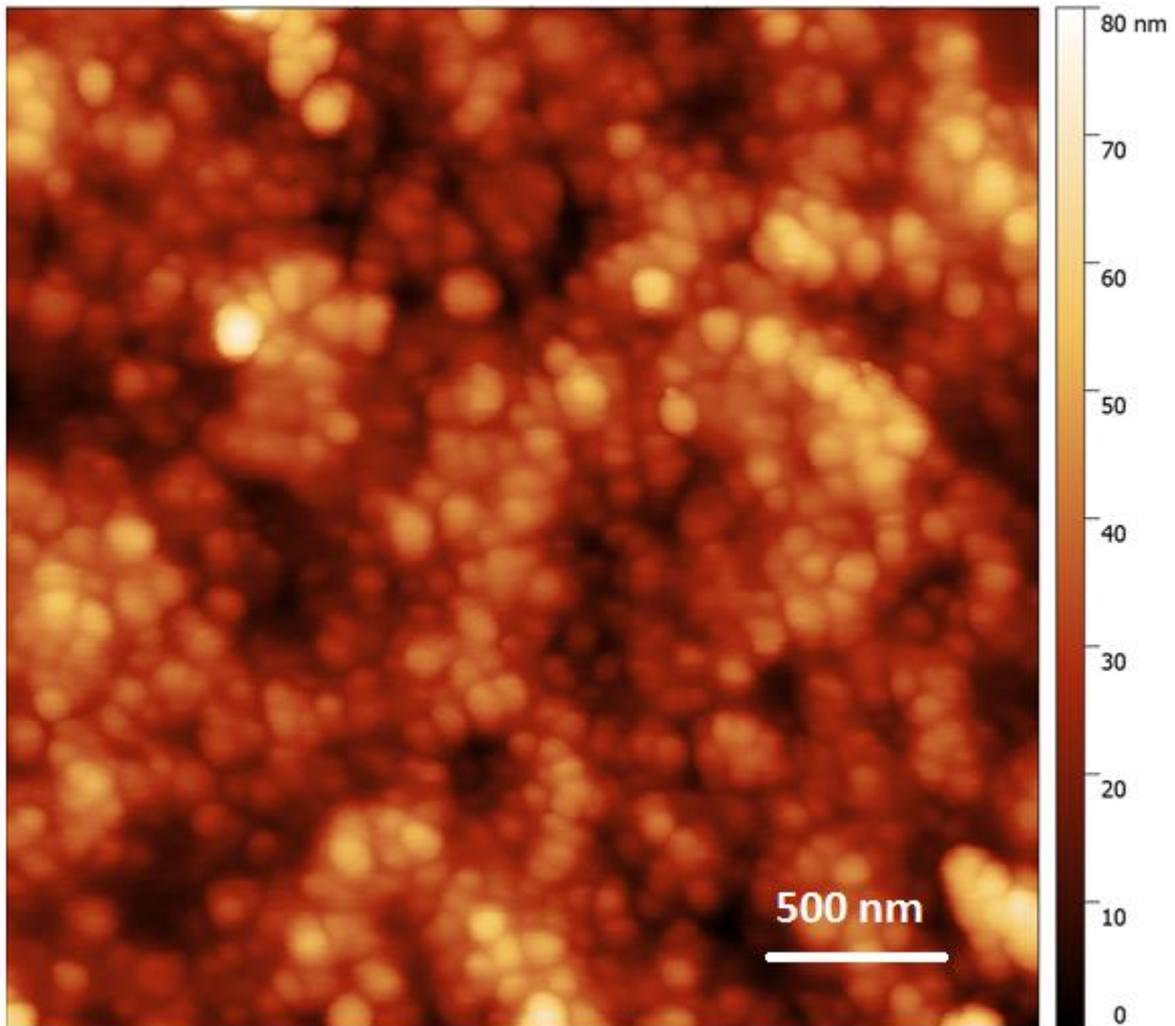


FIG. 4.24 Micrografia (AFM) com informação de altura das nanoesferas de alginato

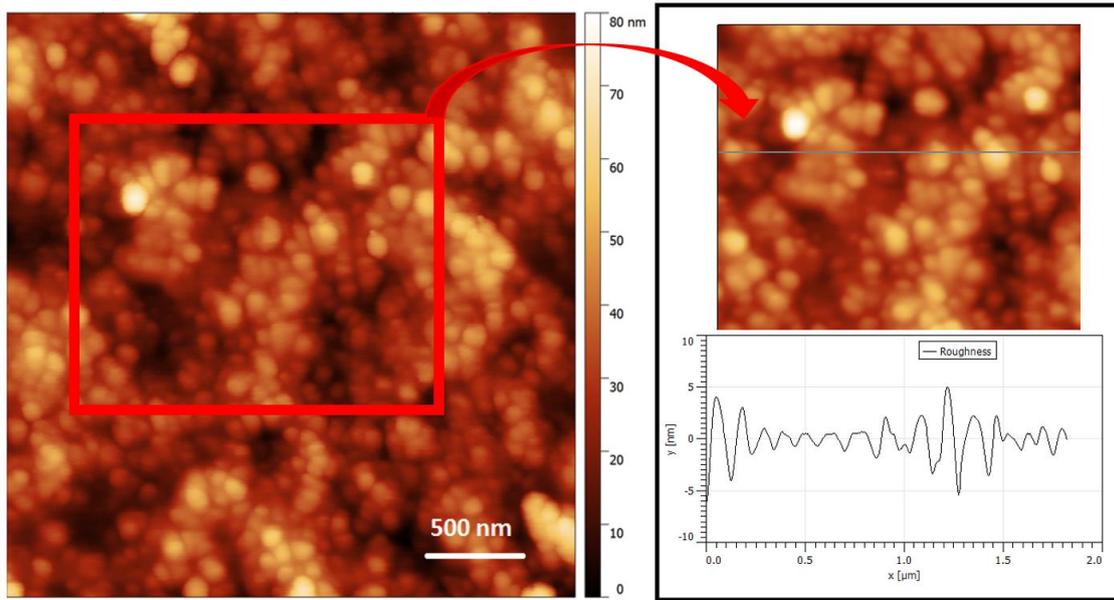


FIG. 4.25 Perfil de rugosidade das nanoesferas de alginato

A FIG. 4.26 é uma simulação tridimensional da FIG. 4.24 e fornece uma visão melhor da topografia desta região da amostra. Os pontos mais claros também equivalem aos pontos mais altos desta região da amostra.

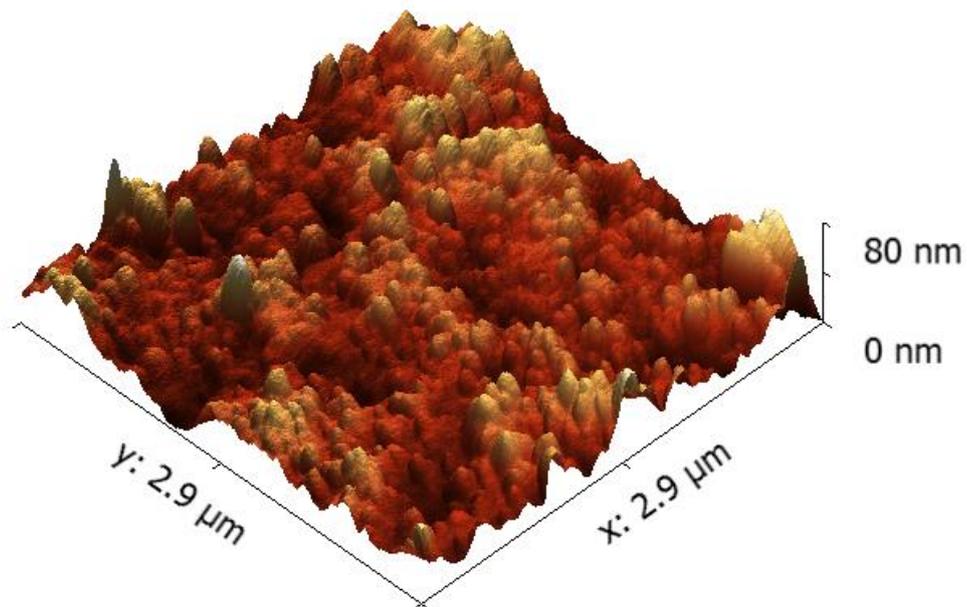


FIG. 4.26 Modelagem 3D da região contendo aglomerados de esferas de alginato.

Durante a varredura da amostra foi possível observar precipitados na forma de agulhas e também de cristais hexagonais (FIG. 4.27). É possível que esteja sendo observado o processo de nucleação dos cristais de apatita, partindo de um estado de total desarranjo para um estado pós-crescimento, em completa ordem. Os resultados indicam que o crescimento tende a ocorrer por empilhamento de planos hexagonais desemparelhados e, à medida que o cristal cresce, os planos são emparelhados, tendo como indicativo de crescimento sua altura (FIG. 4.28). Os cristais em crescimento (com planos desemparelhados) apresentaram uma altura média de 200 nm, enquanto os cristais com maior ordenamento apresentaram altura média de 1,5 μm . Foram escolhidos três cristais para análise, um desemparelhado, um com médio índice de organização das camadas, e um com camadas organizadas.

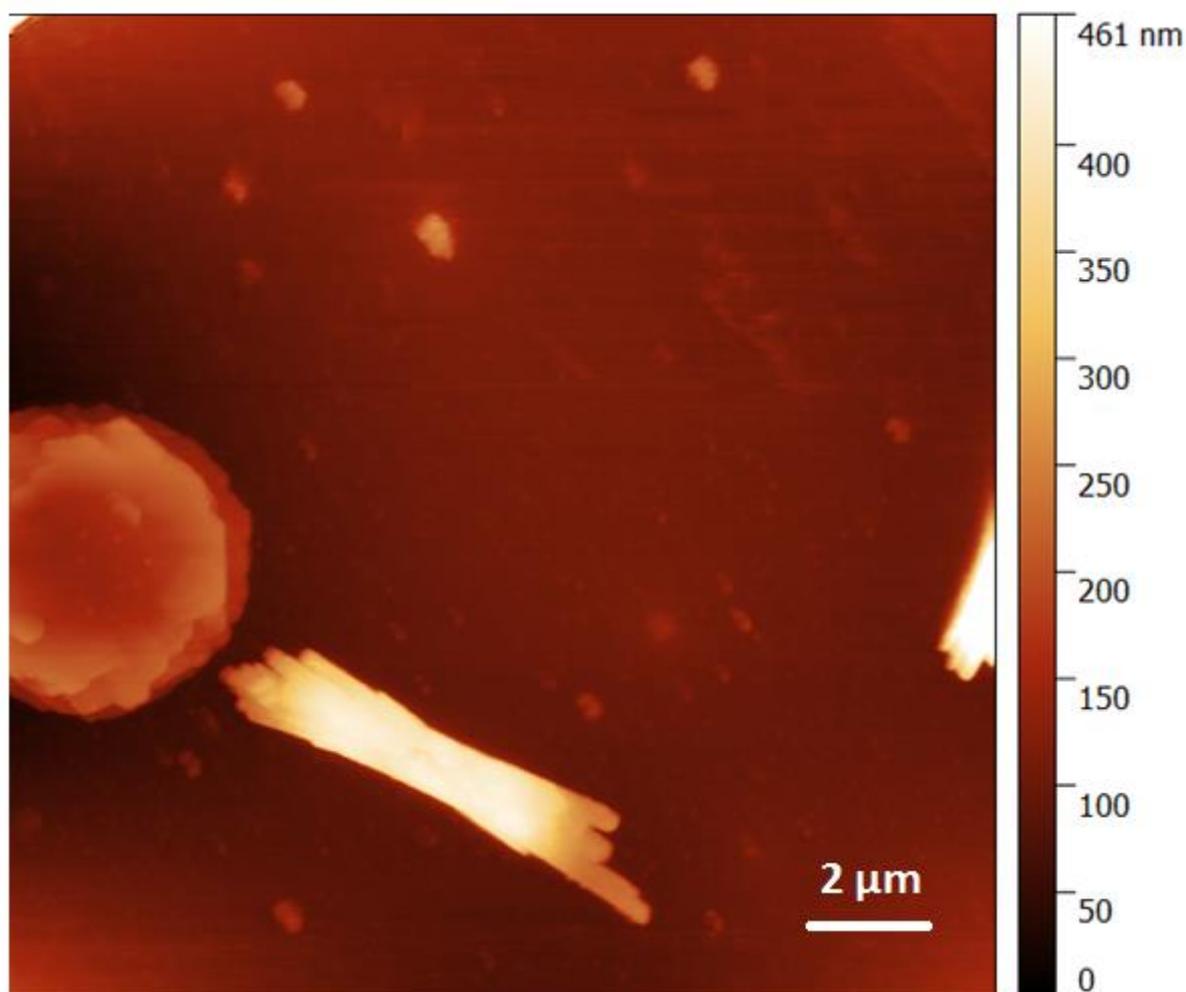


FIG. 4.27 Micrografia (AFM) de cristais hexagonais e precipitados na forma de agulhas.

Através da simulação tridimensional da FIG. 4.28, é possível perceber que os cristais com formas mais alongadas poderiam ser os mesmos cristais em crescimento, porém estão tombados. É possível também identificar as diversas camadas destes cristais (FIG. 4.29). Pode-se inferir que estes cristais estavam nucleando e crescendo dentro das microesferas de alginato de cálcio e, devido à utilização do ultrassom de ponta para a preparação das amostras, foram espalhados por toda a solução.

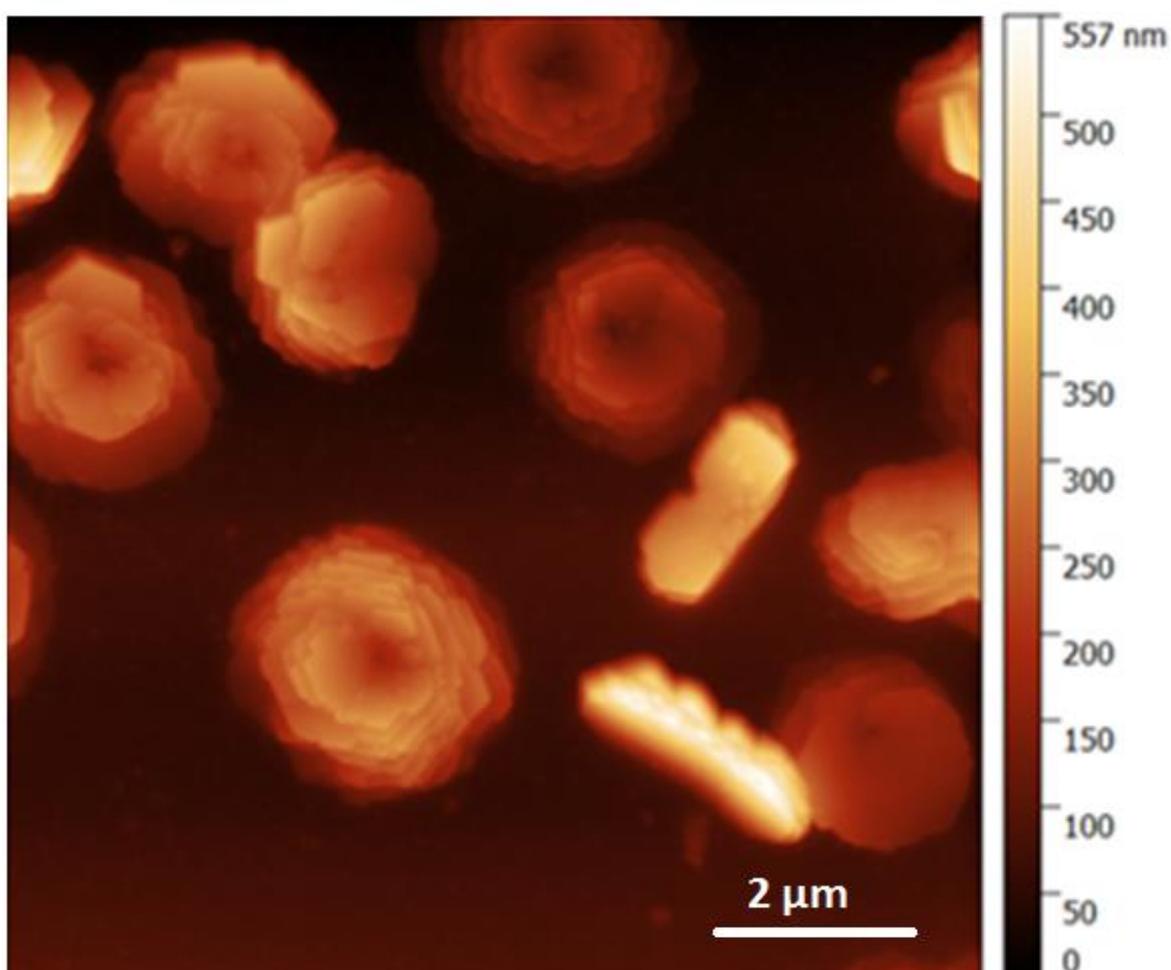


FIG. 4.28 Micrografia (AFM) da região com diferentes cristais hexagonais

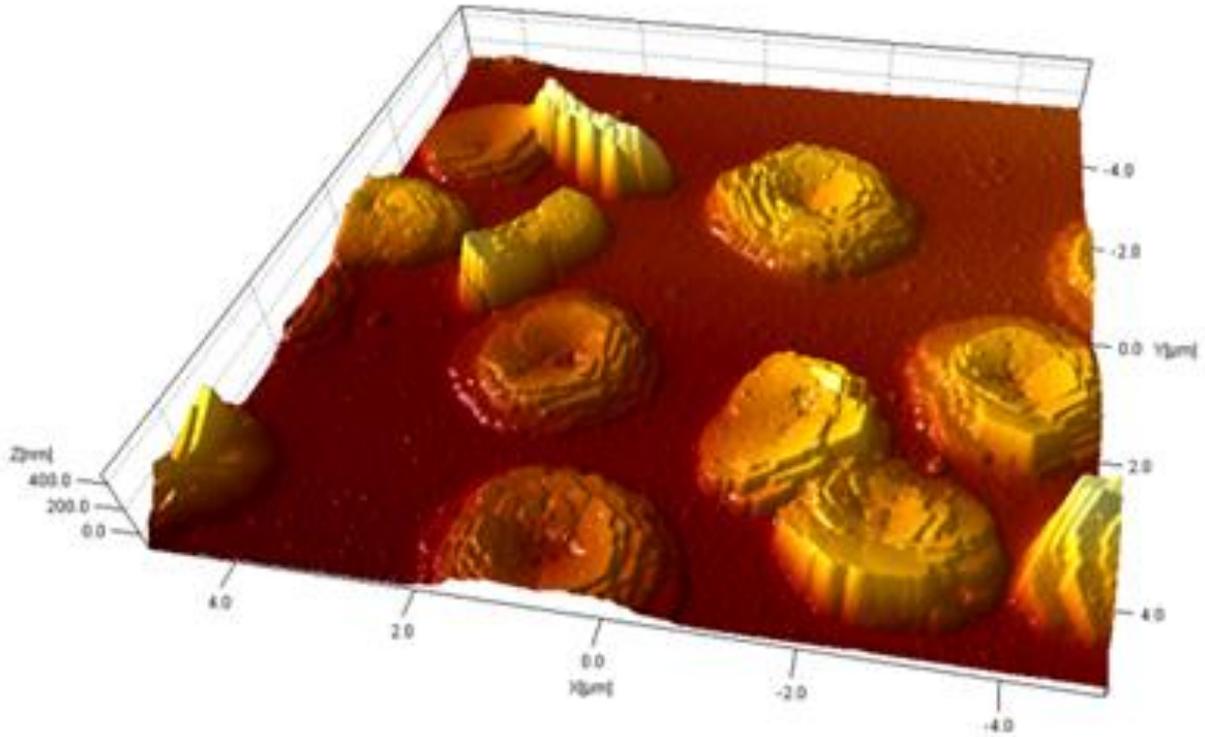


FIG. 4.29 Simulação 3D da região mostrada na FIG. 4.27.

Analisando a FIG. 4.30, é possível ter a percepção clara do desarranjo dos planos a medida que o cristal cresce. Por se tratar de uma imagem de topográfica (altura), pode-se concluir que altura do cristal é aproximadamente 180 nm. A FIG. 4.31 é uma figura formada a partir da amplitude de oscilação da sonda durante varredura da amostra, e nos fornece, ainda que de maneira qualitativa, uma melhor resolução da superfície do cristal. Já a FIG. 4.32 é uma simulação tridimensional de topografia (quantitativa) deste mesmo cristal, onde os tons de cor azul representam as regiões mais baixas e os tons de vermelho, as regiões mais altas do cristal. A FIG. 4.33 representa um mapa qualitativo de dureza no cristal. Percebe-se que os maiores índices de dureza são encontrados nas bordas das diversas camadas que compõem o cristal.

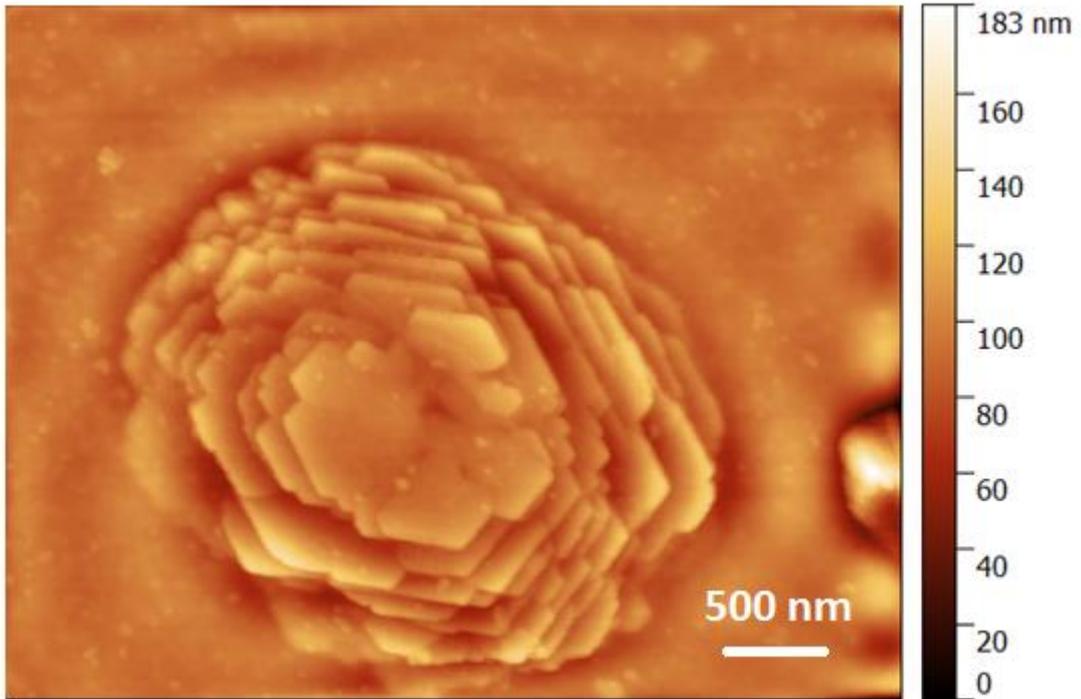


FIG. 4.30 Micrografia (AFM) de topográfica do cristal hexagonal com camadas desemparelhadas.

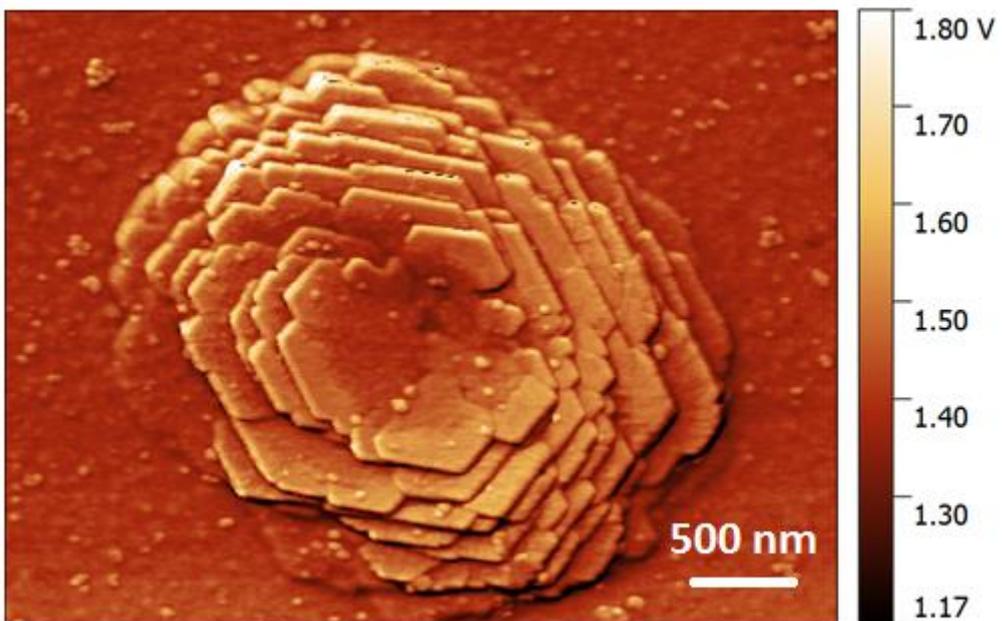


FIG. 4.31 Micrografia (AFM) de amplitude do mesmo cristal hexagonal

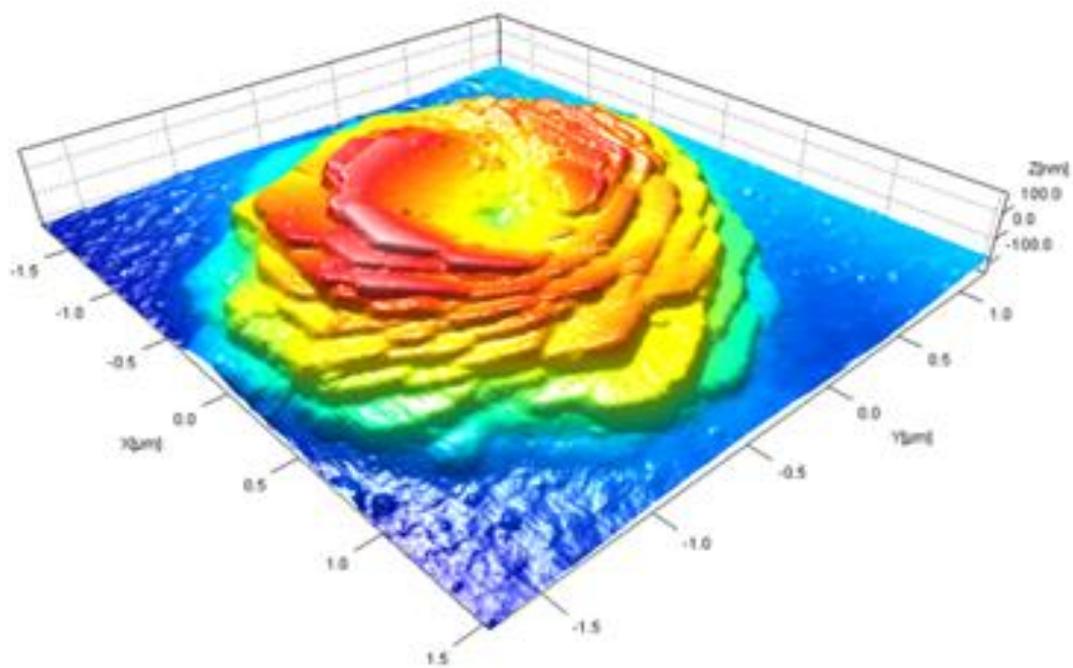


FIG. 4.32 Simulação 3D da imagem de altura do cristal.

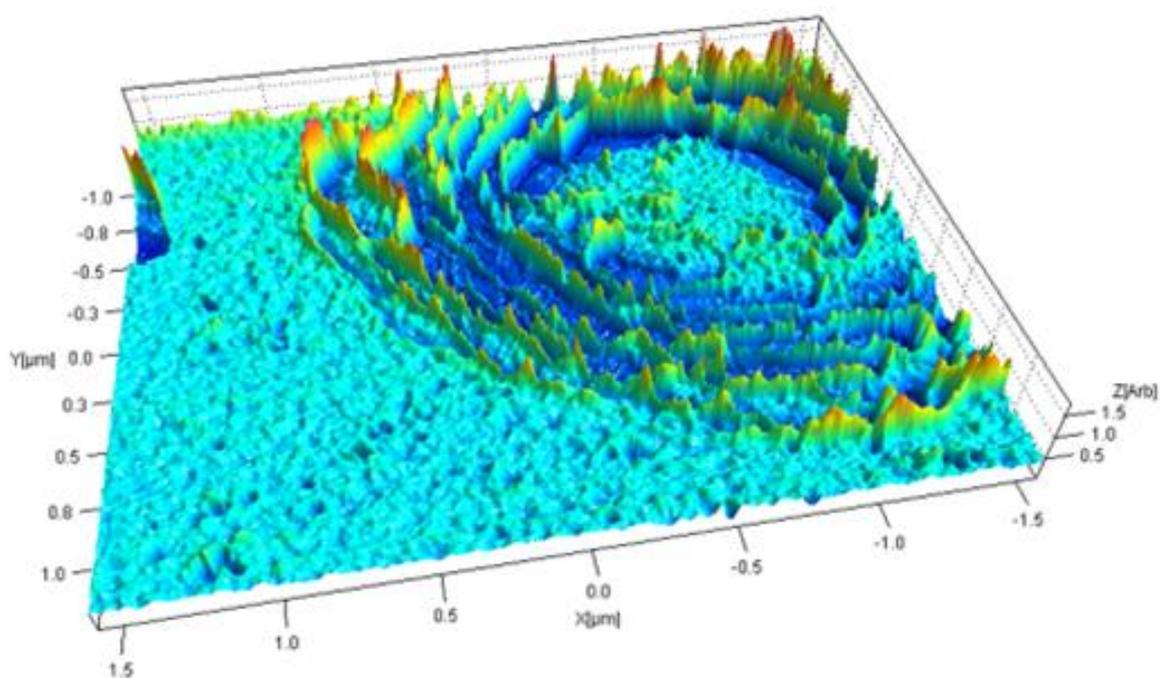


FIG. 4.33 Mapa qualitativo da dureza do cristal.

A dinâmica de crescimento parece respeitar o modelo proposto por S. R. Qiu, 2008. Através da observação das amostras, pôde-se concluir que, quanto maior o grau de organização das camadas do cristal, maior é sua altura, indicando crescimento, e a forma hexagonal do cristal torna-se um pouco mais nítida. O cristal mostrado na FIG. 4.34 apresenta altura aproximada de 900 nm. A FIG. 4.35 é uma imagem de amplitude do mesmo cristal, representando de maneira mais fiel a morfologia real do cristal. A parte destruída do cristal foi causada pelo feixe de elétrons durante uma tentativa de fazer EDS no MEV. Mesmo trabalhando no modo ambiental, com energia mínima, a intensidade do feixe foi suficiente para destruir parte do cristal.

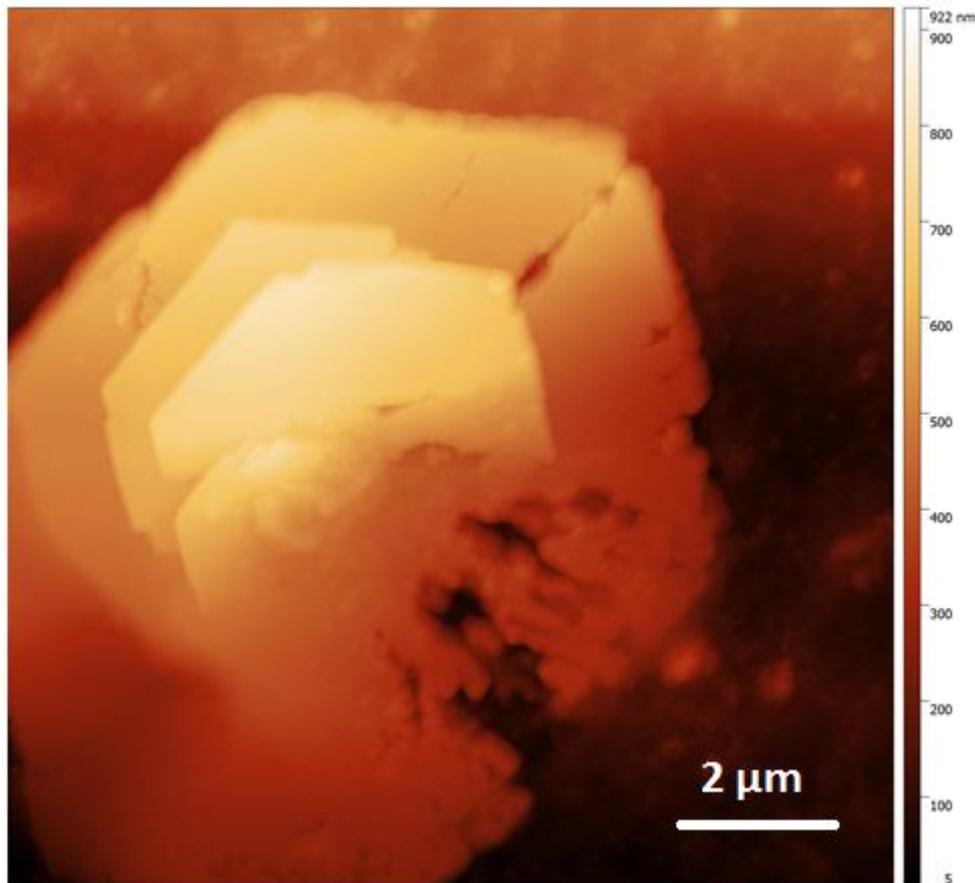


FIG. 4.34 Micrografia (AFM) de cristal hexagonal com grau de organização das camadas um pouco maior.

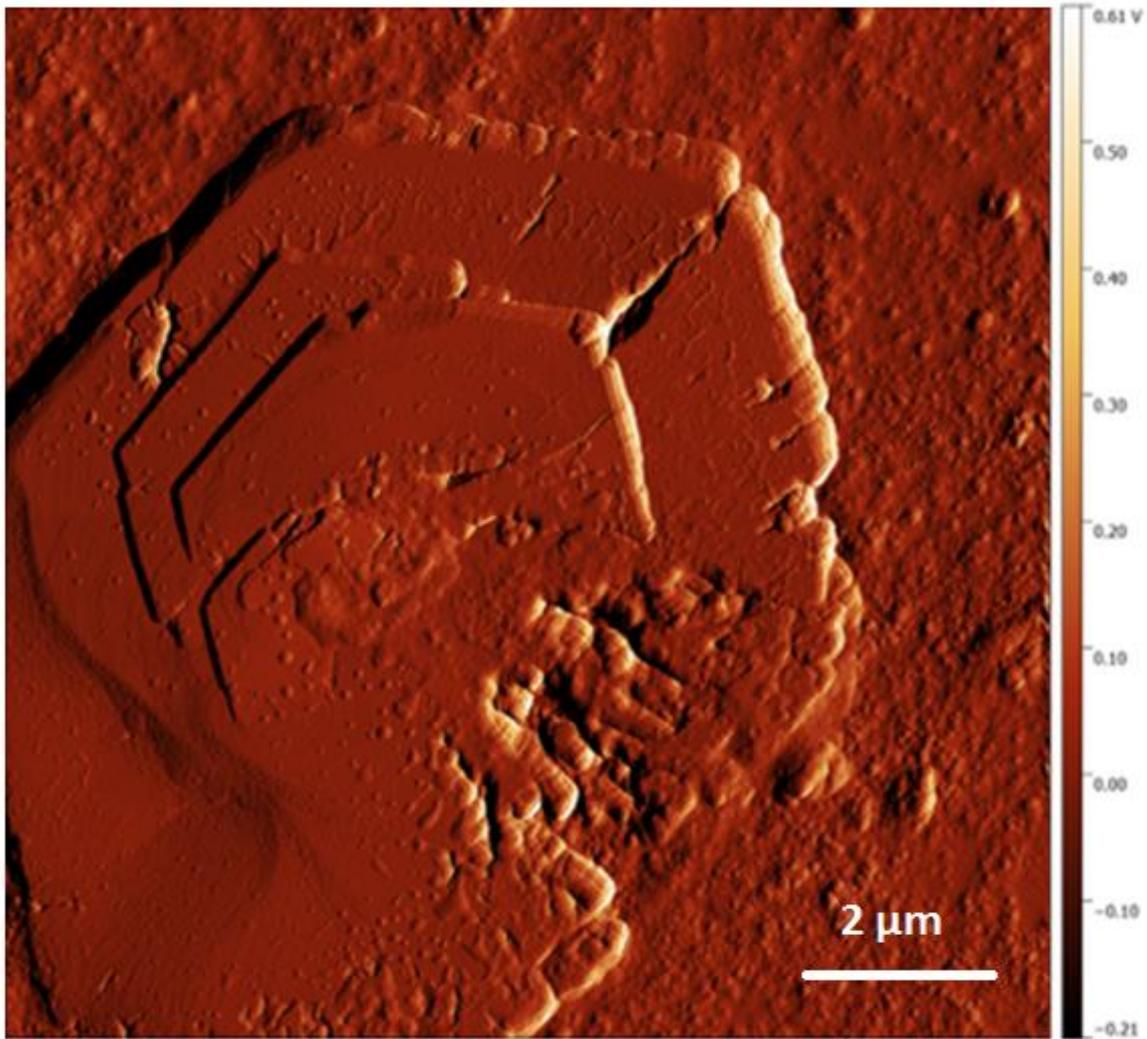


FIG. 4.35 Micrografia (AFM) de amplitude do cristal

As FIG. 4.36 e 4.37 representam, respectivamente, mapas qualitativos das propriedades mecânicas adesão e rigidez do cristal. Analisando o primeiro mapa, é nítido que o cristal possui adesão muito inferior à matriz polimérica (indicado pela escala de contraste – quanto mais escuro/claro maior/menor a adesão). Em relação ao segundo mapa, de dureza, a situação se inverte, e cristal demonstra rigidez superior à matriz (também pela escala de contraste da micrografia). Ambos resultados eram os esperados, tendo em vista a natureza de cada um dos materiais (cerâmica e polimérica).

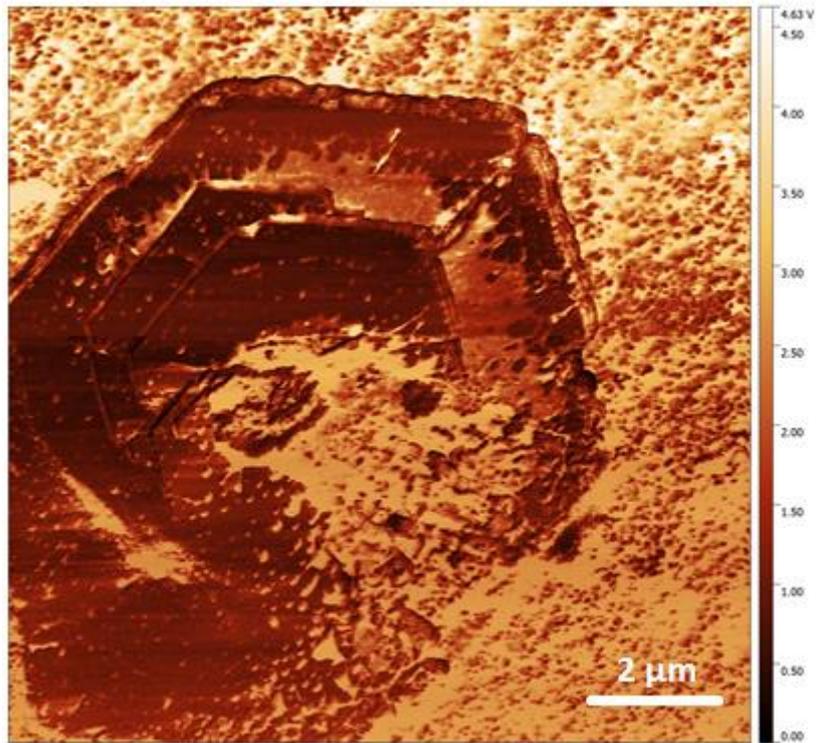


FIG. 4.36 Mapa qualitativo de adesão.

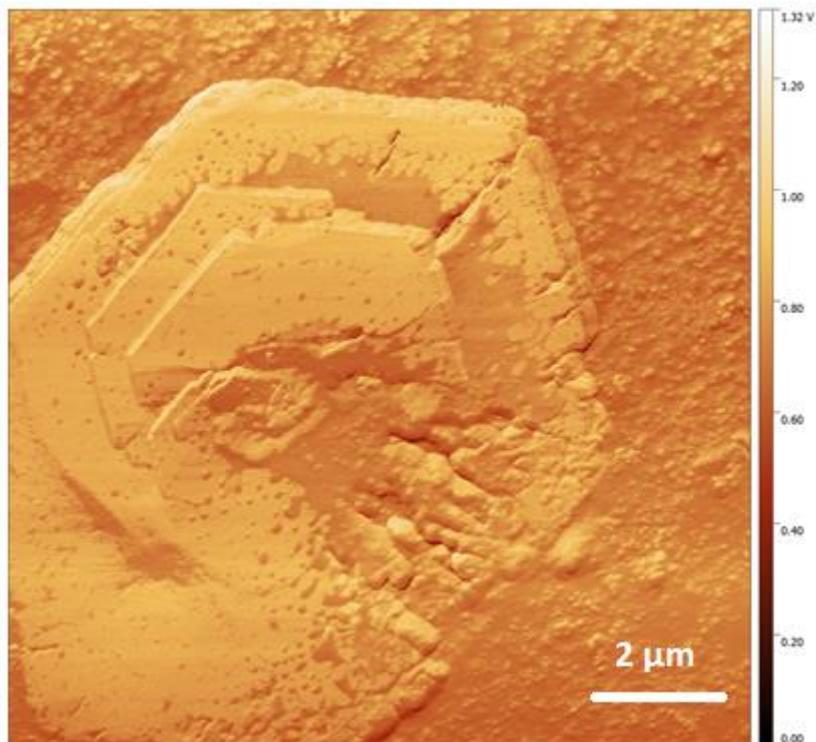


FIG. 4.37 Mapa qualitativo de rigidez.

A FIG. 4.38 é uma micrografia de um cristal de apatita com alto grau de organização das suas camadas. É possível afirmar que este cristal apresenta estágio mais avançado de crescimento que os anteriores pela altura máxima registrada, que foi de $1.34\mu\text{m}$ (diferença entre altura mínima e máxima). É possível perceber outras camadas menores no centro do cristal, indicando que este ainda se encontrava em estágio de crescimento. A FIG. 4.39 é uma micrografia de amplitude, e fornece uma melhor noção da topografia do cristal.

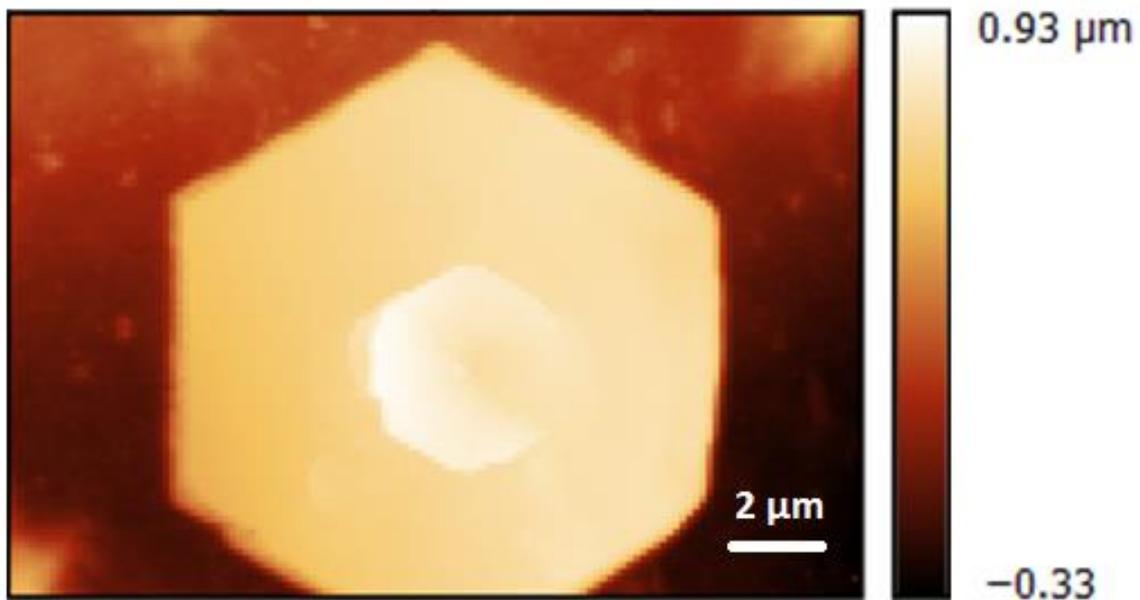


FIG. 4.38 Micrografia (AFM) de Cristal com alto grau de organização das suas camadas.

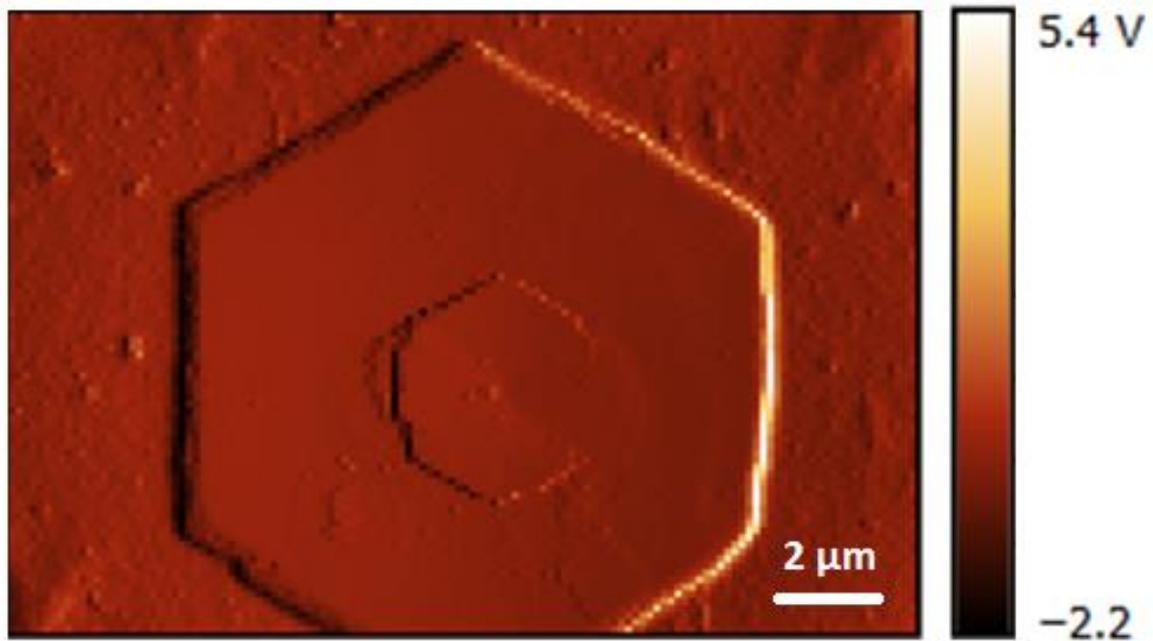


FIG. 4.39 Micrografia (AFM) de amplitude desde cristal.

A FIG. 4.40 é uma simulação tridimensional quantitativa da topografia deste cristal. Quando comparada com a FIG. 4.32, o crescimento em direção à um estado organizado de camadas torna-se nítido.

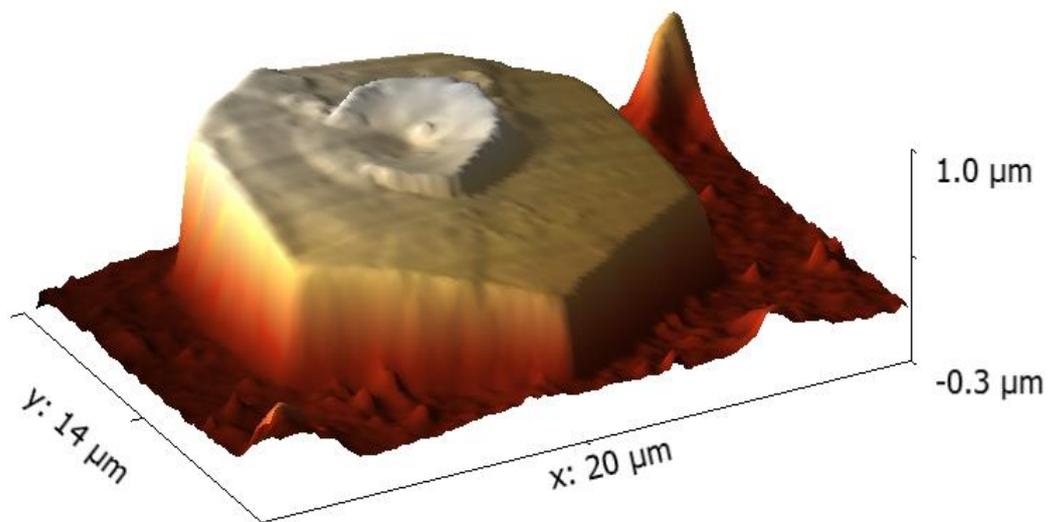


FIG. 4.40 Simulação 3D da topografia do cristal

Com a intenção de comparar como os cristais em maior e menor grau de organização interagem com a sonda do AFM, foram feitos mapas qualitativos de adesão para ambos (FIG. 4.41 e 4.42). O resultado é bastante interessante, pois mostra ainda que de maneira qualitativa que os cristais tendem a apresentar maior interação com a sonda enquanto estão nos estágios iniciais de nucleação e crescimento, e essa interação tende a diminuir a medida que o cristal cresce. Este resultado também pode estar associado ao fato de que os cristais estão nucleando e crescendo confinados em matriz de alginato que, por ser um polímero, apresenta sempre grande interação com a sonda devido a sua alta viscosidade.

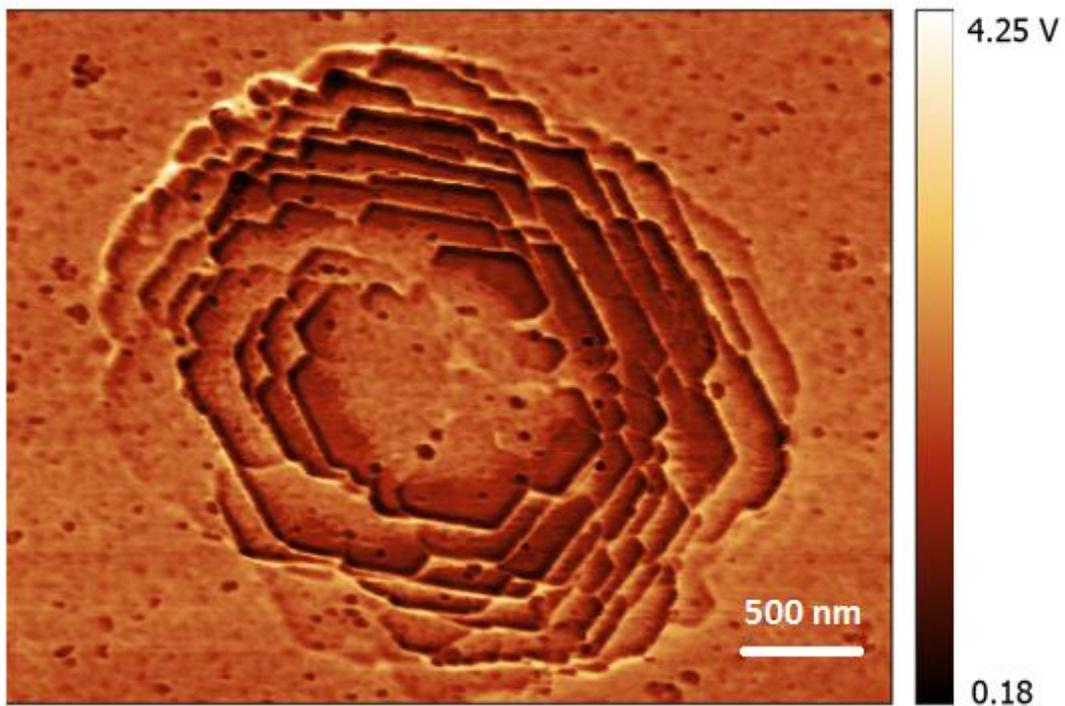


FIG. 4.41 Mapa qualitativo de adesão do cristal com menor grau de organização das camadas.

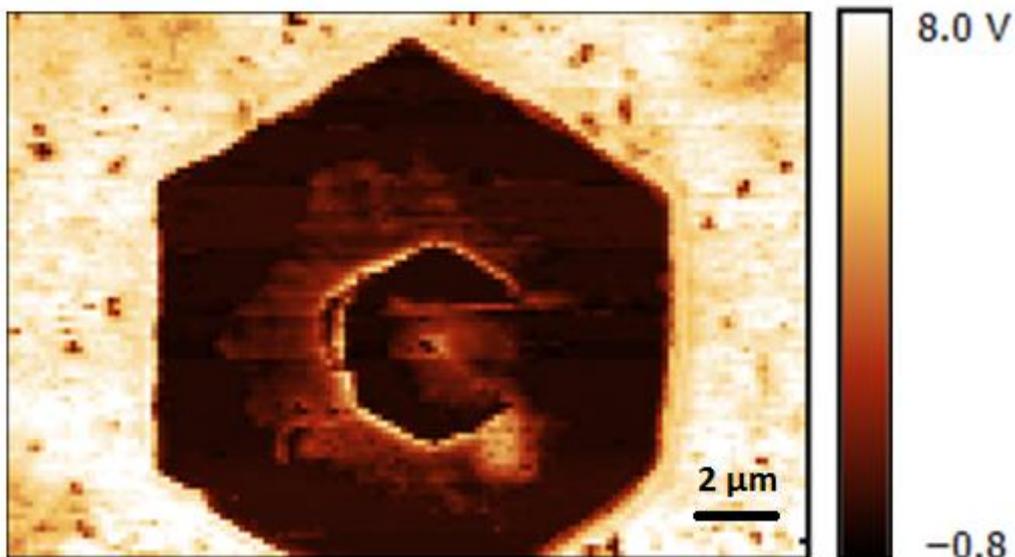


FIG. 4.42 Mapa qualitativo de adesão do cristal com maior grau de organização das camadas.

Foi realizada análise de EDS nos cristais hexagonais observados por AFM. Porém, não foi possível fazer a coleta dos espectros, pois mesmo utilizando a mínima energia possível para a coleta, o feixe destruía os cristais. As FIG 4.43 e FIG. 4.44 mostram cristais completamente destruídos pelo processo.

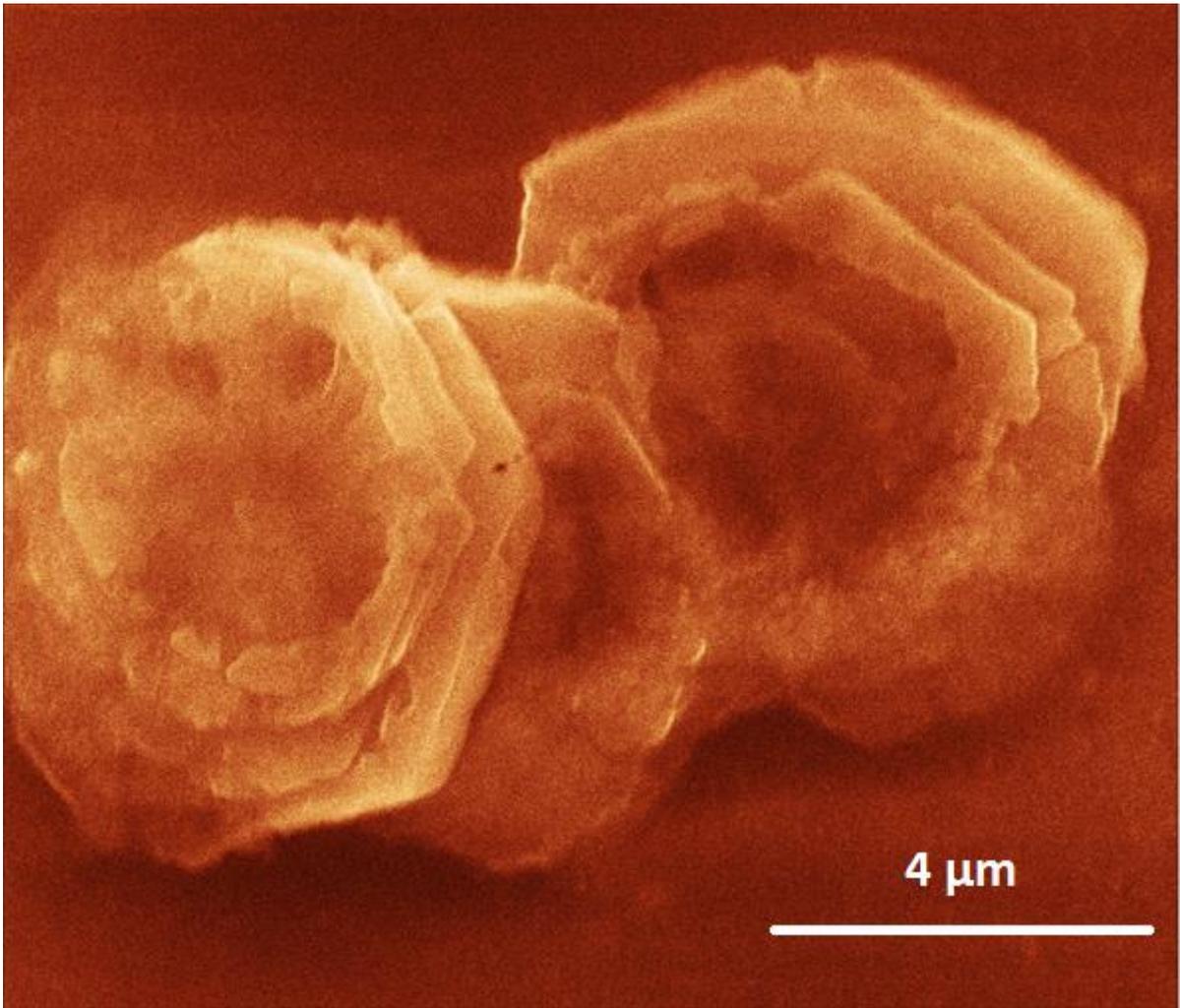


FIG. 4.43 Micrografia (MEV) de cristais destruídos pela energia do feixe.

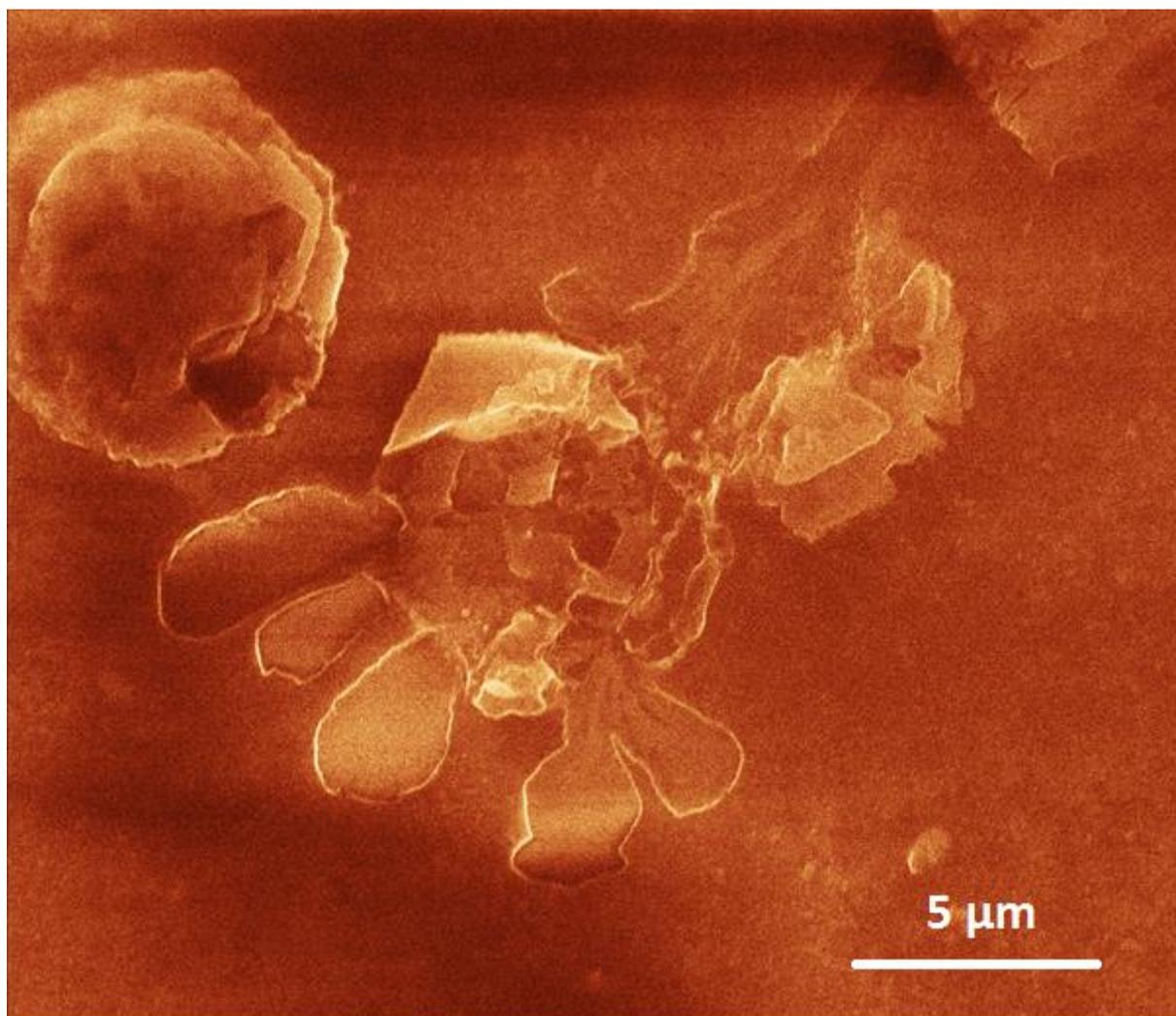


FIG. 4.44 Micrografia (MEV) de cristais completamente destruídos pelo feixe.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR):

As análises por FTIR foram realizadas com o objetivo de se determinar a natureza dos cristais observados nas amostras de AFM. Com auxílio de um microscópio óptico acoplado ao espectrômetro, foi possível realizar as medidas na região onde se encontrava a maior concentração de cristais. Foram analisadas quatro regiões com diferentes concentrações de

cristais (chamadas de regiões 1, 2, 3 e 4). Os espectros obtidos são muito semelhantes ao espectro da hidroxiapatita. Porém, as bandas que seriam características da hidroxiapatita parecem estar deslocadas. Era esperado o aparecimento das bandas de absorção referentes aos grupos PO_4^{3-} em 560 e 600 cm^{-1} , e também em 1000 e 1100 cm^{-1} . Devido ao aparecimento de bandas entre 800 e 900 cm^{-1} , pode-se supor que essas bandas sejam referentes a grupos CO_3^{2-} , que levaria a conclusão que a hidroxiapatita formada seja carbonatada. Segundo Drouet, C., 2013, esse deslocamento pode ser causado pelo baixo grau de cristalinidade observado em apatitas nanoestruturadas, além de quantidades limitadas de OH^- . Bandas que apareceriam isoladas em HA bem cristalizadas tendem a aparecer apenas em grupos em HA nanoestruturadas. Uma vez que as análises foram realizadas em cristais que estavam começando a nuclear, ou seja, com baixa grau de cristalinidade, esta hipótese parece levar ao entendimento correto do fenômeno. Deve-se levar em consideração também a dificuldade em realizar este ensaio com precisão por conta da localização dos cristais na amostra, assim como o fato de que a amostra não é constituída apenas de apatitas. Toda a matriz é constituída de alginato de cálcio, que é um material amorfo e está em maior quantidade na amostra e, possivelmente, há também a presença de potássio, originado do processo de síntese do material. Portanto, é esperado que os espectros apresentem diferenças em relação aos espectros das hidroxiapatitas puras e bem cristalizadas. As FIG. 4.45 – 4.48 são referentes aos espectros das regiões (aqui serão chamadas de regiões 1, 2, 3, e 4) onde foram realizadas as análises.

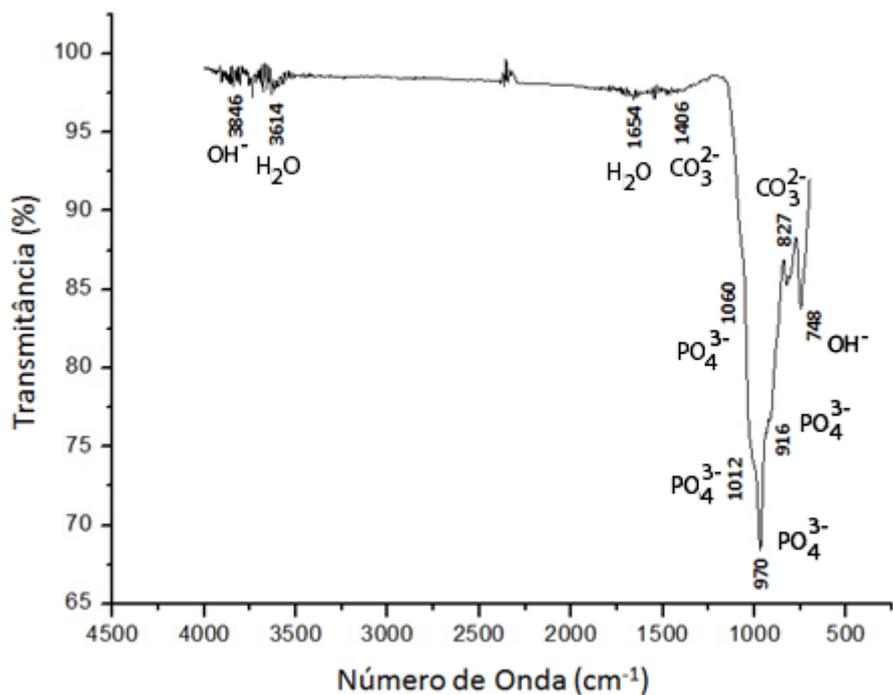


FIG. 4.45 FTIR da região 1.

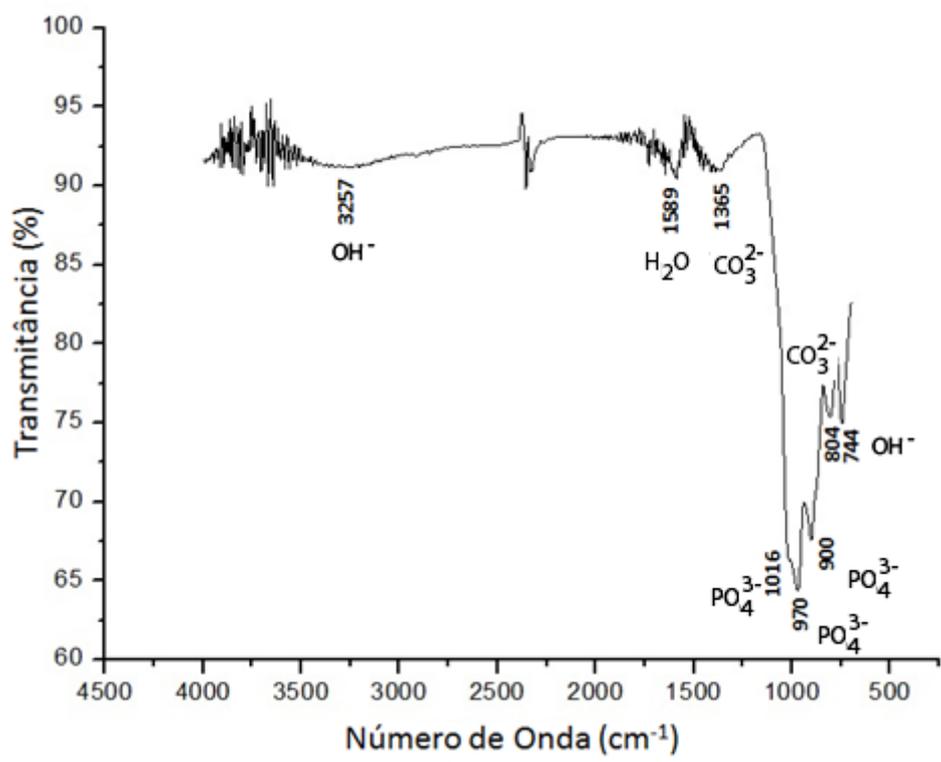


FIG. 4.46 FTIR da região 2.

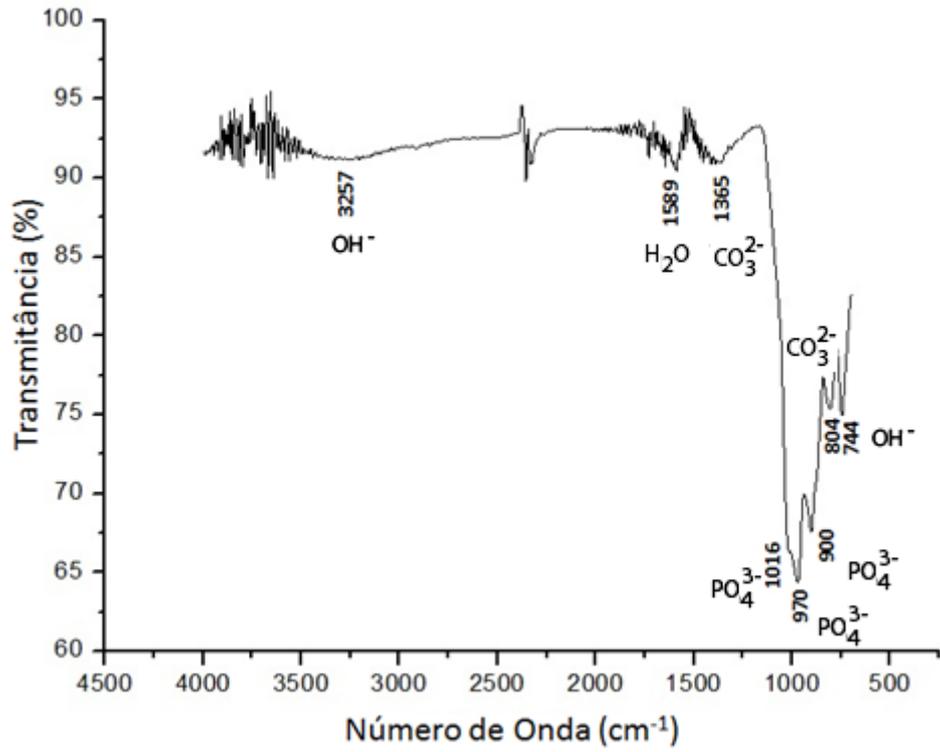


FIG. 4.47 FTIR da região 3.

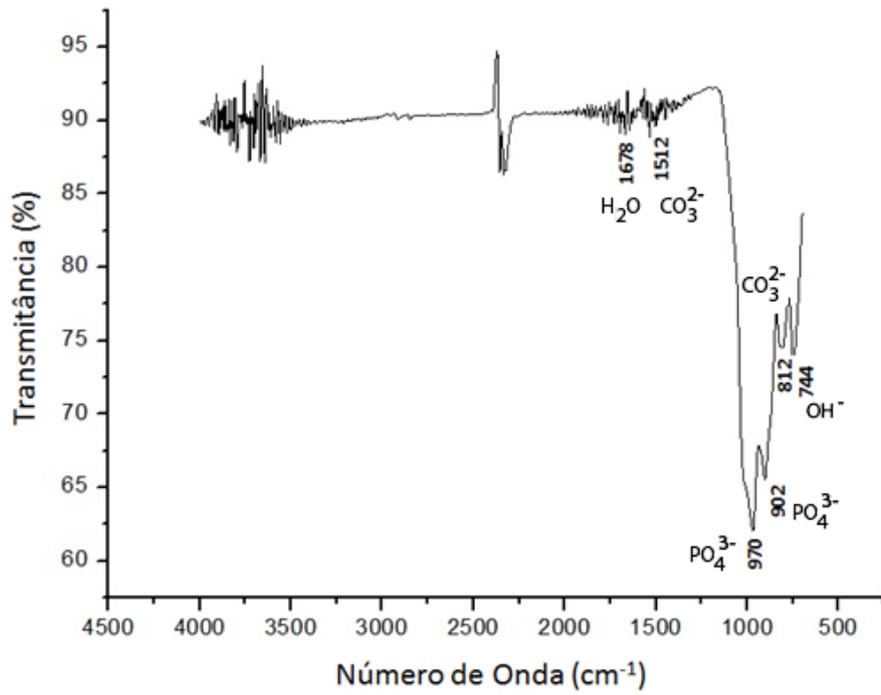


FIG. 4.48 FTIR da região 4.

5 CONCLUSÕES

Uma nova rota de encapsulamento de hidroxiapatita nanoestruturada em matriz de alginato foi proposta. A rota mais comumente utilizada sintetiza a hidroxiapatita separadamente do alginato e, somente depois da HA estar estruturada, o encapsulamento é realizado. Esta nova rota utiliza a própria solução precursora da hidroxiapatita para realizar a troca de catiônica com o alginato de sódio, resultando na reticulação do polímero na forma de alginato de cálcio, e consequente encapsulamento da HA. Diversos ensaios foram realizados para medir a eficiência da nova rota. As medidas de MEV permitiram verificar a precipitação de HA nanoestruturada, na forma de agulha, no interior das microesferas de alginato. As agulhas apresentaram dimensões e formas coerentes com a literatura. Também foram encontradas HA na forma de placas. Os dados de EDS das regiões de aglomerados - tanto agulhas quanto de placas - confirmaram a presença de Ca e P. A análise de MET possibilitou também a visualização de HA nanoestruturada com dimensões compatíveis com as encontradas nas análises de MEV. Também foi possível observar nanoesferas de alginato de cálcio de diferentes diâmetros na amostra. Os resultados de AFM permitiram estudar a topografia das amostras, assim como algumas propriedades mecânicas de forma qualitativa. Foram observadas nanoesferas de alginato de cálcio com diâmetros de até 80 nm. Também foram observados cristais hexagonais de apatita na fase de nucleação. Os cristais com maior grau de desorganização apresentaram altura média de 200 nm, enquanto os de maior grau de organização, 1,3 μm . Os cristais hexagonais apresentaram ângulos internos de 120° . Foram feitos mapas qualitativos de rigidez, dureza e adesão nos cristais. Com objetivo de determinar os grupos presentes nos cristais observados nas amostras de AFM, foram realizadas análises de FTIR nas regiões onde eles se encontravam em maior concentração. Foram feitas análises em quatro regiões diferentes. Os espectros obtidos foram muito semelhantes aos da hidroxiapatita, porém com deslocamento das bandas. Estes deslocamentos estão previstos na literatura e são associados, principalmente, ao grau de cristalinidade da amostra. O trabalho foi extremamente complicado de se realizar, principalmente na parte referente aos processos de caracterização e, a partir dos resultados é possível afirmar que a nova rota proposta para encapsulamento de HA em alginato foi executada com sucesso e o objetivo principal desta tese foi alcançado com êxito.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para continuidade do trabalho ou inovações para a área:

- Desenvolver um modelo matemático para a eficiência de encapsulamento da hidroxiapatita na matriz de alginato;
- Realizar o encapsulamento de HA misturada com outros compostos e comparar as propriedades obtidas;
- Estudar o comportamento *in vivo* e *in vitro* das esferas de alginato;
- Investigar mais profundamente a cinética de formação dos cristais hexagonais, assim como sua natureza e interação com outros materiais, via funcionalização de sondas de AFM.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAR SCIENTIFIC LTD., (2016).

AGUERO, L., **Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review**, Carbohydrate Polymers, (2017).

ANJANEYULU U, PRIYADARSHINI B, NIRMALA GRACE B VIJAYALAKSHMI U. **Fabrication and characterization of Ag doped hydroxyapatitepolyvinyl alcohol composite nanofibers and its in vitro biological evaluations for bone tissue engineering applications**. J Sol-Gel Sci Technol (2016);1:1-12.

BANERJEE A, BANDYOPADHYAY A, BOSE S. **Hydroxyapatite nanopowder synthesis, densification and cell-materials interaction**. Mater Sci Eng C, (2007), v. 27, p.729-35.

BENS-NISSAN, B.; PEZZOTTI, G. **Bioceramics: Processing Routes and Mechanical Evaluation**. Journal of the Ceramic of Japan, (2002), v. 110, n. 7, p. 601608.

BOISSESON, M.R.; LEONARD, M.; HUBERT, P.; MARCHAL, P.; STEQUEART, A.; CASTEL, C.; FAVRE, E.; DELLACHERIE, E. **Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: Bead formation, structure, and stability**. Journal of Colloid and Interface Science, (2004), 273, 131-1 39.

BRITANNICA, **Enciclopédia**, (2008) – adaptada.

BROWN, P.W., **Hydration behavior of calcium phosphates is analogous to Sj hydration behavior of calcium silicates**, Cement and Concrete Research, (1999), v. 29, n.8, pp. 1167-1171.

CAROZO, V. ; FRAGNEAUD, B. ; G. Cançado ; Almeida, C. ; BEDÊ, P. M. ; ARCHANJO, B. S. ; ACHETE, C. A. . **The role of interference and polarization effects in the optical visualization of carbon nanotubes..** *Journal of Applied Physics*, (2013), v. 113, p. 084314.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. **Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method.** *International Journal of Pharmaceutics*, (2002), 242 (1-2), 259-262.

CHAN, Y. L.; NGAN, A. H. W.; KING, N. M. **Use of focused ion beam milling for investigating the mechanical properties of biological tissues: A study of human primary molars.** *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, (2009), 2 (4), 375-383.

CHEN, Y., CHENG, C., **Studies of magnetic alginate-based electrospun matrices crosslinked with different methods for potential hyperthermia treatment,** *Materials Science & Engineering C*, 2016.

CHIA, S. RICKETTS. **Basic techniques and Experiments in Infrared and FTIR Spectroscopy**, (1984).

DIGITAL INSTRUMENTS, **NanoScope Command Reference Manual**, Santa Barbara - CA.

DOROZHKIN, SV. **Calcium orthophosphates – Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications.** *Biomaterials*, (2011), 1(2):121-64.

DROUET, C., **Apatite Formation: Why It May Not Work as Planned, and How to Conclusively Identify Apatite Compounds**, *BioMed Research International*, (2013).

DUTAA L, OKTAR FN, STANE GE, POPESCU-PELINA G, SERBANA N, LUCULESCUA C, MIHAILESCUA IN. **Novel doped hydroxyapatite thin films obtained by pulsed laser deposition.** *App Surf Scie* (2013);265:41–9.

EDMUNDS, H. L. **The Sangreal**. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, (1985), 90, 1-6.

ELLIOT, C. **Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry**, Elsevier Science, (1994),18.

FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. **Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies**. J. Applied Biomaterials & Biomechanics, (2004), v. 2, p. 74-80.

FINOTELLI, P. V., DA SILVA, D. ; SOLA-PENNA, M., ROSSI, A. M., FARINA, M. ANDRADE, L. R., TAKEUCHI, A. Y., ROCHA-LEAO, M.H.M., **Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin**. **Colloids and Surfaces, Biointerfaces**, (2010),v. 81, p. 206-211.

FINOTELLI, P. V. – Tese de Doutorado - **Microcápsulas de Alginato contendo Nanopartículas Magnéticas para Liberação Controlada de Insulina**. UFRJ, Instituto de Química, (2006).

GALLETTI, P.M.; BRECHER, G.A. **Heart-Lung Bypass. Principles and Techniques of Extracorporeal Circulation**. Grune & Stratton, New York, 1962.

GHORBANI FM, KAFFASHI B, SHOKROLLAHI P, SEYEDJAFARI E, ARDESHIRYLAJIMI A. **PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation**. Carbohydrate Polymers (2015);118:133-42.

HAO J, KURODA S, OHYA K, BARTAKOVA S, AOKI H, KASUGAI S. **Enhanced osteoblast and osteoclast responses to a thin film sputtered hydroxyapatite coating**. J Mater Sci: Mater Med (2011);22:1489–99.

HE G, GUO B, WANG H, LIANG C, YE L, LIN Y, CAI X. **Surface characterization and osteoblast response to a functionally graded hydroxyapatite/fluoro-hydroxyapatite/titanium oxide coating on titanium surface by sol–gel method.** Cell Prolif (2014);47:258–66.

HEIDARI F, BAHROLOLOOM ME, VASHAEE D, TAYEBI L. **In situ preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application.** Ceram Int 2015;41(2):3094-00.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to Bioceramics.** T ed., Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., (1993).

ILLIE, C., **New Composite Materials Based On Alginate And Hydroxyapatite As Potential Carriers For Ascorbic Acid,** International Journal of Pharmaceutics, (2016).

ISKAKOV, R.M.; KIKUCHI, A.; OKANO, T. **Time-programmed pulsatile release of dextran from calcium-alginate gel beads coated with carboxyn-propylacrylamide copolymers.** Journal of Controlled Release, (2002), 80: 57–68.

ISRAELACHIVILI, J., **Intermol. and Surf. Forces,** Academic Press, San Diego, (1992), p. 312.

JALILI, K.; ABBASI, F.; OSKOEI, S. S.; ALINEJAD, Z. **Relationships between The morphology, swelling and mechanical properties of poly(dimethyl siloxane)/poly (acrylic acid) interpenetrating networks.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, (2009) 2 (5), 534-541.

KALITA S. J., BHARDWAJ A.; BHATT H. A. **Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering.** Mater Sci Eng C, (2007), v. 27, p. 441-9.

KAWASHI, E. Y.; BERTRÁN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. **Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar**. Química Nova, (2000) v. 23, n. 4, p.518-522.

KIM, H. L., JUNG, G. Y., YOON, J. H., HAN, J. S., PARK, Y. J., KIM, D. G., KIM, D. J., **Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering**, Materials Science and Engineering C, (2015), 54, p. 20–25.

KULANTHAIVEL S, MISHRA U, AGARWAL T, GIRI S, PAL K, PRAMANIK K, BANERJEE I. **Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion**. Ceram Inter (2015);41:11323–33.

LANDI E, LOGROSCINO G, PROIETTI L, TAMPIERI A, SANDRI M, SPRIO S. **Biomimetic Mgsubstituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour**. J Mater Sci: Mater Med (2008);19(1):239-47.

LAURENT, S., DUTZ, S., **Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles**, Advances in Colloid and Interface Science, 166 (2011), 8-23.

LI, H., **Bioactive apatite incorporated alginate microspheres with sustained drugdelivery for bone regeneration application**, Materials Science & Engineering C, 2015.

LI, P., DAI, Y., ZHANG, J., WANG, A., WEI, Q., **Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine**, (2008), v. 4(3), p. 221-228.

- LIU, D. M. **Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine (1997) v. 8,p. 227-232.
- LU XY, QIU T, WANG XF, ZHANG M, GAO XL, LI RX, LU X, WENG J. **Preparation of foam-like carbon nanotubes/hydroxyapatite composite scaffolds with superparamagnetic properties**. App Surf Sci (2012);262:227-30.
- MA HB, SU WX, TAI ZX, SUN DF , YAN XB, LIU B, XUE QJ. **Preparation and cytocompatibility of polylactic acid/hydroxyapatite/ graphene oxide nanocomposite fibrous membrane**. Chinese Sci Bull (2012);57(23):3051-8.
- MAITY, S., **Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals—An *in vitro* and *in vivo* approach**, Carbohydrate Polymers, (2017).
- MALEKI-GHALE H, AGHAIE E, NADERNEZHAD A, ZARGARZADEH M, KHAKZAD A, SHAKERI MS, BEYGI KHOSROSHAHI Y, SIADATI MH. **Influence of Fe₃O₄ Nanoparticles in Hydroxyapatite Scaffolds on Proliferation of Primary Human Fibroblast Cells**. J Mater Eng Perform (2016);25(6):2331-9.
- MARTÍNEZ-VÁZQUEZ FJ, CABAÑAS MF, PARIS JL, LOZANO D, VALLET-REGÍ M. **Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration**. Acta Biomater (2015);15:200–9.
- MAVROPOULOS, E. **A hidroxiapatita como removedora de chumbo**. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia (1999), Rio de Janeiro.
- MEJIAS A, CANDIDATO JR RT, PAWŁOWSKI L, CHICOT D. **Mechanical properties by instrumented indentation of solution precursor plasma sprayed hydroxyapatite coatings:Analysis of microstructural effect**. Surf Coatings Technol (2016);298:93-102.

MORA-HUERTAS, C., FESSI, H., **Polymer-based nanocapsules for drug delivery**, International Journal of Pharmaceutics, (2010), v. 385, 113-142.

MURUGAN R.; RAMAKRISHNA S. **Development of nanocomposites for bone grafting**. Compos Sci Technol, (2005), v. 65, p. 2385-406.

NAIR M, NANCY D, KRISHNAN AG, ANJUSREE GS, VADUKUMPULLY S, NAIR SV. **Graphene oxide nanoflakes incorporated gelatin–hydroxyapatite scaffolds enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells**. Nanotechnology (2015);26: 161001 (10pp).

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN F.J.; LEMONS, J.E.: **An introduction to materials in medicine**, (2005), Academic Press, San Diego.

RAUCCI MG, GIUGLIANO D, ALVAREZ-PEREZ MA, AMBROSIO L. **Effects on growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by the strontium-added sol–gel hydroxyapatite gel materials**. J Mater Sci: Mater Med (2015) 26:90.

RICHARD, W., **Atomic Force Microscopy in Process Engineering**, Butterworth-Heinemann (2009).

RSC – THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, (2010).

SANDUKAS S, YAMAMOTO A AND RABIEI A. **Osteoblast adhesion to functionally graded hydroxyapatite coatings doped with silver**. J Biomed Mater Res A (2011);97A(4):490-7.

SHAHIN, V., LUDWIG, Y., SCHAFFER, C. NIKOVA, D., **Glucocorticoids remodel nuclear envelope structure and permeability**, J Cell Sci, (2005), 118, 2881-288.

- SHAO F., ANKUR T., DIANA M. S., RICCARDO L. B., IRA S. B., SACHIN V., ERIC J. M., LAWRENCE H. B., **Relevance of Rheological Properties of Sodium Alginate in Solution to Calcium Alginate Gel Properties**, AAPS PharmSciTech, (2011), v. 12, i. 2, pp 453-460.
- SHI Z., HUANG X., CAI Y., TANG R., YANG D., **Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells**, Acta Biomaterialia, (2009), 5, 338–345.
- S.R. QIU AND C. A. ORME, **Dynamics of biomineral formation at the near-molecular level**, Chemical Reviews, (2008), 108,4784-4822.
- WU, J., **Multi-drug delivery system based on alginate/calcium carbonate hybrid nanoparticles for combination chemotherapy**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (2014).
- WIESENDANGER, R., **Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy**. Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
- WILLIAMS, D. B. e CARTER, C. B., **Transmission electron microscopy: A textbook for materials science**. New York: Plenum Press (1996).
- YANG, J.; PARK, S.B.; HUH, Y.; HAAM, S. **Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier**. In. J. Pharm. (2006), In Press.
- YANG T, GE J, ASMATULU R, YANG S-Y. **Magnetically Inducible Nanocomposite Scaffolds for Improved Bone Regenerations**. Adv Sci Eng Med (2015);7(9):790-6.
- YUNAN Q, QIN C, WU J, XU A, ZHANG Z, LIAO J, LIN S, REN X, ZHANG P. **Synthesis and characterization of Cerium-doped hydroxyapatite/poly(lactic acid) composite coatings on metal substrate**. Mater Chem Phys (2016);182:324-32.

ZHAO, D.; ENG, X.; XIA, Q.; TANG, J. **Inductive heat property of Fe₃O₄ nanoparticles in AC magnetic field for local hyperthermia.** Rare Metals, (2006) V. 25, Spec. Issue, p .621.

ZHENG XB, HU H, XIE LQ, LAN F, JIANG W, WU Y, GU ZW. **Magnetic responsive hydroxyapatite composite scaffolds construction for bone defect reparation.** Int J Nanomed (2012);7:3365–78.

ZHOU K, DONG C, ZHANG X, SHI L, CHEN Z, XU Y, CAI H. **Preparation and characterization of nanosilver-doped porous hydroxyapatite scaffolds.** Ceram Int (2015);41(1):1671-76.