

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Estudo, caracterização e propriedades de ortofosfatos  
multifuncionais”**

**Thales Rafael Machado\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA  
INORGÂNICA.

**Orientador(a): Prof. Dr. Elson Longo da Silva**

**Coorientador(a): Profa. Dra. Eloisa Cordoncillo  
Prof. Dr. Héctor Beltrán-Mir**

**\* bolsista FAPESP Processo 2013/11144-3**

**São Carlos – SP  
2016**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

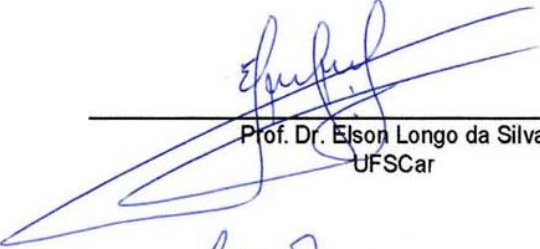
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

### Folha de Aprovação

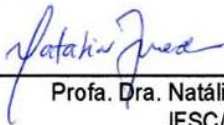
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Thales Rafael Machado, realizada em 28/10/2016:




---

Prof. Dr. Elson Longo da Silva  
UFSCar



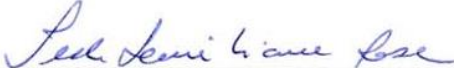
---

Profa. Dra. Natália Mayumi Inada  
IFSC/USP




---

Prof. Dr. Máximo Siu Li  
IFSC/USP



---

Profa. Dra. Ieda Lucia Viana Rosa  
UFSCar



---

Profa. Dra. Lúcia Helena Mascaro Sales  
UFSCar

*Aos meus pais Ivo e Clarice e minha irmã Thalita,  
muito obrigado por tudo, eu amo vocês...*

*...in memoriam de Augusto Celso Antunes e Purificación Escribano...*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos:

- a Deus por sempre me guiar nos momentos de alegria e de maiores dificuldades, dando-me saúde e força para seguir adiante;
- à minha família, pelo apoio e incentivo ao longo de minha formação pessoal e profissional. Sem vocês, não sou absolutamente ninguém;
- ao Prof. Dr. Elson Longo, orientador da presente tese, pelos valiosos ensinamentos, motivação, confiança e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa;
- à Profa. Dra. Eloísa Cordoncillo e ao Prof. Dr. Héctor Beltrán-Mir, professores da Universitat Jaume I e coorientadores deste trabalho, pela expressiva contribuição no meu crescimento profissional;
- à FAPESP pelo auxílio financeiro (processo 2013/11144-3);
- aos membros da banca pelas futuras contribuições;
- à Profa. Dra. Sandra Regina Masetto Antunes por sempre ter me incentivado a trabalhar em pesquisa científica;
- ao Prof. Dr. Juan Andrés e ao Prof. Dr. Juan Carda por todo o apoio e incentivo no desenvolvimento da pesquisa;
- ao Prof. Dr. Edson Roberto Leite pelo auxílio na realização do trabalho;
- ao Prof. Dr. Joaquin Fernández e à Profa. Dra. Rolíndes Balda por todo o auxílio nas medidas de TRFLN;
- ao Prof. Dr. Vanderlei Bagnato por receber de portas abertas no CEPOF para a realização dos ensaios biológicos e ópticos. À Ma. Ilaiáli Leite pelos ensaios, discussões e, principalmente, pela amizade;
- a Alliny Tiemi Otaguiri, por todo o afeto, apoio pessoal e profissional;
- ao Dr. Júlio Cesar Sczancoski, pela amizade e auxílio na pesquisa;
- à Profa. Dra. Içamira Nogueira pelas análises de refinamento *Rietveld*;
- ao Prof. Dr. Joaquim Nóbrega e ao Dr. Alex Virgílio pelas medidas de ICP-AES;
- ao Prof. Dr. Valmor Mastelaro e a Nathaly Colmenares pelas medidas de XPS;
- a Tiago Martins, Moises Albuquerque, Mateus Ferrer, Geisiane Rocha, Pablo Lemos, Mario Rodrigo, Andressa Kubo, Dyovani Coelho, Rafael Zornitta, Tássia Oliveira, Wyllamanney Silva, Gleice Botelho, Marc Jovaní, Lívio Ferrazza, María Domingo, Miriam Cabello, Verónica de la Luz, Marta Prades Tena e aos demais amigos pelo auxílio em tarefas laborais e também pelo companheirismo;

- à equipe do CDMF, professores, alunos, funcionários e técnicos presentes em todos os momentos. Em especial, agradeço a Maria Madalena Turssi e Rorivaldo Camargo pelas contribuições com as medidas de difração de Raios X e microscopia eletrônica, e a Daniela Caceta Armelin e Luma Garcia pela ajuda na área administrativa;
- à UFSCar pelas condições ideais de trabalho e à UJI pela disponibilidade de uso da infraestrutura;
- aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSCar e do Departamento de Química Inorgánica y Orgánica da UJI que permitiram que a realização desta tese fosse possível;
- às grandes amizades construídas nestes últimos anos e a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### Artigos publicados

1. MARTINS, T. A. ; **MACHADO, T. R.** ; FERRER, M. M. ; ZANETTI, S. M. ; LONGO, E. Facile microwave-assisted hydrothermal synthesis of hexagonal sodium tungsten bronze and its high response to NO<sub>2</sub>. *Materials Letters*, v. 185, p. 197-200, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.08.126>
2. JOVANI, M. ; DOMINGO, M. ; **MACHADO, T. R.** ; LONGO, E. ; BELTRAN-MIR, H. ; CORDONCILLO, E. Pigments based on Cr and Sb doped TiO<sub>2</sub> prepared by microemulsion-mediated solvothermal synthesis for inkjet printing on ceramics. *Dyes and Pigments*, v. 116, p. 106-113, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2015.01.016>

### Artigos em fase de submissão

1. **MACHADO, T. R.** ; SCZANCOSKI, J. C. ; BELTRÁN-MIR, H. ; NOGUEIRA, I. C. ; LI, M. S. ; ANDRÉS, J. ; CORDONCILLO, E. ; LONGO, E. A novel approach to obtain highly intense self-activated photoluminescence emissions in hydroxyapatite nanoparticles.
2. **MACHADO, T. R.** ; SCZANCOSKI, J. C. ; BELTRÁN-MIR, H. ; LI, M. S. ; ANDRÉS, J. ; CORDONCILLO, E. ; LONGO, E. Structural properties and self-activated photoluminescence emissions in hydroxyapatite particles with distinct shapes synthesized via chemical precipitation.
3. **MACHADO, T. R.** ; LONGO, E. ; BELTRAN-MIR, H. ; BALDA, R. ; FERNANDEZ, J. ; ANDRÉS, J. M. ; CORDONCILLO, E. Thermally induced site-selection of Eu<sup>3+</sup> in hydroxyapatite powders.
4. **MACHADO, T. R.** ; JOVANI, M. ; LONGO, E. ; BELTRÁN-MIR, H. ; CORDONCILLO, E. Colorimetric properties of Cu<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> co-substituted calcium phosphates and their potential application as new pigments for ceramics, polymers and glasses.

## Resumos publicados em anais de congressos e participação em eventos

- 1. MACHADO, T. R.** ; CORDONCILLO, E. ; BELTRÁN-MIR, H. ; LI, M. S. ; LONGO, E. Mechanisms involved in self-activated luminescence of hydroxyapatite nanoparticles. In: XIV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em materiais (SBPMat), 2015, Rio de Janeiro, Brasil.
- 2. MACHADO, T. R.** ; LONGO, E. ; BELTRÁN-MIR, H. ; BALDA, R. ; FERNANDEZ, J. ; CORDONCILLO, E. Study of Eu(III) distribution in poorly- and well-crystallized domains of hydroxyapatite particles using site-selective excitation. In: XIV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em materiais (SBPMat), 2015, Rio de Janeiro, Brasil.
- 3. MARTINS, T. A.** ; **MACHADO, T. R.** ; FERRER, M. M. ; ZANETTI, S. M. ; LONGO, E. Synthesis and gas sensing of hexagonal WO<sub>3</sub> prepared via microwave-assisted hydrothermal. In: XIV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em materiais (SBPMat), 2015, Rio de Janeiro, Brasil.
- 4. MACHADO, T. R.** ; LONGO, E. ; BELTRAN-MIR, H. ; JOVANI, M. ; BALDA, R. ; FERNANDEZ, J. ; CORDONCILLO, E. . Photoluminescence Properties of Eu(III)-Doped Hydroxyapatite. In: 5th International Workshop on Photoluminescence in Rare Earths PRE'14, 2014, San Sebastian, Espanha. 5th International Workshop on Photoluminescence in Rare Earths PRE'14, 2014.
- 5. MACHADO, T. R.** ; LONGO, E. ; BELTRAN-MIR, H. ; BALDA, R. ; FERNANDEZ, J. ; CORDONCILLO, E. . Synthesis and Characterization of Eu(III)-Doped Hydroxyapatite: Photoluminescence Properties and Occupational Preferences. In: VIII Rencontre Franco-Espagnole Chimie et Physique de L'etat Solide, 2014, Vila-Real, Espanha.
- 6. JOVANI, M.** ; DOMINGO, M. ; **MACHADO, T. R.** ; BELTRAN-MIR, H. ; CORDONCILLO, E. . Estudio de nano-pigmentos basados en TiO<sub>2</sub> dopado con Cr y Sb para su aplicación en tecnología inkjet. In: VIII Rencontre Franco-Espagnole Chimie et Physique de L'etat Solide, 2014, Vila-Real, Espanha.
- 7. JOVANI, M.** ; DOMINGO, M. ; **MACHADO, T. R.** ; BELTRAN-MIR, H. ; CORDONCILLO, E. Estudio del Nanopigmento Ocre Basado em el Sistema Cr,Sb-TiO<sub>2</sub> para su Aplicación en Impresoras de Chorro de Tinta (Tecnología Inkjet). In: QIES 2014. 10<sup>a</sup> Reunión Biental del Grupo Especializado en Química del Estado Sólido de la RSEQ, 2014, Castellón, Espanha.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

### Símbolos e abreviações (Maiúsculos)

A549	Linhagem celular de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
BC	Banda de condução
BCP	Fosfato(s) de cálcio bifásico(s)
Bel-7402	Linhagem de células humanas de câncer de fígado
BV	Banda de valência
$C_3$	Tipo de grupo pontual de simetria
$C_{6h}$	Tipo de grupo pontual de simetria
Ca-dHA	Hidroxiapatita deficiente em cálcio
Capan-1	Linhagem de células humanas de câncer de pâncreas
CEPOF	Centro de pesquisa em óptica e fotônica
CIA	Cloroapatita
CIHA	Hidroxiapatita onde os grupos $\text{OH}^-$ foram parcialmente substituídos por $\text{Cl}^-$
Cs	Tipo de grupo pontual de simetria
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamonio
DMEM	Meio de cultivo <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios X
DTG	Termogravimetria derivada
$E$	Energia de um fóton
EDS	Energia dispersiva de raios X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
$E_g$	Energia(s) de <i>band gap</i>
Eu(A)	Sítio para a espécie $\text{Eu}^{3+}$ na estrutura cristalina da hidroxiapatita
Eu(B)	Sítio para a espécie $\text{Eu}^{3+}$ na estrutura cristalina da hidroxiapatita
Eu(C)	Sítio para a espécie $\text{Eu}^{3+}$ na estrutura cristalina da hidroxiapatita
$F(R^\infty)$	Função de reflectância
FA	Fluorapatita
FHA	Hidroxiapatita onde grupos $\text{OH}^-$ foram parcialmente substituídos por $\text{F}^-$



FL	Fotoluminescente(s) ou fotoluminescência
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GSAS	<i>General structure analysis system</i>
HA	Hidroxiapatita
HA_AL	Amostra de hidroxiapatita sintetizada em meio ácido com mistura lenta (0,15 mL/min) dos precursores usando bomba de injeção
HA_AM	Amostra de hidroxiapatita sintetizada em meio ácido com mistura média (7,00 mL/min) dos precursores usando bomba peristáltica
HA_AR	Amostra de hidroxiapatita sintetizada em meio ácido com mistura rápida (600,00 mL/min) dos precursores por vertida
HA_BL	Amostra de hidroxiapatita sintetizada em meio básico com mistura lenta (0,15 mL/min) dos precursores usando bomba de injeção
HA_BM	Amostra de hidroxiapatita sintetizada em meio básico com mistura média (7,00 mL/min) dos precursores usando bomba peristáltica
HA_BR	Amostra de hidroxiapatita sintetizada em meio básico com mistura rápida (600,00 mL/min) dos precursores por vertida
HA1100Q	Amostra de hidroxiapatita tratada termicamente a 1100 °C seguido de “ <i>quenching</i> ” térmico em N <sub>2</sub> líquido
HA1100S	Amostra de hidroxiapatita tratada termicamente a 1100 °C
HA600S	Amostra de hidroxiapatita tratada termicamente a 600 °C
HAEu	Hidroxiapatita dopada com Eu <sup>3+</sup>
HAEu1100Q	Amostra de hidroxiapatita dopada com Eu <sup>3+</sup> tratada termicamente a 1100 °C seguido de <i>quenching</i> térmico em N <sub>2</sub> líquido
HAEu1100S	Amostra de hidroxiapatita dopada com Eu <sup>3+</sup> tratada termicamente a 1100 °C
HAEu600S	Amostra de hidroxiapatita dopada com Eu <sup>3+</sup> tratada termicamente a 600 °C
HAEuRaw	Amostra de hidroxiapatita dopada com Eu <sup>3+</sup> precipitada quimicamente
HARaw	Amostra de hidroxiapatita precipitada quimicamente
HEK293	Linhagem de células humanas embrionárias de rim
HeLa	Linhagem de células humanas de câncer cervical
HDFn	Fibroblasto dérmico neonatal humano
I <sub>300</sub>	Intensidade do pico de difração (300) da hidroxiapatita

ICP-AES	Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente
ICSD	<i>Inorganic Crystal Structure Data</i>
IFSC	Instituto de física de São Carlos
IO	Imagem óptica
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Momento angular total
<i>L</i>	Momento angular orbital
LIEC	Laboratório interdisciplinar de eletroquímica e cerâmica
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OA	Oxoapatita
OCP	Fosfato octacálcico
OHA	Oxohidroxiapatita
<i>P1</i>	Grupo espacial do fosfato octacálcico triclinico
<i>P2<sub>1</sub>/b</i>	Grupo espacial da hidroxiapatita monoclinica
<i>P6<sub>3</sub>/m</i>	Grupo espacial da hidroxiapatita hexagonal
PBS	Tampão fosfato salino
Ppt	Amostra de hidroxiapatita precipitada quimicamente
R	RAMAN
$R^\infty$	Reflectância difusa
$R_{bragg}$	Fator esperado
$R_p$	Fator de perfil
$R_{wp}$	Fator de perfil ponderado
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Spin eletrônico
SAED	Difração de elétrons de área selecionada
SFB	Soro fetal bovino
TC	Tomografia computadorizada
$T_d$	Tipo de grupo pontual de simetria
TG	Análise termogravimétrica
TRFLN	Fluorescência de estreitamento de linha resolvida no tempo
USP	Universidade de São Paulo

UV-Vis	Espectroscopia óptica na região ultravioleta-visível
$V_{112/300}$	Intensidade da abertura entre os picos de difração (112) e (300) da hidroxiapatita
$V_{Ca}$	Vacância iônica ou intersticial de cálcio
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
$Y_{cal}$	Padrão de difração calculado
$Y_{obs}$	Padrão de difração observado

### Símbolos e abreviações (Minúsculos)

$a$	Parâmetro de rede
$b$	Parâmetro de rede
$c$	Parâmetro de rede
$e^-$	Elétron
$e^-h^\bullet$	Par elétron-buraco
$h$	Constante de <i>Planck</i>
$h^\bullet$	Buraco
$h\nu$	Energia do fóton
$k$	Comprimento de onda da radiação utilizada no equipamento de difração de raios X
$n$	Variável dependente do tipo de transição eletrônica
pH	Potencial hidrogeniônico
pV-TCH	Função <i>Thompson-Cox-Hastings-pseudo-Voigt</i>
$x$	Coordenada cartesiana
$y$	Coordenada cartesiana

### Símbolos gregos

$2\theta$	Ângulo de <i>Bragg</i>
$\alpha$	Coeficiente de absorção
$\beta$	Largura à meia altura de pico de difração de raios X
$\beta$ -TCP	Fase cristalina do fosfato de tricálcio
$\epsilon$	Coeficiente de absorção molar
$\lambda$	Comprimento de onda
$\nu$	Frequência de vibração
$\nu_1$	Modo vibracional

$\nu_2$	Modo vibracional
$\nu_3$	Modo vibracional
$\nu_4$	Modo vibracional
$\chi^2$	Índice de convergência ou preciso do ajuste do difratograma
$\chi_c$	Fração de fase cristalina
$\chi_s$	Tamanho de domínio de coerência cristalográfica

## LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – Ortofosfatos de cálcio e suas propriedades (adaptado de [2]).....	9
TABELA 2.2 – Número de níveis <i>Stark</i> permitidos teoricamente para a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ ( $J = 0-6$ ) dos íons $\text{Eu}^{3+}$ alocados em clusters de coordenação com distintas simetrias e grupos pontuais (adaptado de [132]).....	36
TABELA 3.1 – Reagentes químicos utilizados na preparação das amostras de HA.	39
TABELA 3.2 – Equipamentos utilizados na obtenção dos pós de HA.....	40
TABELA 3.3 – Parâmetros selecionados para conduzir a mistura dos precursores e o pH final resultante.....	41
TABELA 3.4 – Parâmetros utilizados para a preparação das soluções com o precursor de $\text{Ca}^{2+}$ .....	44
TABELA 3.5 – Parâmetros utilizados para a preparação das soluções com o precursor de $\text{H}_x\text{PO}_4^{x-3}$ .....	45
TABELA 3.6 – Amostras precipitadas e condições de tratamentos térmicos utilizadas para o estudo da HA dopada com $\text{Eu}^{3+}$ .....	47
TABELA 3.7 – Parâmetros operacionais da medida por ICP-AES.....	51
TABELA 4.1 – Resultado composicional obtido por ICP-AES para as amostras preparadas.....	63
TABELA 4.2 – Valor de $\chi_s$ em distintas direções cristalográficas para as amostras preparadas.....	65
TABELA 4.3 – Modos vibracionais internos teóricos para o <i>cluster</i> $[\text{PO}_4]$ na HA estequiométrica. Os modos ativos no infravermelho são representados por IV e no Raman por R [33].....	66
TABELA 4.4 – Modos vibracionais observados no FTIR e Raman para as amostras preparadas em pH básico.....	69
TABELA 4.5 – Modos vibracionais observados no FTIR e Raman para as amostras preparadas sem controle de pH.....	71
TABELA 4.6 – Morfologias obtidas para cada amostra e suas respectivas dimensões aproximadas.....	73
TABELA 4.7 – Dados dos ajustes das emissões obtidas após excitar as amostras a 350 nm.....	90
TABELA 4.8 – Dados dos ajustes das emissões após excitar as amostras a 415 nm.....	90
TABELA 5.1 – Indicadores da qualidade dos refinamentos de <i>Rietveld</i> .....	103

<b>TABELA 5.2</b> – Espécies presentes em amostras de HA obtidas por precipitação aquosa.....	104
<b>TABELA 5.3</b> – Principais reações na rede da HA em função da temperatura.....	107
<b>TABELA 5.4</b> – Energias de ligação obtidas através da deconvolução dos espectros XPS em alta resolução das amostras do presente estudo comparado com dados da fase HA presentes na literatura.....	115
<b>TABELA 6.1</b> – Tempos de vida para o nível $^5D_0$ obtidos pela excitação a 573,8 nm, 577,4 nm e 579,2 nm e coletando a luminescência da emissão $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ para a amostra HAEu600S, HAEu1100S e HAEu1100Q .....	147

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1** – Exemplos de biocerâmicas a base ortofosfatos de cálcio comercialmente disponíveis [20]..... 8
- FIGURA 2.2** – Representação esquemática de uma cela unitária hexagonal de HA e os clusters de coordenação nela presentes (adaptado de [36])..... 11
- FIGURA 2.3** – (a) Visualização do padrão hexagonal da cela unitária da HA desde a direção [001] e (b) triângulos de Ca(2) e oxigênios ao redor do eixo-c formando canais hexagonais com as hidroxilas no seu interior (adaptado de [38,39])..... 13
- FIGURA 2.4** – Diagrama em forma de “cebola” representando algumas das possíveis substituições nas apatitas. No centro, encontram-se as distintas apatitas em função do contraíon OH<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> e Cl<sup>-</sup>. A primeira camada contém substituições aniônicas possíveis para a HA. Já as três camadas exteriores representam as substituições catiônicas monovalentes, divalentes e trivalentes. Estas substituições encontram-se ordenadas de maneira aproximada e decrescente no sentido das flechas presentes na ilustração em função da habilidade de substituição (adaptado de [45]). FHA e CIHA consistem em HA onde os grupos OH<sup>-</sup> foram parcialmente substituídos por F<sup>-</sup> e Cl<sup>-</sup>, respectivamente..... 14
- FIGURA 2.5** – Estrutura cristalina da bioapatita. Padrões de difração de raios X e espectros na região do infravermelho referentes ao esmalte dentário, dentina e ossos humanos (adaptado de [5]). □ = Vacância em Ca..... 18
- FIGURA 2.6** – Marcadores luminescentes utilizados para obter propriedades ópticas melhoradas na HA [6]..... 20
- FIGURA 2.7** – Imagens ilustrando o *uptake* de nanopartículas de HA dopada com Eu<sup>3+</sup> (15 % molar) (a–c) ou HA dopada com Tb<sup>3+</sup> (5 % molar) (d–f) em células A549. (a e d) imagens obtidas usando microscopia de transmissão de luz, (b e e), microscopia confocal e (c e f) sobreposição de ambas micrografias (adaptado de [12])..... 21
- FIGURA 2.8** – Procedimento experimental do processo de carregamento e liberação de Ibuprofeno em HAEu junto das correspondentes pastilhas do sistema fotografadas sobre irradiação de lâmpada UV com  $\lambda_{max} = 365$  nm (adaptado de [11])..... 22
- FIGURA 2.9** – (a) Espectro de FL, (b) fotografia das amostras de HA excitadas em 377 nm depois de imersas em ácido acético por 0 h, 3 h, 12 h, 24 h, respectivamente; (c) liberação de fosfato depois da imersão em ácido acético por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h (adaptado de [9])..... 23
- FIGURA 2.10** – Representação do espectro eletromagnético [113]..... 27

<b>FIGURA 2.11</b> – Esquema de processos de excitação e emissão de FL [114].....	29
<b>FIGURA 2.12</b> – Modelo esquemático de bandas para materiais (adaptado de [116]).	30
<b>FIGURA 2.13</b> – Modelo de banda larga para semicondutores (adaptado de [123])..	31
<b>FIGURA 2.14</b> – Níveis de energia das configurações $4f^n$ dos íons lantanídeos trivalentes (adaptado de [125]).....	32
<b>FIGURA 3.1</b> – Esquema de montagem dos equipamentos utilizados para a síntese com bomba de injeção.....	42
<b>FIGURA 3.2</b> – Esquema de montagem dos equipamentos utilizados para a síntese com bomba peristáltica.....	43
<b>FIGURA 3.3</b> – Esquema de montagem dos equipamentos utilizados para a síntese por vertida.....	44
<b>FIGURA 3.4</b> – (a) Forno utilizado para a realização dos tratamentos térmicos e, (b) representação geral do ciclo empregado. 1 = rampa de aquecimento, 2 = patamar de permanência e 3 = etapa de resfriamento.....	46
<b>FIGURA 3.5</b> – (a) Forno utilizado para a realização dos tratamentos térmicos. Representação geral do ciclo empregado para as amostras tratadas termicamente a (b) 600 °C, e (c) a 1100 °C com resfriamento sem controle de temperatura ou com <i>quenching</i> térmico em N <sub>2</sub> líquido.....	48
<b>FIGURA 4.1</b> – Padrões de DRX para as amostras preparadas em distintas condições de síntese. Os padrões em verde remetem às amostras preparadas sem controle de pH e em marrom às preparadas em pH entre 9,5–10,0.....	64
<b>FIGURA 4.2</b> – Representações dos valores encontrados para $\chi_s$ em distintas direções (a) e a razão entre as mesmas (b).....	65
<b>FIGURA 4.3</b> – Espectros de FTIR para as amostras preparadas. As linhas em verde remetem a amostras preparadas sem controle de pH e as em marrom são referidas a amostras preparadas em pH básico.....	67
<b>FIGURA 4.4</b> – Espectros Raman para as amostras preparadas em distintos valores de pH e velocidades de adição do precursor de fosfato.....	68
<b>FIGURA 4.5</b> – Micrografias obtidas por MEV para as amostras preparadas em pH básico. (a) amostra HA_BL com adição a 0,15 mL/min do precursor de fosfato e menor supersaturação, (b) amostra HA_BM com adição a 7,00 mL/min do precursor e, (c) amostra HA_BR com adição a 600 mL/min do precursor de fosfato. Micrografias obtidas por MEV para as amostras preparadas sem controle de pH. (d) amostra HA_AL com adição a 0,15 mL/min do precursor de fosfato e menor supersaturação, (e) amostra HA_AM com adição a 7,00 mL/min do precursor e, (f) amostra HA_AR com adição a 600 mL/min do precursor de fosfato.....	73



<b>FIGURA 4.6</b> – Esquema geral das condições de síntese estudadas, as morfologias obtidas e a ampliação da região mais importante dos padrões de DRX com distintas resoluções dos picos relacionadas a variações no ordenamento a longo alcance.....	74
<b>FIGURA 4.7</b> – Mecanismo de formação das nanopartículas com forma de arroz na amostra HA_BR.....	76
<b>FIGURA 4.8</b> – Mecanismo de formação das nanopartículas com forma de bastão na amostra HA_BM.....	77
<b>FIGURA 4.9</b> – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de bastão hexagonal na amostra HA_BL.....	78
<b>FIGURA 4.10</b> – Relação entre os métodos de adição do precursor de fosfato nas amostras preparadas em pH básico. Destaca-se a variação das morfologias obtidas e os processos de aglomeração e coalescência.....	79
<b>FIGURA 4.11</b> – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de fita e agulha na amostra HA_AR.....	81
<b>FIGURA 4.12</b> – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de fita e agulha na amostra HA_AM.....	81
<b>FIGURA 4.13</b> – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de fita e agulha na amostra HA_AL.....	82
<b>FIGURA 4.14</b> – Modelo baseado na notação de <i>Kröger-Vink</i> para o processo de polarização da rede da HA. (a) clusters ordenados da estrutura da HA, (b–d) mecanismos de formação de vacâncias em Ca.....	84
<b>FIGURA 4.15</b> – Espectros UV-Vis para as amostras preparadas por precipitação química em distintas condições experimentais.....	85
<b>FIGURA 4.16</b> – Espectros de emissão obtidos ao excitar em 350 e 415 nm as amostras preparadas nas distintas condições de síntese.....	87
<b>FIGURA 4.17</b> – Ajustes dos espectros de emissão obtidos ao excitar em 350 nm as amostras sintetizadas.....	89
<b>FIGURA 4.18</b> – Ajustes dos espectros de emissão obtidos ao excitar em 415 nm as amostras precipitadas em distintas condições.....	89
<b>FIGURA 4.19</b> – (a) Esquema da estrutura de bandas das amostras de HA, (b) processo de excitação (formação de pares $e'-h^*$ ), e (c) processo de recombinação dos pares $e'-h^*$ , resultando na emissão de FL ( $h\nu > h\nu'$ ).....	92
<b>FIGURA 5.1</b> – Curvas TG/DTG da amostra de HA sintetizada por precipitação química. (a) DTG, e (b) TG.....	97

- FIGURA 5.2** – Análise estrutural por DRX. (a) Difratoograma completo medido no intervalo de 20–70° 2 $\theta$ . Magnificações na regiões correspondentes aos planos (b) (002), (c) (211)/(112), e (d) (112)/(300)..... 99
- FIGURA 5.3** – Representações gráficas ilustrando os valores obtidos para: (a)  $\chi_c$ , (b)  $\chi_s$ , e (c)  $\chi_{s(002)}/\chi_{s(300)}$ ..... 100
- FIGURA 5.4** – Refinamento *Rietveld* da amostra precipitada (Ppt) e tratada termicamente nas distintas temperaturas estudadas..... 102
- FIGURA 5.5** – Parâmetros de rede e volume de cela unitária obtidos pelo refinamento *Rietveld* das amostras. (a) Parâmetro a, (b) parâmetro c, e (c) volume de cela unitária..... 103
- FIGURA 5.6** – Caracterização estrutural das amostras de HA por espectroscopia FTIR. (a) Região com os principais modos entre 1300–400 cm<sup>-1</sup>, (b) magnificação entre 3700–2700 cm<sup>-1</sup>, e (c) razão de intensidades OH/PO<sub>4</sub>. 110
- FIGURA 5.7** – Espectros de FTIR ilustrando a presença de bandas de espécies presas na rede cristalina da HA. (a) região entre 1800–1200 cm<sup>-1</sup>, e (b) entre 900–700 cm<sup>-1</sup>..... 111
- FIGURA 5.8** – Espectros de XPS das amostras de HA precipitada quimicamente e tratada em diferentes temperaturas..... 112
- FIGURA 5.9** – Espectros XPS de alta-resolução do P2p. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C..... 113
- FIGURA 5.10** – Espectros XPS de alta-resolução do Ca2p. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C..... 113
- FIGURA 5.11** – Espectros XPS de alta-resolução do O1s. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C..... 114
- FIGURA 5.12** – Espectros XPS de alta-resolução do C1s. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C..... 114
- FIGURA 5.13** – Micrografias obtidas por MEV para as distintas amostras estudadas. (a) Ppt, (b) 200 °C, (c) 300 °C, (d) 350 °C, (e) 400 °C, (f) 450 °C, (g) 500 °C, (h) 600 °C, e (i) 800 °C..... 113
- FIGURA 5.14** – Estimativa do tamanho de partícula para a amostra de HA precipitada e tratada termicamente. (a) Largura da partícula, e (b) comprimento da partícula..... 118
- FIGURA 5.15** – Valores de largura e comprimento da partícula em função da temperatura de tratamento térmico..... 118
- FIGURA 5.16** – Análise realizada por MET para as distintas amostras de HA. (a + b) Ppt, micrografia em baixa magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução, (c + d) 350 °C, micrografia em baixa

- magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução, (e + f) 400 °C, micrografia em baixa magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução, e (g + h) 800 °C, micrografia em baixa magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução..... 119
- FIGURA 5.17** – Espectros de UV-Vis obtidos para a amostra de HA Ppt e após a realização dos tratamentos térmicos a 200, 300, 350, 400, 450, 500, 600 e 800 °C..... 121
- FIGURA 5.18** – Valor de  $E_g$  para a amostra de HA Ppt e após a realização dos tratamentos térmicos a 200, 300, 350, 400, 450, 500, 600 e 800 °C..... 122
- FIGURA 5.19** – Comportamento óptico das amostras de HA em função da temperatura de tratamento térmico. Espectros de emissão ao excitar as amostras com  $\lambda_{exc} = 350$  nm. (a) Espectro não normalizado e imagens digitais mostrando a emissão das amostras no momento da excitação, e (b) espectros de emissão normalizados..... 123
- FIGURA 5.20** – Espectros de emissão das amostras tratadas a distintas temperaturas ao excitar em  $\lambda_{exc} = 350$  nm. (a) Ppt, (b) 200 °C, (c) 300 °C, (d) 350 °C, (e) 400 °C, (f) 450 °C, (g) 500 °C, (h) 600 °C, e (i) 800 °C..... 124
- FIGURA 5.21** – Centro das emissões da HA em função da temperatura de tratamento térmico..... 125
- FIGURA 5.22** – Esquema geral dos resultados obtidos no presente estudo. Resumo das modificações estruturais em função da temperatura (esquerda) dentro da faixa estudada (90–800 °C) e modelo proposto para a recombinação par  $e'-h^*$  na estrutura eletrônica da HA seguindo o modelo da banda larga para a FL (direita)..... 128
- FIGURA 6.1** – Padrões de DRX para a amostra de HA dopada com  $Eu^{3+}$  preparada por precipitação a 90 °C (HAEuRaw), após tratamento térmico a 600 °C (HAEu600S), 1100 °C (HAEu1100S) e 1100 °C com resfriamento rápido em  $N_2$  líquido (HAEu1100Q)..... 133
- FIGURA 6.2** – Padrões de DRX para a amostra de HA pura preparada por precipitação a 90 °C (HARaw), após tratamento térmico a 600 °C (HA600S), 1100 °C (HA1100S) e 1100 °C com resfriamento rápido em  $N_2$  líquido (HA1100Q)..... 134
- FIGURA 6.3** – Espectros FTIR para (a) amostras puras e (b) amostras dopadas com  $Eu^{3+}$ . A parte ampliada na região entre 420–700  $cm^{-1}$  com as correspondentes deconvoluções das bandas é mostrada para as amostras (c) puras e (d) dopadas com  $Eu^{3+}$  ..... 136
- FIGURA 6.4** – Diferenças no conteúdo relativo de OH na estrutura da HA e HAEu estimados pela razão OH/PO<sub>4</sub>. S = resfriamento lento e Q = resfriamento rápido com *quenching* em  $N_2$  líquido..... 137

- FIGURA 6.5** – Micrografias obtidas por MEV para as amostras (a) HAEuRaw e, (b) HAEu600S..... 138
- FIGURA 6.6** – Micrografias obtidas por MEV para as amostras (a) HARaw e, (b) HA600S..... 139
- FIGURA 6.7** – Análise estatística das dimensões das nanopartículas e suas razões de aspecto. (a) Largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HAEuRaw e, (b) largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HAEu600S..... 140
- FIGURA 6.8** – Análise estatística das dimensões das nanopartículas e suas razões de aspecto. (a) Largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HARaw e, (b) largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HA600S..... 141
- FIGURA 6.9** – Micrografias obtidas pelo MEV e análise composicional por espectroscopia EDS. (a) Micrografia para a amostras HAEu1100S e (b) para a amostra HAEu1100Q. (c) análise por EDS para a amostra HAEu1100S e (d) para a amostra HAEu1100Q. As linhas consistem nos valores ideais  $(Ca+Eu)/P = 1,667$  e  $Eu/Ca = 0,010$ ..... 141
- FIGURA 6.10** – Excitação não seletiva a 254 nm em temperatura ambiente das amostras dopadas com  $Eu^{3+}$ . As linhas de emissão das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$   $j=0,1,2$  (esquerda) e  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  (direita) podem ser identificadas para as amostras (a) HAEuRaw, (b) HAEu600S, (c) HAEu1100S e, (d) HAEu1100Q..... 142
- FIGURA 6.11** – Emissões  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  para o  $Eu^{3+}$  obtidas em três comprimentos de excitação distintos na banda de absorção  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  para (a) HAEuRaw, (b) HAEu600S, (c) HAEu1100S, e (d) HAEu1100Q..... 145
- FIGURA 6.12** – Energias das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  do  $Eu^{3+}$  na amostra HAEuRaw em função da energia de excitação na banda de absorção  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ ..... 145
- FIGURA 6.13** – Espectro de excitação a baixa temperatura (10 K) da transição  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  para todas as amostras obtidas ao coletar a luminescência na emissão  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ . (a) HAEuRaw, (b) HAEu600S, (c) HAEu1100S, e (d) HAEu1100Q..... 146
- FIGURA 6.14** – Modelos gerais para a alocação do  $Eu^{3+}$  na rede cristalina da HA. (a) representação dos canais hexagonais da HA mostrando os triângulos de espécies Ca(2), o grupo OH dentro do canal formado e três tetraedros  $[PO_4]$  vizinhos. (b) consiste no mecanismo proposto na Equação 29 e, (c) a substituição pelo mecanismo representado pela Equação 30..... 149
- FIGURA 6.15** – Modelo geral para a ocupação de  $Eu^{3+}$  nos sítios Ca(2) presentes em amostras de HA obtidas por precipitação a  $90^\circ C$  e após distintos tratamentos térmicos..... 152

- FIGURA 7.1** – Viabilidade celular de fibroblastos que foram incubados com diferentes concentrações de nanopartículas de HA por 24 e 48 horas. Os símbolos \* e \*\* indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$  e  $p \leq 0,005$ , respectivamente) quando comparados com o grupo controle..... 156
- FIGURA 7.2** – Imagem de microscopia óptica com contraste de fase (aumento de 16X) de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (*HDFn*) incubados com: (a) meio de cultura e com soluções de nanobastões de hidroxiapatita de (b) 20, (c) 40, (d) 80, (e) 160 e (f) 320  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas..... 157
- FIGURA 7.3** – Imagem de microscopia óptica com contraste de fase (aumento de 16X) de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (*HDFn*) incubados com: (a) meio de cultura e com soluções de nanobastões de hidroxiapatita de (b) 20, (c) 40, (d) 80, (e) 160 e (f) 320  $\mu\text{g/mL}$  por 48 horas..... 158
- FIGURA 7.4** – Imagens de microscopia confocal de fluorescência de fibroblastos dérmicos neonatais humanos (*HDFn*) incubados com nanopartículas de HA 320  $\mu\text{g/mL}$  (azul) e marcados com Alexa Fluor 532 Faloidina (amarelo). Pode-se observar, no mesmo campo de imagem, a excitação (a) do marcador de citoesqueleto, (b) das nanopartículas e (c) a sobreposição da excitação da sonda e das nanopartículas de HA..... 159

## RESUMO

### Estudo, caracterização e propriedades de ortofosfatos multifuncionais

O estudo de materiais inorgânicos atóxicos com propriedades fotoluminescentes (FL) tem se intensificado para aplicações biomédicas. Considerando este propósito, a hidroxiapatita [HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] possui baixa toxicidade e uma rede cristalina que permite a estabilização de distintos centros luminescentes baseados em defeitos estruturais, assim como em lantanídeos ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , etc.). A presente tese visa contribuir com o estudo das propriedades ópticas da HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  (HAEu) e correlacioná-las com suas propriedades estruturais, composicionais e morfológicas. Ademais, apresenta um estudo preliminar com a avaliação da biocompatibilidade, capacidade de internalização e marcação celular por FL. As amostras de HA foram sintetizadas por precipitação química a 90 °C em meio básico (pH ~ 10) e ácido (pH ~ 5). Para cada um desses grupos, variou-se a velocidade de mistura dos precursores (600, 7 ou 1,5 mL/min). Estudou-se também o efeito de posteriores tratamentos térmicos no intervalo de 200–800 °C nas propriedades da HA pura, e a 600 °C e 1100 °C com resfriamento não controlado, bem como com a realização de *quenching* em  $\text{N}_2$  líquido para a HAEu. Foram investigadas as características estruturais e composicionais dos materiais por difração de raios X (DRX), refinamento *Rietveld*, espectroscopia no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) e RAMAN, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) e análise termogravimétrica (TG). Os aspectos morfológicos foram estudados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). As propriedades eletrônicas e ópticas foram avaliadas por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia de FL e fluorescência de estreitamento de linha resolvida no tempo (TRFLN). A TRFLN foi realizada visando coletar informações sítio-seletivas dos entornos do  $\text{Eu}^{3+}$ . Foi possível confirmar a obtenção de nano e micropartículas de HA com distintos graus de organização estrutural, tamanhos e formas de partícula, ao variar os parâmetros de síntese selecionados. Confirmou-se ainda a obtenção de fase única de HAEu. Os tratamentos térmicos posteriores se mostraram cruciais em relação às características finais da HA e HAEu. As emissões de FL das amostras puras possuem perfil de banda larga típica de

defeitos estruturais, com cores de emissão variáveis, incluindo a cor azul, amarela, branca-azulada e branca-amarelada. Este resultado demonstra que intensas e estáveis emissões, além da azul característica do material, são possíveis para a HA através de uma metodologia simples e barata de síntese. Ensaio de MTT das amostras de HA pura com FL intrínseca melhorada em linhagem de fibroblastos dérmicos neonatais humanos (*HDFn*) demonstraram elevada viabilidade celular. A capacidade de internalização das mesmas (*Uptake* celular) e de marcação celular pela FL intrínseca foram avaliadas por microscopia confocal, e demonstram ser promissoras para aplicações em bioimagem. Os estudos da FL do  $\text{Eu}^{3+}$  na HA foram efetivos em revelar informações sítio-seletivas de três entornos para esta espécie na amostra precipitada. Com os tratamentos térmicos, a concentração de  $\text{Eu}^{3+}$  em cada sítio varia, e com a realização do *quenching* térmico ocorre a preferência por um único entorno.

## ABSTRACT

### Study, characterization and properties of multifunctional orthophosphates

Scientific research focused on non-toxic inorganic materials with photoluminescence (PL) properties has been intensified in pursuance of biomedical applications. Considering this purpose, hydroxyapatite [HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] present low toxicity and a crystalline structure which can stabilize distinct luminescent centres based on structural defects, and lanthanides ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , etc.). This thesis aims to contribute with the study of the optical properties of pure and  $\text{Eu}^{3+}$ -doped HA (HAEu) and their correlation to its structural, compositional and morphological properties. Moreover, a preliminary study comprising of biocompatibility evaluation, internalization capability and cell labelling by PL is presented. The HA samples were synthesized by chemical precipitation at 90 °C in a basic (pH ~10) and acidic (pH ~ 5) environment. The addition rate of the precursors was varied for each group (600, 7 ou 1,5 mL/min). Furthermore, the effects of posterior heat treatments in the range of 200–800 °C on the properties of pure HA, and at 600 °C and 1100 °C with normal cooling step, as well as followed by a quenching procedure at liquid  $\text{N}_2$  for HAEu were also evaluated. The materials structural and compositional characteristics were evaluated by X-ray diffraction (XRD), *Rietveld* refinement, *Fourier* transform infrared (FTIR) and RAMAN spectroscopies, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES), and thermogravimetric analysis (TG). The morphological aspects were studied by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The electronic and optical properties were evaluated by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), fluorescence spectroscopy, and time-resolved fluorescence line narrowing technique spectroscopy (TRFLN). TRFLN technique was realized in order to collect site-selective information of  $\text{Eu}^{3+}$  environments in HA structure. The formation of HA nano and microparticles with distinct degrees of structural ordering, particle sizes and shapes, through changing the synthesis parameters was confirmed. Moreover, a single phase of HAEu was obtained. The posterior heat treatments were crucial on the final characteristics of HA and HAEu. The PL emissions of pure samples have a broad band profile typical from structural defects, with tunable colors, including blue, yellow, bluish-white, and yellowish-white colors. This result demonstrates that intense and stable emissions, besides the



characteristic blue emission of the material, are possible for HA by using a simple and cheap methodology. MTT assays of pure HA samples with enhanced intrinsic PL in human dermal fibroblasts neonatal (HDFn) shows high cell viability. The internalization capability of these samples (cell uptake) and cell labelling by the intrinsic PL were evaluated by confocal microscopy, and showed promising results for bioimage procedures. The PL studies of  $\text{Eu}^{3+}$  in HA were effective on reveal site-selective information for three environments for this specie in the precipitated sample. After the heat treatments, the  $\text{Eu}^{3+}$  concentration in each site changes, and by using the quenching step it was evidenced the preference for only one site.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Objetivos da tese .....	3
1.2 – Estrutura do texto .....	4
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO .....	7
2.1 – A família dos ortofosfatos de cálcio.....	7
2.2 – Apatitas .....	10
2.3 – Estrutura cristalina da hidroxiapatita .....	10
2.4 – Flexibilidade e desordem estrutural na hidroxiapatita .....	13
2.5 – Propriedades, aplicações e efeito de substituições iônicas .....	16
2.6 – Aplicações com centros luminescentes.....	18
2.7 – Principais métodos de preparação da hidroxiapatita.....	24
2.7.1 – Métodos de preparação por via úmida.....	25
2.7.2 – Precipitação química.....	26
2.8 – Luminescência .....	27
2.9 – Fotoluminescência em sólidos inorgânicos .....	28
2.9.1 – Estrutura de bandas e fotoluminescência intrínseca.....	29
2.9.2 – Estrutura eletrônica e fotoluminescência dos íons lantanídeos .....	31
2.9.3 – Propriedades fotoluminescentes do íon $\text{Eu}^{3+}$ .....	34
CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39
3.1 – Síntese por precipitação química e tratamentos térmicos.....	39
3.1.1 – Reagentes e equipamentos utilizados .....	39
3.1.2 – Síntese da hidroxiapatita pura .....	40
3.1.3 – Tratamentos térmicos aplicados à hidroxiapatita pura .....	45
3.1.4 – Síntese de hidroxiapatita dopada com $\text{Eu}^{3+}$ .....	46
3.1.5 – Tratamentos térmicos na hidroxiapatita dopada com $\text{Eu}^{3+}$ .....	47
3.2 – Caracterizações .....	48
3.2.1 – Difração de raios X .....	48
3.2.2 – Refinamento Rietveld.....	50
3.2.3 – Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente .....	51
3.2.4 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier .....	51
3.2.5 – Espectroscopia de espalhamento Raman.....	52
3.2.6 – Espectroscopia óptica na região ultravioleta-visível.....	52

3.2.7 – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X .....	53
3.2.8 – Análise termogravimétrica.....	54
3.2.9 – Microscopia eletrônica de varredura .....	54
3.2.10 – Microscopia eletrônica de transmissão .....	55
3.2.11 – Espectroscopia de fotoluminescência.....	55
3.2.12 – Espectroscopia sítio-seletiva do $\text{Eu}^{3+}$ .....	55
3.2.13 – Ensaio biológicos .....	56
3.2.13.1 – Linhagem e cultivo celular .....	56
3.2.13.2 – Biocompatibilidade das nanopartículas de hidroxiapatita.....	57
3.2.13.3 – Avaliação qualitativa de Uptake celular .....	58

## CAPÍTULO 4 – PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FOTOLUMINESCÊNCIA INTRÍNSECA DE PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA COM DISTINTAS FORMAS

.....	61
4.1 – Introdução .....	61
4.2 – Objetivo .....	62
4.3 – Resultados e discussão .....	62
4.3.1 – Análise composicional por ICP-AES.....	62
4.3.2 – Análise estrutural por DRX.....	63
4.3.3 – Espectroscopias vibracionais.....	66
4.3.4 – Caracterização morfológica por MEV .....	72
4.3.5 – Mecanismos de formação das partículas de hidroxiapatita.....	74
4.3.6 – Fotoluminescência e estrutura eletrônica.....	82
4.4 – Conclusões .....	92

## CAPÍTULO 5 – INFLUÊNCIA DE TRATAMENTOS TÉRMICOS NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FOTOLUMINESCENTES DA HIDROXIAPATITA

.....	95
5.1 – Introdução .....	95
5.2 – Objetivo .....	96
5.3 – Resultados e discussão .....	96
5.3.1 – Análise térmica .....	96
5.3.2 – Análise estrutural por DRX e refinamento Rietveld.....	98
5.3.3 – Espectroscopia FTIR.....	108
5.3.4 – Análise estrutural e superficial por XPS .....	111
5.3.5 – Análise morfológica e estrutural por MEV e MET .....	116
5.3.6 – Estrutura eletrônica e fotoluminescência da hidroxiapatita .....	121

5.3.7 – Possíveis origens para a fotoluminescência intrínseca na hidroxiapatita tratada termicamente .....	124
5.4 – Conclusões .....	128
CAPÍTULO 6 – HIDROXIAPATITA DOPADA COM $\text{Eu}^{3+}$ : DISTRIBUIÇÃO NA MATRIZ E INFLUÊNCIA DE TRATAMENTOS TÉRMICOS .....	131
6.1 – Introdução .....	131
6.2 – Objetivo .....	132
6.3 – Resultados e discussão .....	133
6.3.1 – Análise estrutural por DRX e FTIR.....	133
6.3.2 – Estudo morfológico e composicional por MEV acoplado com EDS	138
6.3.3 – Propriedades fotoluminescentes: Excitação não sítio-seletiva.....	142
6.3.4 – Espectroscopia sítio-seletiva do $\text{Eu}^{3+}$ pela técnica de TRFLN.....	143
6.3.5 – Preferências de entornos do $\text{Eu}^{3+}$ e mecanismos de estabilização	147
6.4 – Conclusões .....	152
CAPÍTULO 7 – RESULTADOS PRELIMINARES PARA FUTURAS APLICAÇÕES	155
CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	161
CAPÍTULO 9 – PERSPECTIVAS DE NOVAS LINHAS DE PESQUISA.....	163
APÊNDICE – RESUMEN EXTENSO DE LA TESIS.....	165
Referências Bibliográficas .....	175

## **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**

A ciência de materiais desenvolve um papel fundamental para a sociedade na atualidade. Através dela, novos materiais são desenvolvidos com vistas à melhoria da qualidade e expectativa de vida da população mundial. Para a obtenção destes resultados, é essencial amplo conhecimento sobre os sistemas estudados. Além disso, a colaboração interdisciplinar de pesquisadores de distintas áreas é imprescindível para seu progresso, e especialistas nos diversos campos da química, física, matemática, biologia, medicina, engenharia, etc., vem cooperando de maneira extensiva nos últimos anos. Dessa maneira, alberga-se todo o processo de desenvolvimento de um novo material, desde a síntese, caracterização, estudo de suas propriedades, fabricação em larga escala e, finalmente, a viabilização da sua utilização pela sociedade. Partindo desse sistema de pesquisa e desenvolvimento, um exponencial avanço do conhecimento científico e tecnológico foi gerado nas últimas décadas.

Em especial, busca-se a partir dessa interação multidisciplinar o desenvolvimento de materiais de baixa toxicidade e custo, e que ao mesmo tempo possam desempenhar distintas funções. Materiais multifuncionais podem ser elaborados para unificar propriedades elétricas, ópticas, magnéticas, mecânicas, biológicas, etc., e possuem potencial na redução de tamanho, peso, custo, consumo de energia e complexidade de dispositivos tecnológicos [1]. Sistemas multifuncionais podem ser observados na natureza, onde nota-se evolução e aperfeiçoamento contínuos destes materiais, que podem possuir complexas e variadas utilidades, estando presentes desde na composição da madeira até nos tecidos duros (ossos, dentes, etc.) de animais [2].

É notável que nos laboratórios a multifuncionalidade dos materiais parte desde a escala nano até a macro. Especificamente, pode-se ressaltar a miniaturização de dispositivos eletrônicos e biomédicos à escala nanométrica devido ao avanço no controle de fenômenos físico-químicos em diversos materiais. Neste âmbito, sistemas multifuncionais nanoestruturados apontam para um promissor futuro no desenvolvimento de ferramentas e dispositivos aplicáveis em tratamentos específicos na área da medicina moderna, dentre outras aplicações [3]. Destaca-se a potencial aplicação de nanopartículas inorgânicas biocompatíveis para tratamento do câncer pela liberação controlada de fármacos no local desejado, e o acompanhamento desta

liberação pela geração de imagem *in vivo* (bioimagem) via fotoluminescência (FL) do material [4]. Neste caso, espera-se uma significativa contribuição por parte dos nanoveículos farmacêuticos multifuncionais na melhoria da eficiência de vários protocolos terapêuticos e de diagnóstico, ao agrupar distintas propriedades em um único sistema [3].

Um grupo de materiais multifuncionais que vem se destacando no campo das aplicações biomédicas é o dos ortofosfatos de cálcio – mais especificamente, a hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  – HA]. Isso deve-se principalmente à associação das seguintes propriedades, dentre outras [5,6]: (i) superior resposta em sistemas fisiológicos, como biocompatibilidade (característica que surge como fruto das similaridades físico-químicas que a HA possui com o principal componente mineral presente nos tecidos duros de mamíferos); (ii) capacidade de transportar e liberar controladamente fármacos; (iii) aceitação de grupos funcionais e modificações na superfície das partículas; (iv) capacidade de internalização celular; (v) baixo custo de produção, baixo custo dos elementos que a compõem e facilidade do método experimental de preparação; (vi) possibilidade de albergar inúmeras espécies na rede cristalina, incluindo centros luminescentes de distintas naturezas, desde lantanídeos até os oriundos de defeitos e impurezas.

Durante o estudo das propriedades de um determinado material, é fundamental que haja detalhado e preciso conhecimento acerca dos fenômenos e características responsáveis pelas mesmas. Em relação aos materiais multifuncionais, segundo MCDOWELL *et al.* [1], um material multifuncional é aquele cujo “desempenho dita múltiplas exigências de propriedade e/ou de resposta”. Ao aplicar esta definição no campo das aplicações biomédicas para partículas de HA em que haja o interesse do uso de propriedades ópticas, como é o caso das emissões FL para bioimagem, tais propriedades ópticas devem ser conhecidas detalhadamente com vistas a otimizar o desempenho do material como um todo nos propósitos desejados.

Atualmente, sabe-se que as propriedades ópticas intrínsecas da HA podem ser otimizadas pela presença de defeitos estruturais originários da síntese do material por via hidrotérmica, na presença de citrato de sódio e outros aditivos orgânicos, os quais promovem um incremento na tipicamente fraca emissão azul que o material apresenta ( $\lambda_{max} = 420$  nm) [7]. Esta metodologia mostrou ser viável na obtenção partículas biocompatíveis multifuncionais com potencial uso em

procedimentos de bioimagem, monitoramento de mecanismos moleculares intracelulares e acompanhamento da liberação controlada de fármacos [8–10]. Por outro lado, a propriedade óptica da HA também vem sendo melhorada pela incorporação de espécies de lantanídeos trivalentes, como o  $\text{Eu}^{3+}$  e o  $\text{Tb}^{3+}$ , devido a suas emissões na região espectral correspondente ao vermelho e verde, respectivamente, e utilizadas para bioimagem e monitoramento da liberação de fármacos [11,12]. Cada uma destas estratégias de otimização das propriedades ópticas da HA apresenta determinadas vantagens e desvantagens a serem consideradas, bem como limitações a serem superadas.

No caso da FL intrínseca da HA, apesar do procedimento levar à obtenção de um material com respostas biológicas e ópticas importantes, sem a necessidade do uso de dopantes – uma vez que a FL tem como origem defeitos estruturais –, a rota sintética utilizada possui relativa complexidade, o que poderia dificultar seu emprego em larga escala. Além disso, a obtenção de outras cores de emissão além da azul sem a necessidade de dopantes é um relevante tema atual de pesquisa. Uma vez que a HA apresenta uma estrutura defeituosa complexa, a identificação dos principais estados eletrônicos responsáveis por emissões radiativas ainda é um dos temas centrais de estudos envolvendo este material. O controle preciso e a manipulação destes estados poderiam permitir a obtenção de cores ajustáveis, característica importante para aplicações tecnológicas. Já no segundo caso (presença de lantanídeos), distintas cores de emissão podem ser obtidas e ajustadas de acordo com a necessidade da aplicação e técnica de bioimagem. Entretanto, faz-se necessário conhecimento da distribuição na matriz e do entorno em que estão presentes os lantanídeos, a fim de se aprimorar as respostas FL dos materiais, tema que ainda desperta discussão na literatura. Neste sentido, faz-se necessária a pesquisa básica e aplicada com o objetivo de contribuir no entendimento e melhora da propriedade óptica intrínseca da HA pura e também da HA dopada com  $\text{Eu}^{3+}$ .

## **1.1 – Objetivos da tese**

Considerando o que foi exposto anteriormente, a presente tese “*Estudo, caracterização e propriedades de ortofosfatos multifuncionais*”, insere-se no campo de materiais inorgânicos com propriedades fotoluminescentes e, mais

especificamente, centra-se na preparação e estudo da HA, cujas características estruturais, composicionais, morfológicas e ópticas foram modificadas quimicamente.

Os resultados apresentados neste trabalho correspondem ao que se obteve a partir do estudo da HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  sintetizadas pela metodologia de precipitação química simples, com variáveis adaptadas para a compreensão de tais características e suas correlações. Especificamente, propõe-se o estudo de fatores que possuem potencial em modificar as propriedades ópticas da HA, além de contribuir no entendimento dos fenômenos que permitem estas propriedades. A seguir, são listados os objetivos concretos propostos para esta tese de doutorado:

- a. Obter pela metodologia de precipitação química partículas de HA com distintas formas e composições, bem como estudar a FL intrínseca dos materiais sintetizados;
- b. Sintetizar nanopartículas de HA por precipitação química e verificar a influência de posteriores tratamentos térmicos nas propriedades estruturais e fotoluminescentes das mesmas;
- c. Sintetizar nanopartículas de HA dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  através do método de precipitação química e verificar a influência de distintos tratamentos térmicos nas propriedades estruturais, composicionais, assim como nas propriedades fotoluminescentes do sistema. Realizar um estudo através de técnicas sitio-seletivas de caracterização fotoluminescente do  $\text{Eu}^{3+}$ .

Além dos objetivos primários destacados acima, esta tese visa também a realização de um estudo preliminar com os materiais desenvolvidos, com vistas à obtenção de resultados experimentais de caráter indicativo acerca da utilização dos mesmos para futuras aplicações biomédicas, como no campo de bioimagem.

## **1.2 – Estrutura do texto**

A presente tese doutoral está estruturada em 9 capítulos bem diferenciados que percorrem os principais avanços logrados durante a realização da



mesma. Este capítulo, “*Introdução*”, enumerado como Capítulo 1, faz uma breve introdução da temática da tese, além de destacar seus objetivos e um curto guia de leitura do texto. O Capítulo 2, intitulado “*Fundamentação*”, pretende introduzir conceitos utilizados ao longo dos capítulos posteriores, e que são essenciais na interpretação dos resultados obtidos. Neste sentido, o Capítulo 2 trata de temas como noções gerais sobre ortofosfatos de cálcio, bem como uma revisão atualizada da bibliografia a respeito da estrutura cristalina HA, propriedades, aplicações e métodos de preparação. Ademais, este capítulo contém a descrição de alguns dos fundamentos da FL em sólidos inorgânicos, os fenômenos e mecanismos presentes na literatura para a interpretação da FL intrínseca dos mesmos, além das propriedades fotoluminescentes dos íons trivalentes de lantanídeos e, mais especificamente, do  $\text{Eu}^{3+}$ , o qual se utiliza na presente tese.

O Capítulo 3, “*Procedimento experimental*”, expõe a metodologia utilizada como base para os estudos contidos na presente tese, descrevendo o procedimento de síntese e de tratamentos térmicos dos materiais estudados, além das caracterizações realizadas. É importante destacar que a metodologia foi elaborada com vistas à maior simplicidade quanto fosse possível para a realização dos estudos da presente tese.

No Capítulo 4, “*Propriedades estruturais e fotoluminescência intrínseca de partículas de hidroxiapatita com distintas formas*”, encontram-se os resultados mais expressivos derivados da otimização da metodologia de precipitação química escolhida para o estudo da correlação entre morfologia, organização estrutural, composição e a FL intrínseca. Ainda neste capítulo, descreve-se a obtenção e caracterização de partículas de HA (prismas hexagonais, bastões e arroses) com composição próxima à da HA estequiométrica, bem como de partículas (placas e agulhas) de HA deficiente em cálcio (Ca-dHA), ao variar os valores de pH do meio reacional, e o método de mistura dos precursores durante o procedimento de síntese. As propriedades fotoluminescentes destes materiais foram estudadas e evidenciou-se que o perfil e intensidade das emissões do tipo banda larga são sensíveis a organização estrutural e morfologia das partículas.

À continuação, o Capítulo 5, “*Influência de tratamentos térmicos nas propriedades estruturais e fotoluminescentes da hidroxiapatita*”, consiste na descrição da segunda etapa do estudo das propriedades fotoluminescentes intrínsecas com relação às propriedades estruturais e morfológicas das partículas de HA. Os

resultados contidos neste capítulo demonstram que simples tratamentos térmicos efetuados posteriormente à síntese de precipitação química alteram a ordem-desordem estrutural, morfologia e também as emissões intrínsecas da HA. Neste sentido, descreve-se a obtenção de partículas com propriedades FL melhoradas e emissões variadas, incluindo a azul tradicionalmente observada, como também colorações branca-azulada e branca-amarelada, de alta intensidade, cobrindo uma ampla parte do espectro visível.

O Capítulo 6, “*Hidroxiapatita dopada com  $\text{Eu}^{3+}$ : Distribuição na matriz e influência de tratamentos térmicos*”, visa descrever as alterações estruturais da HA pela FL do  $\text{Eu}^{3+}$ , bem como contribuir com conceitos envolvendo as características das emissões do  $\text{Eu}^{3+}$  na matriz da HA, a distribuição das espécies na mesma e a natureza de seus entornos em função dos tratamentos térmicos. Com a técnica de espectroscopia sítio-seletiva foi possível identificar detalhadamente os entornos do  $\text{Eu}^{3+}$  na estrutura e como a densidade de ocupação dos mesmos varia de acordo com as condições de tratamento térmico.

Com os resultados de pesquisa científica básica obtidos neste trabalho, espera-se contribuir com o avanço na compreensão das propriedades fotoluminescentes da HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$ , bem como no promissor desenvolvimento de futuros dispositivos ópticos e biomédicos multifuncionais à base de HA com propriedades FL melhoradas, custos reduzidos e obtidos por metodologias simplificadas.

Neste sentido, no Capítulo 7 intitulado “*Resultados preliminares para futuras aplicações*” são descritos promissores resultados que demonstram a significativa viabilidade celular dos materiais preparados, bem como a utilização dos mesmos em pesquisa aplicada no campo da bioimagem. Para este capítulo em específico, foram utilizadas as nanopartículas com a melhor resposta de FL intrínseca desenvolvidas nesta tese, conforme descrito no Capítulo 5.

Em conclusão, o Capítulo 8, “*Considerações finais*”, abrange as conclusões e contribuições para a literatura alcançadas com a presente tese, e o Capítulo 9, “*Perspectivas de novas linhas de pesquisa*”, apresenta propostas de linhas de pesquisa possíveis a partir dos estudos realizados.

## CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO

### 2.1 – A família dos ortofosfatos de cálcio

Os ortofosfatos de cálcio constituem uma família de compostos contendo grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  originários do ácido fosfórico. Esta família de materiais apresenta-se na forma de sólidos brancos pouco solúveis em água, porém todos dissolvem em ácidos. Abundantemente presentes na natureza, podem ser encontrados em diversos depósitos minerais misturados com outros elementos [13]. Entretanto, a extensão de sua presença na forma de minerais não se limita ao planeta Terra – evidências apontam a presença destes compostos na superfície da lua [14].

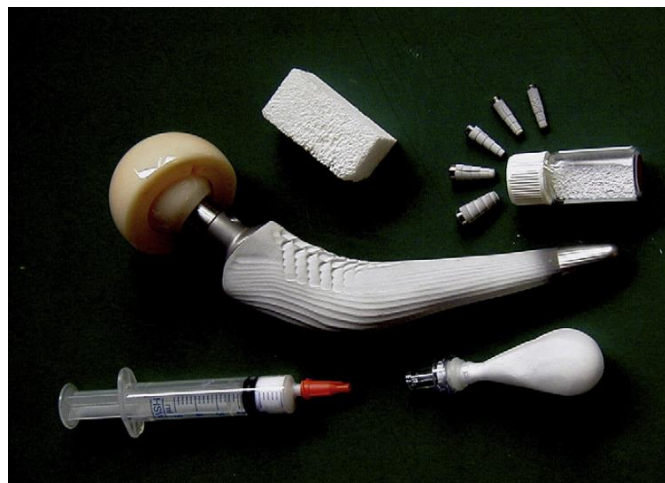
Ao longo do processo evolutivo da vida, os ortofosfatos de cálcio foram inclusos pela natureza na mistura de compostos essenciais para o desenvolvimento de algumas espécies, como é o caso dos vertebrados (incluindo os seres humanos). Neste sentido, os mesmos compõem uma classe de materiais chamados de biominerais e estão presentes principalmente na fase mineral de ossos e dentes [5]. Apesar de tamanha importância, o grupo dos ortofosfatos é um dos grupos de biominerais menos abundantes na natureza, atrás do carbonato de cálcio, dióxido de silício, etc. [15]. Entretanto, é certo que se tornaram essenciais para a ocorrência da vida como a conhecemos e sua importância para nós é tão vital quanto a das moléculas de água, assim como indaga USKOKOVIC [16]. As funções exercidas por estes biominerais são complexas e específicas, e atualmente estão presentes em uma infinidade de seres vivos. Nota-se que apresentam fundamental importância na biomedicina, pois irregularidades no esqueleto e nos dentes consistem em relevantes enfermidades presentes nos seres humanos [2].

Destaca-se o fato de os ortofosfatos de cálcio presentes em organismos vivos fazerem parte de um dos melhores exemplos de multifuncionalidade que um sistema nano-, micro- e macroestruturado pode abarcar ante as necessidades de possíveis aplicações. Os ossos dão ao corpo sustentação, mobilidade e função. Uma destas funções em específico é a utilização da estrutura dos ortofosfatos de cálcio na estocagem de minerais ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , etc.), os quais são liberados de acordo com a necessidade do organismo [16].

Por outro lado, os ortofosfatos de cálcio sintéticos são materiais que desempenham papéis fundamentais na área de biomedicina, e são estudados e

aplicados em clínicas médicas, odontológicas e hospitais. A ampla gama de aplicabilidade se deve principalmente aos bem conhecidos e excelentes rendimentos em condições fisiológicas, sendo a maioria deles considerados relevantes na área dos biomateriais [17]. Uma dessas características é a biocompatibilidade, ou seja, não apresentam efeitos adversos ao organismo, como toxicidade, alergia, inflamação e corrosão. Isto se deve às similaridades que estes materiais possuem com fase mineral dos ossos e dentes [5,18]. Outros aspectos importantes de alguns ortofosfatos sintéticos consistem na bioatividade e reabsortividade que apresentam em sistemas fisiológicos, além da capacidade de estimularem a formação de novas células ósseas [18]. A lista completa dos ortofosfatos de cálcio conhecidos está exposta na Tabela 2.1, juntamente com as suas respectivas solubilidades em água e razão molar Ca/P [2]. Nesta lista, pode-se destacar a hidroxiapatita (HA) e a hidroxiapatita deficiente em cálcio (Ca-dHA) e o  $\beta$ -fosfato de tricálcio ( $\beta$ -TCP).

Usados na forma *bulk*, pó e recobrimento para próteses metálicas, os ortofosfatos de cálcio estão atualmente disponíveis de diversas maneiras (Figura 2.1). A acessibilidade a tais compostos permite, por exemplo, sua aplicação em tratamentos de quase todo o esqueleto humano e articulações. A primeira aplicação comercial dos ortofosfatos de cálcio sintéticos ocorre nos anos 80 [19] e, desde então, HA,  $\beta$ -TCP e BCP (fosfatos bifásicos compostos de HA e  $\beta$ -TCP) são usados em implantes dentais, equipamentos percutâneos, no tratamento de defeitos ósseos, tratamento de fraturas, substituição total de articulações, usos ortopédicos, reconstruções maxilo-faciais, entre outros [20]. Dependendo se a aplicação necessita um material mais bioativo ou reabsorvível, diferentes fosfatos e misturas entre eles são utilizados [21].



**FIGURA 2.1** – Exemplos de biocerâmicas a base ortofosfatos de cálcio comercialmente disponíveis [20].

**TABELA 2.1 – Ortofosfatos de cálcio e suas propriedades (adaptado de [2]).**

Razão Ca/P	Composto	Fórmula química	Solubilidade a 25°C (g.l <sup>-1</sup> )	pH de estabilidade em dissolução aquosa a 25°C
0,5	Fosfato monocálcico monohidratado	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	~18	0,0–2,0
0,5	Fosfato monocálcico anidro	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	~17	c
1,0	Fosfato bicálcico dihidratado	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	~0,088	2,0–6,0
1,0	Fosfato bicálcico anidro	CaHPO <sub>4</sub>	~0,048	c
1,33	Fosfato octacálcico	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	~0,0081	5,5–7,0
1,5	α-fosfato de cálcio	α-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	~0,0025	a
1,5	β-fosfato de cálcio	β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	~0,0005	a
1,2–2,2	Fosfato de cálcio amorfo	Ca <sub>x</sub> H <sub>y</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>z</sub> .nH <sub>2</sub> O n = 3-4.5; 15-20% H <sub>2</sub> O	b	~5–12 <sup>d</sup>
1,5–1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio	Ca <sub>10-x</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6-x</sub> (OH) <sub>2-x</sub> (0 < x < 1)	~0,0094	6,5–9,5
1,67	Hidroxiapatita	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	~0,0003	9,5–12
1,67	Fluoroapatita	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (F) <sub>2</sub>	~0,0002	7–12
2,0	Fosfato tetracálcico	Ca <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O	~0,0007	a

- a. Não pode ser precipitado a partir de uma solução aquosa.  
b. Não pode ser medido de uma maneira precisa.  
c. Estável a temperaturas superiores a 100 °C.  
d. Metaestável.

Os ortofosfatos de cálcio puros ou dopados, fases únicas ou bifásicos e os compósitos são importantes materiais nas novas aplicações biomédicas, como a liberação controlada de fármacos [22]. Somando-se a este fato, as nanopartículas destes compostos têm sido sugeridas como hospedeiras para centros fotoluminescentes. A presença de um comportamento luminescente estende ainda

mais a diversa multifuncionalidade deste material e potencialmente permite o acompanhamento da liberação de fármacos no organismo [23,24]. Quando comparados com outros sistemas para tais fins (por exemplo, *Quantum Dots* [25] e corantes orgânicos [26]), as nanopartículas de ortofosfatos de cálcio possuem significantes vantagens, incluindo a biocompatibilidade, fotoestabilidade e alta eficiência quântica da FL [27–31].

## 2.2 – Apatitas

A nomenclatura apatita surge da palavra grega *απαταω*, que significa “enganar”, pois as apatitas geralmente eram confundidas com outros minerais, como olivina, fluorita, ametista, etc. Os compostos do tipo apatita possuem fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ , e são referenciadas a partir da espécie X, que pode ser na forma de  $\text{OH}^-$  [hidroxiapatita, HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], de  $\text{F}^-$  [fluorapatita, FA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ], ou de  $\text{Cl}^-$  [cloroapatita, CIA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ ]. Também é possível a presença de uma mistura entre as distintas espécies X, como no caso da fluorhidroxiapatita [FHA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F})_2$ ] [13,32].

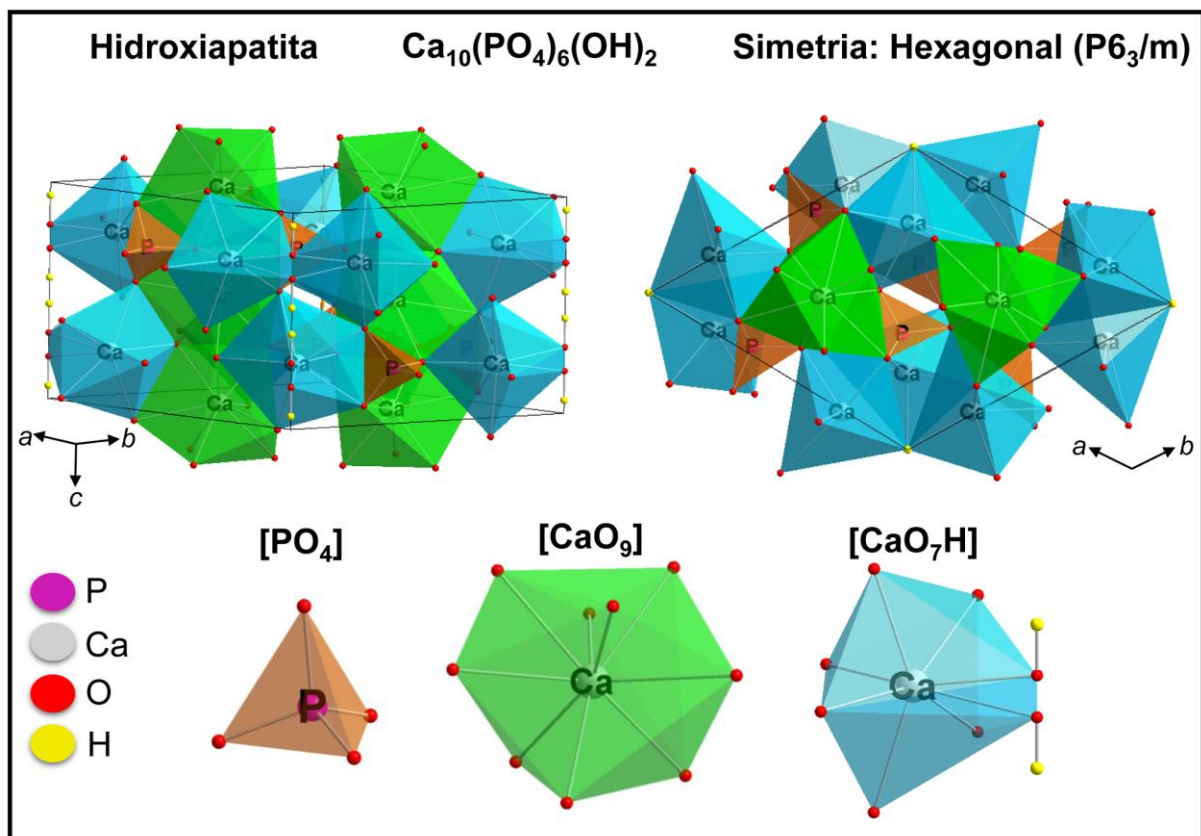
A estrutura das apatitas permite a introdução de diferentes espécies em sua rede na forma de substituições parciais e totais. Um exemplo é o do mineral vanadinita ( $\text{Pb}_{10}(\text{VO}_4)_6\text{Cl}_2$ ), em que o  $\text{Pb}^{2+}$  e o  $\text{VO}_4^{3-}$  substituem em sua totalidade as espécies  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , respectivamente [13]. Devido à facilidade de incorporar impurezas na rede cristalina, as apatitas estão presentes em rochas sedimentares e ígneas basicamente em uma forma impura (com substituições iônicas) de FA, FA carbonatada e fosforita (HA + FA) – o mineral puro é raramente encontrado na natureza. Atualmente, a principal aplicação das apatitas naturais é na agricultura, na forma de fertilizantes [15].

## 2.3 – Estrutura cristalina da hidroxiapatita

A HA é um ortofosfato de cálcio que cristaliza com o grupo espacial monoclinico  $P2_1/b$  na sua forma pura e, a temperaturas superiores a 207 °C, ocorre a transição reversível da fase monoclinica para a hexagonal, com grupo espacial  $P6_3/m$  [33]. Entretanto, a presença de impurezas na rede cristalina da HA (como  $\text{CO}_3^{2-}$ ) e vacâncias iônicas estabilizam a fase hexagonal na temperatura ambiente. Isto faz com

que na natureza, os raros minerais geológicos de HA assumam a estrutura hexagonal, bem como a HA biológica em sistemas fisiológicos, pois ambos são versões impuras da HA [16]. Em laboratório, a síntese da HA em condições atmosféricas também leva à inclusão de impurezas e estabilização de vacâncias na rede cristalina, fazendo com que a estrutura hexagonal seja adotada nestes casos [34].

A representação estrutural da HA hexagonal é ilustrada na Figura 2.2. A rede cristalina da HA, definida pelos *clusters*  $[PO_4]$  – grupo denominado formador de rede – cristaliza com grupo espacial  $P6_3/m (C_{6h})$  e com parâmetros de cela unitária  $a = b = 9,418 \text{ \AA}$  e  $c = 6,884 \text{ \AA}$  [35]. Os tetraedros de fosfato estão arranjados na forma de empacotamento compacto hexagonal (ABABA), sendo que os íons  $Ca^{2+}$  (modificador de rede) ocupam as cavidades maiores geradas por esta organização [16]. A cela unitária da HA contém duas fórmulas químicas  $Ca_5(PO_4)_3OH$ , e por isso normalmente é disposta como  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  [32]. Nota-se que a mesma contém dez íons de cálcio localizados em dois sítios não equivalentes, seis grupos fosfato e duas hidroxilas.



**FIGURA 2.2** – Representação esquemática de uma cela unitária hexagonal de HA e os clusters de coordenação nela presentes (adaptado de [36]).

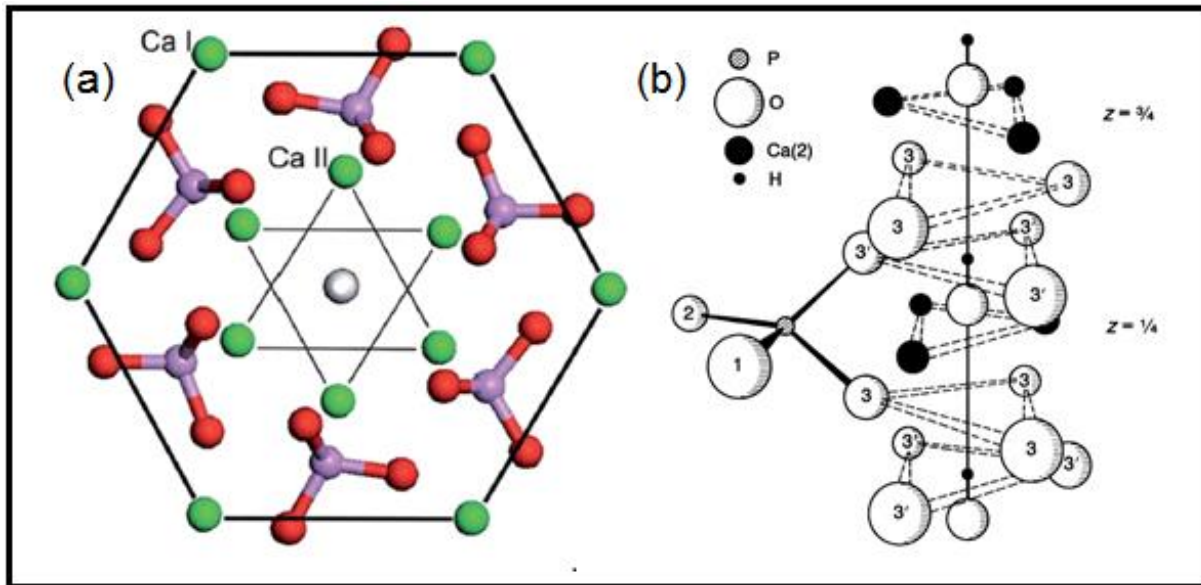
Devido a estes sítios cristalograficamente distintos para o Ca, a fórmula da HA também pode ser representada como  $Ca(1)_4Ca(2)_6(PO_4)_6(OH)_2$ . O sítio Ca(1)

está localizado entre as camadas paralelas A e B de *clusters* [PO<sub>4</sub>] e coordena-se com nove oxigênios pertencentes a seis *clusters* [PO<sub>4</sub>], sendo que três dos mesmos situam-se acima do sítio Ca(1), e três abaixo. Este arranjo próximo ao Ca(1) origina o *cluster* de coordenação [CaO<sub>9</sub>] com simetria local C<sub>3</sub> (Figura 2.2, parte inferior). Estes *clusters*, por sua vez, estão organizados na forma de colunas no eixo ternário da estrutura sendo, assim, também chamados de cálcios colunares. Em relação ao Ca(2), este sítio está localizado no mesmo plano dos *clusters* de [PO<sub>4</sub>], e define os canais hexagonais da estrutura. A espécie Ca nesta posição é circundada por seis átomos de O pertencentes a 5 distintos *clusters* [PO<sub>4</sub>] e um O referente ao grupo OH. Esta organização origina o *cluster* de coordenação [CaO<sub>7</sub>H] (Figura 2.2, parte inferior) com uma menor simetria (C<sub>s</sub>) em relação ao cluster [CaO<sub>9</sub>] [37].

Há de se destacar ainda outras características pertinentes a respeito da estrutura da HA e da organização das espécies que a compõem. Os canais hexagonais da estrutura são definidos por triângulos de espécies Ca(2) posicionados perpendicularmente ao eixo-c do cristal, uns sobre os outros nesta mesma direção, e encontram-se rotacionados 60° entre si. Dentro destes canais, situam-se os grupos OH alinhados sobre o eixo-c. Na estrutura monoclinica, os mesmos se encontram organizados no canal em colunas ordenadas OH<sup>-</sup> OH<sup>-</sup> OH<sup>-</sup> OH<sup>-</sup>, e o oxigênio está localizado no mesmo plano do triângulo de Ca(2). Na estrutura hexagonal, as hidroxilas estão presentes em forma de colunas desordenadas, que podem estar situadas seguindo o arranjo OH<sup>-</sup> OH<sup>-</sup> OH<sup>-</sup> OH<sup>-</sup> ou HO<sup>-</sup> HO<sup>-</sup> HO<sup>-</sup> HO<sup>-</sup>. Neste caso, os oxigênios estão ligeiramente acima ou abaixo dos triângulos de Ca(2) [16,36,37]. Ainda segundo *USKOKOVIC* [16], existe uma probabilidade igual a 50% das hidroxilas estarem dispostas para cima ou para baixo em referência ao eixo-c, dado que não há significativa vantagem energética em nenhum destes arranjos.

A Figura 2.3a ilustra uma projeção da cela unitária da HA no eixo-c [001] com destaque para o canal hexagonal da estrutura no centro com os grupos OH<sup>-</sup> no interior, e os Ca(2) delimitando os mesmos, bem como os Ca(1) colunares nas arestas que definem a geometria hexagonal da HA. A Figura 2.3b, por sua vez, ilustra a organização das espécies que compõem os canais hexagonais [38,39].





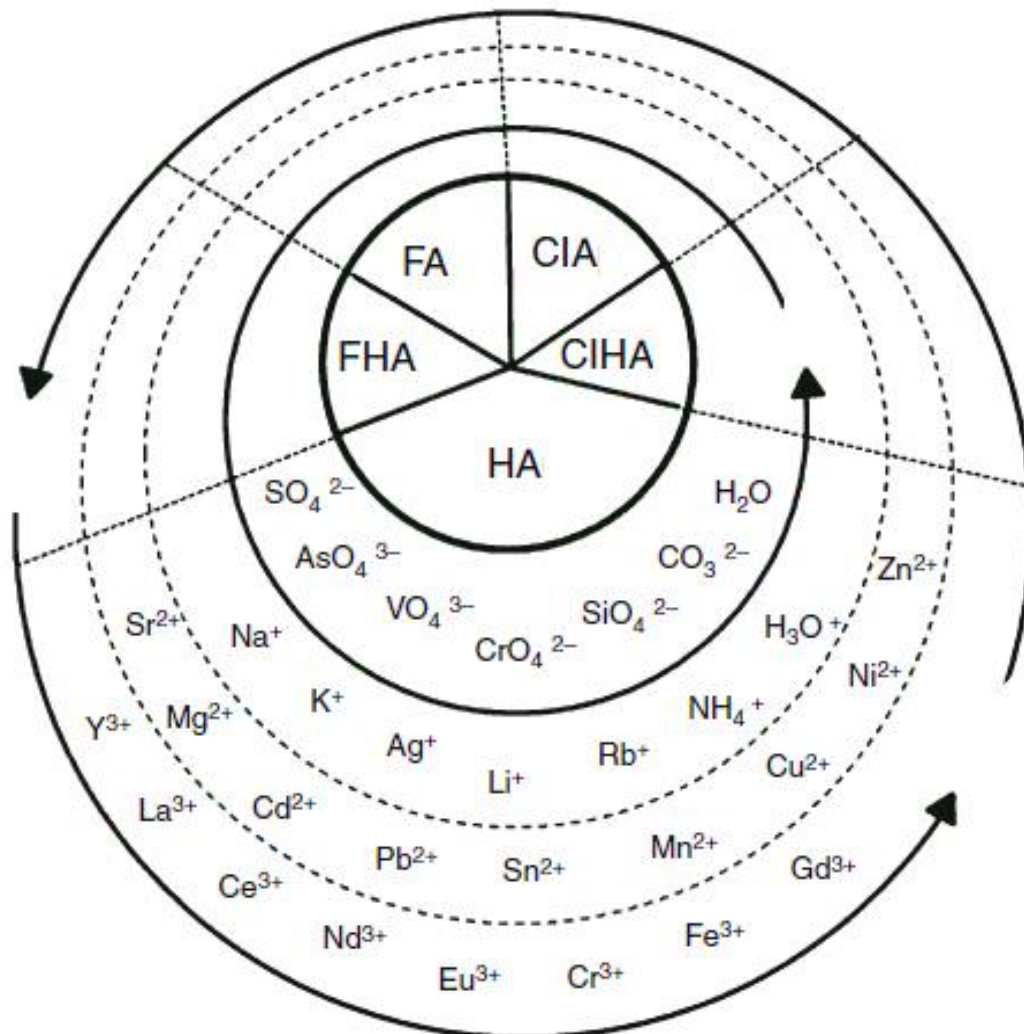
**FIGURA 2.3** – (a) Visualização do padrão hexagonal da célula unitária da HA desde a direção [001] e (b) triângulos de Ca(2) e oxigênios ao redor do eixo-c formando canais hexagonais com as hidroxilas no seu interior (adaptado de [38,39]).

## 2.4 – Flexibilidade e desordem estrutural na hidroxiapatita

Uma das mais relevantes características da HA consiste na flexibilidade estrutural apresentada pelo composto, a qual a possibilita sua exploração como material multifuncional tanto pela natureza, quanto em sua versão sintética. Em outras palavras, devido a tal flexibilidade, a rede cristalina da HA é capaz de estabilizar significativas quantidades de substituições iônicas nos mais variados tamanhos, e em praticamente todos os sítios disponíveis [40].

Esta peculiaridade da HA é reflexo das distorções (por exemplo, alterações nos comprimentos e ângulos das ligações Ca-O e P-O) que a rede é capaz de suportar sem que haja ruptura do sistema hexagonal [41]. Além disso, parte do caráter flexível da HA se deve também a propensão em possuir defeitos estruturais e vacâncias. Neste sentido, os mesmos ocorrem devido ao princípio de neutralidade de carga para acomodar espécies com distintas valências. A rede cristalina da HA hexagonal pode expandir ou contrair consideravelmente na presença de substituições iônicas e vacâncias em relação a sua versão pura e estequiométrica, e valores do parâmetro  $a$  entre 9,41 e 9,44 Å e do parâmetro  $c$  entre 6,84 e 6,94 Å são relatados na literatura [13,16,35,42–44].

Considerando o que foi anteriormente exposto, nota-se que a estrutura da HA pode estabilizar praticamente metade dos elementos da tabela periódica nas mais variadas valências e tamanhos, desde  $\text{AsO}_4^{3-}$  até  $\text{As}^{5+}$  [32]. Uma evidência deste comportamento estrutural advém do fato que a HA hexagonal, mais desordenada em relação a monoclinica, existe em temperatura ambiente devido à presença de impurezas e vacâncias que a estabilizam em tais condições [16]. TÔNSUAADU *et al.* [45] resumiram em um diagrama algumas das substituições iônicas presentes na HA, ilustrado pela Figura 2.4.



**FIGURA 2.4** – Diagrama em forma de “cebola” representando algumas das possíveis substituições nas apatitas. No centro, encontram-se as distintas apatitas em função do contraíon  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{Cl}^-$ . A primeira camada contém substituições aniônicas possíveis para a HA. Já as três camadas exteriores representam as substituições catiônicas monovalentes, divalentes e trivalentes. Estas substituições encontram-se ordenadas de maneira aproximada e decrescente no sentido das flechas presentes na ilustração em função da habilidade de substituição (adaptado de [45]). FHA e CIHA consistem em HA onde os grupos  $\text{OH}^-$  foram parcialmente substituídos por  $\text{F}^-$  e  $\text{Cl}^-$ , respectivamente.

Na natureza, uma versão impura da HA hexagonal (também chamada de bioapatita) consiste na fase cristalina mais abundantemente encontrada em tecidos duros de vertebrados. Dependendo do tecido em questão (esmalte, dentina ou ossos), a bioapatita pode possuir em sua rede distintas concentrações de espécies como  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{F}^-$ , apresentar várias outras em baixas concentrações, como como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ , etc., e vacâncias em  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$  como consequência destas substituições e da intrínseca desordem estrutural presente na mesma [13,46,47].

A HA apresenta distintas estequiometrias, mesmo que não estejam presentes impurezas e substituições iônicas. Neste sentido, a mesma existe tanto na forma de sua composição nominal,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  com relação molar  $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$ , como também em sua forma deficiente em cálcio (Ca-dHA). Nota-se que para o caso da Ca-dHA, com objetivo de contrabalancear a carga positiva faltante, encontram-se presentes vacâncias em  $\text{OH}^-$  e *clusters*  $[\text{HPO}_4]$  protonados [48]. Nestes casos, a relação molar  $\text{Ca}/\text{P}$  é variável, e pode assumir valores superiores a 1,50 e inferiores a 1,67. Em laboratório, a presença da HA estequiométrica ou Ca-dHA (com distintas razões molares  $\text{Ca}/\text{P}$ ) dependerá diretamente da metodologia de síntese escolhida e dos parâmetros utilizados para conduzi-la [49].

Ademais, em reações aquosas, carbonatos presentes no meio reacional devido à dissolução de sais precursores do mesmo, ou simplesmente provenientes da atmosfera ambiente ou controlada pela dissolução de  $\text{CO}_2$  gasoso, são incorporados na estrutura durante a etapa de preparação [34]. Os grupos carbonato podem substituir tanto os grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  quanto as  $\text{OH}^-$ , e, em ambos os casos, vacâncias são geradas para contrabalancear a carga do  $\text{CO}_3^{2-}$  introduzido [33,50,51]. É importante destacar que dependendo das condições de síntese, como por exemplo a natureza do agente basificante e dos precursores utilizados, distintos contraíons podem se acomodar na rede com o objetivo de neutralizar a estrutura. Deste modo, têm lugar substituições iônicas combinadas de impurezas. Segundo a literatura [13], desde espécies como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , até moléculas relativamente grandes como  $\text{H}_3\text{O}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , podem desempenhar este papel na estrutura. Sabe-se também que moléculas ainda maiores podem ser estabilizadas. Estudos indicam que ao ocorrer simultaneamente vacâncias de  $\text{OH}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , moléculas de glicina podem ficar presas na rede da HA [52].

Atualmente, pesquisadores vem explorando a facilidade da HA em suportar substituições iônicas e vacâncias para introduzir distintas espécies, como a

substituição de  $\text{Ca}^{2+}$  por íons divalentes  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , bem como alguns íons trivalentes como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  e  $\text{In}^{3+}$  [13,53–56], além das espécies mencionadas anteriormente. Ademais, a HA é uma rede cristalina eficiente para hospedar espécies de lantanídeos potencialmente luminescentes, como  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$  [57–60]. Estas espécies normalmente apresentam baixos limites de incorporação na rede cristalina da HA, salvo os íons  $\text{Y}^{3+}$  e  $\text{Eu}^{3+}$ . Entretanto, como estes valores são dependentes dos métodos de síntese, e das técnicas de caracterização utilizadas, eles podem variar ligeiramente. No tocante à ciência dos materiais, sabe-se que as dopagens possuem papel crucial nas propriedades finais do material, e o tema será abordado ao longo dos pontos posteriores, assim como o efeito de impurezas intrínsecas e desordem estrutural.

## 2.5 – Propriedades, aplicações e efeito de substituições iônicas

Ao longo dos últimos anos, a maior aplicação da HA consiste na substituição e tratamento de tecidos duros, uma vez que a HA é bem aceita pelo organismo vivo, como resultado de sua elevada biocompatibilidade [3]. Além disso, a HA é um dos membros mais representativos do grupo de materiais bioativos, e que apresentam significativa integração com o tecido vivo (osteointegração, neste caso) [17]. A HA promove uma ligação físico-química direta com a fase mineral presente no organismo, permitindo a adesão e proliferação de osteoblastos [61].

A maior limitação atual da HA está ligada às suas propriedades mecânicas (assim como boa parte das cerâmicas) limitando sua aplicação no recobrimento de próteses metálicas, dentre outras [62]. Como próteses metálicas normalmente são bioinertes, uma camada de HA, material bioativo, melhora a aceitação da prótese pelo organismo, além de promover uma ligação química com o osso, evitando assim, problemas de micromovimentos na região implantada.

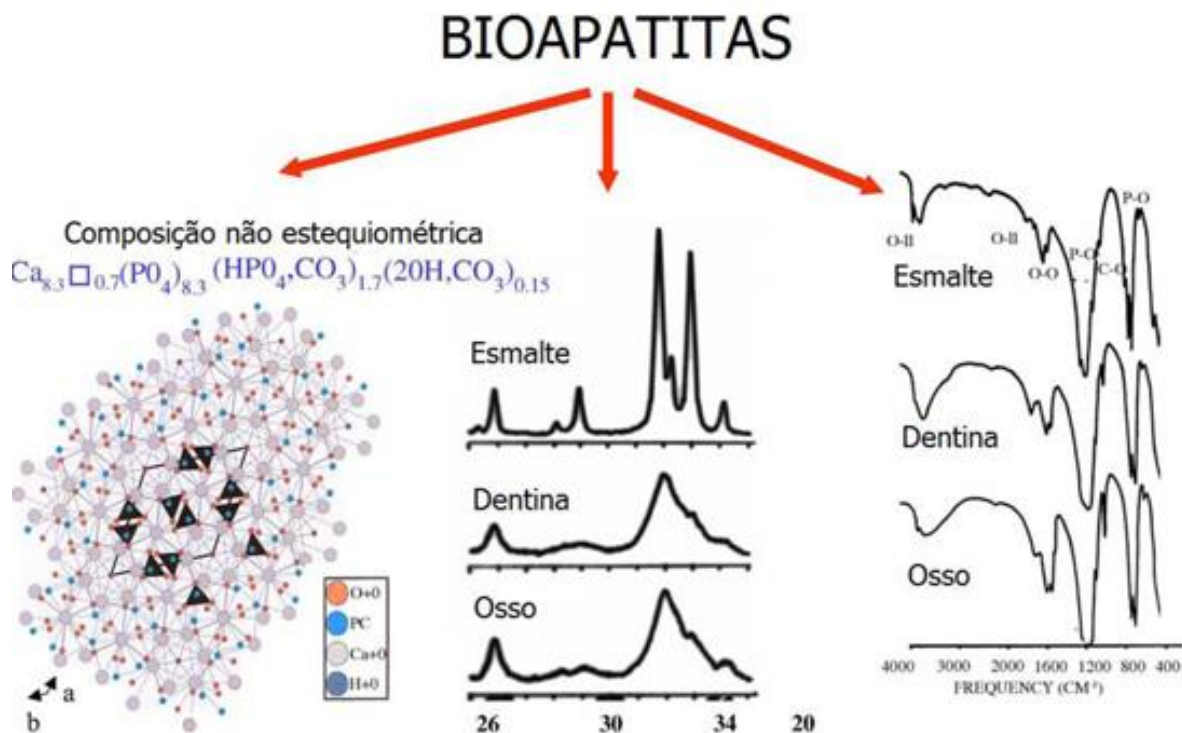
A característica *in vivo* descrita anteriormente deve-se a diversos fatores, mas principalmente às similaridades físico-químicas que possui com a fase mineral do osso, a bioapatita [2]. Entretanto, atualmente sabe-se que não basta somente a presença de uma fase cristalina similar para a obtenção de uma resposta otimizada da HA em sistemas fisiológicos: forma e tamanho das partículas devem ser levados em conta. Estes fatores podem alterar a resposta frente a células no

organismo. Exemplos desta relação no rendimento em sistemas fisiológicos foram publicados nos últimos anos [18]. O efeito de nanopartículas de HA com  $20 \pm 5$ ,  $40 \pm 10$  e  $80 \pm 12$  nm de tamanho foram testadas na proliferação de células ósseas e, especificamente, as com  $20 \pm 5$  nm, possuem a capacidade de inibir a proliferação de células ósseas cancerígenas [63].

Somando-se a estas características, há de se considerar ainda o ordenamento estrutural das espécies que compõe as partículas de HA (curto, médio e longo alcance). Neste sentido, uma estrutura mais desorganizada (menos cristalina), associada a pequenos tamanhos de partícula, permite uma maior reabsortividade da HA quando implantada. Por outro lado, uma partícula de HA com espécies mais ordenadas no retículo (elevada cristalinidade) associada a tamanhos maiores de partícula proporciona maior estabilidade do material [5]. Ademais, a presença de substituições iônicas e vacâncias tem papel crucial nas propriedades finais da HA. As alterações nos parâmetros de rede induzidas pelas mesmas alteram cristalinidade, morfologia, bem como outras propriedades físico-químicas e biológicas da HA [64]. A presença de Ca-dHA e de algumas dessas substituições (por exemplo,  $\text{Na}^+$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ ) é conhecida por enfraquecer a estrutura e aumentar sua solubilidade, já a HA estequiométrica e outras substituições (por exemplo,  $\text{F}^-$ ) a tornam mais estável e diminuem sua solubilidade [65].

A natureza parte das características mencionadas acima para conferir distintas funções aos tecidos duros. De fato, é devido a esta maleabilidade estrutural que os ossos podem atuar como reservatórios de minerais para o corpo além de estocagem de elementos tóxicos [16]. A HA cristaliza entre as fibras de colágeno, e encontra-se na forma de pequenas nanoplacas de baixo ordenamento e com substituições iônicas – estes fatores aumentam sua solubilidade facilitam os processos de remodelagem óssea [66]. Em relação ao esmalte dentário, a HA apresenta elevada ordem estrutural, com partículas relativamente maiores e ordenadas de forma organizada. Este tipo de estrutura faz com que as mesmas possuam a maior resistência necessária frente a ataques dos compostos químicos presentes nos alimentos (por exemplo, sucos ácidos) [67]. A Figura 2.5 ilustra a composição geral da bioapatita, bem como os padrões de difração de raios X e espectros de infravermelho para o esmalte, dentina e ossos [5]. Neles, é possível observar as diferenças de ordenamento da rede cristalina.

As dopagens são frequentemente utilizadas na HA com o objetivo de potencializar certas propriedades que a mesma possui, e também promover novas propriedades a este material. O  $\text{Sr}^{2+}$  pode substituir completamente as espécies de  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura, causando um aumento na desordem estrutural devido a diferença de tamanho. O  $\text{Sr}^{2+}$  aumenta a solubilidade da HA, pode estimular a atividade dos osteoblastos, e é recomendado no tratamento da osteoporose [68,69]. Efeito similar é observado pela dopagem com  $\text{Zn}^{2+}$ , o qual altera a resposta *in vivo* do material e significativamente inibe a cristalização da HA. Altas concentrações deste íon na matriz diminuem os valores dos parâmetros de rede, e tornam as partículas menores e não facetadas em relação a pura, além de estarem presentes na forma de aglomerados [70]. A incorporação de  $\text{Ag}^+$  na HA vem sendo amplamente explorada, pois melhora significativamente as propriedades bactericidas de implantes e próteses [71,72].



**FIGURA 2.5** – Estrutura cristalina da bioapatita. Padrões de difração de raios X e espectros na região do infravermelho referentes ao esmalte dentário, dentina e ossos humanos (adaptado de [5]). □ = Vacância em Ca.

## 2.6 – Aplicações com centros luminescentes

De acordo com estudos anteriores, tanto a presença de defeitos estruturais quanto a inserção de dopantes podem melhorar e otimizar as propriedades da HA para determinadas multifunções em variadas aplicações biomédicas. Outro

ponto importante é o fato da flexibilidade da rede poder ser utilizada a favor do incremento das propriedades ópticas da HA. Normalmente, a HA sintética possui emissões luminescentes de baixa intensidade [73]. Contudo, algumas estratégias podem ser adotadas para melhorá-las, com o objetivo de abrir novos campos de aplicação na nanomedicina. Como exemplo de tais aplicações, é possível citar as nanoprotas em técnicas e procedimentos de bioimagem. Isto faz com que a já notável multifuncionalidade do material seja ampliada quando associada a características e propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de carregar e liberar controladamente drogas no local desejado [3]. Neste sentido, a HA pode ser utilizada em aplicações de imagem/terapia.

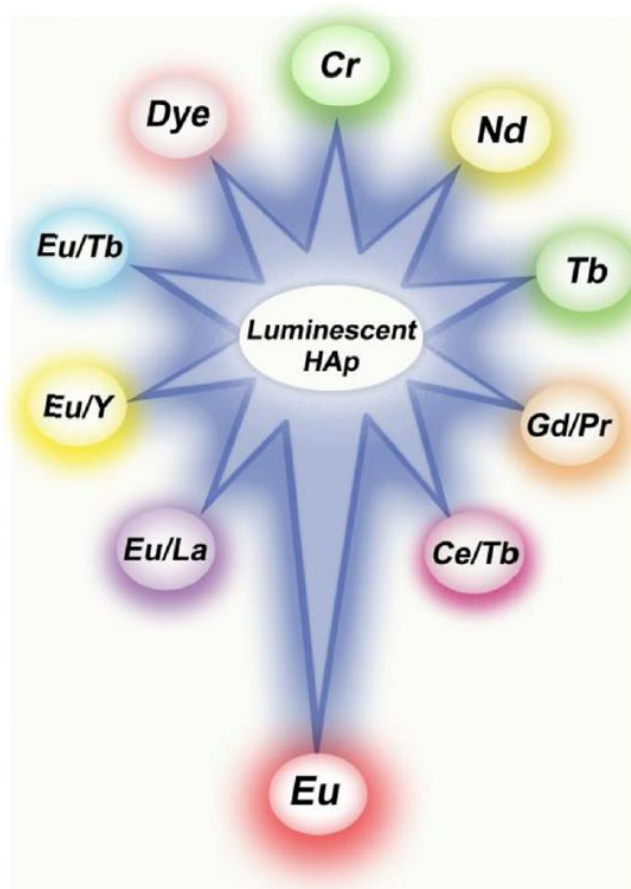
As técnicas de bioimagem são frequentemente exploradas no campo da biomedicina. A utilização das mesmas permite uma ampla gama de possibilidade de análises, partindo desde análise morfológica de estruturas anatômicas, até medidas de eventos moleculares em nível celular e subcelular [74]. Existem distintos tipos de técnicas de bioimagem, tais como ressonância magnética nuclear (RMN), tomografia computadorizada (TC) e imagem óptica (IO). Vários materiais foram propostos para a tarefa de agentes de contraste para estas técnicas, desde aqueles à base de corantes orgânicos, íons de lantanídeos, íons de metais de transição, nanopartículas de ouro, até os *quantum dots* [75–77].

Dentre estas técnicas, a IO vem experimentando crescente interesse, dadas suas marcantes vantagens sobre os métodos convencionais de imagem, como seletividade, elevada sensibilidade, caráter não destrutivo e possibilidade de imagens em tempo real sem a necessidade do uso de radiação [74,78]. Ademais, destacam-se as técnicas multimodais que permitem uma plataforma de imagem híbrida ao associar dois ou mais modos de imagem distintos, como RMN+IO [79].

Segundo SYAMCHAND e SONY [6], as partículas de HA para aplicações em bioimagem podem ser classificadas como HA luminescente, HA magnética e HA luminomagnética, de acordo com o tipo da propriedade explorada para bioimagem. As partículas luminescentes de HA ainda podem ser classificadas de acordo com a natureza do centro luminescente presente na HA que a torna útil para o uso em IO: (i) lantanídeos, (ii) metais de transição, (iii) corantes orgânicos. A Figura 2.6 ilustra as principais espécies luminescentes utilizadas na HA de acordo com estes autores [6]. Entretanto, pode-se ainda incluir os centros luminescentes baseados em defeitos

estruturais dando origem a um quarto grupo (iv) [9]. Cada grupo apresenta suas próprias vantagens e desvantagens quanto ao uso em bioimagem.

Há a possibilidade de em um mesmo grupo existir distintas maneiras de adicionar a espécie luminescente. Por exemplo, os lantanídeos podem ser inseridos na forma de substituições iônicas na estrutura cristalina da HA e na forma de compósitos com outros materiais contendo estas espécies [80]. Dentre tais metodologias, as estratégias utilizadas para dar origem às propriedades luminescentes da HA na presente tese estão centradas na incorporação dos lantanídeos na rede cristalina (i) e defeitos estruturais (iv).



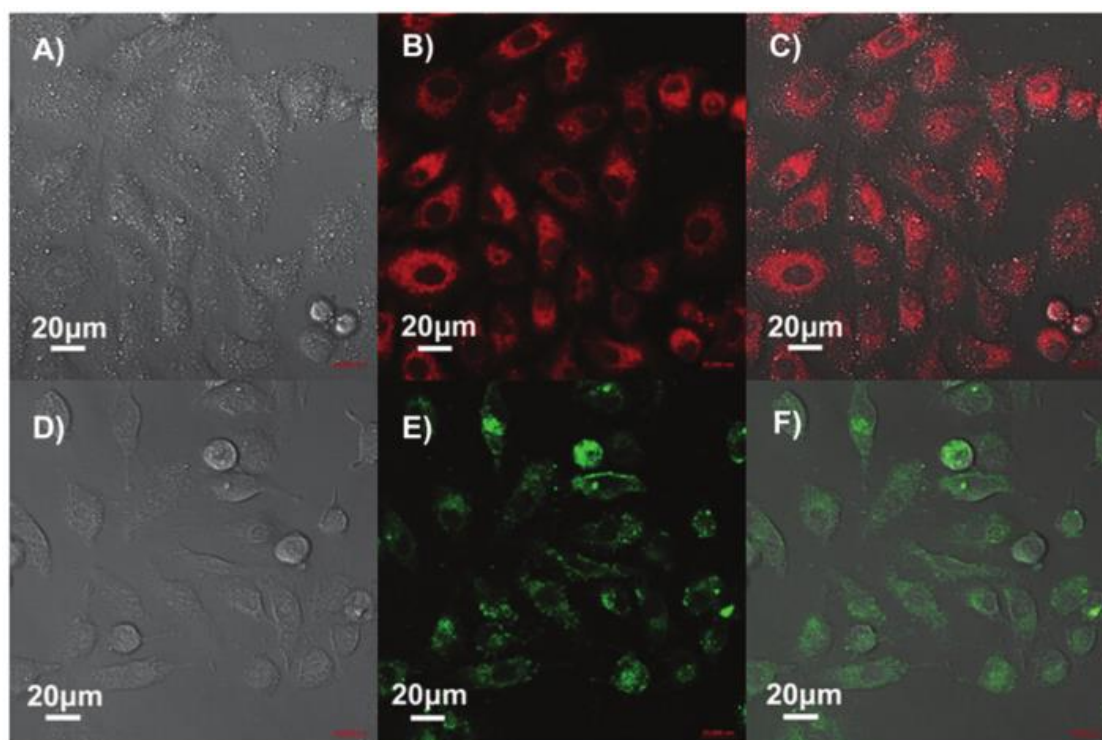
**FIGURA 2.6** – Marcadores luminescentes utilizados para obter propriedades ópticas melhoradas na HA [6].

A inserção de baixas concentrações de íons lantanídeos dá a HA importantes propriedades luminescentes devido às transições  $4f \rightarrow 4f$  e  $5d4f \rightarrow 4f$  destas espécies. Dentre as utilizadas para este fim e com potenciais aplicações, destaca-se o  $\text{Eu}^{3+}$ , amplamente pesquisado em relação as outras espécies de lantanídeos por apresentar características como emissões apropriadas para fins biológicos (próximos à janela de infravermelho [81]), longos tempos de vida e simplicidade da sua estrutura eletrônica [30]. Ademais, a biocompatibilidade das



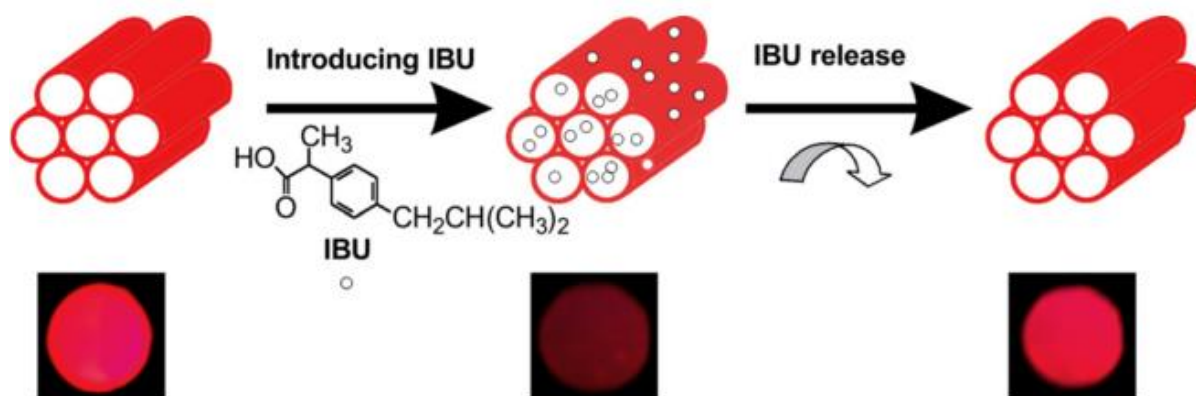
partículas não é significativamente alterada com a presença do  $\text{Eu}^{3+}$ , permitindo seu uso na biomedicina [29]. Nanopartículas de  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Gd}^{3+}$  também foram propostas para bioimagem multimodal como agente de contraste para RMN, IO e imagem por raios X [79,82].

É notável abundância de publicações sobre o uso de HAEu na bioimagem. Em um estudo pioneiro, DOAT *et al.* [83] demonstraram a aplicabilidade da HAEu na marcação e internalização em células humanas de câncer de pâncreas (*Capan-1*). Além disso, diversos outros estudos demonstraram a possibilidade de uso da HAEu em bioimagem de células. POPA *et al.* [29] descreveram a obtenção de imagem por fluorescência de células humanas embrionárias de rim (*HEK293*). HAN *et al.* [28], por sua vez, ilustraram a capacidade das nanopartículas de HAEu de marcar e serem internalizadas por células humanas de câncer de fígado (*Bel-7402*). WAGNER *et al.* [30] demonstraram a possibilidade de utilizar HAEu biocompatível para a imagem de células *7F2*, enquanto ZHENG *et al.* [12] realizaram a marcação e internalização de HAEu em células humanas de câncer cervical (*HeLa*). A Figura 2.7 ilustra a aplicação de HA dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  ou  $\text{Tb}^{3+}$  na geração de imagem de estruturas celulares [12].



**FIGURA 2.7** – Imagens ilustrando o *uptake* de nanopartículas de HA dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  (15 % molar) (a–c) ou HA dopada com  $\text{Tb}^{3+}$  (5 % molar) (d–f) em células *A549*. (a e d) imagens obtidas usando microscopia de transmissão de luz, (b e e), microscopia confocal e (c e f) sobreposição de ambas micrografias (adaptado de [12]).

Junto a estes estudos, pesquisadores também demonstraram que as nanopartículas de HAEu podem ser utilizadas para a liberação controlada de fármacos rastreadas por bioimagem [84]. Além disso, a liberação do fármaco altera a intensidade de luminescência da nanopartícula, o que pode servir para acompanhar a sua efetividade para este fim (Figura 2.8) [11]. Outras aplicações para HAEu incluem termômetro luminescentes e tintas de impressão de segurança [85].

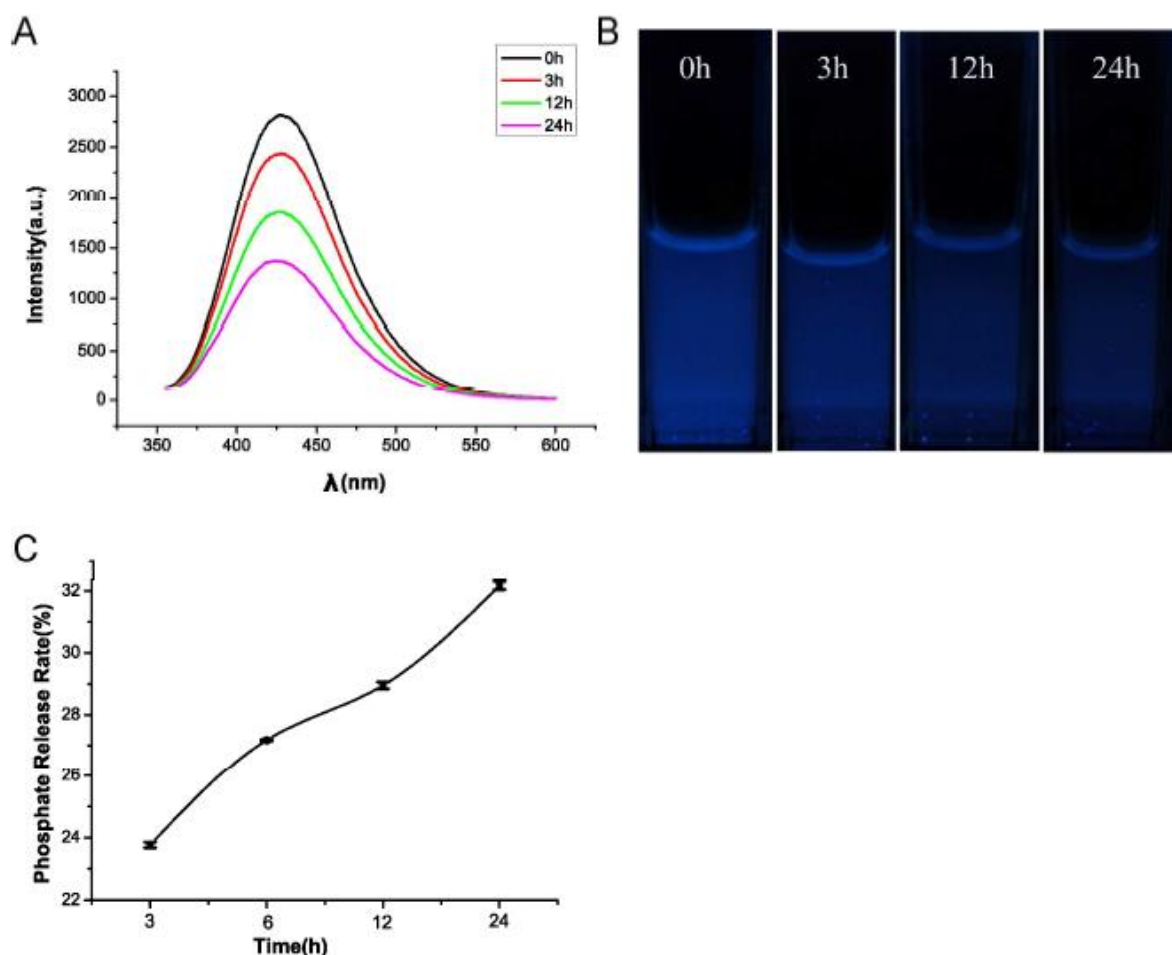


**FIGURA 2.8** – Procedimento experimental do processo de carregamento e liberação de Ibuprofeno em HAEu junto das correspondentes pastilhas do sistema fotografadas sobre irradiação de lâmpada UV com  $\lambda_{\max} = 365$  nm (adaptado de [11]).

Nota-se que as significativas propriedades luminescentes do  $\text{Eu}^{3+}$ , quando incorporado à HA, são consideravelmente úteis para a área da biomedicina relacionada a bioimagem e/ou acompanhamento da liberação controlada de fármacos. Sua utilização, contudo, pode aumentar o custo do produto final. Uma alternativa emergente para a utilização desta espécie está associada a FL que surge como efeito da presença de defeitos estruturais na HA. Conforme discutido anteriormente, a HA possui uma estrutura extremamente flexível que permite a presença de uma ampla quantidade de defeitos estruturais (distorções, vacâncias iônicas, impurezas) que podem ser otimizados para produzir FL intrínseca na HA sem a necessidade de dopagens [7,86,87]. Este tipo de processo rende uma banda de emissão na região correspondente ao azul ( $\lambda_{\max} = 420$  nm) do espectro eletromagnético [73].

Sistemas que apresentam FL intrínseca possuem excelentes propriedades biológicas. DAI *et al.* [88] demonstraram que os mesmos possuem elevada biocompatibilidade frente a osteoblastos. Este tipo de sistema foi sugerido para ser utilizado na bioimagem e liberação controlada de fármacos [8,10]. Eventos intracelulares também podem ser monitorados pelas partículas em questão. Em uma

recente publicação [9], pesquisadores utilizaram a FL por defeitos na HA para revelar mecanismos moleculares relacionados a osteogênese de células tronco ósseas pela liberação de  $\text{PO}_4^{3-}$  devido à internalização das partículas na célula e sua degradação no lisossomo. A degradação lisossômica promove diminuição na intensidade da FL com o tempo, indicando o processo degradativo. A Figura 2.9 ilustra os resultados obtidos na pesquisa de WANG *et al.* [9].



**FIGURA 2.9** – (a) Espectro de FL, (b) fotografia das amostras de HA excitadas em 377 nm depois de imersas em ácido acético por 0 h, 3 h, 12 h, 24 h, respectivamente; (c) liberação de fosfato depois da imersão em ácido acético por 3 h, 6 h, 12 h e 24 h (adaptado de [9]).

Apesar das vantagens frente aos materiais que utilizam dopagens de lantanídeos e outros compostos caros, as nanopartículas de HA com FL intrínseca ainda possuem uma série de limitações a serem superadas. Atualmente, são, em geral, obtidas pela metodologia hidrotérmica com o uso de aditivos orgânicos (brometo de hexadeciltrimetil amônio e citrato de sódio) [7]. Em vista disso, com o objetivo de associar o baixo custo do material que a FL intrínseca oferece a este sistema, novas rotas sintéticas mais viáveis economicamente e simples devem ser desenvolvidas.

Além do mais, a FL intrínseca da HA ocorre na região espectral correspondente a cor azul, o que limita a utilização das partículas para tecidos mais profundos em aplicações em bioimagem.

## **2.7 – Principais métodos de preparação da hidroxiapatita**

Considerando o que foi exposto anteriormente, pode-se constatar que as propriedades finais e aplicações da HA são dependentes de vários fatores, como composição (estequiometria, presença de vacâncias, dopagens e impurezas), grau de ordenamento das espécies que compõem a rede cristalina, forma e tamanho das partículas, funcionalização das partículas, porosidade, etc. Ao longo das últimas décadas, diversos métodos de preparação incluindo a manipulação de tais fatores foram desenvolvidos e adaptados com o objetivo de obter respostas otimizadas da HA nas aplicações desejadas, bem como no emprego de estudos de ciência básica, e no uso da HA como modelo de biomineralização da biopatita no corpo humano [3]. Na atualidade, há uma vasta quantidade de informação sobre as metodologias e os parâmetros usados nos processos em questão, que podem ser utilizados como base para os pesquisadores de ciência de materiais e biológicas, sendo encontrada em diversos artigos de revisão, como os publicados por SADAT-SHOJAI *et al.* [89] e LIN *et al.* [90].

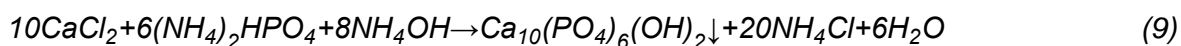
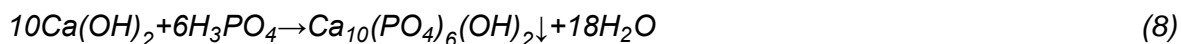
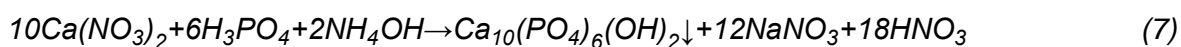
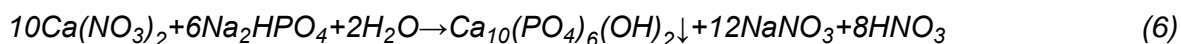
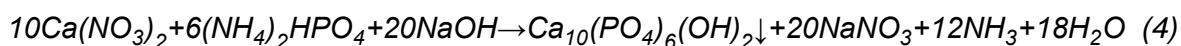
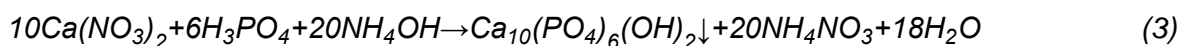
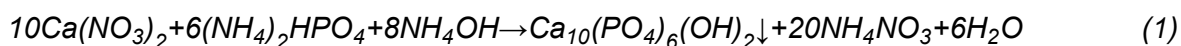
Os métodos de preparação da HA podem ser divididos em métodos por via úmida, métodos por via seca, processamentos a alta temperatura e sínteses baseadas fontes biogênicas [89]. Apesar desta classificação mais genérica, os grupos ainda podem ser diferenciados de acordo com o procedimento experimental e a maneira como se produz a reação de obtenção da HA. Este é o caso dos métodos por via seca que incluem reações no estado sólido a alta [53,91] e baixa [92] temperatura, e moagem mecânica [93]. Há também os métodos de processamento a alta temperatura, representados pelo método de combustão [59] e a pirólise [94]. Em relação aos métodos por via úmida pode-se destacar os tratamentos hidrotérmicos [7,95,96], a precipitação química [49,97,98], precipitação química assistida por tratamento ultrassônico [28,99], precipitação química com aditivos orgânicos [11,100,101], hidrotérmico assistido por micro-ondas [102], Sol-Gel [103] e a hidrólise dos precursores [104–106]. Cada uma das metodologias desenvolvidas apresenta

suas próprias vantagens e desvantagens, as quais devem ser levadas em conta durante o desenvolvimento da pesquisa científica.

### 2.7.1 – Métodos de preparação por via úmida

Nesta tese, utiliza-se a precipitação química, que consiste em um método por via úmida. Desta maneira, será dada uma maior ênfase neste grupo na presente fundamentação. Os métodos por via úmida se tornaram populares na síntese da HA pura e dopada por permitirem a obtenção de partículas em diversas formas, tamanhos e composições. Isto é possível a partir da seleção da rota sintética adequada e adaptação dos parâmetros de síntese como temperatura e tempos de reação, solventes, concentração dos precursores, etc. Devido a esta maleabilidade, tais métodos tornaram-se os mais utilizados nos últimos anos. Neste sentido, mais de 60% das metodologias descritas hoje são voltadas a síntese por via úmida [89].

Os métodos podem ir desde simples e economicamente viáveis precipitações químicas aquosas, até elaboradas estratégias de obtenção por microemulsão reversa assistida por tratamentos solvotérmicos assistidos, por sua vez, por micro-ondas [107]. Neste sentido, a seleção do procedimento de síntese é ditada pelo tipo de estudo em questão, e os métodos por via úmida abarcam estas necessidades. Algumas das possíveis desvantagens incluem sínteses complexas com o uso de vários aditivos orgânicos e solventes em aparelhos complexos, elevado custo e longos tempos de síntese. A seguir, são listadas algumas das reações mais utilizadas na preparação da HA por via úmida [32,35,89]:



Em todos os casos, pode-se notar que as reações consistem na mistura em valores estequiométricos (em relação à estequiometria HA) dos precursores de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , na presença ou não de um agente basificante, podendo ser utilizadas em rotas sintéticas relativamente simples. Apesar desta vantajosa possibilidade, devem ser notadas algumas considerações a respeito das reações durante a elaboração do procedimento experimental, pois há potencial de alteração da estequiometria final do produto, bem como sua morfologia [3]. As reações podem ser conduzidas em solventes orgânicos ou aquosos, a baixas temperaturas ou elevadas temperaturas (abaixo, próximo ou acima do ponto de ebulição do solvente). As mesmas podem ainda ser realizadas por distintas rotas envolvendo diversos aparelhos e aditivos químicos auxiliares [89].

### 2.7.2 – Precipitação química

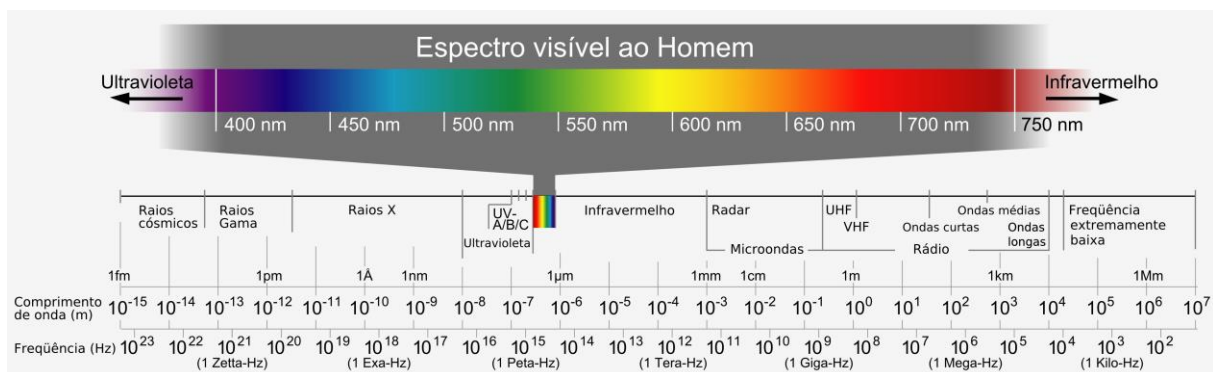
Apesar da grande variedade de metodologias atualmente disponíveis, a precipitação química continua sendo a rota mais viável para a obtenção contínua e em escala industrial da HA, devido ao baixo custo e simplicidade em relação às outras [108–110]. A metodologia em questão consiste na formação de um sólido (amorfo ou cristalino) por uma reação química em solução na qual a concentração de um composto é maior que seu valor de solubilidade. Neste sentido, atinge-se o valor de supersaturação na solução e a precipitação do produto desejado ocorre [32]. Estas reações envolvem também etapas e mecanismos de formação e cristalização, temática a qual será abordada de maneira mais detalhada no Capítulo 4 da presente tese.

As características do produto resultante são essencialmente dependentes da maneira que os precursores são misturados. Ao longo dos últimos anos, foram realizados estudos para relacionar a influência dos parâmetros nas características da HA. Dentre eles, destacam-se a temperatura, tempo de reação e maturação e o valor de pH [49,97,98,111]. Com a otimização desses parâmetros, é possível obter materiais com distintas características, como morfologia, quantidade de vacâncias, cristalinidade e tamanho de partículas. Em um procedimento tradicional, realiza-se a adição de maneira controlada do precursor de fosfato sobre o de cálcio (ou vice-versa) sob constante agitação. A suspensão resultante pode ser então

envelhecida na solução ou imediatamente lavada, recuperada, secada e moída na forma de pó.

## 2.8 – Luminescência

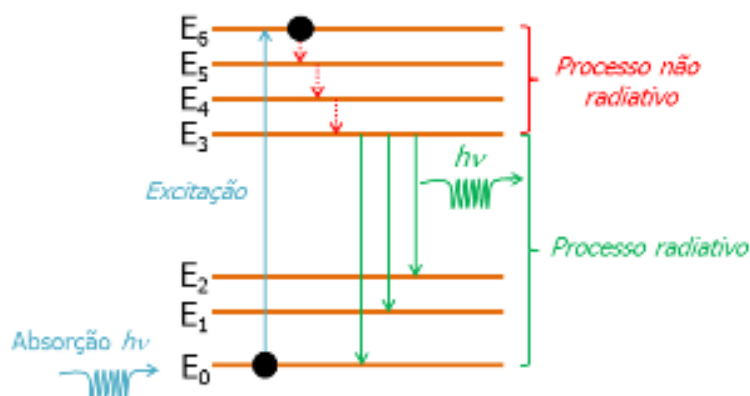
Considerando os pontos mencionados anteriormente, a tese está centrada no estudo dos fenômenos de luminescência em materiais. Neste sentido, a continuação, descreve-se a fundamentação sobre os sólidos inorgânicos com propriedades luminescentes, focando principalmente nos mecanismos que levam a esta propriedade nos mesmos. De uma maneira geral, a luminescência consiste em um fenômeno físico no qual materiais absorvem energia induzindo os elétrons neles presentes a um estado de maior energia (estado excitado). Ao retornarem ao seu estado de menor energia (estado fundamental), tem-se lugar a liberação da energia excedente na forma de radiação eletromagnética [112]. Esta liberação de energia normalmente se caracteriza pela emissão de luz na região correspondente ao visível no espectro eletromagnético (Figura 2.10), mas também pode ser em outras regiões espectrais (por exemplo, ultravioleta e infravermelho).



**FIGURA 2.10** – Representação do espectro eletromagnético [113].

O termo luminescência é um termo geral para o processo de liberação de energia na forma de luz. Entretanto, dependendo do tipo de energia utilizada para a excitação do material distintas denominações para este processo podem ser designadas. Neste sentido, a eletroluminescência ocorre através da excitação com energia elétrica; quimiluminescência através da energia de reações químicas; triboluminescência através da energia mecânica exercida sobre um sólido; catodoluminescência ocorre pela energia de um feixe de elétrons de alta energia; termoluminescência pela excitação com a energia gerada pelo aquecimento;

fotoluminescência ocorre pela excitação por meio de fótons que são absorvidos pelo material [114]. Na presente tese, estuda-se o fenômeno de FL nos sólidos. Este mecanismo é ilustrado pela Figura 2.11.



**FIGURA 2.11** – Esquema de processos de excitação e emissão de FL [114].

A FL é classificada de acordo com a magnitude do tempo de retardo entre os eventos de absorção e emissão, sendo denominada fluorescência ou fosforescência. Na fluorescência a radiação emitida cessa quase que imediatamente ao se extinguir a radiação de excitação. Trata-se assim de uma transição rápida (tempos inferiores a  $10^{-5}$  segundos) sem a alteração de *spin* eletrônico. Em contrapartida, a emissão na fosforescência pode persistir durante longos períodos de tempo (desde frações de segundo, até minutos ou mais), devido a que se trata de uma transição com alteração de *spin* eletrônico [114].

Na presente tese, será abordada a preparação de HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$ , com foco na investigação suas propriedades fotoluminescentes, principalmente. Neste sentido, à continuação, descreve-se a fundamentação sobre os sólidos inorgânicos com propriedades luminescentes e, com maior ênfase, os mecanismos de FL intrínseca e originária da dopagem com lantanídeos.

## 2.9 – Fotoluminescência em sólidos inorgânicos

Geralmente, materiais inorgânicos fotoluminescentes podem ser classificados de acordo com suas atividades ópticas: (i) materiais com eficientes centros luminescentes por si só; (ii) materiais com baixa atividade óptica em que a mesma é melhorada pela presença de espécies fotoluminescentes (geralmente dopagens com íons de lantanídeos e/ou metais de transição); (iii) combinação de materiais com

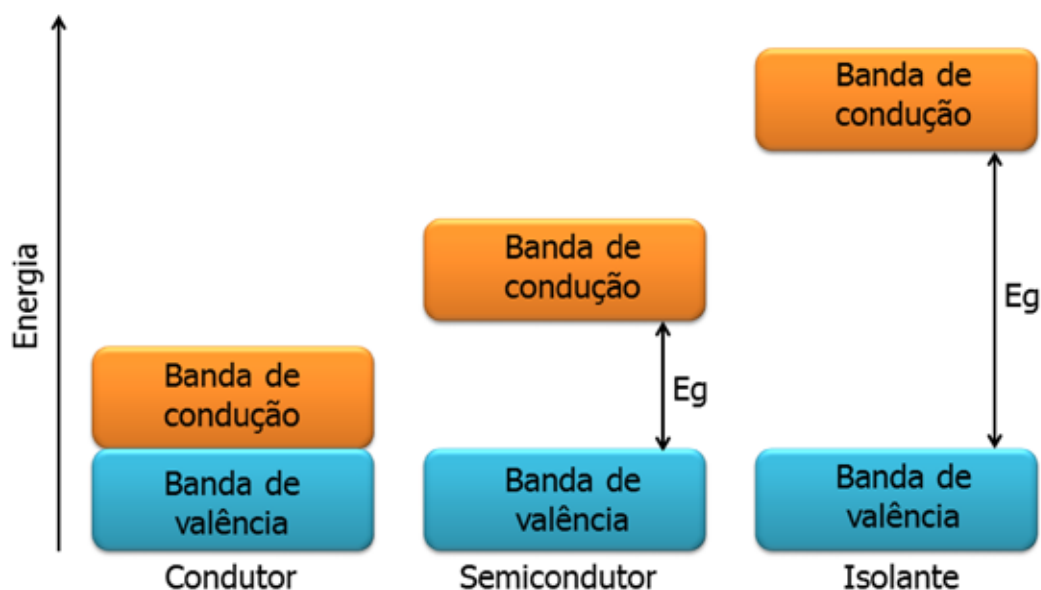


eficientes centros fotoluminescentes e introdução de espécies fotoluminescentes [115]. No primeiro caso, a FL é intrínseca ao material e surge devido a níveis de energia de natureza defeituosa presente no material. Já no segundo caso, as transições eletrônicas que levam a FL são entre os níveis de energias da espécie introduzida (por exemplo, transições  $4f \rightarrow 4f$  no  $\text{Eu}^{3+}$ ). Por último, é possível a combinação entre a FL intrínseca e a de dopantes com o objetivo de alterar as características de emissão como um todo (região espectral, amplitude da banda de emissão, intensidade, etc.). A continuação, serão abordados os mecanismos de FL intrínseca em sólidos e as principais características dos íons lantanídeos e, em específico, do  $\text{Eu}^{3+}$ .

### 2.9.1 – Estrutura de bandas e fotoluminescência intrínseca

No estado sólido, sabe-se que átomos se encontram próximos uns aos outros. Estes átomos se repelem causando uma perturbação nos seus níveis de energia. Como consequência, uma grande quantidade de átomos estreitamente posicionados (devido ao estado sólido do material) permite um grande número de níveis energéticos próximos formando uma banda de energia quase contínua. Entretanto, tais níveis eletrônicos podem possuir significativas separações energéticas, dando origem bandas de energia permitidas (ocupadas por elétrons) e proibidas (desocupadas). A natureza desta separação dá lugar a distintas classes de materiais: condutores, semicondutores e isolantes [116].

A Figura 2.12 ilustra as configurações de bandas para estes tipos de materiais. Um material é classificado como condutor quando a banda de valência (BV, preenchida) e a banda de condução (BC, parcialmente preenchida) possuem energias tão próximas que existe uma sobreposição entre as mesmas [117]. Em um semicondutor, a banda de valência (BV) se encontra totalmente ocupada, e a de condução (BC), por sua vez, totalmente vazia. Estas bandas estão separadas por uma quantidade intermediária de energia (por exemplo, separação de energia equivalente a 2 eV para o Si), dando lugar a uma região proibida conhecida como *band gap* sem estados eletrônicos. Quando excitados, os elétrons passam da BV para a BC. Para que isso ocorra, é necessária energia suficiente para que o valor de energia de *band gap* ( $E_g$ ) seja superado. Já os isolantes possuem uma grande diferença energética entre a BV e a BC ( $E_g$  do diamante = 7 eV), o que torna difícil a condução [116].

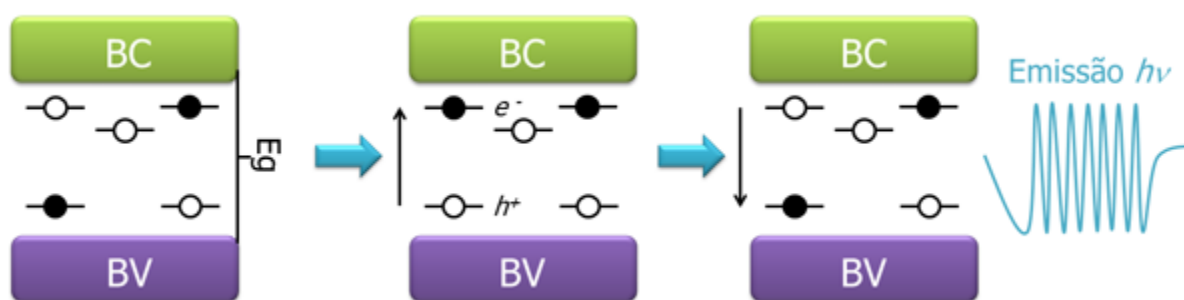


**FIGURA 2.12** – Modelo esquemático de bandas para materiais (adaptado de [116]).

Ainda acerca dos materiais semicondutores, o processo de recombinação par elétron-buraco ( $e^-h^*$ ) após a excitação pode levar a FL dos materiais. Um crescente interesse no fenômeno fotoluminescente ocorreu após a obtenção de emissão no visível em silício poroso [118]. Nos últimos anos, distintos modelos e mecanismos foram propostos para explicar a possível origem da FL em semicondutores. O modelo de *Blasse* foi um dos pioneiros, e está baseado na transferência direta de cargas da BV para a BC, com processos de decaimento radiativo e não radiativo [114]. O modelo de *Korzhik*, por sua vez, propõe estados de energia localizados no  $E_g$  logo acima e abaixo da BV e BC, respectivamente, como resultado de defeitos estruturais intrínsecos ou impurezas na rede cristalina, podendo armadilhar elétrons durante processos de recombinação [119]. Já segundo o modelo de *Leonelli* pequenos *polarons* são formados como efeito do movimento de cargas elétricas em um cristal, causando a polarização da rede cristalina e formando estados intermediários na banda proibida. Os *polarons* podem interagir com buracos no cristal (defeitos e impurezas), e contribuem para a emissão da FL [120].

Baseado em informações obtidas por resultados experimentais e cálculos teóricos, propôs-se nos últimos anos o modelo da *banda larga*, que tem sido bem aceito pela literatura. A Figura 2.13 ilustra uma representação da estrutura de bandas seguindo este modelo. Os níveis de energia na região proibida, neste caso, originam-se da distribuição aleatória e não homogênea de cargas na rede cristalina

que, por sua vez, emergem pela quebra de simetria dos *clusters* formadores e modificadores de rede causada por distorções a curta, média e longa distância. Os estados já existentes no  $E_g$  podem capturar elétrons. Quando ocorre excitação, os elétrons armadilhados acima da BV são promovidos a níveis de energia próximos a BC. No processo de recombinação, ocorre a emissão de fótons com distintas energias, dando origem ao espectro de FL do tipo banda larga [121–123].



**FIGURA 2.13** – Modelo de banda larga para semicondutores (adaptado de [123]).

## 2.9.2 – Estrutura eletrônica e fotoluminescência dos íons lantanídeos

Os íons trivalentes da série dos lantanídeos ( $\text{Ln}^{3+}$ , com configuração  $[\text{Xe}]4f^n$ ) sofrem um gradual preenchimento dos orbitais  $4f$ , partindo do  $4f^0$  ( $\text{La}^{3+}$ ) ao  $4f^{14}$  ( $\text{Lu}^{3+}$ ). Os elétrons relacionados a suas propriedades luminescentes ocupam orbitais  $4f$ , cuja localização é mais interna. Em decorrência desta configuração espacial, estão blindados do entorno do íon pelos orbitais  $5s^2$  e  $5p^6$ , completamente preenchidos [78]. Como consequência, o entorno exerce pouca influência sobre os estados de energia oriundos da configuração  $4f^n$  – a Figura 2.14 ilustra os níveis de energia originários da configuração  $4f^n$  dos íons  $\text{Ln}^{3+}$ . Para um determinado  $\text{Ln}^{3+}$ , estes níveis de energia permanecem praticamente invariáveis como efeito da blindagem.

Acerca da Figura 2.14, é possível observar que a amplitude do desdobramento do campo cristalino é dada pela largura das barras destes níveis. Nestes casos, pode-se observar um desdobramento significativamente inferior ao dos íons de metais de transição. Este comportamento é explicado pelo fato dos orbitais  $f$  estarem localizados mais internamente em comparação aos orbitais  $d$  que, por sua vez, são mais susceptíveis a influências do entorno. Por conseguinte, para os íons de lantanídeos a força do campo cristalino gira na ordem de centenas de  $\text{cm}^{-1}$ ,



comumente observadas para estas espécies – são observados tons menos intensos, por vezes quase imperceptíveis [126].

Há de se destacar ainda que as propriedades ópticas dos íons  $\text{Ln}^{3+}$  são essencialmente associadas às transições  $4f \rightarrow 4f$ . Conforme a regra de seleção de paridade (*Laporte*), a absorção óptica é vigorosamente proibida [127]. Entretanto, quando os íons de lantanídeos ocupam posições cristalográficas sem centro de simetria, há a possibilidade de relaxamento da regra de seleção de paridade. Este fato se deve às componentes não homogêneas do campo cristalino presentes neste caso, viabilizando a mistura das funções de onda  $4f$  com funções de onda de paridade oposta – este é o caso das funções  $5d$ , que permitem o aparecimento de picos de ligeira intensidade das transições intraconfiguracionais  $4f^n$  [126].

A técnica de dopagem, que envolve a incorporação de baixas concentrações de átomos ou íons em uma rede hospedeira, é amplamente usada para sintetizar materiais inorgânicos com propriedades luminescentes. Considerando haver dificuldade em excitar diretamente os íons  $\text{Ln}^{3+}$ , em virtude de apresentarem baixa absorção de energia, a técnica em questão é uma alternativa viável na superação desta característica intrínseca aos lantanídeos. Neste sentido, o maior coeficiente de absorção de alguns materiais acarreta em eficientes mecanismos de transferência de energia para a espécie  $\text{Ln}^{3+}$ . Assim, a rede cristalina destes materiais permite um estável microambiente para o emissor  $\text{Ln}^{3+}$  [78].

Em associação à técnica de dopagem, o desenvolvimento de materiais luminescentes também pode ocorrer a partir da incorporação de um sensibilizador (codopagem). A partir deste procedimento, o material sensibilizador é excitado e absorve a energia (estado excitado) que é, em seguida, transferida ao íon  $\text{Ln}^{3+}$ . Este mecanismo é conhecido como “efeito antena” [78].

Todos os íons  $\text{Ln}^{3+}$ , com exceção do  $\text{La}^{3+}$  e  $\text{Lu}^{3+}$ , possuem propriedades luminescentes, e suas linhas de emissão  $4f \rightarrow 4f$  cobrem desde a região ultravioleta ( $\text{Gd}^{3+}$ ) ao espectro visível ( $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ) e infravermelho próximo ( $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ). Assim como as bandas de absorção, as emissões dos íons  $\text{Ln}^{3+}$  são formadas por um conjunto de bandas (linhas) agudas. Para os íons  $\text{Ln}^{3+}$ , o tempo de vida de estado excitado é longo ( $\sim 10^{-3}$  s), pois não há variações de paridade [124].

Por outro lado, sabe-se que algumas características das bandas de emissão vão depender do entorno em que se encontram os íons  $\text{Ln}^{3+}$  – como suas

posições, ou seja, a energia das transições, a largura e definição destas bandas, bem como os tempos de vida das transições. Deste modo, as propriedades supracitadas podem variar de acordo com o sítio em que o lantanídeo está estabilizado numa dada estrutura cristalina. Em alguns casos, podem existir distintos entornos disponíveis para o  $\text{Ln}^{3+}$  em uma mesma matriz inorgânica – logo, para cada entorno, as características das linhas podem ser distintas. Assim, conclui-se que um espectro de emissão observado pode ser o resultado da contribuição de cada entorno em que o  $\text{Ln}^{3+}$  esteja alocado [114].

As propriedades espectrais dos íons  $\text{Ln}^{3+}$  são ditadas pelo campo cristalino e a covalência dos distintos entornos em que os mesmos podem estar submetidos. No primeiro caso, a força do campo cristalino pode alterar o desdobramento observado de algumas transições, bem como suas posições espectrais. De fato, esta característica permite a utilização de certos íons  $\text{Ln}^{3+}$  como sondas espectrais de seus entornos, auxiliando na determinação da simetria do cluster de coordenação no qual os mesmos se encontram alocados. Por outro lado, a interação entre os elétrons pode ser mais débil uma vez ocorra um aumento no caráter covalente do entorno devido a sobreposição de orbitais. Neste caso, os elétrons estarão distribuídos de uma maneira mais ampla nos mesmos. Por consequência, as transições eletrônicas passam a estar situadas em regiões de menores energias (efeito nefelauxético) [125,127].

### 2.9.3 – Propriedades fotoluminescentes do íon $\text{Eu}^{3+}$

O  $\text{Eu}^{3+}$  possui uma configuração  $4f^6$ , e é um importante emissor na região laranja-vermelho (590–625 nm), devido às transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ ,  $J = 0-6$ . Além da emissão destas linhas, também é possível observar emissões desde níveis  ${}^5D_J$  mais elevados em termos de energia, como o  ${}^5D_1$ ,  ${}^5D_2$  e inclusive o  ${}^5D_3$  [124].

As propriedades espectrais do  $\text{Eu}^{3+}$ , assim como dos outros  $\text{Ln}^{3+}$ , são minimamente perturbadas pelo campo externo, fato comum às outras terras raras [126]. Além disso, alterações nas simetrias dos sítios e forças de campo cristalino podem afetar algumas das características das emissões deste íon, como resolução, intensidades relativas, separação e tempos de vida das transições [128]. O  $\text{Eu}^{3+}$  tem uma simples estrutura de níveis energéticos e mudanças nestes parâmetros também

revelam notáveis informações sobre a rede hospedeira e o entorno em que o mesmo está presente.

Nesta perspectiva, o  $\text{Eu}^{3+}$  tem sido extensivamente utilizado como prova local de simetria em sistemas cristalinos e amorfos [91,129–131], sendo considerado como a sonda espectral mais útil entre os íons de lantanídeos. Este vasto leque de possibilidades de aplicação do  $\text{Eu}^{3+}$  se deve ao fato de o nível emissivo  ${}^5D_0$  e o nível no estado fundamental  ${}^7F_0$  serem não degenerados. Ademais, pode-se identificar distintos sítios para o íon  $\text{Eu}^{3+}$  com variados campos cristalinos atuando sobre os mesmos, ao avaliar o desdobramento do campo cristalino das transições em função das predições teóricas [132].

De maneira geral, na forma gasosa como íons livres (a dizer, íons  $\text{Ln}^{3+}$  não coordenados e amplamente separados), os estados de energia são descritos como sendo  ${}^{2S+1}L_J$ , em que  $S$  consiste no spin eletrônico,  $L$  o momento angular orbital e  $J$  o momento angular total (vetor da somatória entre  $S$  e  $L$ ). Os valores de  $L$  podem ser  $0, 1, 2, 3, 4...$  e são referidos pelas letras  $S, P, D, F, G...$ . O íon  $\text{Eu}^{3+}$  possui o estado  ${}^7F_J$  ( $J = 0-6$ ), onde  $S = 3, L = 3$  e  $J$  pode assumir valores inteiros entre 0 e 6, sendo 0 o estado fundamental. Além disso, para cada valor de  $J$  podem existir  $2J+1$  microestados de energia, também chamados de componentes *Stark*, com valores iguais a  $J, J-1, J-2 \dots 0 \dots -J$ . Logo, para  $J = 2$  temos as componentes *Stark* com valores 2, 1, 0, -1, -2 [128].

Sabe-se que quando em forma de íon livre e sem a presença de um campo magnético, os microestados de energia são degenerados (possuem a mesma energia), sempre que  $N$  assuma um valor par nas configurações eletrônicas  $4f^n$ . Neste caso, o número de componentes *Stark* nos estados  ${}^{2S+1}L_J$  será dado por  $2J+1$ . Desta maneira, para o  $\text{Eu}^{3+}$ , o estado  ${}^7F_2$  se desdobra em 5 componentes *Stark* de energia. Entretanto, quando os íons  $\text{Ln}^{3+}$  são alocados em um sítio cristalino, o aparecimento de todas as componentes *Stark* dependerá, dentre outros fatores, da simetria do *cluster* de coordenação em que se encontra a espécie  $\text{Ln}^{3+}$  [128]. Em sítios de baixa simetria, as regras proibitivas às transições são quebradas, o que não ocorre em sítios de elevadas simetrias. Neste sentido, o estado  ${}^7F_2$  do  $\text{Eu}^{3+}$  é composto de 2 níveis em um sítio octaédrico (alta simetria), mas de 5 níveis em um sítio  $C_2$  (baixa simetria). Com base nas regras de seleção, as linhas de transições permitidas para  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$  para o  $\text{Eu}^{3+}$ , em 32 grupos pontuais, são listados na Tabela 2.2 [132].

**TABELA 2.2** – Número de níveis *Stark* permitidos teoricamente para a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$  ( $J = 0-6$ ) dos íons  $\text{Eu}^{3+}$  alocados em clusters de coordenação com distintas simetrias e grupos pontuais (adaptado de [132]).

Simetria local	Grupo pontual	Número de componentes <i>Stark</i> permitidas para o estado ${}^7F_J$ no $\text{Eu}^{3+}$							
		$J = 0$	1	2	3	4	5	6	
Triclínica	$C_1$	1	3	5	7	9	11	13	
	$C_i$	0	3	0	0	0	0	0	
Monoclínica	$C_s$	1	3	5	7	9	11	13	
	$C_2$	1	3	5	7	9	11	13	
	$C_{2h}$	0	3	0	0	0	0	0	
Ortorrômbica	$C_{2v}$	1	3	4	5	7	8	10	
	$D_2$	0	3	3	6	6	9	9	
	$D_{2h}$	0	3	0	0	0	0	0	
Tetragonal	$C_4$	1	2	2	3	5	6	6	
	$C_{4v}$	1	2	2	2	4	4	5	
	$S_4$	0	2	3	4	4	5	7	
	$D_{2d}$	0	2	2	3	3	4	5	
	$D_4$	0	2	1	3	3	5	4	
	$C_{4h}$	0	2	0	0	0	0	0	
	$D_{4h}$	0	2	0	0	0	0	0	
Trigonal	$C_3$	1	2	3	5	6	7	9	
	$C_{3v}$	1	2	3	3	5	5	7	
	$D_3$	0	2	2	4	4	6	6	
	$D_{3d}$	0	2	0	0	0	0	0	
	$S_6$	0	2	0	0	0	0	0	
Hexagonal	$C_6$	1	2	2	2	2	3	5	
	$C_{6v}$	1	2	2	1	2	2	4	
	$D_6$	0	2	1	2	1	3	3	
	$C_{3h}$	0	2	1	2	3	3	3	
	$D_{3h}$	0	2	1	2	3	3	3	
	$C_{6h}$	0	2	0	0	0	0	0	
	$D_{6h}$	0	2	0	0	0	0	0	
Cubica	$T$	0	1	1	2	2	3	3	
	$T_d$	0	1	1	1	1	1	2	
	$T_h$	0	1	0	0	0	0	0	
	$O$	0	1	0	1	1	2	1	
	$O_h$	0	1	0	0	0	0	0	

As transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-6}$  do íon  $\text{Eu}^{3+}$  estão estritamente submetidas às regras de seleção de *Laporte*, e o aparecimento delas em espectros de emissão varia de acordo com o entorno em que esta espécie está situada. Segundo esta regra, as transições em questão são proibidas por dipolo elétrico sempre que o íon  $\text{Eu}^{3+}$  esteja localizado em um entorno de alta simetria com centro de inversão. A única exceção à regra consiste na transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ , pois nestas condições somente são permitidas



transições de natureza do tipo dipolo magnético que obedecem a regra de seleção  $\Delta J = 0, \pm 1$  ( $J = 0$  para  $J = 0$  não é permitida). Entretanto, as transições de dipolo elétrico podem ser observadas no espectro de emissão (dipolo elétrico forçadas) caso não haja centro de inversão (baixa simetria). Neste caso, o que ocorre é um relativo relaxamento das regras proibitivas. Em especial, existem algumas transições que são hipersensíveis a este efeito de tal maneira podem aparecer de forma majoritária no espectro de emissão, como é o caso da transição hipersensível  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  [133].

O íon  $\text{Eu}^{3+}$ , quando alocado em um entorno de baixa simetria ( $C_s$ ,  $C_{1-6}$  ou  $C_{2v, 4v, 6v}$ ), apresenta em seu espectro banda de emissão referente a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ , que, neste caso, serve como um indicativo da baixa simetria. Somando-se a isto, a linha de emissão não degenerada  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  possui uma importância especial, pois revela a presença de sítios não equivalentes em uma dada matriz. Uma vez que o estado  ${}^5D_0$  é não degenerado sobre nenhuma simetria, a estrutura da emissão  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$  é somente determinada pela separação dos níveis terminais, causada pelo campo cristalino local. Além disso, o nível  ${}^7F_0$  também é não degenerado. Desta forma, excitação sítio-seletiva de alta resolução na banda de absorção  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  pode ser realizada com um laser, e a simetria de múltiplos sítios do  $\text{Eu}^{3+}$  em um material ou molécula podem ser estudados facilmente [127]. Para a realização de excitações seletivas, é necessário que a técnica seja capaz de utilizar um único nível de excitação, tarefa complexa, a não ser que se empregue a caracterização com laser [126,128]. Por esta razão, a banda de excitação de transferência de carga  $\text{Eu}^{3+}-\text{O}^{2-}$  (aproximadamente 250–300 nm) e outras linhas intensas de excitação, como  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5L_6$  (aproximadamente 395 nm) e  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_2$  (aproximadamente 465 nm) são corriqueiramente utilizadas para caracterizar as amostras, mesmo não sendo seletivas [91].



## CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Na presente tese, pós de HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  (1% molar) foram sintetizados pelo método de precipitação química em meio aquoso. Neste capítulo são detalhadas as rotas sintéticas e parâmetros selecionados para obter estes materiais, bem como os reagentes e equipamentos utilizados. Ademais, são apresentados os parâmetros utilizados para efetuar os tratamentos térmicos posteriores às sínteses. Por último, são descritas as técnicas de caracterização empregadas com o objetivo de analisar as propriedades estruturais, morfológicas, fotoluminescentes e biológicas dos materiais preparados.

### 3.1 – Síntese por precipitação química e tratamentos térmicos

#### 3.1.1 – Reagentes e equipamentos utilizados

Todos os reagentes utilizados para a obtenção dos materiais por precipitação química foram de grau analítico e sem purificação prévia. Os mesmos estão listados na Tabela 3.1, assim como os seus respectivos níveis de pureza e empresas fornecedoras. Em todas as sínteses, utilizou-se água *Milli-Q* como meio reacional. Os equipamentos empregados na síntese e nos tratamentos térmicos das amostras de HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  estão listados na Tabela 3.2.

**TABELA 3.1** – Reagentes químicos utilizados na preparação das amostras de HA.

Reagente	Fórmula	Fornecedor	Pureza (%)
Nitrato de cálcio tetra hidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	99,0
Nitrato de európio	$\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$	Strem Chemicals	99,9
Hidrogenofosfato diamônico	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Strem Chemicals	98,0+
Hidróxido de amônio	$\text{NH}_4\text{OH}$	Synth	30% em $\text{NH}_3$
Álcool etílico absoluto	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Synth	99,5

**TABELA 3.2 – Equipamentos utilizados na obtenção dos pós de HA.**

<b>Equipamento</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Modelo</b>
Balança analítica	Sartorius	CPA225D
Placa com agitador magnético e controle de aquecimento	IKA	C-MAG HS-7
Bomba peristáltica	Masterflex	77240-10 L/S
Bomba de injeção	New Era Pump Systems	NE-4000
Mangueira	Masterflex	Tygon E-Lab E-3603
Sistema de refrigeração	Ethik Technology	521-TD
Centrífuga	Eppendorf	5804
Estufa	Quimis	Q-317 B222

### 3.1.2 – Síntese da hidroxiapatita pura

Esta seção descreve a metodologia de síntese utilizada para obtenção de HA pura com distintos graus de organização estrutural, formas e tamanhos de partículas. Os materiais preparados foram estudados quanto às suas composições químicas, propriedades estruturais, morfológicas e fotoluminescentes, e os resultados estão expostos no Capítulo 4 da presente tese.

As reações de formação da HA com os precursores selecionados são descritas de acordo com as equações (1) e (5). Entretanto, as características dos produtos obtidos por estas reações, como forma e tamanho de partículas, grau de ordem/desordem estrutural, bem como composição química (vacâncias iônicas e impurezas) estão estritamente relacionadas aos parâmetros de síntese (método de adição, concentração e natureza dos precursores, pH, temperatura, etc.) utilizados para a precipitação [3]. A escolha dos parâmetros supracitados permite a manipulação das características finais dos produtos com o objetivo de estudar a relação das mesmas com as propriedades de FL. O procedimento e parâmetros para conduzir a precipitação estão baseados em estudos prévios realizados, e na literatura relevante [49,97,98,134].

De maneira específica, as amostras foram separadas em dois grupos principais de estudo. O primeiro consiste no controle do valor de pH com a adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\text{pH}_{\text{final}} = 9,5-10,0$ ) antes da síntese (Equação 1). Como o precursor  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  atua como tampão, o valor do pH final se mantém próximo ao do pH inicial. Esta condição de síntese favorece a obtenção de amostras de HA com composições próximas as da HA estequiométrica, nas quais as vacâncias iônicas

estão presentes em menores densidades na rede. Em amostras bem cristalizadas em condições similares a estas, ocorre também o favorecimento do crescimento de partículas de HA na forma típica de bastão hexagonal. Por outro lado, o segundo grupo consiste na síntese dos materiais em valores de pH mais baixos ( $\text{pH}_{\text{final}} = 4,5\text{--}5,0$ ) sem o controle por adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Equação 5). Assim, amostras com maiores concentrações de vacâncias iônicas de Ca, OH, além de clusters  $[\text{PO}_4]$  protonados podem ser obtidas (Ca-dHA). Neste caso, é favorecido o crescimento de partículas de HA em forma de fitas ou agulhas. Nestes grupos selecionados, variou-se também o método e velocidade de adição dos precursores, com o objetivo de verificar a influência destes parâmetros na organização estrutural e forma final das partículas. De uma maneira geral, adições mais rápidas de um precursor sobre o outro levam a partículas menos cristalizadas e vice-versa [21].

As amostras foram rotuladas como HA\_XY, onde X refere-se ao pH de estudo (B = básico e A = ácido, sem controle) e Y ao método de adição (L = lento-bomba de injeção, M = médio-bomba peristáltica e R = rápido-vertida). A Tabela 3.3 lista os principais parâmetros experimentais estudados.

**TABELA 3.3** – Parâmetros selecionados para conduzir a mistura dos precursores e o pH final resultante.

Amostra	Método de mistura	Velocidade de mistura (mL/min)	pH <sub>final</sub>
HA_BL	Bomba de injeção	0,15	9,5–10,0
HA_BM	Bomba peristáltica	7,00	9,5–10,0
HA_BR	Vertida	600,00	9,5–10,0
HA_AL	Bomba de injeção	0,15	4,5–5,0
HA_AM	Bomba peristáltica	7,00	4,5–5,0
HA_AR	Vertida	600,00	4,5–5,0

(A) Síntese utilizando bomba de injeção – Nesta etapa, partículas bem cristalizadas foram obtidas pela mistura lenta dos precursores utilizando uma bomba de injeção (Figura 3.1). O procedimento consiste na adição de uma solução aquosa contendo o precursor de fosfato, presente dentro de uma seringa descartável de 25 mL, com o auxílio da bomba de injeção. A mesma permite baixas velocidades de adição para uma cristalização significativamente lenta das partículas de HA. Através da mangueira, o precursor de fosfato (com ou sem a presença de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) é inserido no frasco de reação que, por sua vez, contém a solução aquosa do precursor de

cálcio. A temperatura (igual a 90–95 °C) e agitação no frasco reacional são controladas com o auxílio da placa de aquecimento.



**FIGURA 3.1** – Esquema de montagem dos equipamentos utilizados para a síntese com bomba de injeção.

Foram preparados 50 mL de uma solução aquosa contendo 1,0 mmol de íons de Ca<sup>2+</sup> e 12 mL de uma solução aquosa contendo 0,6 mmol do precursor de fosfato. As soluções foram então rotuladas como solução 1 e solução 2, respectivamente. Com o objetivo de obter a amostra em pH básico, o mesmo foi ajustado ao adicionar NH<sub>4</sub>OH até valores entre 9,5–10,0. Uma vez preparadas nas condições indicadas, fez-se a adição da solução 2 na solução 1 em uma taxa de adição aproximada de 0,15 mL/min. Após esta etapa, obteve-se um precipitado branco, o qual foi envelhecido com agitação durante 2 h. Em todas as etapas, a temperatura foi controlada com valor entre 90 e 95 °C. Em seguida, resfriou-se o produto em um banho de gelo. Com o objetivo de eliminar grupos residuais e neutralizar o pH as amostras, lavou-se o precipitado por centrifugação (6000 rpm) com um total de 200 mL de H<sub>2</sub>O e 70 mL de álcool etílico. Após esta etapa, as amostras foram secadas em estufa durante 24 h a 80 °C. A seguir, os produtos foram então moídos com almofariz de ágata, armazenados em fracos de vidro e rotulados como HA\_BL (meio básico e adição lenta) e HA\_AL (meio ácido e adição lenta).

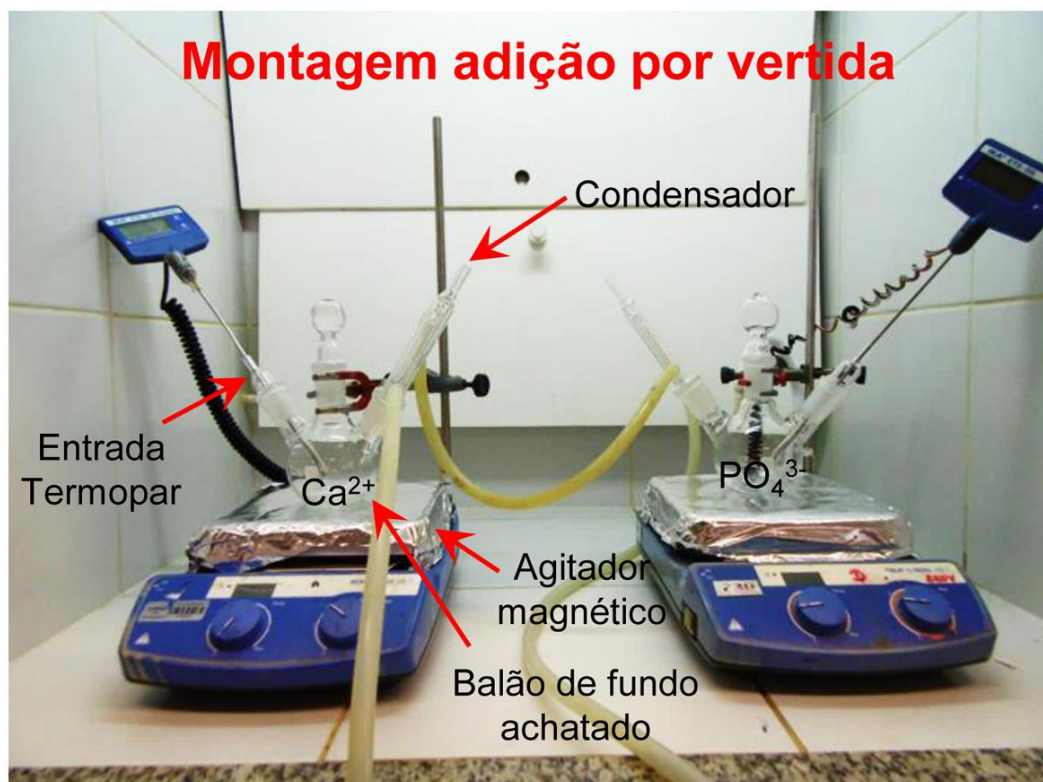
(B) Síntese utilizando bomba peristáltica – Este procedimento é similar ao descrito com o uso de bomba de injeção. Entretanto, as soluções neste caso foram misturadas em uma taxa de adição moderada do precursor de fosfato (7 mL/min) usando uma bomba peristáltica, que permite velocidades superiores em comparação com a bomba de injeção. A Figura 3.2 ilustra o sistema montado. Neste caso, as soluções 1 e 2 consistem de 50 mL de uma solução aquosa contendo 10 mmol de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e 100 mL de uma solução aquosa contendo 6 mmol do precursor de fosfato, respectivamente. As mesmas encontram-se inseridas em balões volumétricos de fundo achatado de 250 mL. Em ambos os casos, as soluções estão sob placas de aquecimento que permitem a constante agitação e o controle de temperatura (90–95 °C). A adição da solução 2 na solução 1 é feita com o auxílio de vidrarias adaptadas (entrada bomba peristáltica), que se encontram em contato com as soluções e estão conectadas entre si pela mangueira que, por sua vez, passa pelo sistema da bomba peristáltica. No final desta etapa, as amostras obtidas foram rotuladas como HA\_BM (meio básico e adição média) e HA\_AL (meio ácido e adição média).



**FIGURA 3.2** – Esquema de montagem dos equipamentos utilizados para a síntese com bomba peristáltica.

(C) Síntese por mistura imediata dos precursores – Este procedimento foi utilizado para obter amostras de HA pouco cristalizadas. Esta etapa é similar ao

descrito utilizando a bomba peristáltica. A única diferença consiste no método de mistura dos precursores, que foi realizado ao verter a solução contendo o precursor de fosfato sobre a de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  em uma taxa de adição aproximada de 600 mL/min (Figura 3.3). No final desta etapa, as amostras obtidas foram rotuladas como HA\_BR (meio básico e adição rápida) e HA\_AR (meio ácido e adição rápida).



**FIGURA 3.3** – Esquema de montagem dos equipamentos utilizados para a síntese por vertida.

As Tabelas 3.4 e 3.5 resumem os parâmetros utilizados para a preparação das soluções com os precursores de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfato, respectivamente.

**TABELA 3.4** – Parâmetros utilizados para a preparação das soluções com o precursor de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Amostra	Solução 1				
	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{inicial}}$ (mol/L)	$\text{Ca}^{2+}_{\text{inicial}}$ (mmol)	Volume (mL)	pH	Temperatura (°C)
HA_BL	0,02	1,00	50	9,5–10,0	90–95
HA_BM	0,2	10,00	50	9,5–10,0	90–95
HA_BR	0,2	10,00	50	9,5–10,0	90–95
HA_AL	0,02	1,00	50	~6,00	90–95
HA_AM	0,2	10,00	50	~6,00	90–95
HA_AR	0,2	10,00	50	~6,00	90–95



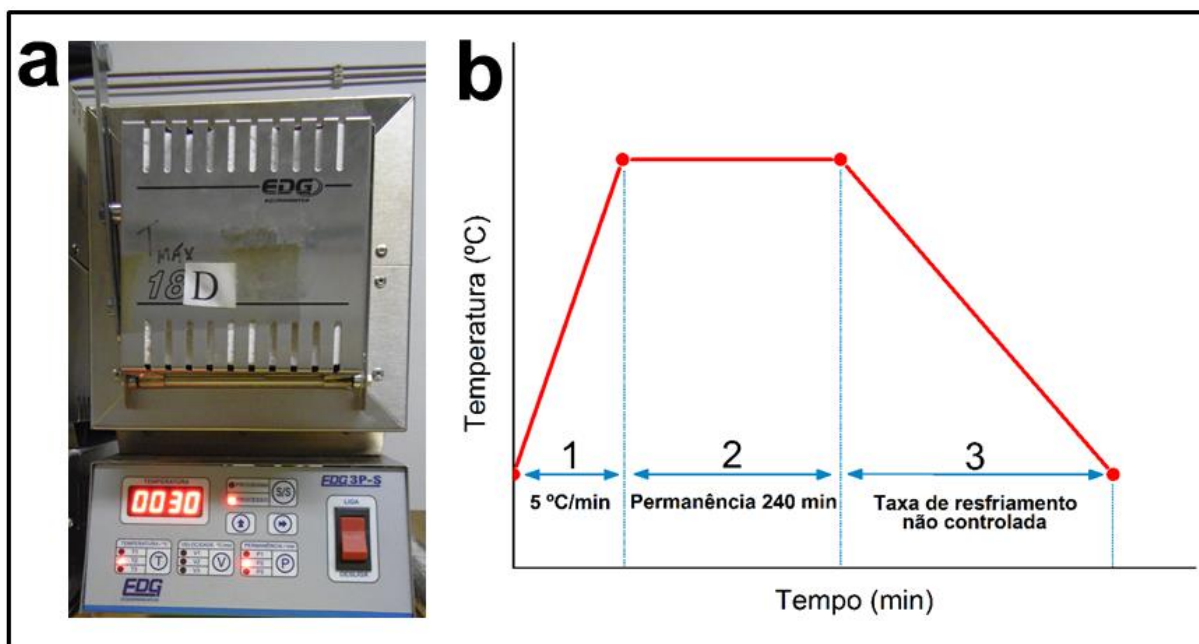
**TABELA 3.5** – Parâmetros utilizados para a preparação das soluções com o precursor de  $H_xPO_4^{x-3}$ .

Amostra	Solução 2				
	$[H_xPO_4^{x-3}]_{\text{inicial}}$ (mol/L)	$H_xPO_4^{x-3}$ (mmol)	Volume (mL)	pH	Temperatura (°C)
HA_BL	0,05	0,60	12,0	9,5–10,0	Ambiente
HA_BM	0,06	6,00	100	9,5–10,0	90–95
HA_BR	0,06	6,00	100	9,5–10,0	90–95
HA_AL	0,05	0,60	12,0	~8,00	Ambiente
HA_AM	0,06	6,00	100	~8,00	90–95
HA_AR	0,06	6,00	100	~8,00	90–95

### 3.1.3 – Tratamentos térmicos aplicados à hidroxiapatita pura

Na presente seção, detalha-se o procedimento dos tratamentos térmicos empregados com vistas ao estudo de sua influência sobre as propriedades estruturais, morfológicas e fotoluminescentes da HA pura. Os resultados obtidos de acordo com o presente procedimento são apresentados no Capítulo 5. Além disso, devido ao potencial do material com a melhor resposta em sua propriedade de FL intrínseca (tratada termicamente a 350 °C), foram realizados experimentos preliminares com o objetivo de evidenciar suas propriedades biológicas e possíveis aplicações em bioimagem, conforme descrito no Capítulo 7.

Para tais estudos, o material de partida foi sintetizado de acordo com a metodologia e os parâmetros descritos na seção 3.1.2 para a preparação da amostra HA\_BM com forma de bastões. Esta metodologia de síntese foi escolhida por permitir a obtenção de um material estável termicamente, que não se decompõe em outras fases de ortofosfatos de cálcio com os tratamentos térmicos. A amostra, aqui nomeada como Ppt, foi tratada termicamente em um forno cerâmico convencional EDG 3P-S (Brasil) em atmosfera não controlada a 200 °C, 300 °C, 350 °C, 400 °C, 450 °C, 500 °C, 600 °C e 800 °C por 4 h. A taxa de aquecimento para cada temperatura foi mantida em 5 °C/min. As amostras foram resfriadas em condições naturais até a temperatura ambiente. A imagem presente na Figura 3.4a ilustra o forno utilizado e a Figura 3.4b a programação geral do ciclo de aquecimento utilizado.



**FIGURA 3.4** – (a) Forno utilizado para a realização dos tratamentos térmicos e, (b) representação geral do ciclo empregado. 1 = rampa de aquecimento, 2 = patamar de permanência e 3 = etapa de resfriamento.

### 3.1.4 – Síntese de hidroxiapatita dopada com $\text{Eu}^{3+}$

Os resultados obtidos ao estudar os materiais preparados de acordo com o presente procedimento são apresentados no Capítulo 6, no qual são descritas detalhadamente as alterações estruturais da HA pela FL do  $\text{Eu}^{3+}$ . Além disso, são discutidos conceitos envolvendo as características das emissões do  $\text{Eu}^{3+}$  na matriz da HA, a distribuição das espécies na mesma e a natureza de seus entornos em função dos tratamentos térmicos.

O procedimento adotado é similar ao descrito no ponto 3.1.2 para a amostra HA\_BM, com algumas modificações: 29,7 mmol do precursor de  $\text{Ca}^{2+}$  e 0,3 mmol do precursor de  $\text{Eu}^{3+}$  foram dissolvidos em 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (solução 1). Com isso, é alcançada uma dopagem inicial de 1% molar (razão molar inicial  $\text{Eu}/\text{Ca} = 0,01$ ). Logo, 18 mmol do precursor de fosfato foi dissolvido em 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q, resultando na solução 2. Os precursores foram misturados na razão molar  $(\text{Ca}+\text{Eu})/\text{P} = 1,667$ . O procedimento da síntese consiste na adição da solução 2 sobre a solução 1 com o auxílio de uma bomba peristáltica em uma taxa de adição de 7 mL/min. A reação foi realizada em um sistema fechado a 90–95°C e envelhecido a esta mesma temperatura durante 2 h. Os precipitados obtidos foram centrifugados de acordo com a metodologia na seção 3.1.2. A amostra dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  é referida

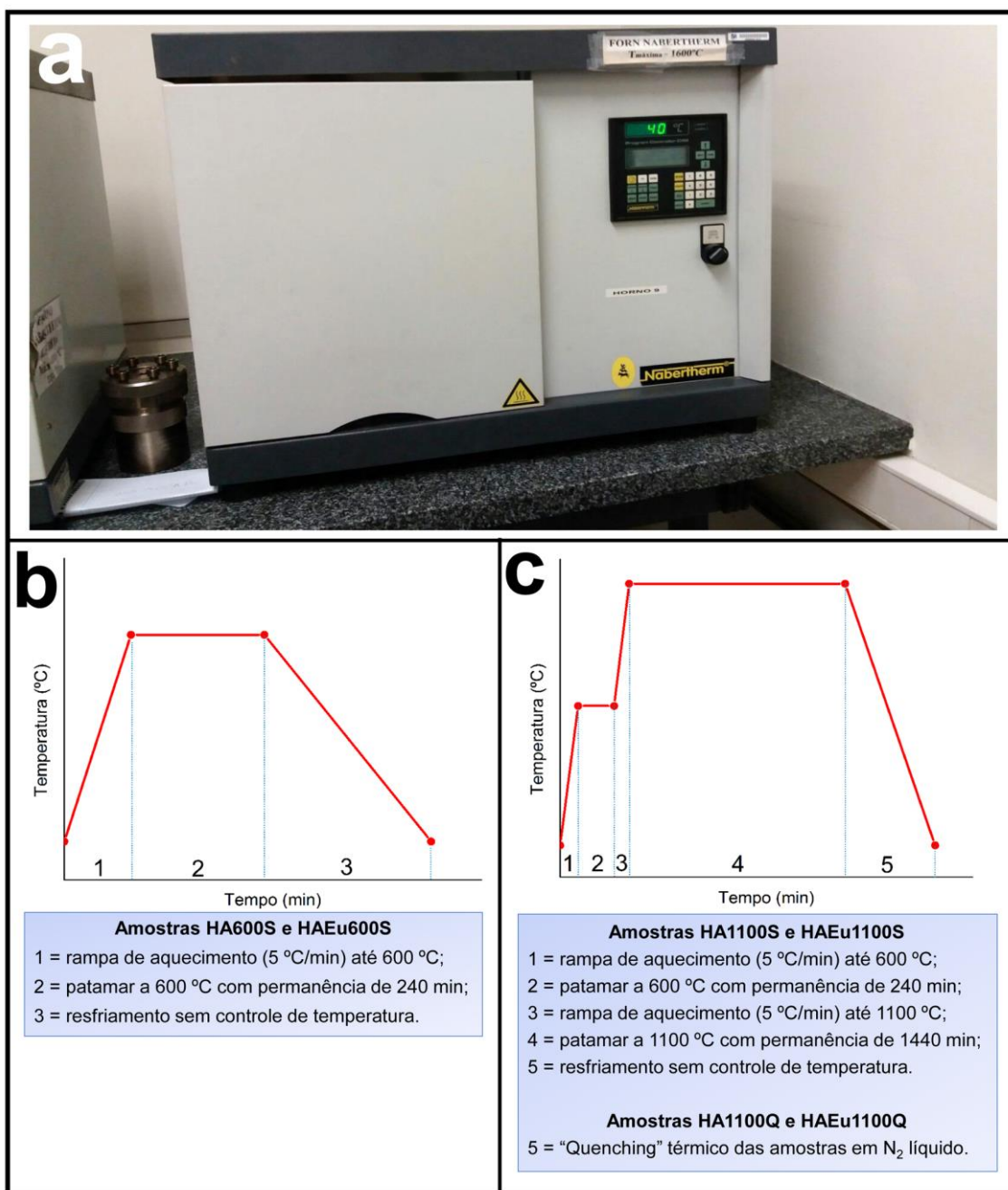
como HAEuRaw. Para efeito comparativo, utilizou-se uma amostra pura de HA estequiométrica preparada nas mesmas condições e com razão molar Ca/P = 1,667, rotulada como HARaw.

### 3.1.5 – Tratamentos térmicos na hidroxiapatita dopada com $\text{Eu}^{3+}$

As amostras de HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  foram tratadas termicamente em forno cerâmico convencional Nabertherm (Alemanha) em atmosfera não controlada. As mesmas foram tratadas inicialmente a 600 °C por 4 h (HA600S e HAEu600S) e naturalmente resfriadas de maneira lenta. Em seguida, as amostras foram tratadas a 1100 °C durante 24 h e foram resfriadas naturalmente (HA1100S e HAEu1100S) ou por um processo de resfriamento rápido (*quenching* térmico) ao imergir as amostras em  $\text{N}_2$  líquido (HA1100Q e HAEu1100Q). A taxa de aquecimento para todos os casos foi de 5 °C/min. As referências das amostras e todas as condições de tratamento estão resumidas na Tabela 3.6. A imagem presente na Figura 3.5a ilustra o forno utilizado, e a Figura 3.5b, a programação geral do ciclo de aquecimento utilizado para as amostras tratadas a 600 °C. Por fim, a Figura 3.5c demonstra a programação referente às amostras tratadas a 1100 °C.

**TABELA 3.6** – Amostras precipitadas e condições de tratamentos térmicos utilizadas para o estudo da HA dopada com  $\text{Eu}^{3+}$ .

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Processo de Resfriamento
HARaw		Condições de Síntese	
HAEuRaw		Condições de Síntese	
HA600S	600	4	Lento
HAEu600S	600	4	Lento
HA1100S	1100	24	Lento
HAEu1100S	1100	24	Lento
HA1100Q	1100	24	<i>Quenching</i> em $\text{N}_2$ líquido
HAEu1100Q	1100	24	<i>Quenching</i> em $\text{N}_2$ líquido



**FIGURA 3.5** – (a) Forno utilizado para a realização dos tratamentos térmicos. Representação geral do ciclo empregado para as amostras tratadas termicamente a (b) 600 °C, e (c) a 1100 °C com resfriamento sem controle de temperatura ou com "quenching" térmico em N<sub>2</sub> líquido.

## 3.2 – Caracterizações

### 3.2.1 – Difração de raios X

A técnica de difração de raios X (DRX) foi utilizada com o objetivo de analisar os produtos obtidos pela precipitação química quanto às fases cristalinas

presentes, e o comportamento das mesmas frente às variáveis estudadas. Neste sentido, as amostras obtidas pelas metodologias descritas nos pontos 3.1.2 e 3.1.3 e estudadas nos Capítulos 4 e 5 foram analisadas em um difratômetro de Raios X 6000 XRD (Shimadzu, Japão) operando com um tubo de cobre a 30 kV. Os dados foram coletados em um alcance de  $5^\circ$  até  $110^\circ$ , com passo de  $0.02^\circ$  e tempo por passo de 6 seg. O equipamento foi calibrado com um padrão externo de Si. Os produtos obtidos de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 3.1.4 e 3.1.5 e estudados no Capítulo 6 foram analisados em um difratômetro de raios X D4 Endeavor (Bruker, Alemanha). Os dados foram coletados entre  $2\theta$  de  $20^\circ$  a  $70^\circ$  com passo de  $0.05^\circ$  e tempo por passo de 5 seg. O equipamento foi calibrado com um padrão externo de Si.

O tamanho de domínio de coerência cristalográfica ( $\chi_s$ ) das amostras foi calculado pela de *Scherrer* [135], como mostra a equação 10:

$$\chi_s = \frac{0.9 \times k}{\beta \times \cos\theta} \quad (10)$$

Onde,

$k$  é o comprimento de onda da radiação utilizada no equipamento ( $CuK\alpha = 0,154184$  nm) e  $\beta$  a largura à meia altura do pico analisado. Para o cálculo se considera a largura devido ao efeito instrumental obtido com padrão externo de  $SiO_2$  (*Quartzo*) pela relação  $\beta = \sqrt{\beta_{observado}^2 - \beta_{instrumental}^2}$ . A equação de *Scherrer* possibilita encontrar o valor médio de  $\chi_s$ . Assim, um único valor é suficiente para o cálculo baseado em um pico de difração, nos casos em que os cristais são esféricos. Entretanto, quando há crescimento anisotrópico dos cristais, deve-se considerar a medida de  $\chi_s$  em distintas direções cristalográficas. A literatura nos diz que amostras de HA normalmente crescem de maneira anisotrópica, incluindo os cristais obtidos em condições similares às usadas em todas as etapas deste trabalho [49]. Os resultados apresentados na presente tese confirmam este comportamento, e evidenciam um crescimento preferencial na direção referente ao eixo-c. De acordo com a literatura [3,33,136], o pico normalmente utilizado para o cálculo de  $\beta$  nesta direção (comprimento) é o plano (002). Por outro lado, para estimar a espessura do domínio de coerência se utiliza picos perpendiculares e referentes a direção no eixo-a, como

(300) ou (310), de acordo com a definição dos padrões difração. Para os presentes estudos, os picos selecionados foram os (002) e (300).

A cristalinidade dos materiais sintetizados foi comparada através do cálculo da fração de fase cristalina  $\chi_c$ , de acordo com a Equação 11 [137]:

$$\chi_c = 1 - \left( \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \right) \quad (11)$$

Onde,

$I_{300}$  consiste na intensidade do pico de difração referente ao plano (300) da HA e  $V_{112/300}$  referente a intensidade da abertura entre os picos de difração dos planos (112) e (300).

### 3.2.2 – Refinamento *Rietveld*

Os refinamentos de *Rietveld* foram realizados usando o programa de análise geral de estrutura (*General structure analysis system* – GSAS) [138]. O método de *Rietveld* é baseado na construção de padrões de difração calculados de acordo com um modelo estrutural [139]. Os padrões calculados com o ajuste em relação aos dados do padrão observado permitem a obtenção dos parâmetros estruturais de materiais e o perfil de difração. Nestas análises, os parâmetros do refinamento são o fator de escala, *background*, deslocamentos das constantes de rede, parâmetros de meia altura do perfil (u, v, w), parâmetros de deslocamento isotrópico, parâmetros de rede, fator de anisotropia de tensão, orientações preferenciais, ocupação e posições funcionais atômicas. O *background* foi corrigido usando um polinômio *Chebyshev* de primeiro tipo. Os perfis de picos de difração foram melhores ajustados com a função *Thompson-Cox-Hastings-pseudo-Voigt* (pV-TCH) [140] com a função assimétrica descrita por FINGER *et al.* [141], que explica a assimetria devido à divergência axial. O modelo reportado por STEPHENS [142] utilizado a fim de se considerar a anisotropia na meia-largura das reflexões. O método *Rietveld* foi aplicado para ajustar a cela unitária e determinar os parâmetros de rede, bem como o volume e as coordenadas atômicas de todas as amostras de HA. Os padrões de difração medidos foram bem ajustados ao padrão presente na ICSD (*Inorganic Crystal Structure Data*) com No.: 26204 [36].

### 3.2.3 – Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente

A composição das amostras sólidas foi analisada por espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (*Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry* – ICP-AES) utilizando um analisador iCAP 6500 Duo (Thermo Scientific, EUA). Para isso, pesou-se com precisão cerca de 0,05 g (erro percentual de 0,2%) de cada amostra em balança analítica. Solubilizaram-se os sólidos em frascos volumétricos com solução 1% HNO<sub>3</sub> até a marca de 50 mL. As amostras foram diluídas 20 vezes com a mesma solução e analisadas por ICP-AES, onde foram feitas curvas analíticas entre 0–40 mg/L para o Ca e P. As condições operacionais são descritas na Tabela 3.7.

**TABELA 3.7 – Parâmetros operacionais da medida por ICP-AES.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Potência de RF	1250 W
Modo de visão	Axial
Vazão do gás do plasma	15 L/min Ar
Vazão do gás auxiliar	0,5 L/min Ar
Vazão do gás de nebulização	0,6 L/min Ar
Vazão de introdução da amostra	1,5 mL/min
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Replicatas	3
Tempo de integração	15 s
Comprimentos de onda	317,9 e 422,6 nm (Ca) 177,4 e 178,2 nm (P)

### 3.2.4 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de *Fourier*

As amostras foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de *Fourier* (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR), com o objetivo de analisar o grau de ordenamento a curto alcance das amostras preparadas,

bem como a possível presença de outras espécies residuais. A caracterização foi realizada em um espectrômetro Equinox 55 (Bruker, Alemanha), exceto as amostras preparadas segundo o procedimento descrito no ponto 3.1.4, cujos resultados estão presentes no Capítulo 6. Neste caso, a análise foi realizada em um espectrômetro FT/IR-6200 (Jasco, Japão). As medidas foram feitas no intervalo de 400 até 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com passo de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 acumulações por medida. As análises foram realizadas em modo absorbância e as amostras foram preparadas pelo método de pastilha de KBr.

### 3.2.5 – Espectroscopia de espalhamento Raman

As amostras foram analisadas por espectroscopia RAMAN por permitir informações adicionais quanto ao grau de ordenamento a curto alcance das amostras preparadas. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro Micro-Raman iHR550 (Horiba Jobin-Yvon, Japão) acoplado com um detector CCD operando com um laser de íon de argônio (Melles Griot, EUA) em 514,5 nm com potência máxima de 200 mW.

### 3.2.6 – Espectroscopia óptica na região ultravioleta-visível

As medidas de espectroscopia óptica na região ultravioleta-visível (UV-Vis) das amostras de HA foram feitas em temperatura ambiente utilizando um espectrômetro modelo Cary 5G (Varian, EUA), programado em modo de refletância difusa. Esta medida é de fundamental importância no entendimento da estrutura de bandas de materiais. Para isto, utilizaram-se comprimentos de onda na faixa de 190 a 800 nm para obter os espectros. A calibração do equipamento foi ajustada com o uso dos padrões desenvolvidos pela empresa *Labsphere* [143].

O valor de  $E_g$  foi calculado de acordo com a metodologia proposta por WOOD e TAUC [144]. Conforme estes pesquisadores, a  $E_g$  está relacionada com a absorbância e a energia dos fótons assim como representado na Equação 12.

$$\alpha h\nu = A(h\nu - E_g)^n \quad (12)$$



Onde,

$\alpha$  é o coeficiente de absorção,  $h$  é a constante de Planck,  $\nu$  a frequência de vibração,  $A$  é uma constante proporcional,  $E_g$  a energia de *band gap* e  $n$  está relacionada com a natureza da transição da amostra. Para transições diretas permitidas, diretas proibidas, indiretas proibidas e indiretas proibidas  $n$  assume os valores de 1/2, 3/2, 2 e 3, respectivamente. Como o espectro UV-Vis foi obtido em modo refletância difusa ( $R^\infty$ ), deve-se utilizar a função de refletância  $F(R^\infty)$  proposta por KUBELKA e MUNK [145] que é proporcional ao coeficiente de absorção.  $F(R^\infty)$  pode ser encontrado pela seguinte equação:

$$F(R^\infty) = \frac{(1-R^\infty)^2}{2R^\infty} \quad (13)$$

Assim, rearranjando a Equação 12 temos como resultado:

$$[F(R^\infty)h\nu]^{1/n} = A(h\nu - E_g) \quad (14)$$

Usando a Equação 14 se plota  $[F(R^\infty)h\nu]^{1/n}$  contra  $h\nu$ . Este último termo consiste na energia do fóton ( $E$ ) em elétron volts (eV). A conversão pode ser realizada pela seguinte equação.

$$E = h\nu = \frac{1240}{\lambda} \quad (15)$$

Onde,

$E$  é a energia de um fóton em eV e  $\lambda$  é o comprimento de onda em nanômetros. Assim, faz-se uma extrapolação linear sobre a curva obtida. O ponto de intercessão no eixo-x é equivalente a  $E_g$  do material analisado.

### 3.2.7 – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

A análise por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (*X-ray photoelectron spectroscopy* – XPS) foi realizada em um espectrômetro Scienta Omicron ESCA+ (Alemanha) equipado com analisador hemisférico EA 125 e um monocromador de raios X modelo Xm 1000 utilizando radiação  $Al_{K\alpha}$  (1486,7 eV). A

fonte de raios X foi usada com uma potência de 280 W e o espectrômetro operando em um modo de fluxo de energia constante de 50 eV. As amostras necessitaram do uso de neutralizador de carga para compensar o efeito de carregamento durante a obtenção dos espectros. Utilizou-se um neutralizador de carga Scienta Omicron CN10 (Alemanha) com energia de feixe igual a 1,6 eV. Para a correção do deslocamento de picos devido a efeito de carga residual, a energia de ligação de todos os espectros foi corrigida levando em consideração como referência o pico principal do C1s em 284,8 eV [29]. O espectro de varredura ampla foi adquirido com um passo de 0,5 eV para a identificação de picos, enquanto que para os espectros de alta resolução dos níveis internos Ca2p, O1s, P2p e C1s utilizou-se um passo de 0,03 eV. Todos os espectros obtidos foram analisados utilizando o *software CasaXPS* [146]. A deconvolução dos níveis internos Ca2p, O1s e C1s foi efetuada a partir da função assimétrica gaussiana lorentziana.

### 3.2.8 – Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TG) foi conduzida em uma termomicrobalança Netzsch TG 209 F1 Iris (Alemanha). Esta medida foi realizada com o objetivo de analisar a perda de massa referente a possíveis grupos residuais presentes na superfície e estrutura cristalina dos materiais preparados. A faixa de temperatura utilizada para a medida foi de 25 °C a 800 °C em uma taxa de aquecimento igual a 10 °C/min em ar sintético (5 mL/min de O<sub>2</sub> e 15 mL/min de N<sub>2</sub>) em um cadinho de alumina.

### 3.2.9 – Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de HA pura obtidas pelas metodologias descritas nos pontos 3.1.2 e 3.1.3 e estudadas nos Capítulos 4 e 5 foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) através de um MEV Inspect F50 (FEI, Holanda) usando voltagem de aceleração 5 kV e 20 kV com distância de trabalho 3 mm. As amostras foram preparadas através de dispersão em álcool etílico dos pós, para em seguida serem depositadas em placas de Si metálico.

Os pós de HAEu preparados de acordo com a metodologia presente no ponto 3.1.4, e estudadas no Capítulo 6, foram analisados através de um MEV Leo 440

(Leica, Alemanha), equipado com um espectrofotômetro de energia dispersiva de raios X (EDS), usando os seguintes parâmetros operacionais: voltagem de aceleração 20 kV, tempo de medida 100 s, distância de trabalho 25 mm e taxa de contagem 1,2 kcps. Para as análises morfológicas e estruturais, as amostras foram depositadas em fita de carbono e recobertas com Pt metálica. Para análise microestrutural e nas determinações microanalíticas, as amostras foram, também, depositadas em fita de carbono, porém recobertas com grafite.

### 3.2.10 – Microscopia eletrônica de transmissão

As partículas de HA também foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em um microscópio FEI TECNAI F20 (Holanda) operando a 200 kV. Nesta análise também foram realizadas medidas em modo de alta resolução, bem como difração de elétrons de área selecionada (*Selected area electron diffraction* – SAED) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS).

### 3.2.11 – Espectroscopia de fotoluminescência

A FL intrínseca da matriz de HA foi estudada em um monocromador Monospec 27 (Thermal Jarrel Ash, EUA) acoplado a uma fotomultiplicadora (Hamamatsu Photonics, Japão). A excitação é feita através de um laser de criptônio (Coherent Innova 200K) operando com comprimento de onda em 350 e 415 nm e potência igual a 500 mW. Após o alinhamento do feixe modulo para excitação, o laser atinge a amostra com ~14 e ~7 mW, respectivamente. Os espectros de emissão das amostras de HA dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$  foram obtidos em um espectrofluorímetro Eclipse (Varian, EUA) com uma fonte de lâmpada de Xe. Os espectros de emissão foram obtidos com excitação em 254 nm.

### 3.2.12 – Espectroscopia sítio-seletiva do $\text{Eu}^{3+}$

Com o objetivo de elucidar a natureza dos entornos do  $\text{Eu}^{3+}$  na estrutura da HA, realizaram-se estudos fotoluminescentes sítio-resolvidos das amostras. Esta análise foi realizada no departamento de física aplicada I, escola superior de engenharia, Universidade do País Basco, Espanha. A mesma foi conduzida sob

supervisão do Professor Doutor Joaquin Fernández e da Professora Doutora Rolíndes Balda. Uma vez que o estado  $^5D_0$  é não degenerado em qualquer simetria, a estrutura da emissão  $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$  é somente determinada pela separação dos níveis terminais causados pelo campo cristalino local. Além disso, o nível  $^7F_0$  é também não degenerado, assim excitação sítio-seletiva na banda de absorção  $^7F_0 \rightarrow ^5D_0$  ampla e não homogênea pode ser realizada pela técnica de fluorescência de estreitamento de linha resolvida no tempo (*time-resolved fluorescence line narrowing technique – TRFLN*) para distinguir entre os distintos entornos envolta dos lantanídeos. Neste sentido, os espectros de TRFLN ressonante foram obtidos ao excitar as amostras no intervalo de 570,0–580,0 nm com laser Nd:YAG regulável com bombeamento de corante com frequência duplicada pulsada, 9 ns de largura de pulso e  $0,08 \text{ cm}^{-1}$  de espessura de linha. Os sinais foram detectados por um analisador óptico multicanal EGG&PAR. As medidas foram realizadas a 10 K com o uso de um criostato de ciclo fechado de He.

### 3.2.13 Ensaio biológicos

Os ensaios apresentados nesta seção foram realizados em parceria com o Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF, processo CEPID 2013/07276-1), no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. Estes testes tiveram como finalidade a averiguação da biocompatibilidade das nanopartículas de HA pura desenvolvidas na presente tese, bem como observar a internalização das mesmas em células humanas através da propriedade de FL intrínseca melhorada. Os resultados obtidos são apresentados no Capítulo 7.

#### 3.2.13.1 – Linhagem e cultivo celular

Para os ensaios em cultura de células, a linhagem de fibroblastos dérmicos neonatais humanos *HDFn* (C-004-5C, Gibco™, USA) foi utilizada. As células, estocadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultivo celular com meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM*, Cultilab, Campinas, SP) com fenol vermelho suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP) e

antibiótico (penicilina/estreptomicina: 50 UI/mL e 50 µg/mL, respectivamente – Cultilab, Campinas, SP). Os frascos foram mantidos em estufa incubadora umidificada, a 37 °C e em atmosfera contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, com a troca de meio de cultura sendo realizada num intervalo de 48 h, e o subcultivo quando as células atingiam confluência de 80 % da superfície do frasco.

### 3.2.13.2 – Biocompatibilidade das nanopartículas de hidroxiapatita

Com o objetivo de averiguar o efeito que as nanopartículas sintetizadas exerceriam sobre a viabilidade de células normais, os fibroblastos, células que crescem aderidas à superfície dos frascos de cultivo, foram dissociados com a utilização de uma solução de tripsina (0,25 %, Sigma, EUA) e ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA – 0,03%, Panreac, Espanha). Após a inativação da tripsina pela adição de meio de cultura suplementado (como descrito na seção 3.2.13.1), as células foram centrifugadas à temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C) a 800 rpm durante 5 minutos. Após a ressuspensão do *pellet* em um volume conhecido de meio de cultura, as células foram quantificadas utilizando-se uma câmara de *Neubauer* para a realização do ensaio de exclusão por azul de tripan (0,4%, Sigma-Aldrich, EUA). Nesse ensaio, as células são observadas em um microscópio óptico Zeiss AxioObserver.Z1 (Alemanha) e contadas, sendo que células inviáveis são marcadas pelo corante azul, capaz de ser internalizado somente quando a membrana citoplasmática se encontra danificada, enquanto que as viáveis permanecem sem marcação. Para os experimentos de biocompatibilidade, placas de 96 poços contendo 10<sup>4</sup> células/poço foram preparadas, com meio de cultura suplementado, 24 h antes da realização do protocolo experimental e mantidas em estufa incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

A cada experimento foram preparadas soluções de distintas concentrações das nanopartículas de HA pura tratadas termicamente a 350 °C (Capítulo 5): 20, 40, 80, 160 e 320 µg/mL. As amostras foram preparadas em DMEM sem fenol vermelho suplementado com 10% de SFB a partir da solução de maior concentração, feita através da pesagem de 3,2 mg de nanopartícula que foram redispersos em 10 mL do mesmo meio. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes de seu uso e permaneceram em banho ultrassônico (Soni-tech, São Bernardo do Campo, SP) por 10 minutos para que as nanopartículas se

encontrassem dispersas no líquido. Nas placas de 96 poços, os meios de cultura foram cuidadosamente removidos, sendo substituídos por 100 µL das diferentes concentrações de nanopartículas ou por DMEM sem fenol vermelho com 10% de SFB, para o grupo controle. Dois diferentes tempos de incubação foram estudados: 24 e 48 h. Após esses intervalos, nos quais as placas de 96 poços permaneceram em estufa incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, imagens de contraste de fase com um microscópio óptico invertido Zeiss AxioObserver.Z1 (Alemanha) foram obtidas de cada grupo para sua avaliação qualitativa.

Foi realizado o ensaio de MTT para obter a viabilidade celular das amostras, que se baseia na conversão do sal amarelo brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) por enzimas mitocondriais em cristais de formazan, que possui cor azulada. Para isso, o meio de cultura foi removido de cada poço e foram adicionados 90 µL de DMEM sem fenol vermelho e 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA). As placas foram mantidas protegidas de luminosidade em estufa incubadora por 3 h, sendo então realizada a remoção de todo líquido dos poços e a adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Labsynth, Diadema, SP) para a dissolução dos cristais de formazan [147]. As absorbâncias de cada poço foram então lidas em 570 nm e 690 nm, como sugerido pelo fabricante [148], por um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, EUA). O valor final de absorbância foi obtido subtraindo-se a leitura de 690 nm da obtida em 570 nm, e a viabilidade de cada grupo foi calculada em relação ao grupo controle, considerado como 100% de viabilidade. Os grupos foram feitos em quintuplicata, sendo que cada experimento foi realizado em duas diferentes ocasiões.

### *3.2.13.3 – Avaliação qualitativa de Uptake celular*

Para verificar a ocorrência da internalização das nanopartículas de HA pela FL intrínseca do material, imagens de microscopia confocal por fluorescência (LMS 780, Zeiss, Alemanha) foram realizadas com a marcação concomitante de citoesqueleto através da sonda fluorescente Alexa Fluor 532 Faloidina (A22282, Molecular Probes, EUA). Placas de 35 mm para cultura de tecidos (Ibidi, Alemanha) foram preparadas contendo 10<sup>4</sup> células em 2 mL de meio de cultura suplementado (como descrito na seção 3.2.13.2). Após serem mantidas 24 h em estufa incubadora umidificada a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, os meios de cultura foram substituídos por 2 mL

de solução de nanopartícula 320 µg/mL (preparadas como descrito previamente na seção 3.2.13.2). Após 48 h de incubação em estufa incubadora umidificada, as soluções foram removidas das placas, que foram cuidadosamente lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (*phosphate saline buffer* – PBS, pH 7.4). As células foram então fixadas, utilizando PBS com 3,7 % de formaldeído (Labsynth, Diadema, SP) por 10 minutos à temperatura ambiente e novamente lavadas duas vezes com PBS. As amostras foram incubadas com acetona (Labsynth, Diadema, SP) a 20 °C por 5 minutos e depois lavadas com PBS duas vezes. Foram adicionados 5 µL do Alexa Fluor 532 Faloidina a 200 µL de PBS em cada placa, sendo essa solução incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS, 2 mL do tampão foram adicionados às placas, que foram submetidas à microscopia confocal, com excitação em 514 nm e filtro de emissão em 531–735 nm para a observação da sonda fluorescente e excitação em 405 nm e filtro de emissão em 415–497 nm para detectar as nanopartículas.





# CAPÍTULO 4 - PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FOTOLUMINESCÊNCIA INTRÍNSECA DE PARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA COM DISTINTAS FORMAS

## 4.1 – Introdução

A FL intrínseca pode ser observada em diversos materiais, sendo atribuída a defeitos estruturais e impurezas neles presentes [149–151]. O processo de quebra de simetria resultante de efeitos de ordem-desordem estrutural induzidos, por exemplo, pela presença de vacâncias na superfície e no *bulk* das partículas, promove recombinações radiativas de par elétron–buraco ( $e'-h^*$ ) [121]. Esta recombinação origina emissões de FL. Ademais, alguns estudos ainda apontam a influência dos aspectos morfológicos na emissão intrínseca em materiais [152,153].

A FL originária de defeitos estruturais, além de permitir uma ampla gama de aplicações tecnológicas sem a necessidade de espécies dopantes de lantanídeos, é útil também para obter informações gerais acerca das características das estruturas eletrônicas e do arranjo de *clusters* em redes cristalinas [154,155].

No caso da HA, uma diversidade de mecanismos foi investigada na literatura com o objetivo de explicar a FL intrínseca da HA [73,86,87,156,157]. ZHANG *et al.* [7] relataram que impurezas como ânions radicais de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2^{\bullet-}$ ) localizados nas regiões intersticiais da rede de HA possuem papel significativo na FL intrínseca. Recentemente, BYSTROVA *et al.* [157] correlacionaram dados experimentais e cálculos teóricos pretendendo a explicação do papel de defeitos estruturais na organização da estrutura de bandas e atividade FL. Defeitos como vacâncias de OH e H nos interstícios da rede foram considerados neste estudo.

A despeito das recentes pesquisas presentes na literatura, o efeito do grau de ordem-desordem estrutural, da composição química e dos aspectos morfológicos e estruturais nas propriedades fotoluminescentes da HA permanece como tema de discussão na literatura. A síntese da HA pode ser realizada por distintas metodologias [89]. Um destes métodos, a precipitação química, pode ser utilizada para obter partículas com distintas formas, bem como introduzir diversos tipos de defeitos na estrutura, com o objetivo de compreender a FL intrínseca da HA. Esta

parte do estudo está focada no estudo da influência dos valores de pH e taxa de adição do precursor de fosfato no ordenamento estrutural (longo e curto alcance), aspectos morfológicos, propriedades eletrônicas e fotoluminescentes da HA. A metodologia empregada na obtenção de cada amostra, bem como a nomenclatura das mesmas são apresentadas na seção 3.1.2 do Capítulo 3.

## **4.2 – Objetivo**

Obter pela metodologia de precipitação química partículas de HA com distintas formas e composições, bem como estudar a fotoluminescência intrínseca dos materiais sintetizados.

## **4.3 – Resultados e discussão**

### **4.3.1 – Análise composicional por ICP-AES**

A composição dos materiais obtidos foi analisada com o uso de ICP-AES. Esta é uma técnica bem aceita na caracterização composicional de HA pura e dopada [28,60,158]. A Tabela 4.1 resume os resultados obtidos para as seis amostras sintetizadas. Pode-se observar que as amostras preparadas em pH básico possuem os maiores valores da razão Ca/P, próximos aos da HA estequiométrica (Ca/P = 1,667). Ou seja, a deficiência em Ca foi significativamente evitada. Por outro lado, as amostras sem controle de pH apresentam um valor abaixo do estequiométrico. O fosfato de cálcio cuja razão Ca/P corresponde aos valores obtidos para estas amostras é a HA deficiente em cálcio (Ca-dHA,  $1,50 < \text{Ca/P} < 1,667$ ). Assim, os resultados confirmam que em pH básico temos a cristalização de produtos com composição próxima a da HA estequiométrica e sem o controle ocorre a cristalização de materiais com composições relacionadas a Ca-dHA. Entretanto, a confirmação da presença destas fases deve ser realizada também por outras técnicas de caracterização, como DRX, FTIR e RAMAN.

**TABELA 4.1** – Resultado composicional obtido por ICP-AES para as amostras preparadas.

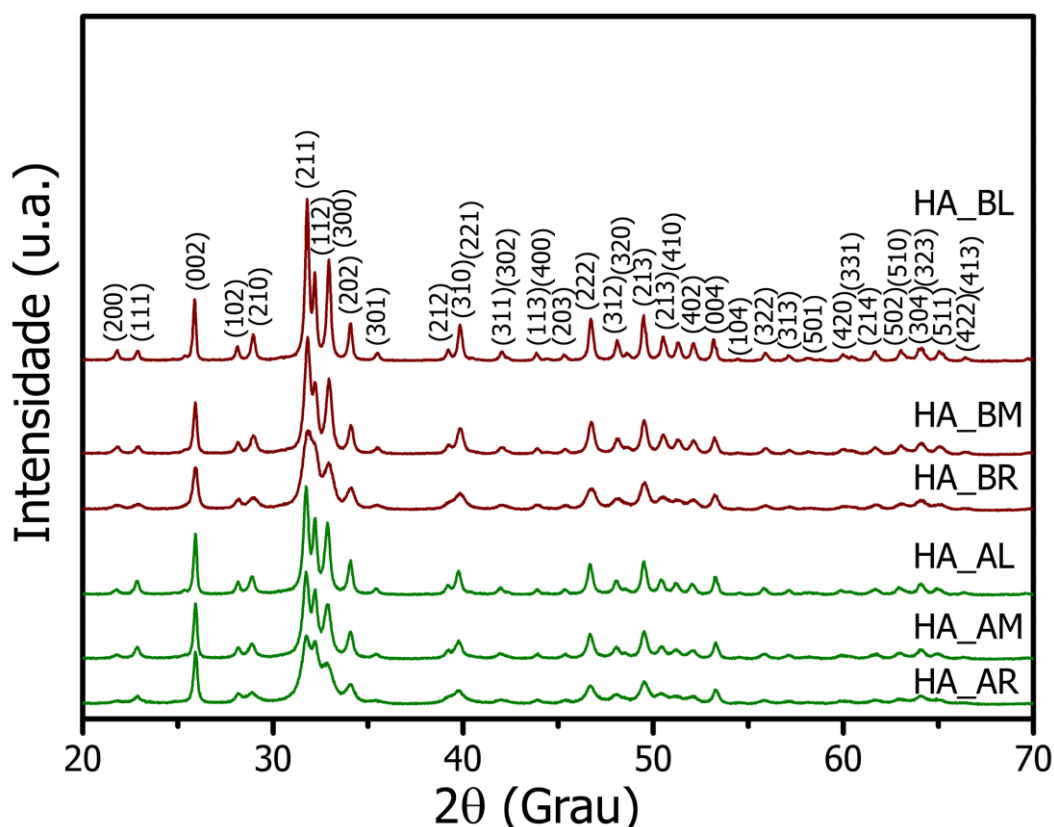
<b>Amostra</b>	<b>Ca (%m/m)</b>	<b>P (%m/m)</b>	<b>Ca/P</b>
HA_BL	31,3	18,60	1,68
HA_BM	34,4	20,60	1,67
HA_BR	34,8	20,80	1,67
HA_AL	32,9	20,31	1,62
HA_AM	32,6	21,00	1,55
HA_AR	31,1	19,30	1,61

#### 4.3.2 – Análise estrutural por DRX

A análise de um material com difração de raios X permite extrair informações sobre as fases obtidas após a metodologia de síntese. Como os picos observados são referentes a famílias de planos específicos para cada rede cristalina, esta técnica pode identificar se a fase desejada foi preparada, se a mesma é a única presente ou se existe uma mistura de fases [159]. No caso dos ortofosfatos de cálcio esta é uma técnica imprescindível, visto que ligeiras alterações nos parâmetros de síntese podem dar distintos fosfatos e misturas entre eles [105]. A Figura 4.1 ilustra os difratogramas obtidos para as amostras preparadas neste estudo, com distintas taxas de mistura dos precursores e valores de pH. Em todos os casos, os picos de difração foram perfeitamente indexados a fase hexagonal da HA, descrita pelo grupo  $P6_3/m$ , e em concordância com o padrão reportado na ICSD No. 26204 [36]. Não foram observados os picos de outras fases cristalinas, o que indica a viabilidade em se preparar fases únicas com os parâmetros estudados.

Outras características dos sistemas podem ser obtidas com a avaliação do perfil de difração de cada amostra. Entre elas, pode-se destacar o ordenamento a longo alcance das espécies que formam a estrutura do material. Um material ordenado a longo alcance apresenta elevada periodicidade da rede tridimensional possuindo maior caráter cristalino. Por outro lado, quando existe um déficit de periodicidade, o material é menos ordenado a longo alcance e o caráter amorfo do material é mais relevante [160]. Este tipo de informação pode ser extraído pela intensidade e definição dos picos referentes às distintas famílias de planos cristalinos de uma dada estrutura [161]. Em todos os casos, os padrões de difração das amostras preparadas se assemelham aos de amostras de HA nanocristalinas com distintos graus de ordenamento sintetizadas em pH e temperaturas similares [49,97,134]. É possível observar que, em ambos os grupos estudados (sem controle de pH e pH

básico), existe uma tendência em se alcançar picos mais definidos com menores taxas de adição do precursor de fosfato, principalmente nas amostras HA\_BL e HA\_AL. Essas características definem estes materiais como os mais ordenados ou mais bem cristalizados das suas respectivas séries. Este comportamento estrutural também é manifestado em alterações nos comprimentos e ângulos de ligações Ca–O e P–O dos clusters  $[CaO_9]$  e  $[CaO_7H]$ , e  $[PO_4]$ , respectivamente, em ambos os grupos de amostras.



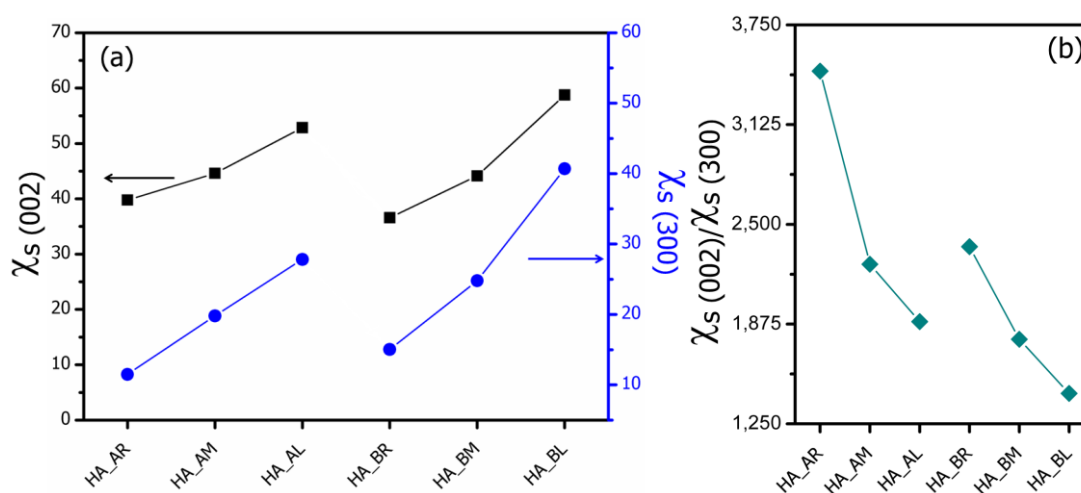
**FIGURA 4.1** – Padrões de DRX para as amostras preparadas em distintas condições de síntese. Os padrões em verde remetem às amostras preparadas sem controle de pH e em marrom às preparadas em pH entre 9,5–10,0.

A natureza cristalina também foi avaliada com medidas de tamanho de domínio de coerência cristalográfica ( $\chi_s$ ). Este parâmetro estima o tamanho de subestruturas da amostra em que existe a difração de raios X de maneira coerente [159]. A HA tende a cristalizar anisotropicamente [162]. Assim, utilizaram-se para os cálculos picos intensos de famílias de planos referentes a crescimentos em direções cristalográficas perpendiculares. As medidas foram realizadas de acordo com o apresentado na Equação 10 da seção 3.2.1 do Capítulo 3. Os valores de  $\chi_s$  encontrados para os planos (002) e (300), bem como as correspondentes razões de

aspecto (002)/(300) estão dispostos na Tabela 4.2 e ilustrados também na Figura 4.2. Neste sentido, os valores de  $\chi_s$  vão de 36,57 a 58,75 nm e de 15,02 a 40,69 nm para os planos (002) e (300), respectivamente, confirmando a presença de HA nanocristalina. Ademais, em ambos os grupos estudados, taxas de adição mais lentas do precursor de fosfato levam a domínios maiores em relação às taxas rápidas de adição. A análise das razões (002)/(300) revelam que as amostras de HA obtidas em pH básico cristalizam de maneira anisotrópica na direção cristalográfica c. Este comportamento também foi observado para as amostras obtidas em pH ácido. Entretanto, este grupo possui domínios mais anisotrópicos em relação aos das amostras no grupo de amostras obtidas em pH básico [162–164].

**TABELA 4.2** – Valor de  $\chi_s$  em distintas direções cristalográficas para as amostras preparadas.

Forma de mistura	pH básico			pH ácido		
	$\chi_{s(002)}$	$\chi_{s(300)}$	$\chi_{s(002)}/\chi_{s(300)}$	$\chi_{s(002)}$	$\chi_{s(300)}$	$\chi_{s(002)}/\chi_{s(300)}$
Rápida	36,57	15,02	2,36	39,78	11,49	3,46
Média	44,14	24,80	1,78	44,61	19,80	2,25
Lenta	58,75	40,69	1,44	52,85	27,82	1,89



**FIGURA 4.2** – Representações dos valores encontrados para  $\chi_s$  em distintas direções (a) e a razão entre as mesmas (b).

### 4.3.3 – Espectroscopias vibracionais

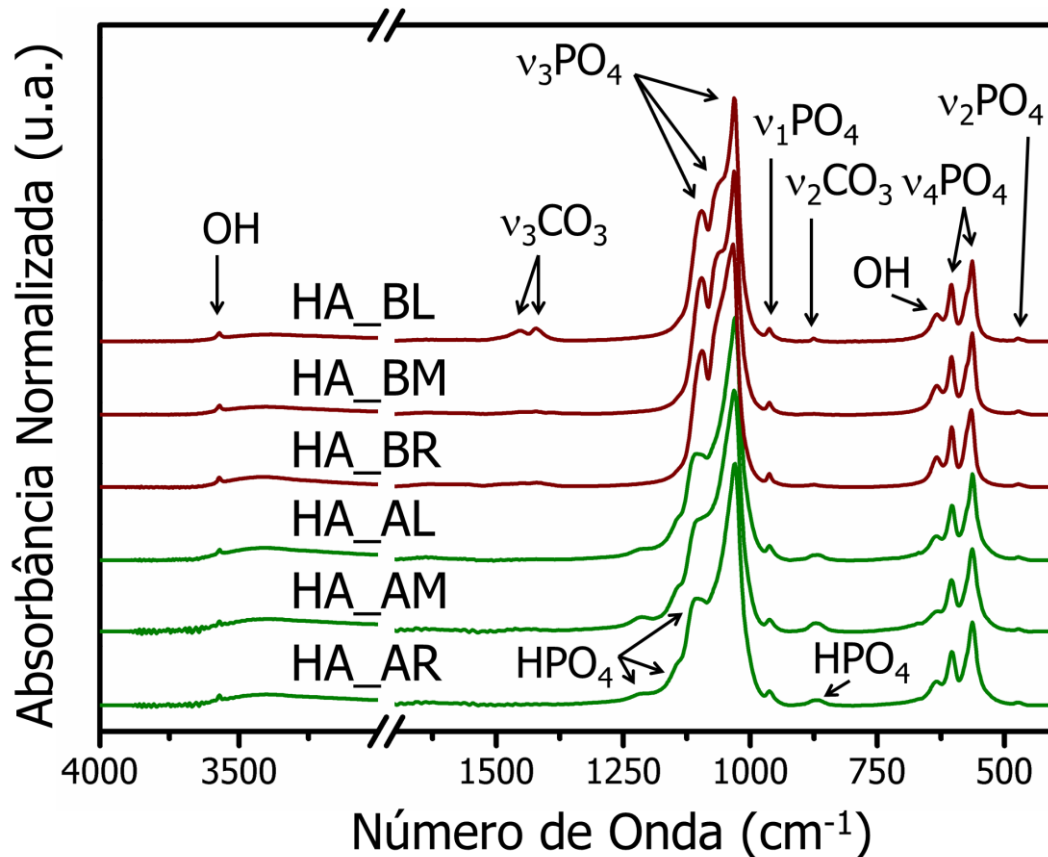
Os estudos dos modos vibracionais ativos no infravermelho e no Raman são fundamentais para amostras baseadas em ortofosfatos de cálcio, pois auxiliam a detectar e discernir qualitativamente entre as distintas fases possíveis [3]. Nos últimos anos, estudos experimentais [165–167] e teóricos [168] focaram em identificar os modos para a estrutura da HA. A maioria deles está relacionada aos *clusters* [PO<sub>4</sub>]. Na sua forma livre, esta espécie apresenta simetria  $T_d$ , o qual nos dá 4 modos ativos:  $\nu_1$  ( $A_1$ ),  $\nu_2$  ( $E$ ),  $\nu_3$  ( $F_2$ ) e  $\nu_4$  ( $F_2$ ). Entretanto, deve-se considerar a simetria resultante quando o mesmo é incorporado na estrutura ( $C_s$ ). Levando isso em consideração, junto com o grupo pontual da estrutura ( $C_{6h}$ ), temos os seguintes modos resumidos na Tabela 4.3 para o *cluster* [PO<sub>4</sub>] [33]. Os modos  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$  são ativos tanto no infravermelho como no Raman. Entretanto, a identificação de todas as componentes experimentalmente é uma tarefa complexa, especialmente as relacionadas ao modo  $\nu_3$ , pois o mesmo está composto de vários sinais com números de onda próximos e geralmente aparecem sobrepostos. Além dos sinais originários dos *clusters* [PO<sub>4</sub>], também estão presentes nos espectros da HA os modos relacionados às hidroxilas estruturais [165].

**TABELA 4.3** – Modos vibracionais internos teóricos para o *cluster* [PO<sub>4</sub>] na HA estequiométrica. Os modos ativos no infravermelho são representados por IV e no Raman por R [33].

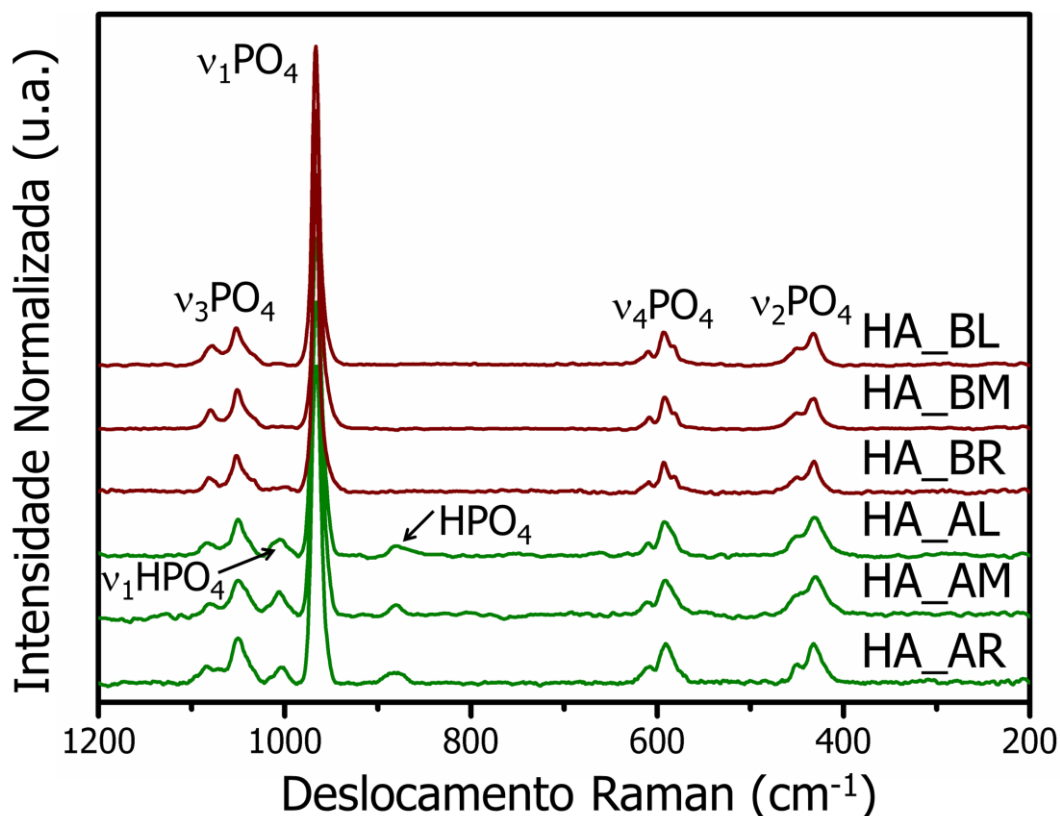
Modos vibracionais	Simetria do sitio $C_s$	Grupo pontual $C_{6h}$
$\nu_1$	1 $A'$ (IV,R)	$A_g$ (R), $E_{2g}$ (R), $B_u$ , $E_{1u}$ (IV)
$\nu_2$	1 $A'$ (IV,R), 1 $A''$ (IV,R)	1 $A_g$ (R), 1 $E_{2g}$ (R), 1 $B_u$ , 1 $E_{1u}$ (IV), 1 $B_g$ , 1 $E_{1g}$ (R), 1 $A_u$ (IV), 1 $E_{2u}$
$\nu_3, \nu_4$	1 $A'$ (IV,R), 2 $A''$ (IV,R)	2 $A_g$ (R), 2 $E_{2g}$ (R), 2 $B_u$ , 2 $E_{1u}$ (IV), 1 $B_g$ , 1 $E_{1g}$ (R), 1 $A_u$ (IV), 1 $E_{2u}$

As técnicas espectroscópicas vibracionais também podem dar informações estruturais e químicas, como a composição, grau de cristalinidade e organização local [169]. A HA possui uma estrutura flexível e aceita facilmente vacâncias e substituições iônicas [35,40]. Quando sintetizada em soluções aquosas, estas modificações comumente acontecem e podem alterar os sinais tanto no infravermelho como no espalhamento Raman [98]. As Figuras 4.3 e 4.4 ilustram os

espectros FTIR e espalhamento Raman, respectivamente, obtidos para todas as amostras preparadas neste estudo. De uma maneira geral, todos os modos correspondem com vibrações dos *clusters* pertencentes a estruturas apáticas. As principais características de cada grupo de amostras preparadas em distintos valores de pH estão descritas abaixo.



**FIGURA 4.3** – Espectros de FTIR para as amostras preparadas. As linhas em verde remetem a amostras preparadas sem controle de pH e as em marrom são referidas a amostras preparadas em pH básico.



**FIGURA 4.4** – Espectros Raman para as amostras preparadas em distintos valores de pH e velocidades de adição do precursor de fosfato.

*Espectroscopia vibracional das amostras em pH básico.* Os espectros observados para estas amostras correspondem com os típicos de amostras nanocristalinas de HA obtidas pelo método de precipitação aquosa em condições similares de pH e temperatura [49,98]. Os principais modos estão listados na Tabela 4.4. A identificação dos mesmos foi realizada de acordo com [51,165,170]. Estão presentes os modos  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do *cluster*  $[\text{PO}_4]$  tanto no infravermelho como no Raman. Já o modo libracional e de estiramento da hidroxila estão presentes no FTIR.

De acordo com DROUET *et al.* [171], as bandas  $[\text{PO}_4]$  podem ser utilizadas para determinar o ordenamento a curta distância da rede apatita. No presente estudo, as bandas no Raman apresentam boa resolução, podendo-se observar distintas componentes dos modos vibracionais do *cluster*  $[\text{PO}_4]$ . A presença de bandas estreitas e bem definidas no modo  $\nu_4$  no FTIR indica um relativo bom ordenamento dos materiais. Por outro lado, os modos  $\nu_3$  do *cluster*  $[\text{PO}_4]$  no FTIR das amostras HA\_BL e HA\_BM possuem uma melhor resolução, o que indica que esses materiais são ligeiramente mais ordenados a curta distância em comparação com a amostra HA\_BR.



**TABELA 4.4** – Modos vibracionais observados no FTIR e Raman para as amostras preparadas em pH básico.

Modo de Vibração	HA_BR		HA_BM		HA_BL	
	FTIR	RAMAN	FTIR	RAMAN	FTIR	RAMAN
v <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> deformação	463	432	461	433	462	433
	473	450	472	450	473	450
v <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> deformação	565	582	563	581	563	582
	574	593	574	592	574	593
	604	609	604	609	605	610
		616		618		618
OH Libracional	633	-	633	-	633	-
v <sub>1</sub> PO <sub>4</sub> estiramento simétrico	962	967	962	965	962	967
v <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> estiramento assimétrico		1033		1032		1032
	1034	1043	1032	1043	1031	1044
	1060	1052	1060	1051	1060	1052
	1094	1075	1095	1076	1095	1078
			1081		1084	
H <sub>2</sub> O	1630	-	1630	-	1630	-
OH Estiramento	3571	-	3570	-	3571	-
H <sub>2</sub> O	3000- 3650	-	3000- 3650	-	3000- 3650	-

Além dessas bandas, pode-se observar na amostra HA\_BL a presença de sinais relacionados a carbonatos estruturais. Quando se tratam de substituições do tipo A, os íons CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> substituem os grupos hidroxila e, quando são do tipo B, alojam-se na posição referente ao *cluster* [PO<sub>4</sub>] [44]. Em ambos os casos, as incorporações ocorrem de maneira isomórfica. As bandas do modo de estiramento v<sub>2</sub> são encontradas em 871 cm<sup>-1</sup> (tipo B) e 880 cm<sup>-1</sup> (tipo A) [33]. Porém, são de difícil atribuição, pois podem estar sobrepostas entre si. Já as bandas entre 1400-1650 cm<sup>-1</sup> podem ser associadas principalmente ao modo v<sub>3</sub> do CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. No presente caso, existe

um dublete ao redor de 1421 (tipo B) e 1453 (tipo A)  $\text{cm}^{-1}$  [51,172], sugerindo substituição do tipo AB [33].

*Espectroscopia vibracional das amostras em pH Ácido.* As amostras preparadas em pH ácido estão compostas de bandas típicas da estrutura apatita, assim como no caso das em pH básico. A Tabela 4.5 resume os modos observados e seus respectivos comprimentos de onda no FTIR e deslocamento Raman. Em todos os casos, foram identificados os modos  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$  do  $[\text{PO}_4]$  e também os modos relacionados a hidroxila [165]. A principal diferença para estas bandas em comparação com as obtidas em pH básico é a menor resolução para os modos  $[\text{PO}_4]$  e de intensidade para a hidroxila. Este é um indicativo do menor ordenamento dos *clusters*  $[\text{PO}_4]$  na estrutura. A menor intensidade da banda em aproximadamente  $633 \text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo OH também está relacionado ao menor ordenamento do material [46].

Os espectros FTIR e Raman apresentaram ainda algumas bandas relacionadas a *clusters* protonados  $[\text{PO}_4\text{H}]$  [173]. A protonação deste *cluster* está estritamente relacionada a vacâncias em Ca na estrutura, principalmente no *cluster*  $[\text{CaO}_7\text{H}]$  [174]. Nas última décadas, diversos mecanismos foram propostos para a estabilização destas vacâncias na estrutura e estão resumidos na Ref. [13]. WINAND e DALLEMAGNE [175] propuseram a fórmula mais aceita nos dias atuais  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ , que envolve a compensação por vacâncias de OH e a protonação do *cluster*  $[\text{PO}_4]$ . Os resultados publicados por BERRY [176], KUHL e NEBERGALL [177] e WILSON *et al.* [48] confirmam esta última estequiometria e a presença de  $[\text{PO}_4\text{H}]$  na estrutura. As amostras com estes tipos de defeitos são comumente referidas como hidroxiapatitas deficientes em cálcio (Ca-dHA).

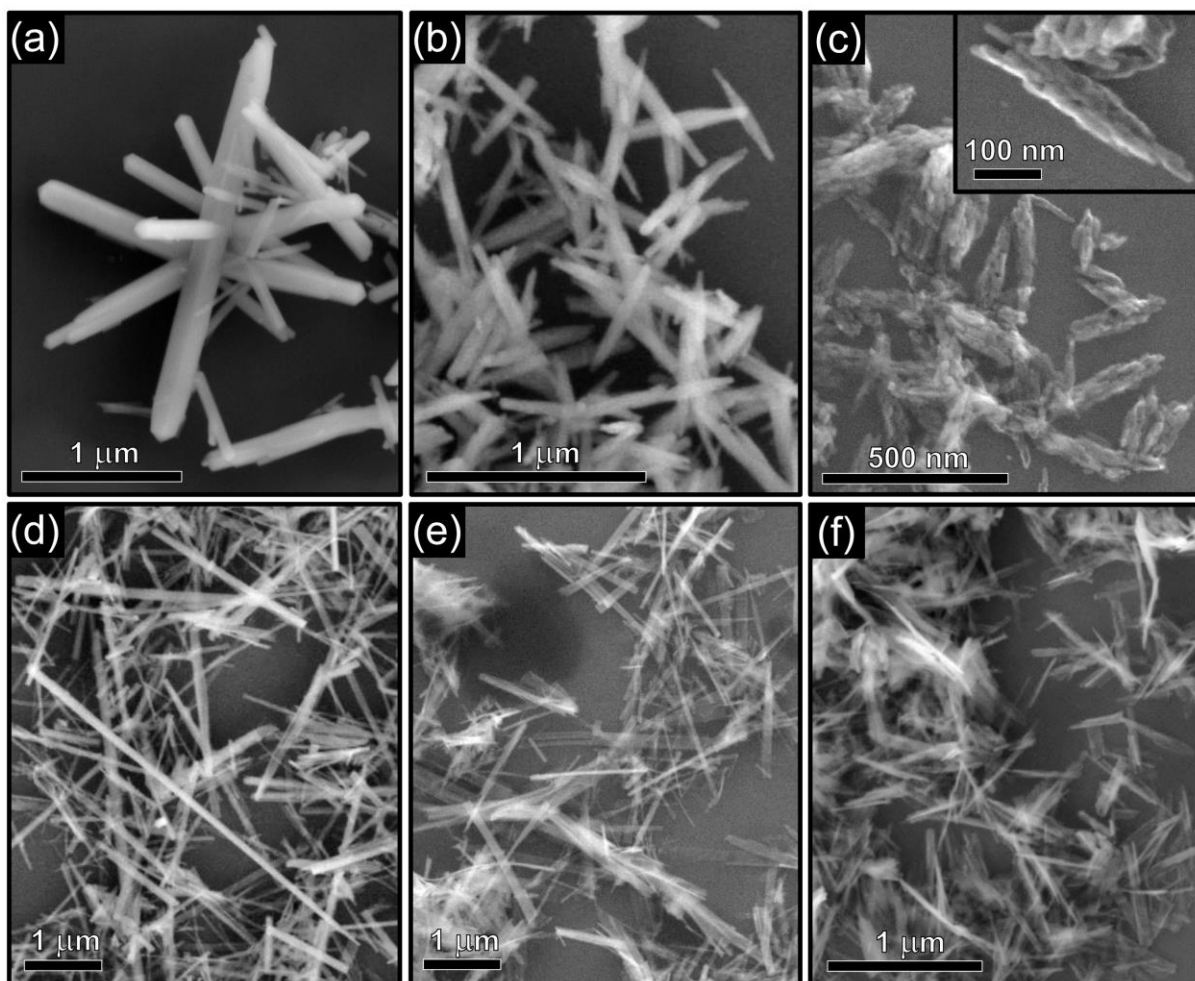
**TABELA 4.5** – Modos vibracionais observados no FTIR e Raman para as amostras preparadas sem controle de pH.

Modo de Vibração	HA_AR		HA_AM		HA_AL	
	FTIR	RAMAN	FTIR	RAMAN	FTIR	RAMAN
v <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Deformação	463	432	461	430	461	431
	472	450	472	449	473	450
v <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> Deformação	563	584	563	584	563	583
	575	592	575	593	574	592
	603	610	604	611	603	610
OH Libracional	633	-	630	-	633	-
HPO <sub>4</sub> Estiramento P-(OH)	869	880	869	880	867	879
v <sub>1</sub> PO <sub>4</sub> Estiramento simétrico	962	966	962	966	962	966
v <sub>1</sub> HPO <sub>4</sub> Estiramento simétrico	-	1004	-	1006	-	1005
v <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> estiramento assimétrico		1032		1034		1036
	1031	1040	1032	1041	1030	1043
	1094	1051	1094	1050	1094	1051
		1084		1080		1083
v <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub> estiramento assimétrico	1106	-	1104	-	1105	-
	1142	-	1143	-	1141	-
HPO <sub>4</sub> Deformação OH no plano	1213	-	1213	-	1213	-
H <sub>2</sub> O	1630	-	1630	-	1630	-
OH Estiramento	3571	-	3570	-	3569	-
H <sub>2</sub> O	3000- 3650	-	3000- 3650	-	3000- 3650	-

#### 4.3.4 – Caracterização morfológica por MEV

Nos últimos anos houve um grande avanço no controle da forma e tamanho de partículas a base de ortofosfatos de cálcio. Os principais trabalhos publicados estão exemplificados na publicação de LIN *et al.* [90] e, no caso da HA, por SADAT-SHOJAI *et al.* [89]. Dentre as rotas sintéticas utilizadas, a precipitação aquosa continua sendo uma das mais viáveis economicamente em que se podem obter materiais em fluxo contínuo e a larga escala com distintas morfologias e propriedades [49,108,110,178]. A Figura 4.5 ilustra as micrografias obtidas por MEV para as amostras preparadas em pH básico e para as preparadas sem controle de pH. Pode-se observar significativas alterações morfológicas dependendo das condições de síntese. Os tamanhos e as formas das partículas encontradas para cada amostra estão resumidos na Tabela 4.6.

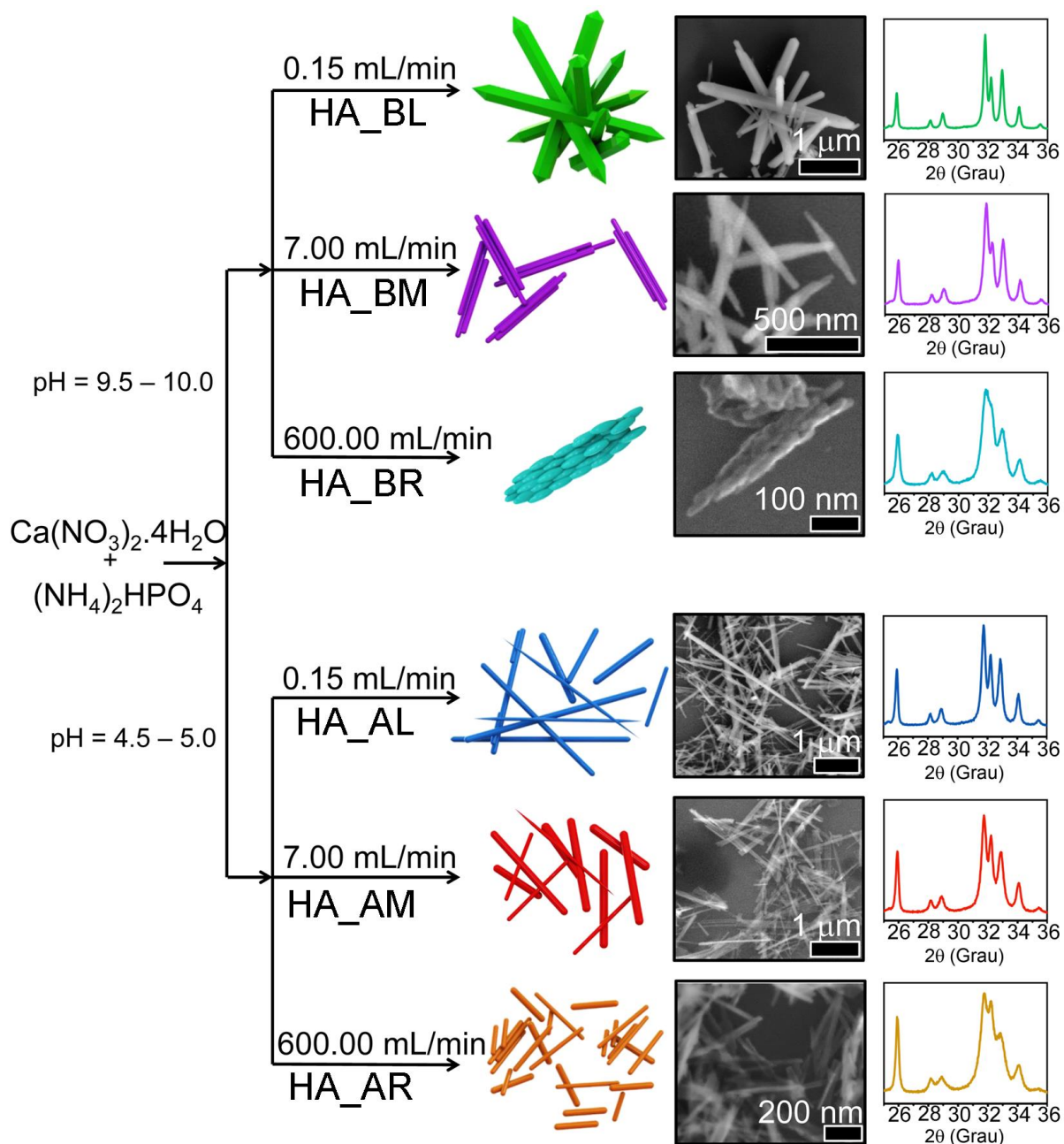
A amostra HA\_BL (Figura 4.5a) é constituída por bastões hexagonais de 70–200 nm de largura chegando a 0,7–2,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. Já na Figura 4.5b se observa que a amostra HA\_BM possui forma tipo bastão com aproximadamente 60–80 nm de largura por 0,3–0,6  $\mu\text{m}$  de comprimento. Com maiores velocidades de mistura em pH básico (HA\_BR, Figura 4.5c), as nanopartículas passam a ter a forma de arrozes com aproximadamente 15–25 nm de largura por 0,05–0,06  $\mu\text{m}$  de comprimento, que formam estruturas aglomeradas. Por outro lado, pode-se observar que as amostras sem o controle de pH possuem forma de fitas e agulhas para os três casos. A principal variação entre elas consiste no tamanho. Para a menor velocidade de mistura (HA\_AL, Figura 4.5d), as partículas chegam a medir 30–200 nm de largura por 0,5–5,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. Ao aumentar a velocidade (HA\_AM, Figura 4.5e) passam a ter 30–200 nm de largura por 0,5–3,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e, por último, na reação com a maior velocidade de mistura (HA\_AR, Figura 4.5f), as partículas não passam dos 20–50 nm de largura e 0,2–0,7  $\mu\text{m}$  de comprimento. A Figura 4.6 ilustra um esquema geral que resume as morfologias obtidas e ordenamentos a longo alcance para cada condição de síntese em específico.



**FIGURA 4.5** – Micrografias obtidas por MEV para as amostras preparadas em pH básico. (a) amostra HA\_BL com adição a 0,15 mL/min do precursor de fosfato e menor supersaturação, (b) amostra HA\_BM com adição a 7,00 mL/min do precursor e, (c) amostra HA\_BR com adição a 600 mL/min do precursor de fosfato. Micrografias obtidas por MEV para as amostras preparadas sem controle de pH. (d) amostra HA\_AL com adição a 0,15 mL/min do precursor de fosfato e menor supersaturação, (e) amostra HA\_AM com adição a 7,00 mL/min do precursor e, (f) amostra HA\_AR com adição a 600 mL/min do precursor de fosfato.

**TABELA 4.6** – Morfologias obtidas para cada amostra e suas respectivas dimensões aproximadas.

Amostra	Morfologia	Comprimento	Largura
HA_BL	Bastão hexagonal	0,7–2,5 μm	70–200 nm
HA_BM	Bastão	0,3–0,6 nm	40–80 nm
HA_BR	Arroz	0,05–0,06 nm	12–25 nm
HA_AL	Fita e Agulha	0,5–5,5 μm	30–200 nm
HA_AM	Fita e Agulha	0,5–3,5 μm	30–200 nm
HA_AR	Fita e Agulha	0,2–0,7 nm	20–50 nm



**FIGURA 4.6** – Esquema geral das condições de síntese estudadas, as morfologias obtidas e a ampliação da região mais importante dos padrões de DRX com distintas resoluções dos picos relacionadas a variações no ordenamento a longo alcance.

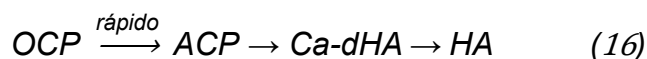
#### 4.3.5 – Mecanismos de formação das partículas de hidroxiapatita

A precipitação da HA consiste em um processo que ainda gera discussão e atrai a atenção de diversos pesquisadores devido a sua complexidade e sensibilidade às condições experimentais, mesmo quando estudada sem aditivos. Como exemplo desta sensibilidade, a precipitação pode sofrer variações na presença de impurezas, e até mesmo com a textura e composição dos recipientes utilizados.

Outros parâmetros como pH, temperatura, grau de supersaturação e identidade dos precursores podem modificar o caminho químico que leva à obtenção de HA [3,5]. Como resultado, o caminho dita o tamanho final das partículas, a forma e a presença de possíveis resquícios amorfos e fases secundárias.

Nos últimos anos, diversos pesquisadores vêm aceitando que os efeitos de difusão não são os únicos responsáveis pela formação e crescimento dos cristais de HA. Entretanto, a regra cinética empírica de *Ostwald-Lussac* de transformação de fases determinaria a formação da HA por meio de uma rota com várias etapas de complexas transformações sólido-sólido [179,180]. Esta regra prevê que, em dadas condições de precipitação, quando o limite de supersaturação for excedido para a fase menos estável, a mesma terá uma maior taxa de nucleação. Como a HA é a fase termodinamicamente mais estável, ela é a última a ser formada. Entretanto, ainda existe discussão na literatura quanto aos intermediários que estão presentes durante a precipitação da HA, bem como os mecanismos de transformação de fases (dissolução/recristalização ou rearranjo dos íons na rede). Neste sentido, as características mencionadas anteriormente quanto à obtenção da HA ainda são incertas [3].

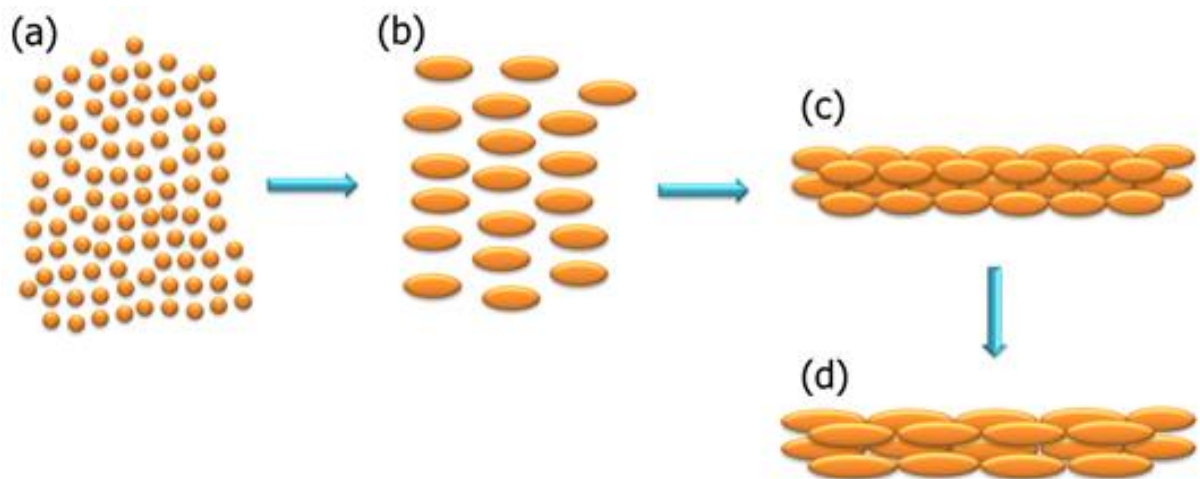
LIU *et al.* [181] estudaram a cinética de formação da HA em pH básico a distintas temperaturas. De acordo com estes pesquisadores, a HA passa pela seguinte transformação sólido-sólido:



O OCP é formado no início da reação. Porém, ele é muito instável nestas condições e se transforma rapidamente em ACP. Os seguintes passos ocorrem lentamente. O ACP se transforma em Ca-dHA com razão Ca/P superior a 1,50, porém inferior a 1,67. Com o passar da reação, a razão Ca/P aumenta até chegar ao valor da HA estequiométrica 1,67. A temperatura tem um papel crucial nessas modificações. Enquanto são necessárias 24 horas a temperatura ambiente para chegar na fase termodinamicamente mais estável (a HA estequiométrica), a 95 °C ocorre tão rapidamente que as fases intermediárias mostradas acima pela Equação 16 são praticamente indetectáveis. A razão Ca/P fica próxima ao da estequiométrica logo após a mistura dos precursores nestas condições de temperatura. Entretanto, para a completa conversão de Ca-dHA para HA são necessárias 2 horas de

maturação das partículas, assim como observado por RODRÍGUEZ-LORENZO e VALLET-REGÍ [49] e realizado no presente estudo.

O uso de  $\text{pH} > 9,5$  favorece a nucleação e crescimento da HA uma vez que existe uma maior concentração de grupos OH assim como ocorre uma maior desprotonação dos grupos fosfatos [182,183]. Em condições de grandes supersaturações, dependendo da velocidade de mistura dos precursores ocorrerá um prevalecimento dos processos de nucleação ou de crescimento das partículas [184]. No propósito de se obter pequenas partículas nanométricas, precipitações abruptas são necessárias para conseguir uma alta densidade de núcleos de cristalização. Este é o caso da amostra HA\_BR. A Figura 4.7 ilustra o processo de cristalização e crescimento das partículas nessas condições.



**FIGURA 4.7** – Mecanismo de formação das nanopartículas com forma de arroz na amostra HA\_BR.

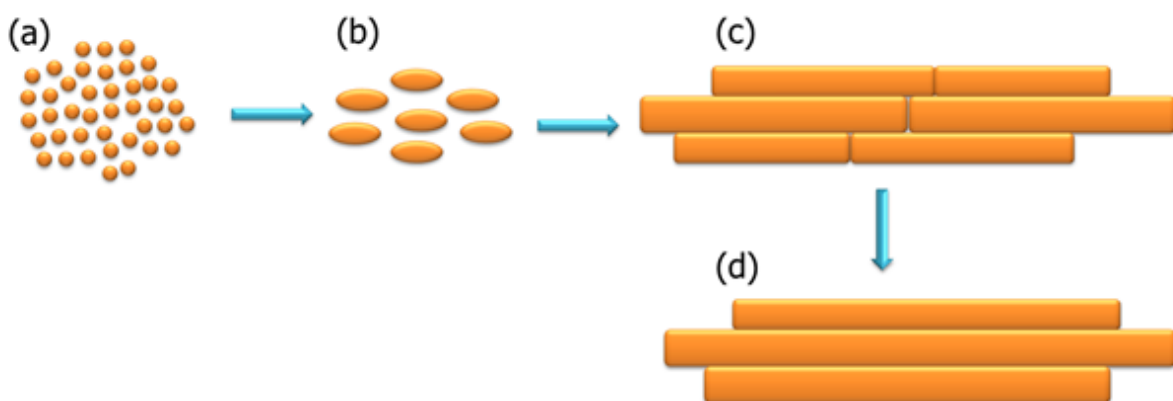
Na etapa (a) da Figura 4.7 existe a formação em grande quantidade de núcleos de HA e a posterior formação das primeiras nanopartículas (b). Nestas condições de síntese, as nanopartículas possuem uma tendência em crescer na forma de arroz. Em seguida, elas tendem a se aglomerar de maneira orientada (c). Por último, processos de coalescência podem ocorrer, aumentando ligeiramente o tamanho das partículas (d).

A presença de aglomerações em partículas com redes cristalinas de HA menos ordenadas foi estudada nos últimos anos, sendo atribuída principalmente a presença de fosfato amorfo durante a síntese. Além de o fosfato amorfo ser uma fase precursora da HA também se sabe que nanopartículas menos cristalizadas possuem composição superficial distinta em relação ao *bulk* [185]. As nanopartículas sintetizadas pelo organismo humano possuem uma camada lábil na superfície que



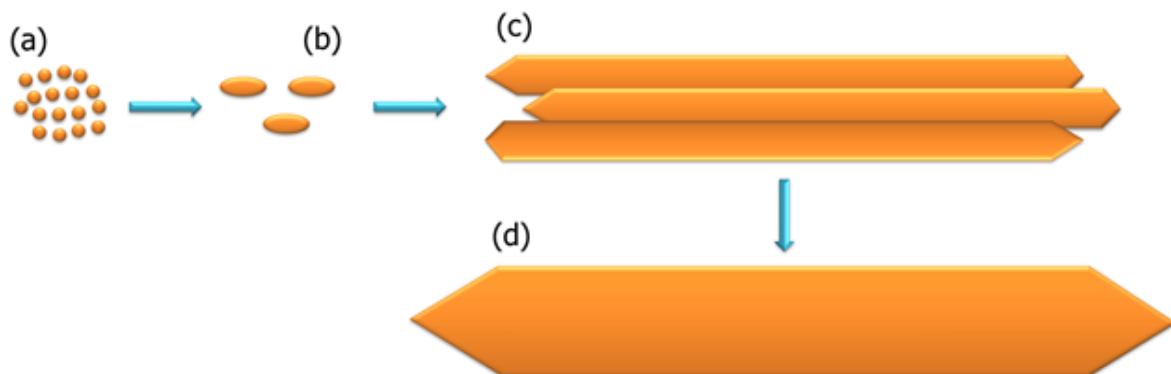
promove trocas iônicas com os fluídos corpóreos de acordo com as necessidades do organismo [186,187]. Em partículas sintetizadas em pH básico, demonstrou-se a existência de uma camada de fosfato amorfo na superfície das nanopartículas de HA que age como uma “argamassa”, ligando as mesmas e posteriormente cristalizando também em HA [188]. As nanopartículas resultantes se agregam de maneira orientada originando as estruturas mais complexas similares as encontradas no organismo vivo. A adição rápida na amostra HA\_BR do precursor de fosfato permite a formação de uma grande quantidade de partículas de menor ordenamento a longo alcance e demonstra um estágio inicial do processo de cristalização, crescimento e aglomeração orientada antes da cristalização na forma dos típicos bastões hexagonais da estrutura.

Com a diminuição da velocidade de mistura dos precursores, existe uma menor taxa de formação de núcleos para a amostra HA\_BM. Este fato favorece a taxa de crescimento dos cristais, produzindo um alongamento das nanopartículas de HA. A Figura 4.8 ilustra o processo de cristalização da HA\_BM. Em (a) podemos ver a formação de uma menor quantidade de núcleos como um efeito da adição mais lenta do precursor de grupos fosfatos. Em seguida, ocorre a formação das primeiras partículas (b). Com o progresso da reação, novos grupos fosfatos são adicionados. Eles, juntamente com os  $\text{Ca}^{2+}$ , depositam-se na superfície das partículas já precipitadas promovendo os seus crescimentos, assim como mostra a etapa (c). Essas partículas se aglomeram de maneira orientada. Com o tempo, as partículas passam pela etapa de maturação e crescimento (d). Assim, o valor intermediário de velocidade de adição da solução com íons fosfato promove uma maior cristalização das partículas em comparação a HA\_BR. Como as etapas de nucleação e crescimento podem se sobrepor neste caso, ocorre a ampliação na distribuição de tamanho de partículas.



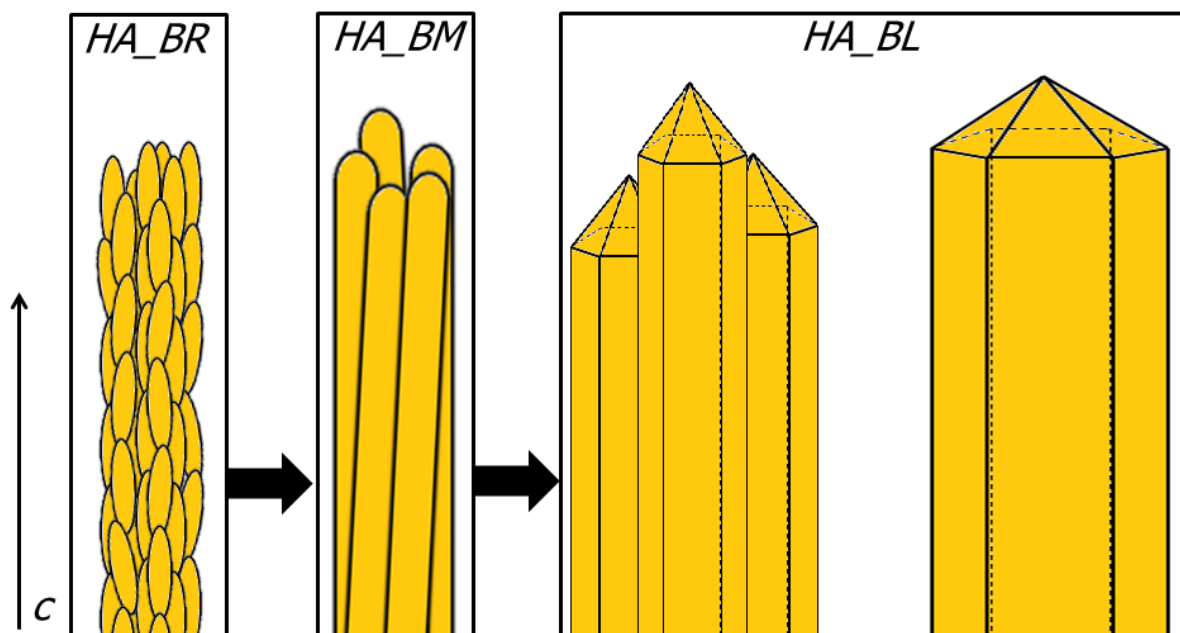
**FIGURA 4.8** – Mecanismo de formação das nanopartículas com forma de bastão na amostra HA\_BM.

Com uma nova diminuição na taxa de adição do precursor de fosfato, menos núcleos são formados e uma lenta deposição de fosfato e cálcio ocorre na superfície das primeiras partículas formadas. Além disso, as espécies na rede possuem mais tempo para se organizar e as nanopartículas em cristalizar. A HA possui uma estrutura hexagonal, com seis faces (100) que crescem longitudinalmente [189]. Elas se tornam evidentes nesta etapa do estudo. O mecanismo de cristalização é representado pela Figura 4.9. Em um primeiro momento, formam-se alguns poucos núcleos na solução (a) e a formação das primeiras partículas (b). A adição de mais grupos fosfato é lenta a ponto de promover um significativo crescimento longitudinal das partículas. Essas partículas, assim como observado na Figura 4.5a tendem a aglomerar e a coalescer, formando grandes bastões hexagonais (d). Assim como no caso anterior, as etapas descritas podem sobrepor, ampliando a distribuição de tamanho de partículas.



**FIGURA 4.9** – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de bastão hexagonal na amostra HA\_BL.

De uma maneira geral, podemos observar a seguinte evolução das partículas sintetizadas no presente trabalho. A Figura 4.10 ilustra um esquema geral para a evolução das morfologias das partículas de acordo com a velocidade de mistura dos precursores.

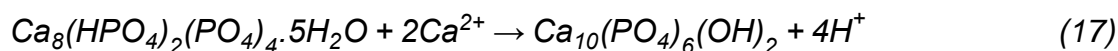


**FIGURA 4.10** – Relação entre os métodos de adição do precursor de fosfato nas amostras preparadas em pH básico. Destaca-se a variação das morfologias obtidas e os processos de aglomeração e coalescência.

Por outro lado, a síntese sem o controle de pH exibiu sensíveis alterações morfológicas. Nestas condições, prevalece o crescimento anisotrópico das partículas inclusive ao adicionar rapidamente o precursor de fosfato. Este resultado corrobora com os mencionados por LEGEROS *et al.* [21] em que reações a menores valores de pH permitem maiores partículas. A estabilidade das distintas fases de ortofosfatos de cálcio é variável de acordo com o pH e temperatura de síntese [15] e a morfologia final das partículas depende sensivelmente do caminho para chegar à fase termodinamicamente mais estável. A presença de fitas alongadas remete à presença da fase fosfato octacálcico (OCP,  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca/P} = 1,33$ ) como fase intermediária nas três amostras [190]. O OCP atinge a supersaturação antes da HA ocorrendo a sua nucleação e crescimento previamente. Um dos principais motivos é o pH de síntese. Quando o mesmo é alterado para valores menores ocorre uma diminuição na quantidade de hidroxilas livres e uma alteração no balanço entre as espécies de fosfatos ( $\text{H}_x\text{PO}_4^{x-3}$ ) prevalecendo as protonadas e, conseqüentemente, desfavorecendo a precipitação da HA [3,191]. O OCP possui cela unitária triclinica com grupo espacial *P1* descrito em termos de camadas de estrutura tipo apatita alternando com camadas hidratadas paralelas ao plano (100) [192,193]. Como essas faces são mais hidratadas que as outras, a adesão de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfatos é reduzida. Assim, os cristais crescem sobre o eixo-c, resultando em cristais com faces

(100) predominantes nas laterais e bordas com faces (010), (001) e (011) [194]. Nos cristais de OCP existem duas faces (100) resultando em partículas semelhantes a lâminas, placas e fitas.

O OCP é termodinamicamente metaestável e com o decorrer da reação e da maturação dos cristais tende a evoluir a HA. Este processo ocorre na forma de hidrólise assim como representa a Equação 17 [182].



Durante a reação acima ocorre a liberação de prótons na solução diminuindo o pH pela desprotonação dos *clusters* [PO<sub>4</sub>H]. Entretanto, existem dois *clusters* cristalograficamente não equivalentes, onde um deles pode continuar protonado, permanecendo na forma de Ca-dHA, assim como observado [173]. Esta reação ocorre em distintas velocidades de acordo com as condições experimentais [104,106]. Em nosso caso, não foi detectada a fase cristalina referente ao OCP na caracterização por DRX, assim como não foram observadas bandas no FTIR e no RAMAN de *clusters* característicos desta estrutura. O ICP-AES nos fornece uma razão molar que remete a Ca-dHA (1,500 < Ca/P < 1,667) e não ao OCP (Ca/P = 1,330). Assim, podemos concluir que nas três condições estudadas em pH ácido houve uma efetiva hidrólise para a Ca-dHA.

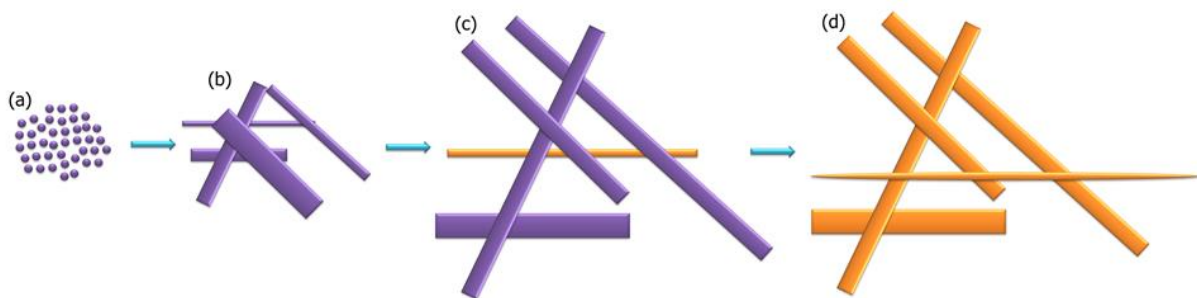
Pode-se observar nas amostras que se manteve a anisotropia das partículas. Quando o OCP age como um precursor da HA, as partículas finais tendem a manter a forma de fita, placa ou fibra [106]. Em outros estudos, demonstrou-se que a HA nucleia e cresce de maneira epitaxial sobre o OCP devido às similaridades entre estas estruturas [195]. A principal força por trás do crescimento epitaxial é a tendência de crescimento de uma fase para atingir um estado de energia mínima interfacial, que ocorre quando as duas redes equivalem entre si. Entretanto, a perda de água na transformação do OCP em HA cria uma significativa tensão nos cristais levando a fragmentações irregulares [190], assim como observado nas amostras estudadas, principalmente no caso das HA\_AM e HA\_AL.

Como mencionado anteriormente, podemos propor um modelo para a formação das partículas observadas para as três amostras preparadas em pH ácido. A Figura 4.11 ilustra a sequência de etapas durante a precipitação da HA para a amostra com adição rápida do precursor de fosfato. As partículas em roxo remetem a

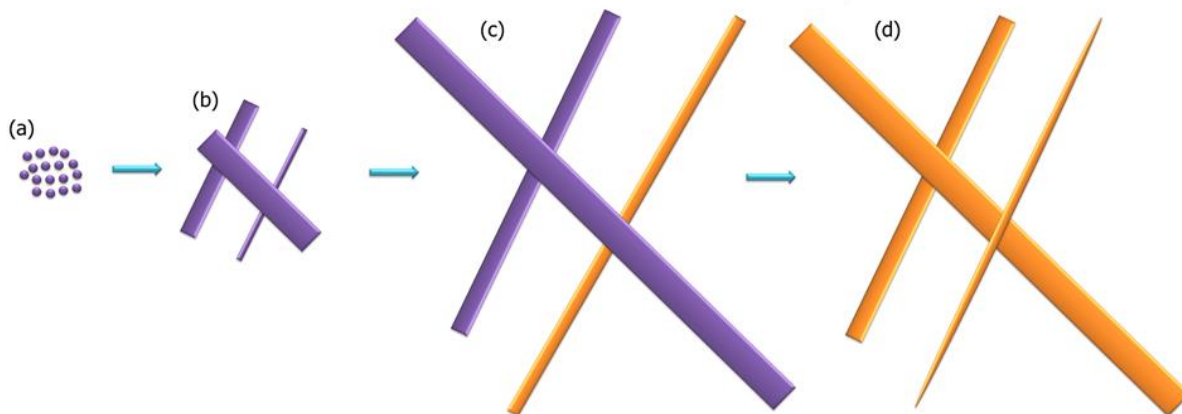
fase OCP e em laranja a fase HA. Nestas condições, ocorre a formação de grandes quantidades de núcleos de OCP (a). Em seguida, ocorre o crescimento das lâminas e fitas com distintas espessuras, porém com comprimentos relativamente parecidos (b). Como os novos grupos  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  tendem a não aderir nas faces expostas (100), ocorre o crescimento longitudinal das partículas. Entretanto, devido à velocidade de adição ser rápida, não há um grande favorecimento da etapa de crescimento das partículas por processo de difusão, pois o processo de nucleação prevalece. Em seguida, ocorre a etapa de hidrólise do OCP, convertendo-se em Ca-dHA (etapa (c)) com a preservação dos aspectos morfológicos do OCP, porém com possíveis desfragmentações das partículas. Já os mecanismos para as amostras HA\_AM e HA\_AL estão representados pelas Figuras 4.12 e 4.13, respectivamente. Para estas amostras, a etapa de crescimento das partículas pela adesão de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfato se torna relevante devido à adição lenta do precursor de fosfato. Essa etapa é mais acentuada para a amostra HA\_BL, pois a baixa velocidade de adição e a menor supersaturação do sistema leva a uma menor formação de núcleos. Com o decorrer da reação ocorre a hidrólise do OCP em ambos os casos, formando Ca-dHA.



**FIGURA 4.11** – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de fita e agulha na amostra HA\_AR.



**FIGURA 4.12** – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de fita e agulha na amostra HA\_AM.



**FIGURA 4.13** – Mecanismo de formação das micropartículas com forma de fita e agulha na amostra HA\_AL.

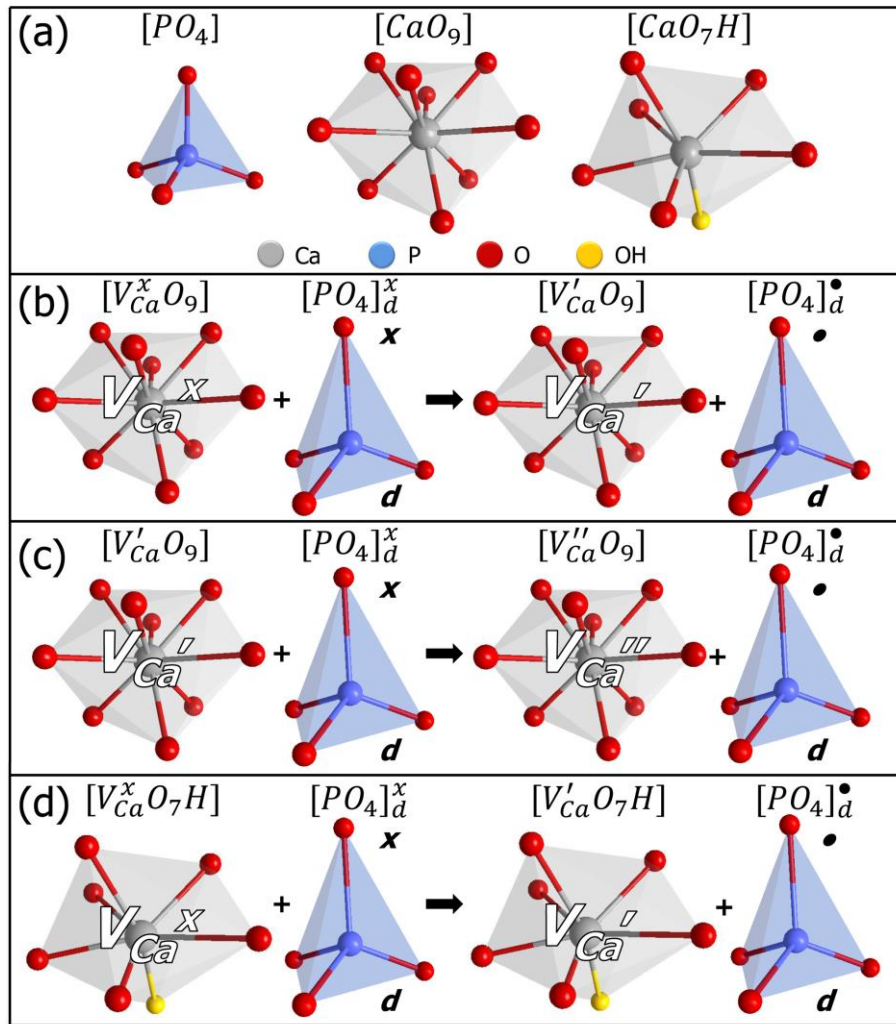
#### 4.3.6 – Fotoluminescência e estrutura eletrônica

A formação espontânea de níveis aceptores e doadores dentro da região de *band gap* (polarização da rede), que é responsável pelas transições radiativas e não radiativas envolvendo pares  $e'-h^*$ , pode ser induzida pela presença de defeitos. Esses defeitos incluem vacâncias, deslocamentos, estresses e torções na rede cristalina, distorções nas ligações atômicas, rachaduras, poros, etc [196]. Os fatores que levam a formação desses defeitos nas matrizes sólidas variam com a metodologia de síntese e processamento usados na preparação dos materiais. Parâmetros experimentais, como o tipo da amostra (pó, filme fino, pastilha), pressão, temperatura, tempo de reação, meio reacional (sólidos e líquidos de distintas polaridades), atmosfera, etc, também tem efeito na formação de defeitos. Neste sentido, o controle dos tipos e da densidade total de defeitos formados em um material é de extrema dificuldade.

Defeitos relacionados à perda de simetria em *clusters* de  $[CaO_9]$ ,  $[CaO_7H]$  e  $[PO_4]$  podem estar presentes na HA sintetizada em soluções aquosas a temperaturas relativamente baixas [13]. Esta perda de simetria possivelmente resulta da presença de vacâncias nos *clusters* de Ca, uma vez que estas espécies estão mais livremente arranjadas, possuindo significativa mobilidade [48,197,198]. No presente estudo, vacâncias de cálcio ( $V_{Ca}$ ) nas amostras de Ca-dHA obtidas em meio ácido resultaram da ausência de alguns átomos de Ca de suas respectivas posições na estrutura da apatita (vacância iônica). As  $V_{Ca}$  podem ter se originado também do deslocamento de espécies Ca de suas posições de equilíbrio (vacância intersticial).

As mesmas ocorrem principalmente devido à baixa organização das espécies presentes na rede de HA. Nas amostras sintetizadas em um meio básico,  $V_{Ca}$  intersticiais ocorrem mais facilmente que as  $V_{Ca}$  iônicas em consequência das condições de síntese (especialmente no caso da amostra HA\_BR), e à baixa densidade dos *clusters* protonados de fosfato. Estas vacâncias intersticiais também podem estar presentes em ambos os grupos estudados em virtude de distorções resultantes de vacâncias vizinhas, como aquelas referentes a grupos OH [86,197]. Nota-se que os *clusters* de fosfato são mais estáveis do que os de Ca, e definem a estrutura hexagonal da HA – embora possam, contudo, sofrer distorções (perda de simetria) na rede. A distorção ocorre por conta de mudanças nos comprimentos de ligação P–O e nos ângulos das ligações O–P–O. As mudanças em questão são induzidas pela protonação na Ca-dHA [48] ou por mudanças no grau de desordem estrutural a curta e longa distância, e são expressas nos resultados obtidos pela caracterização por DRX, FTIR e RAMAN.

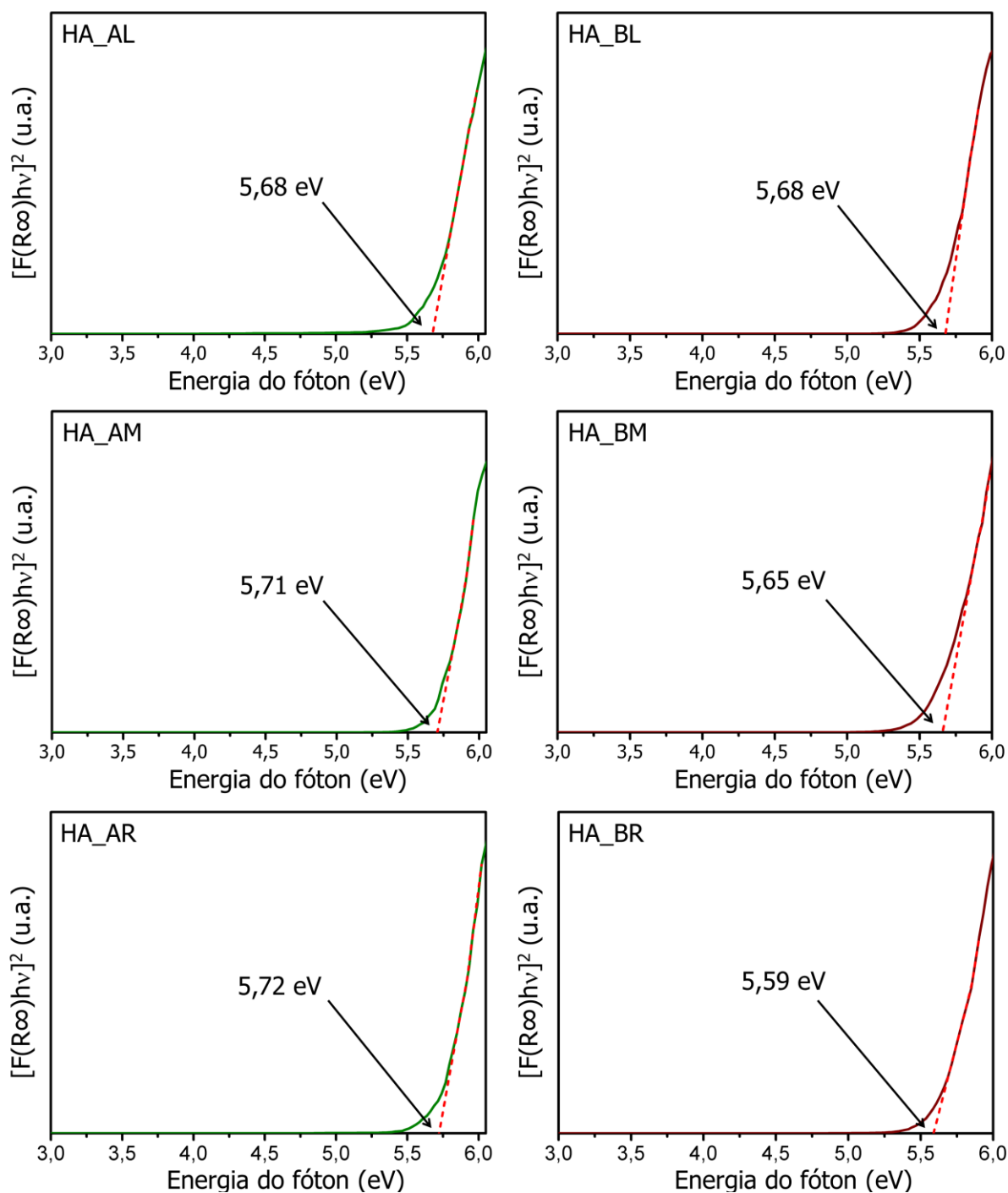
Considerando o que foi exposto anteriormente, propõe-se neste estudo um modelo (Figura 4.14) baseado nos apontamentos de KRÖGER-VINK [199], a fim de elucidar a influência das  $V_{Ca}$  e *clusters* desordenados de  $[PO_4]$  no processo de polarização da rede de HA. Os *clusters*  $[PO_4]$ ,  $[CaO_9]$ , e  $[CaO_7H]$  ilustrados na Figura 4.14a são considerados ideais, ou seja, livres de defeitos. Vacâncias iônicas e intersticiais em meios ácido e básico são indicados nas Figuras 4.14b–d. Considera-se que  $[V_{Ca}^x O_9]$  e  $[V_{Ca}^x O_7H]$  são vacâncias de Ca neutras;  $[V_{Ca}' O_9]$  e  $[V_{Ca}' O_7H]$  são vacâncias de Ca que receberam um elétron;  $[V_{Ca}'' O_9]$  é uma vacância de Ca que recebeu dois elétrons;  $[PO_4]_d^x$  e  $[PO_4]_d^\bullet$  são *clusters* de fosfato distorcidos/desordenados, em que x e  $\bullet$  denotam um estado neutro e um *cluster* com um buraco (carga positiva), respectivamente. Estas equações sumarizam os efeitos da polarização resultantes da formação de vacâncias, nas quais há uma transferência de carga de *clusters* perturbados para *clusters* não perturbados (ordem-desordem estrutural) – em outras palavras, a formação de pares  $e'-h^*$  [152]. Por exemplo, pode-se apontar transferências eletrônicas do *cluster*  $[PO_4]_d^\bullet$  (perturbado) para o *cluster*  $[V_{Ca}' O_9]$  (não perturbado).



**FIGURA 4.14** – Modelo baseado na notação de *Kröger-Vink* para o processo de polarização da rede da HA. (a) clusters ordenados da estrutura da HA, (b–d) mecanismos de formação de vacâncias em Ca.

Além da  $V_{Ca}$  e distorções do  $[PO_4]$  na superfície e no *bulk*, outros defeitos superficiais e interfaciais tais como poros, rachaduras, contornos de grão e etc., também ocorrem na HA [200]. A princípio, independentemente dos tipos de defeitos, é possível haver distribuição não homogênea de cargas, como consequência da quebra de simetria induzida pelo deslocamento de densidades eletrônicas associadas aos *clusters*  $[CaO_9]$ ,  $[CaO_7H]$  e  $[PO_4]$ . Devido a este fenômeno, níveis adicionais de energia podem ocorrer dentro da zona proibida ou *band gap* [86,197,201]. Portanto, a estrutura de bandas nas amostras de HA pode ser revelada a partir da combinação de resultados de medidas no UV-Vis com os espectros de FL.





**FIGURA 4.15** – Espectros UV-Vis para as amostras preparadas por precipitação química em distintas condições experimentais.

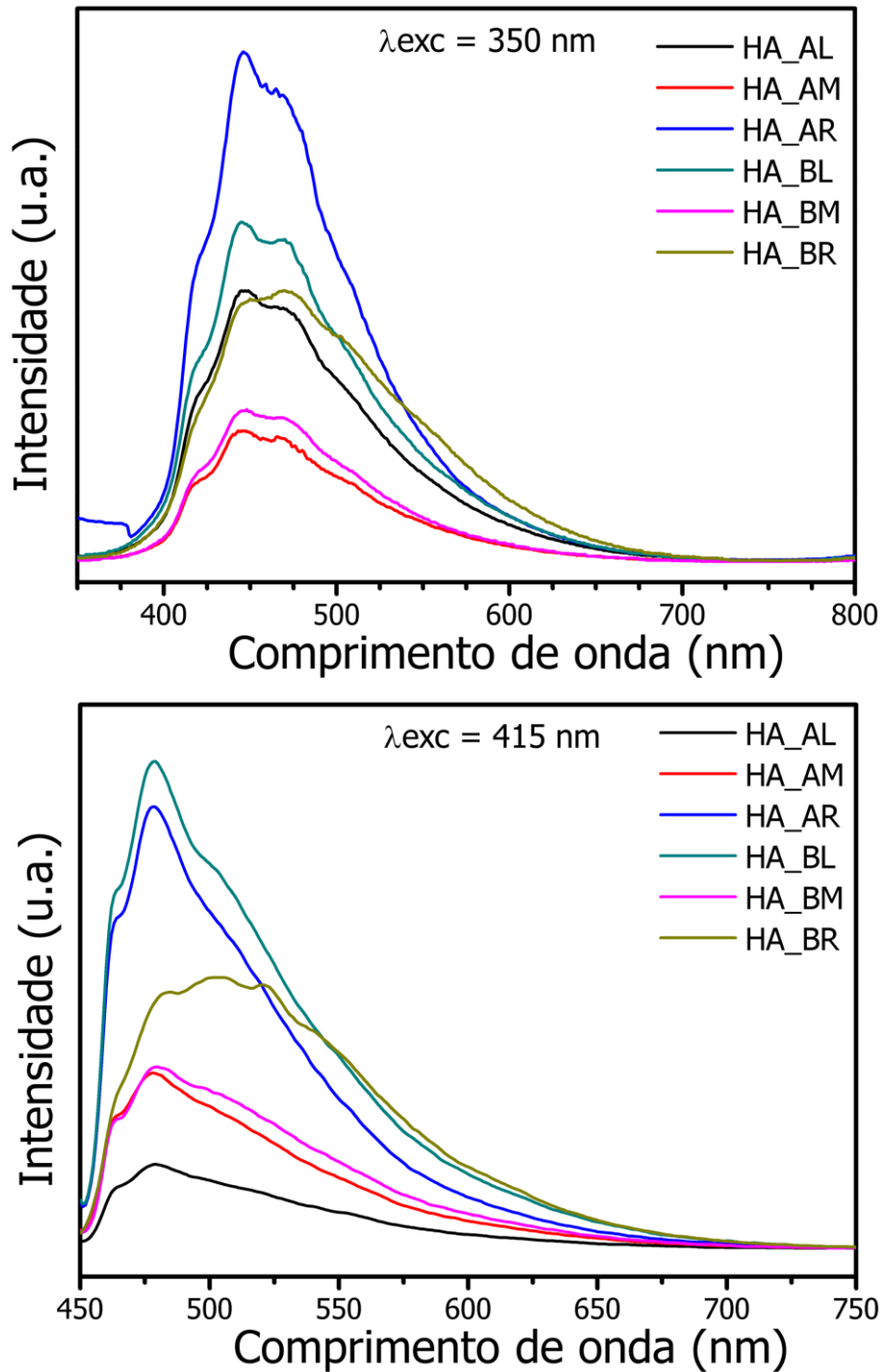
A Figura 4.15 ilustra a caracterização das amostras obtidas a partir da espectroscopia no UV-Vis. A porção linear (a cauda) destes espectros foi extrapolada a partir do uso da equação de KUBELKA-MUNK [202] adaptada (adotou-se  $n=1/2$  para transições indiretas [203]) a fim de se estimar a  $E_g$  de cada amostra. As amostras recém preparadas apresentaram elevados valores de  $E_g$  (de 5.59 a 5.72 eV), os quais foram similares ao que se reporta na literatura para a HA [203–206]. O valor da  $E_g$  das

amostras preparadas apresentou ligeira variação com os parâmetros de síntese. No entanto, o valor mais baixo de  $E_g$  da amostra HA\_BR (~5.59 eV) sugere que esta amostra contém a maior quantidade de níveis intermediários de energia dentro da zona proibida. Estes níveis resultam de diversos tipos de defeitos (estruturais, de superfície e interface).

A influência de alguns parâmetros na FL da HA foi estudada anteriormente. ZHANG *et al.* [7] relataram que impurezas como ânions radicais de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2^{\bullet-}$ ) localizados nas regiões intersticiais da rede de HA possuem papel significativo na FL intrínseca. Recentemente, BYSTROVA *et al.* [157] correlacionaram dados experimentais e cálculos teóricos pretendendo a explicação do papel de defeitos estruturais na organização da estrutura de bandas, e atividade FL de cristais. Defeitos como vacâncias de OH e H nos interstícios da rede foram considerados em seu estudo.

O objetivo do presente estudo dirigiu-se à compreensão da influência do pH, velocidade de adição do precursor de fosfato, forma das partículas, bem como formação de defeitos ( $V_{\text{Ca}}$  iônicas e intersticiais, distorções nos clusters  $[\text{PO}_4]$ ) nas propriedades fotoluminescentes da HA.

A Figura 4.16 ilustra os espectros FL para todas as amostras obtidos à temperatura ambiente e nos comprimentos de onda de excitação de 350 e 415 nm. Estes espectros possuem perfis amplos, indicando que as emissões cobrem grande parte do espectro eletromagnético visível. Neste caso, inúmeros estados de energia estão envolvidos nas transições eletrônicas. Conforme notado a partir da caracterização UV-Vis (Figura 4.15), os valores de  $E_g$  das amostras (de 5.59 a 5.72 eV) são superiores do que as energias de excitação (~3.54 e ~2.98 eV em 350 e 415 nm, respectivamente). Estes dados indicam que as transições eletrônicas banda-banda possuem pouca influência na FL final. A explicação para tal fenômeno óptico está relacionada à ocorrência de níveis de energia adicionais dentro da zona proibida. Estes níveis advêm de defeitos da superfície, interface e *bulk*. Em estudos anteriores [87], níveis adicionais foram atribuídos também a estados de energia da superfície e do *bulk*, reforçando a presente interpretação.



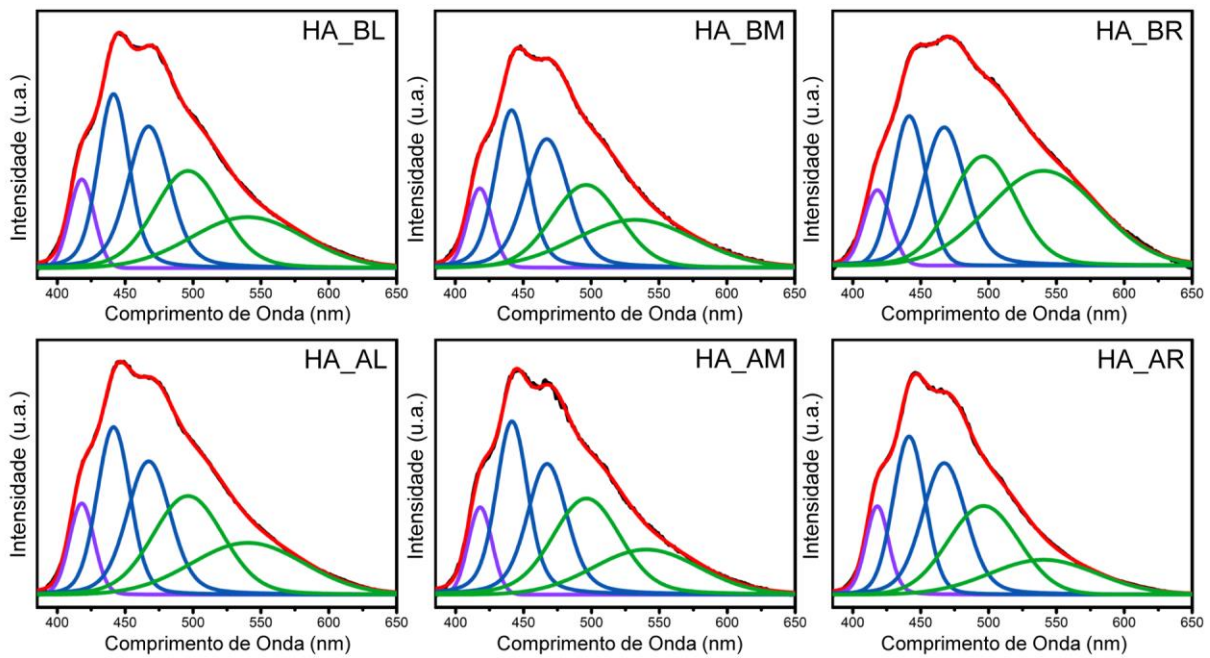
**FIGURA 4.16** – Espectros de emissão obtidos ao excitar em 350 e 415 nm as amostras preparadas nas distintas condições de síntese.

Há de se destacar que tais estados de energia são referidos como estados rasos e profundos de defeitos [196,207]. Os níveis profundos ocorrem próximos do meio do *band gap* e dão origem a emissões FL de cor verde, amarela, laranja e vermelha. Por outro lado, os níveis rasos ocorrem perto dos limites da banda de condução (BC) e/ou da banda de valência (BV). Em especial, aqueles que se localizam próximos da BC exercem papel fundamental nas emissões FL azuis e

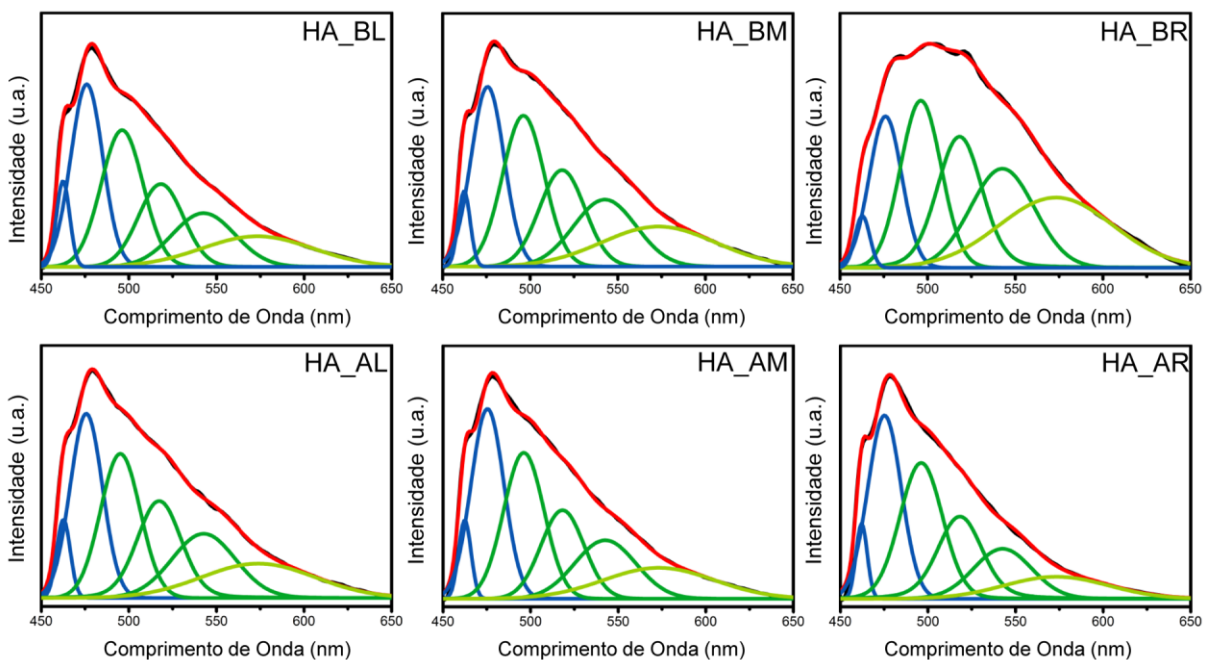
violetas [208]. As intensidades máximas no espectro de FL das amostras de HA estequiométrica e Ca-dHA (Figura 4.16) ocorrem em comprimentos de onda entre 440 e 540 nm, os quais correspondem a regiões verdes e azuis do espectro eletromagnético visível. Conclui-se desta maneira que as emissões observadas a partir do presente procedimento experimental abarcam tanto níveis rasos quanto profundos de defeitos.

Os espectros possuem características similares, embora as intensidades de emissão sejam diferentes. Estas diferenças resultam de variações na concentração de defeitos localizados principalmente no *bulk* (vacâncias iônicas e  $V_{Ca}$  intersticiais, e distorções nos *clusters*  $[PO_4]$ ). Entretanto, quando comparada às amostras Ca-dHA obtidas em meio ácido, a FL das amostras de HA estequiométrica obtidas em meio básico (principalmente a amostra HA\_BR) sofrem ligeiro deslocamento na direção de maiores comprimentos de onda, independentemente da energia de excitação empregada. O deslocamento em questão pode ser atribuído ao efeito de defeitos de interface e superfície. Ademais, na amostra HA\_BR uma rápida supersaturação ocorre e diversos núcleos estáveis são formados a partir da crescente taxa de adição do precursor de fosfato. Na sequência, estes núcleos interagem, originando as nanopartículas. O processo ocorre muito rapidamente, resultando, desta maneira, em uma alta concentração de irregularidades ou defeitos (como rachaduras, quebras de ligação, distorções nos *clusters*  $[PO_4]$  e  $V_{Ca}$ ) na superfície destas nanopartículas. Além disso, nanopartículas de HA podem rotacionar ou colidir umas com as outras ao longo de uma mesma orientação cristalográfica (*oriented attachment*). Defeitos se formam na região de interface entre as nanopartículas no caso de uma adesão imperfeita/defeituosa [209].

Conforme indicado nas seções anteriores, defeitos intrínsecos exercem significativo impacto nos mecanismos de recombinação eletrônica. O espectro FL (coletados nos dois comprimentos de onda) foram então deconvoluídos com vistas à determinação qualitativa da contribuição de cada componente ou centro de emissão de luz visível. Esta deconvolução foi realizada a partir do *software PeakFit* (versão 4.05), e os resultados são apresentados nas Figuras 4.17 e 4.18.



**FIGURA 4.17** – Ajustes dos espectros de emissão obtidos ao excitar em 350 nm as amostras sintetizadas.



**FIGURA 4.18** – Ajustes dos espectros de emissão obtidos ao excitar em 415 nm as amostras precipitadas em distintas condições.

Os perfis FL foram todos bem descritos pela função *Voigt area*. Cinco componentes foram necessários para o espectro observado no comprimento de onda de 350 nm, enquanto seis foram necessários para o comprimento de onda de 415 nm. Tais componentes permaneceram na mesma posição, dependendo do comprimento de onda de excitação. Os dados obtidos são listados nas Tabelas 4.7 e 4.8. Como

indicam as tabelas, centros de emissão azul – que ocorrem em 467 e 475 nm para excitação em 350 e 415 nm, respectivamente – possuem altas porcentagens de área. O mesmo ocorre para centros de emissão verde – que ocorrem em 496 nm, para ambos os comprimentos de onda. Estes dados confirmam que os níveis rasos e profundos de defeitos (localizados aproximadamente no meio e próximos à BC da zona proibida, respectivamente) contribuem significativamente para os mecanismos de recombinação eletrônica. A amostra HA\_BR excitada em 415 nm demonstrou uma tendência diferente – além da componente verde, também foi observada a componente amarela com altas porcentagens de área. Pode-se concluir que níveis profundos de energia dentro da *band gap* desta amostra resultam principalmente do efeito de defeitos de superfície e interface.

**TABELA 4.7** – Dados dos ajustes das emissões obtidas após excitar as amostras a 350 nm.

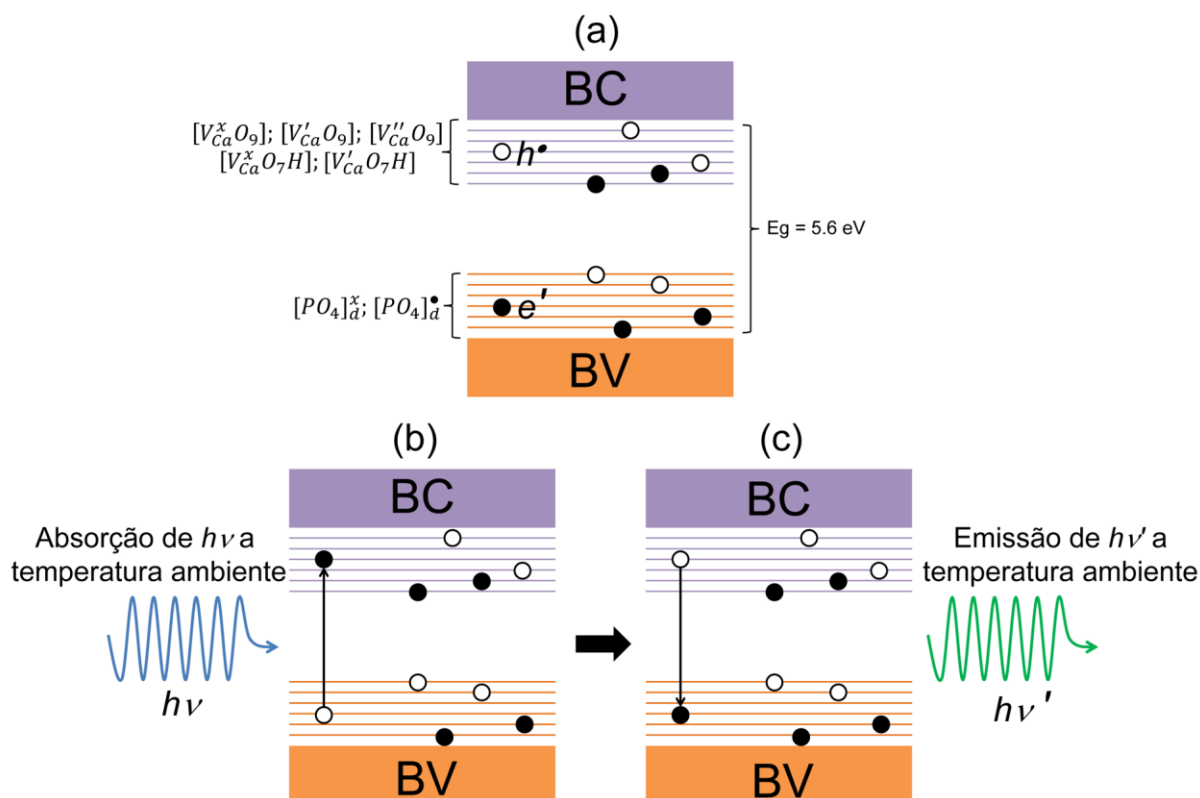
Amostra	Área (%)				
	Banda 1 (420 nm)	Banda 2 (440 nm)	Banda 3 (467 nm)	Banda 4 (496 nm)	Banda 5 (540 nm)
HA_BL	7,87	21,98	24,17	25,27	20,70
HA_BM	7,67	22,67	24,42	23,05	22,19
HA_BR	6,35	15,92	20,70	23,88	33,14
HA_AL	8,33	21,26	23,07	26,34	21,01
HA_AM	7,85	24,01	22,90	27,12	18,11
HA_AR	9,05	22,21	26,42	26,60	15,71

**TABELA 4.8** – Dados dos ajustes das emissões após excitar as amostras a 415 nm.

Amostra	Área (%)					
	Banda 1 (462 nm)	Banda 2 (475 nm)	Banda 3 (496 nm)	Banda 4 (518 nm)	Banda 5 (540 nm)	Banda 6 (573 nm)
HA_BL	4,87	25,17	24,77	16,07	14,49	14,63
HA_BM	3,42	22,64	24,08	16,65	15,93	17,27
HA_BR	2,33	14,91	20,52	18,95	19,18	24,10
HA_AL	4,23	23,50	22,68	17,78	16,39	15,40
HA_AM	4,08	26,14	24,64	15,93	14,94	14,27
HA_AR	3,76	27,61	26,76	18,11	13,39	10,37

Defeitos na superfície e interface, bem como distorções nos clusters  $[\text{PO}_4]$  e vacâncias iônicas e intersticiais  $V_{\text{Ca}}$  (presentes no *bulk* e na superfície), podem alterar a estrutura eletrônica das amostras de HA. Ademais, alguns estados superficiais, que são tanto intrínsecos das terminações do cristal, quanto resultantes da presença de defeitos cristalinos na superfície, induzem a mudanças nas propriedades físico-químicas dos materiais [210,211]. Um único cristal pode ser constituído por vários planos cristalográficos que possuem distintas energias de superfície [212–214]. Estes estados de energia na superfície podem assumir papel importante na formação e organização de estados de energia ocupados e vazios na região de *band gap* [215].

Considerando os resultados de UV-Vis e FL, é possível propor um modelo de estrutura de bandas para explicar o comportamento FL das amostras de HA, assim como ilustra a Figura 4.19. A ideia central está baseada em alguns dos estudos publicados na literatura e descritos acima [157,197,201,203,204], assim como no efeito da ordem-desordem estrutural [121]. Neste modelo, a banda proibida consiste de inúmeros níveis de energia intermediários semipreenchidos. Estes níveis são oriundos de defeitos (*bulk*, superfície e interface) que causam a quebra na simetria dos clusters de coordenação  $[\text{PO}_4]$ ,  $[\text{CaO}_9]$  e  $[\text{CaO}_7\text{H}]$  (Figura 4.19a). Assim, os níveis próximos à borda da BC estão associados aos estados  $3p$  e  $4s$  do Ca nos clusters  $[\text{CaO}_9]$  e  $[\text{CaO}_7\text{H}]$ . Por outro lado, os níveis mais próximos à borda da BV são dominados por estados dos clusters  $[\text{PO}_4]$  como  $3s$  e  $3p$  do P, bem como os estados  $2s$  e  $2p$  do O. Durante o processo de excitação à temperatura ambiente, os elétrons localizados em níveis de energia de menor energia próximos à BV absorvem a energia de fótons ( $h\nu$ ) e, conseqüentemente, são promovidos a níveis de energia intermediários próximos à BC (Figura 4.19b). As energias originárias destas transições eletrônicas são convertidas em fótons ( $h\nu'$ , onde  $h\nu > h\nu'$ , Figura 4.19c) quando os elétrons retornam aos estados de menores energias. Além disso, os espectros amplos e intensos de FL das amostras de HA são atribuídos a numerosos fótons gerados pelas transições eletrônicas, e que envolvem vários estados de energia. Ademais, as transições entre níveis de energia próximos podem resultar em processos de recombinação não radiativos.



**FIGURA 4.19** – (a) Esquema da estrutura de bandas das amostras de HA, (b) processo de excitação (formação de pares  $e'-h^*$ ), e (c) processo de recombinação dos pares  $e'-h^*$ , resultando na emissão de FL ( $h\nu > h\nu'$ ).

#### 4.4 – Conclusões

No presente estudo foi possível sintetizar nano e micropartículas de HA com composição próxima à da HA estequiométrica e deficiente em cálcio (Ca-dHA) a partir da metodologia de precipitação química, partindo da escolha apropriada de parâmetros experimentais (taxa de adição do precursor de fosfato e valor de pH). A formação das partículas foi confirmada via ICP-AES, DRX, espectroscopias FTIR e RAMAN.

Os picos intensos e bem definidos de difração revelaram que todas as amostras apresentam periodicidade a longo alcance. É possível observar uma tendência a alcançar picos mais definidos com menores taxas de adição do precursor de fosfato, indicando alterações no ordenamento a longa distância e/ou na cristalização das partículas.

A existência de ordem local nos *clusters* correspondentes à coordenação dos átomos de Ca e P foram confirmados por FTIR e RAMAN. Ademais, foi observada



uma pequena perda de resolução nos modos vibracionais dos *clusters* [PO<sub>4</sub>] para as amostras preparadas em pH ácido, relacionadas a mudanças de ordem a curto alcance ou desordem estrutural. Em adição, bandas associadas aos *clusters* [PO<sub>4</sub>H] foram observados nas amostras preparadas em pH ácido, típicos de amostras Ca-dHA.

O tamanho e forma das partículas (prismas, bastões, arrozes, agulhas e fitas) variaram de acordo com o valor de taxa de adição do precursor de fosfato e o valor de pH utilizados durante a precipitação.

Os espectros de FL das amostras exibiram perfis do tipo banda larga, com máximos de emissões localizados nas regiões azul e verde do espectro eletromagnético.

As amostras de HA com composição próxima à estequiométrica e Ca-dHA apresentaram valores de  $E_g$  (de 5.59 a 5.72 eV) superiores aos das energias de excitação (~3.54 e ~2.98 eV em 350 e 415 nm, respectivamente). Este comportamento foi atribuído a existência de uma alta densidade de níveis de energia intermediários (rasos ou profundos) na região de *band gap*, devido à presença de defeitos no *bulk*, superfície e interface das partículas.



# CAPÍTULO 5 – INFLUÊNCIA DE TRATAMENTOS TÉRMICOS NAS PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E FOTOLUMINESCENTES DA HIDROXIAPATITA

## 5.1 – Introdução

A utilização de tratamentos térmicos em materiais é um procedimento usual para promover alterações estruturais e, conseqüentemente, alterar as propriedades dos produtos finais. O efeito da temperatura em ortofosfatos de cálcio vem sendo estudada desde 1971 [216]. Desde então, tratamentos térmicos são utilizados na produção de distintos fosfatos de cálcio por reação de estado sólido, decomposição térmica e transições de fases [21]. A etapa de tratamento térmico também é amplamente utilizada para modificar características por efeito de sinterização dos produtos inicialmente obtidos a baixas temperaturas, como a cristalinidade, porosidade e área superficial [97,217].

Por outro lado, reações químicas na superfície e no *bulk* das partículas ocorrem concomitantemente na HA quando a rota sintética envolve meios aquosos e sais precursores. Por exemplo, no caso da precipitação química e rotas hidrotérmicas, estes tratamentos térmicos são utilizados para eliminar moléculas de H<sub>2</sub>O presas na rede, bem como para decompor impurezas do meio reacional incluindo NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, carbonatos e qualquer composto orgânico [13,42]. A transformação de grupos fosfatos presentes na rede, como a condensação de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> em P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>, também é observada em amostras precipitadas seguidas de tratamentos térmicos [111]. Todas estas reações químicas levam à formação de subprodutos que são estabilizados no retículo cristalino, ou liberados na forma gasosa deixando, desta maneira, sítios vacantes na rede. Os tratamentos térmicos também permitem a incorporação de novos grupos OH<sup>-</sup> da atmosfera e, posteriormente a temperaturas superiores a 900 °C, o processo de desidroxilação da matriz [45].

Neste sentido, as propriedades e características da HA sintetizada por precipitação não dependem somente dos parâmetros de síntese, mas também da temperatura de tratamento térmico. Ao estudar outras estruturas, como BaMoO<sub>4</sub>, CaMoO<sub>4</sub> e SrZrO<sub>3</sub>, pesquisadores evidenciaram que as modificações estruturais

induzidas pela temperatura alteram as propriedades fotoluminescentes, podendo incrementar as emissões por recombinações radiativas  $e'-h^\bullet$  entre níveis intermediários originários de defeitos estruturais e superficiais [122,154,155].

A HA possui uma estrutura flexível que sofre significativas transformações durante tratamentos térmicos. Levando em consideração o descrito acima, estes fenômenos têm potencial em alterar as propriedades eletrônicas da HA e, conseqüentemente, suas propriedades fotoluminescentes.

## 5.2 – Objetivo

O presente estudo tem como objetivo sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita por precipitação química e verificar a influência de posteriores tratamentos térmicos nas propriedades estruturais e fotoluminescentes das mesmas.

## 5.3 – Resultados e discussão

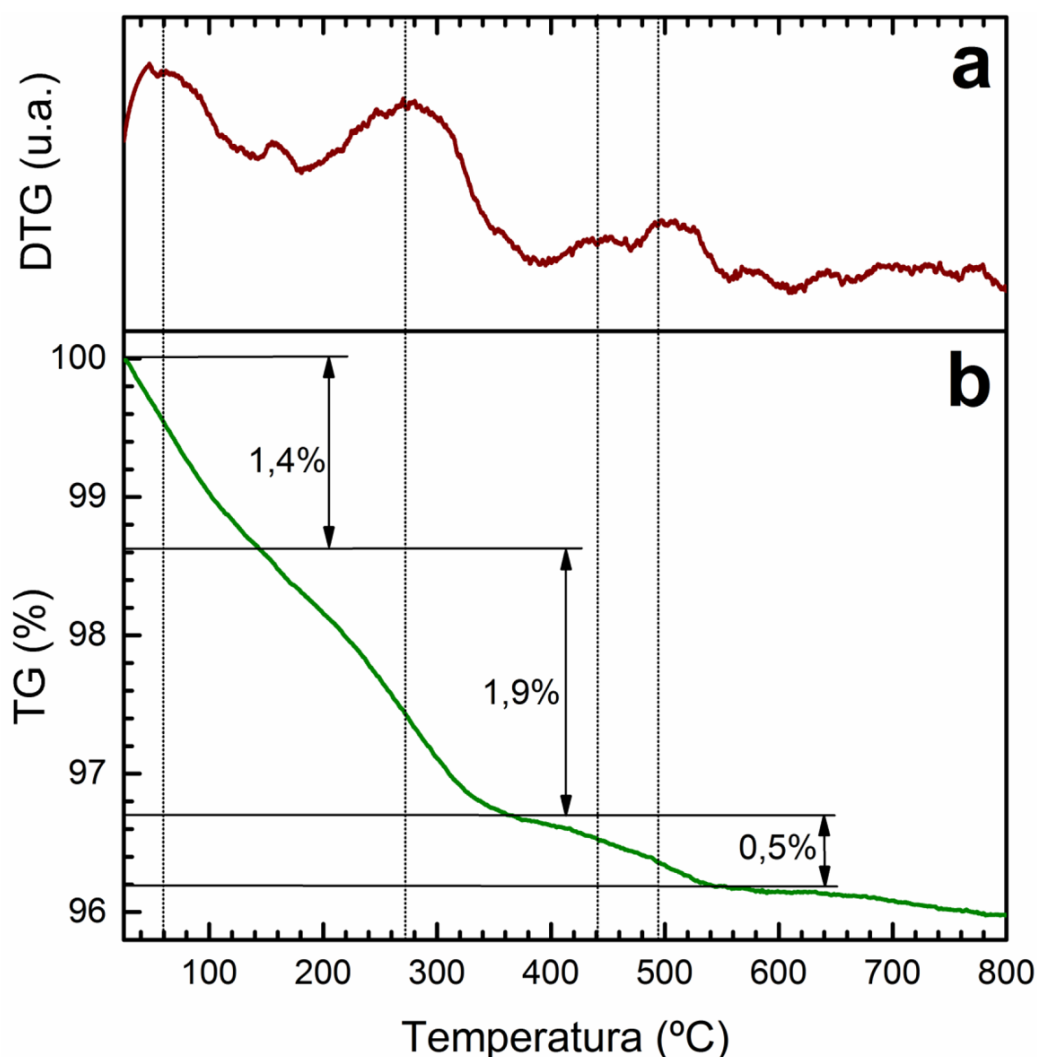
### 5.3.1 – Análise térmica

Para a realização do estudo no presente capítulo, selecionou-se a amostra de HA precipitada quimicamente em condições básicas (HA\_BM) com nanopartículas na forma de bastões, de acordo com o procedimento experimental descrito na seção 3.1.3 do Capítulo 3. Inicialmente, com o objetivo de verificar possíveis variações de massa na amostra em função da temperatura, foi realizada a caracterização da mesma mediante análise termogravimétrica. A Figura 5.1 ilustra o resultado obtido pela análise TG e também pela curva derivada (DTG) na faixa de temperatura de 25 a 800 °C. De maneira geral, pode-se observar uma perda total de 4% em massa, que está dividida em quatro etapas principais:

- a. 1,4% entre 25–150 °C com centro em 60 °C;
- b. 1,9% entre 150–370 °C com centro em 270 °C;
- c. 0,5 % entre 370–560 °C com centro em 440 e 495 °C e;
- d. 0,2% entre 560–800 °C.

Normalmente, as amostras de HA precipitadas possuem de 2 a 5 estágios de perda de massa até 800 °C. A primeira (25–150 °C) e a segunda (150–

370 °C) região estão associadas à perda reversível de água adsorvida ligada de maneira débil à superfície do material, perda irreversível de água cristalização e eliminação de impurezas presas na rede, como  $\text{NH}_4^+$  [13,42,51,218]. As principais variações de massa se concentram nessas duas regiões abaixo de ~370 °C com um valor total de 3,3%. Já a terceira (370–560 °C) e a quarta (560–800 °C) regiões somam um total de 0,7% de perda em massa. Este resultado está associado a eventos que incrementam a perfeição cristalina. Entre eles, está a liberação de água mais fortemente presa à rede e a descarboxilação da estrutura [44,219,220].



**FIGURA 5.1** – Curvas TG/DTG da amostra de HA sintetizada por precipitação química. (a) DTG, e (b) TG.

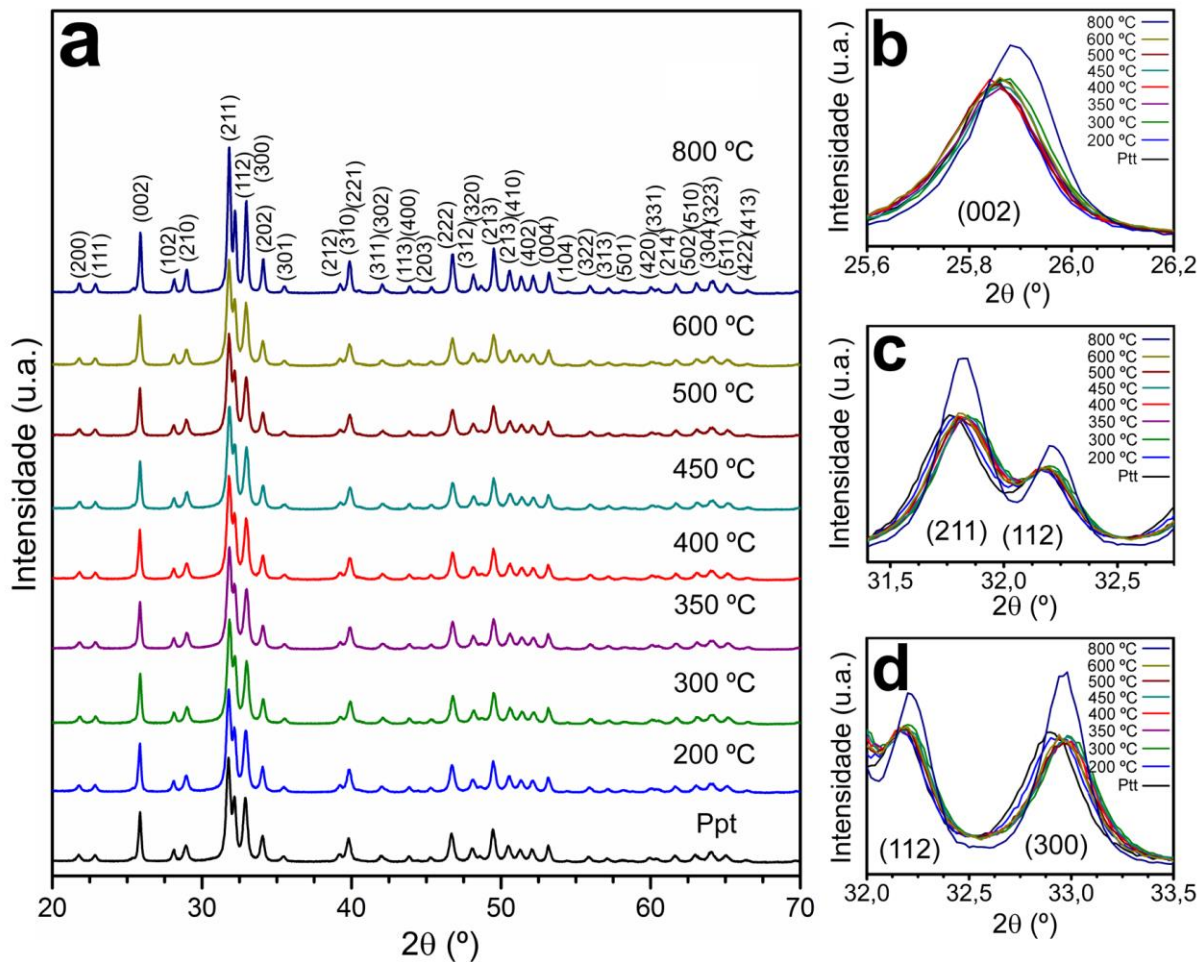
A análise térmica do material indica que existem distintas reações químicas ocorrendo na superfície e na rede da HA que possuem como produto espécies gasosas, cujas respectivas eliminações são alavancadas pela realização de

tratamentos térmicos. A presença de espécies presas na rede e a eliminação das mesmas tem potencial de causar grandes impactos nas propriedades estruturais e físico-química em materiais, como modificações nos parâmetros de rede e volume de cela unitária, ordenamento a curto e longo alcance das espécies na rede, estabilidade térmica da fase cristalina e propriedades eletrônicas [135]. Assim, para verificar a influência da temperatura nas amostras, as mesmas foram estudadas por DRX, refinamento *Rietveld*, FTIR e XPS.

### 5.3.2 – Análise estrutural por DRX e refinamento *Rietveld*

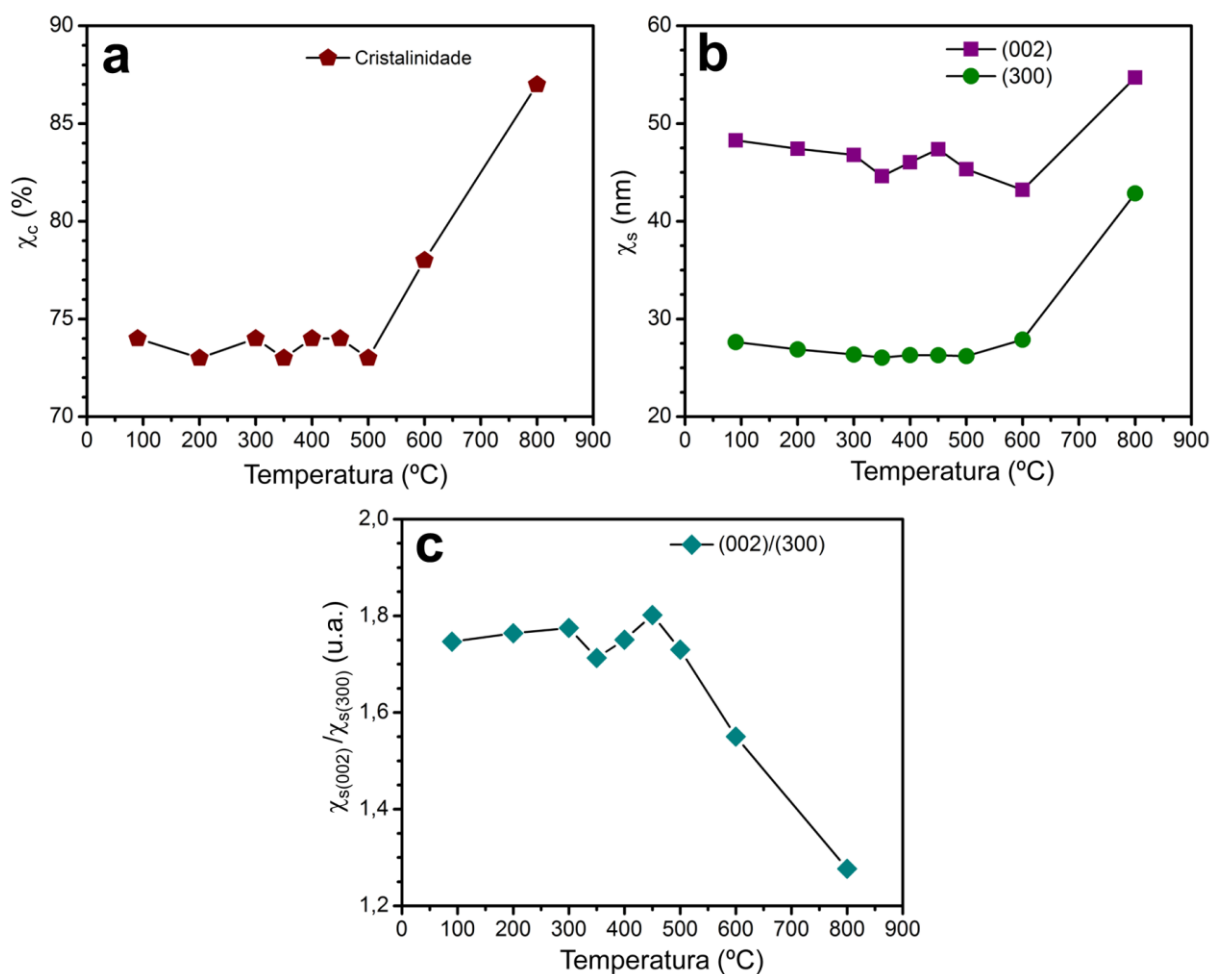
A Figura 5.2a ilustra os padrões de difração obtidos para a amostra de HA precipitada (Ppt) e após a realização dos distintos tratamentos térmicos (faixa de 200 a 800 °C). A metodologia e os parâmetros utilizados para estes tratamentos são descritos na seção 3.1.3 do Capítulo 3. Em todos os casos, os picos de difração foram perfeitamente indexados à fase hexagonal da HA, descrita pelo grupo  $P6_3/m$ , e em perfeita concordância com o padrão reportado na ICSD No. 26204 [36]. Não foram observados picos de fases secundárias mesmo após a realização dos tratamentos térmicos, fato que evidencia a estabilidade térmica do material na faixa de temperatura estudada.

Os padrões observados na Figura 5.2a com picos estreitos e bem definidos remetem a materiais com elevada cristalinidade (ordenamento a longa distância ou periodicidade). Em especial, pode-se destacar que os padrões são similares entre si desde a temperatura de síntese (90 °C) até 500 °C. A partir desta condição de tratamento térmico até 800 °C, os picos se tornam mais definidos, o que indica um aumento no ordenamento das espécies no material. Este fenômeno pode ser melhor observado ao magnificar a região correspondente aos picos primários de difração (002), (211), (112) e (300), assim como ilustram as Figuras 5.2b e 5.2c. Em contrapartida, estas afirmações não excluem a possibilidade da presença de defeitos estruturais e impurezas na rede.



**FIGURA 5.2** – Análise estrutural por DRX. (a) Difratoograma completo medido no intervalo de 20-70° 2 $\theta$ . Magnificações na regiões correspondentes aos planos (b) (002), (c) (211)/(112), e (d) (112)/(300).

A cristalinidade das amostras pode ser melhor avaliada pelo cálculo de fração de fase cristalina  $\chi_c$  pela Equação 11 e de acordo com a metodologia descrita no ponto 3.2.1 do Capítulo 3, em que se considera a intensidade do pico (300) e do vale entre os picos (112) e (300). Esta metodologia é bem aceita na literatura para estimar a cristalinidade de amostras de HA [97,137,221]. A Figura 5.3a ilustra os resultados obtidos. Em todos os casos, foram observados valores de  $\chi_c$  superiores a 73%, refletindo o alto ordenamento a longo alcance das amostras desde a temperatura de síntese. Entretanto, pode-se observar duas faixas de temperaturas com comportamentos distintos e bem definidos. Na primeira região, Ppt–500 °C, os valores de  $\chi_c$  são praticamente constantes. Entretanto, na segunda região, 500–800 °C, tem lugar um expressivo incremento na cristalinidade até atingir o valor de 87%. Ou seja, estes resultados refletem o incremento na ordem a longa distância do material nos tratamentos térmicos a mais elevadas temperaturas.



**FIGURA 5.3** – Representações gráficas ilustrando os valores obtidos para: (a)  $\chi_c$ , (b)  $\chi_s$ , e (c)  $\chi_{s(002)}/\chi_{s(300)}$ .

Os padrões de difração encontrados para a amostra pura e tratada termicamente a distintas temperaturas são similares aos presentes em outros trabalhos [49,222], e remetem a presença de HA nanocristalina. Este fato pode ser avaliado pelo cálculo de tamanho de domínio de coerência cristalográfica ( $\chi_s$ ). Assim, os valores de  $\chi_s$  obtidos pela equação de Scherrer (Equação 10) e seguindo a metodologia descrita na seção 3.2.1 do Capítulo 3 são apresentados na Figura 5.3b. Pode-se observar que os valores de  $\chi_s$  estão entre 43–55 nm e 26–42 nm para os planos (002) e (300), respectivamente, confirmando a presença de amostras nanocristalinas em todos os casos. Assim como no caso do cálculo de  $\chi_c$ , os valores de  $\chi_s$  são praticamente constantes em toda a faixa de Ppt–500  $^{\circ}\text{C}$  e, a partir dessa temperatura, ocorre um significativo aumento nos valores de ambos os planos estudados. Esse comportamento demonstra o crescimento dos domínios de coerência

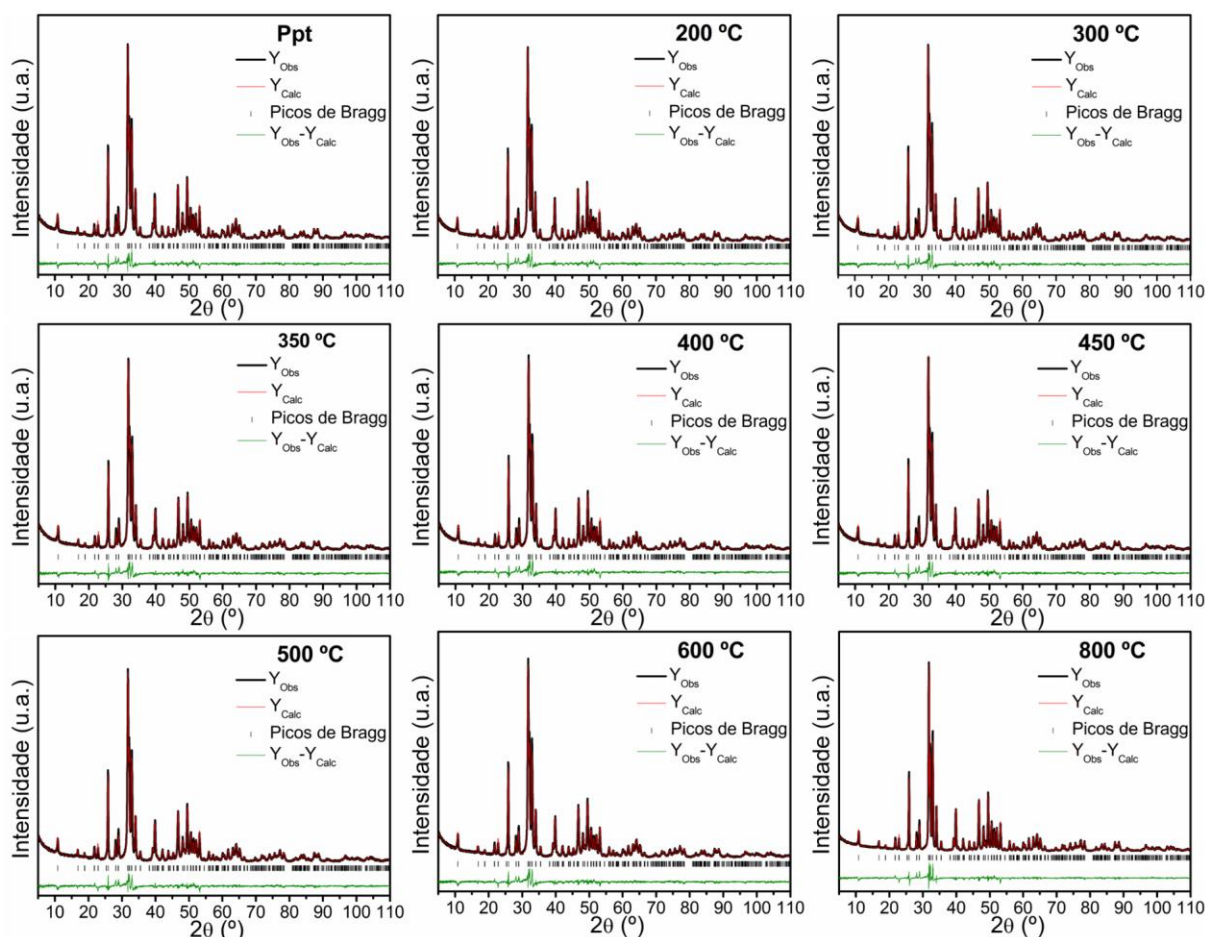


crystalográfica nas direções referentes aos eixos do cristal *a* e *c*, e está relacionado ao aumento do ordenamento a longo alcance do material. Outra informação obtida com base no cálculo de *Scherrer* é a presença de crescimento anisotrópico dos domínios. Este efeito é ilustrado pela Figura 5.3c com o cálculo da razão de aspecto  $\chi_{s(002)}/\chi_{s(300)}$ . Os valores obtidos estão entre 1,7 e 1,8 na região Ppt–500 °C e diminuem significativamente em 500–800 °C até o valor final de 1,3. Ou seja, é possível concluir que nesta última faixa de temperatura os domínios tendem a aumentar e de uma maneira mais acentuada na direção referente ao eixo-*a*. Este fenômeno é resultado do maior aumento de intensidade e definição do pico (300) em relação ao (002) com a efetuação de tratamentos térmicos 600 e 800 °C [136].

A HA pode suportar significativas quantidades de impurezas e vacâncias de distintas naturezas em sua rede cristalina, sem perder o caráter hexagonal da estrutura. A presença das mesmas pode causar expansão ou contração da cela unitária, de acordo com os seus tamanhos em relação à espécie substituída na rede ou à falta dela [3]. Por sua vez, estas alterações na cela unitária refletem em deslocamentos nos picos de difração. Ao analisar detalhadamente os picos nas Figuras 5.2b e 5.2c (principalmente os picos dos planos (211) e (300), mais sensíveis à presença de distorções na rede [35]), podemos observar que os mesmos se encontram deslocados à esquerda na amostra Ppt e tratada a 200 °C. De acordo com a lei de *Bragg*, estes resultados poderiam estar associados à presença de espécies de distintos tamanhos na rede de acordo com a temperatura de tratamento térmico [135]. Entretanto, para uma melhor fiabilidade desta análise, as amostras foram avaliadas teoricamente pelo método de refinamento *Rietveld*.

As estruturas da amostra recém-preparada e das amostras submetidas aos distintos tratamentos térmicos foram determinadas pelo método de refinamento estrutural de *Rietveld* [139]. A Figura 5.4 ilustra a obtenção de gráficos típicos de refinamento da HA. Os mesmos consistem na sobreposição do padrão observado ( $Y_{Obs}$ ) e o padrão calculado ( $Y_{Cal}$ ), assim como os segmentos de linhas verticais mostram as posições dos picos de *Bragg* e a linha contínua logo abaixo ilustra a diferença entre o difratograma observado e o calculado ( $Y_{Obs}-Y_{Cal}$ ). O melhor refinamento foi obtido ao utilizar o modelo estrutural descrito por SUDARSANAN e YOUNG [36] associado ao padrão ICSD No. 26204, cuja fase hexagonal da HA com grupo espacial  $P6_3/m$  é apresentada ao refinar os dados obtidos por difração de nêutrons de monocristais minerais de HA. Este é um padrão bem aceito pela literatura

e utilizado em diversos trabalhos para refinar a estrutura da HA sintética. De uma maneira geral, pode-se observar no presente trabalho que existe uma boa correlação entre os perfis de difração assim como ilustra a linha ( $Y_{Obs}-Y_{Calc}$ ) e as posições dos picos de Bragg. Além disso, não foram observados picos relacionados a fases secundárias, confirmando o discutido anteriormente pela DRX.



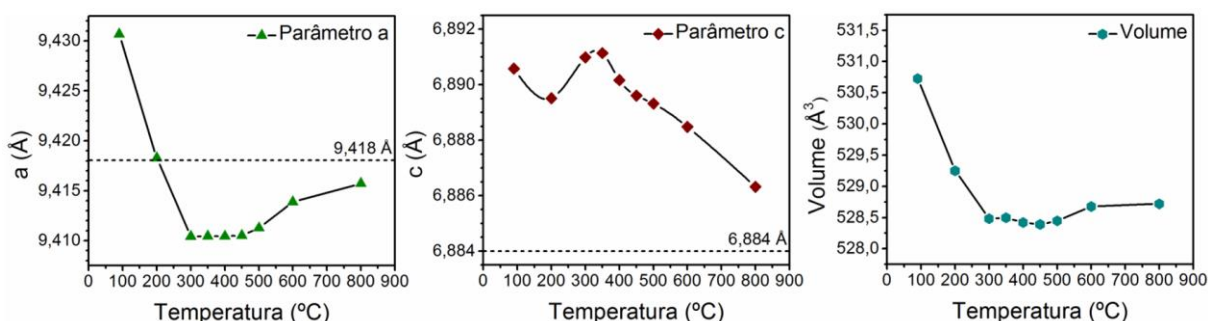
**FIGURA 5.4** – Refinamento *Rietveld* da amostra precipitada (Ppt) e tratada termicamente nas distintas temperaturas estudadas.

Além da visualização gráfica, também é necessário avaliar os parâmetros da qualidade dos refinamentos para garantir a boa qualidade das análises de *Rietveld*. A Tabela 5.1 lista os valores de  $R_p$ ,  $R_{wp}$ ,  $\chi^2$  e  $R_{Bragg}$  obtidos para todas as amostras. Pode-se observar que os valores dos mesmos se encontram dentro do aceitável para um bom refinamento, o que dá credibilidade aos dados obtidos por esta análise.

**TABELA 5.1** – Indicadores da qualidade dos refinamentos de *Rietveld*.

Amostra	$R_{Bragg}$ (%)	$R_{wp}$ (%)	$R_p$ (%)	$\chi^2$
<b>Ppt</b>	4,86	7,89	6,03	1,67
<b>200 °C</b>	4,87	8,14	6,16	1,67
<b>300 °C</b>	4,86	8,31	6,25	1,71
<b>350 °C</b>	4,90	8,50	6,47	1,74
<b>400 °C</b>	4,88	8,45	6,44	1,74
<b>450 °C</b>	4,89	8,49	6,48	1,74
<b>500 °C</b>	4,87	8,30	6,34	1,71
<b>600 °C</b>	4,89	8,43	6,49	1,73
<b>800 °C</b>	4,92	9,22	6,93	1,88

Os valores dos parâmetros de rede e de volume da cela unitária para todas as amostras obtidos pelo refinamento *Rietveld* são ilustrados na Figura 5.5. Pode-se observar significantes variações nestes valores, em outras palavras, a rede cristalina da HA passa por processos de expansão e contração de acordo com a amostra analisada. As informações a respeito deste comportamento foram extensivamente debatidas por outros pesquisadores [13,42,218,223]. Entretanto, não existe um consenso para este comportamento. Após os tratamentos térmicos, distintos eventos e reações na rede cristalina da HA podem ocorrer e alterar o ordenamento a longo alcance e parâmetros de rede. Apesar do parâmetro de rede *c* apresentar apenas ligeiras variações com o aquecimento, o mesmo não é válido para o parâmetro *a* e o volume, os quais variam significativamente. Assim, a discussão a seguir é principalmente focada no parâmetro rede *a*, mais sensível à presença de impurezas e substituições iônicas [224].



**FIGURA 5.5** – Parâmetros de rede e volume de cela unitária obtidos pelo refinamento *Rietveld* das amostras. (a) Parâmetro *a*, (b) parâmetro *c*, e (c) volume de cela unitária.

Primeiramente, os parâmetros *a* e *c* da amostra Ppt possuem valores superiores (+0,013 Å (~0,14%) em *a* e +0,007 Å (~0,11%) em *c*) aos referentes à HA pura e estequiométrica (*a* = 9,418 Å e *c* = 6,884 Å [35]). A razão desta diferença está diretamente associada à presença de quantidades minoritárias de impurezas presas na rede da HA e que possuem raios iônicos superiores aos do Ca, PO<sub>4</sub> ou OH. Pode-se supor distintas substituições iônicas em quaisquer dessas posições, devido à flexibilidade estrutural da HA. Espécies de metais pesados e alcalinos são conhecidas por causar uma expansão da cela ao serem incorporadas na rede [40]. Entretanto, as mesmas não foram utilizadas em nenhuma das etapas de preparação das amostras e não estão presentes nas composições dos precursores iniciais. Além disso, com os tratamentos térmicos, pode-se observar uma abrupta contração do parâmetro *a* (região Ppt–300 °C) a valores inferiores aos referentes a HA pura [35] (300 °C com diminuição total de -0,020 Å (~0,21%)). Neste sentido, os tratamentos térmicos mostraram que as impurezas na rede são liberadas com elevada facilidade. Assim, outra explicação para esta expansão na amostra Ppt se torna mais factível.

Dentre os métodos de síntese para a HA, os que envolvem a presença de meios aquosos levam à obtenção de amostras complexas do ponto de vista composicional. Nestas condições, diversas espécies iônicas na solução e moléculas inteiras podem ser estabilizadas dentro da rede cristalina da HA sendo seguidamente liberadas por tratamentos térmicos. A Tabela 5.2 lista as espécies comumente identificadas em síntese por precipitação da HA, em condições similares às utilizadas nesse trabalho, e as temperaturas onde reações envolvendo as mesmas ocorrem.

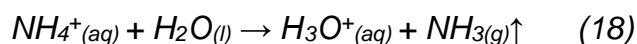
**TABELA 5.2** – Espécies presentes em amostras de HA obtidas por precipitação aquosa.

<b>Espécie</b>	<b>Posição</b>	<b>Temperatura aproximada de reatividade na rede</b>	<b>Ref.</b>
H <sub>2</sub> O	OH	200–400 °C	[218]
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub>	350–720 °C	[220,224]
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ca	<500 °C	[44,225]
H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	Ca	<300 °C	[13,226]
A-CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	OH	450–600 °C	[42]
B-CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	PO <sub>4</sub>	750–950 °C	[42]

Ao observar a Tabela 5.2, vemos que atribuir de maneira individual o fator determinante para o comportamento observado no parâmetro *a* em Ppt–300 °C (expansão e contração da rede, respectivamente) é uma tarefa complicada. O

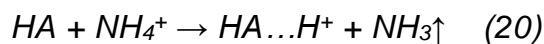
intervalo com as maiores alterações estruturais coincide com a região de maior perda de massa segundo a análise TG (Figura 5.1). Assim, o fenômeno observado está associado com a liberação das espécies presas na estrutura. Dentre elas, pode-se destacar as moléculas de água substituindo grupos hidroxilas e também presas em falhas e poros que causam um aumento no parâmetro  $a$ . A eliminação das moléculas de água ocorre entre 200–400 °C, deixando sítios vacantes. Esta eliminação consiste em uma das principais causas da abrupta redução no parâmetro de rede  $a$  nas amostras tratadas termicamente nesta faixa de temperatura. Além disso, explica também a contração da rede evidenciada, ao levar em consideração os valores dos parâmetros de rede relatados para a HA pura e estequiométrica [45,218].

Em condições básicas com a utilização de NH<sub>4</sub>OH, entretanto, como é o caso da reação utilizada neste trabalho, os íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> podem incorporar na estrutura e serem estabilizados nas posições referentes ao Ca [13,225]. Devido a significativa diferença de tamanho entre os mesmos (raio iônico NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 1,43 Å e Ca 0,99 Å), os íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> são pouco aceitos pela rede, porém o suficiente para causar alterações no espaçamento interplanar com conseqüente expansão da rede. Além disso, as condições são as ideais para que ocorra a reação de hidrólise dos íons NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no transcurso da reação, assim como representa a seguinte equação [13]:



Os íons hidrônios formados nesta reação podem ser neutralizados por grupos OH<sup>-</sup> mas também incorporar na estrutura substituindo espécies de Ca, pois existe certa proximidade entre os raios iônicos destas espécies (1,09 e 0,99 Å para o H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> e Ca, respectivamente) [13,226]. A presença do mesmo é referida como um tipo de “água estrutural”. Assim, a presença de H<sub>2</sub>O (incluindo na forma de H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>) e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> são possíveis causadores da expansão da rede na amostra Ppt, bem como a eliminação dos mesmos são responsáveis pela contração da rede associada aos tratamentos térmicos até 300 °C [42]. De fato, uma vantagem em se utilizar síntese com NH<sub>4</sub>OH ao invés de KOH ou NaOH, por exemplo, é que além dos grupos NH<sub>4</sub><sup>+</sup> terem um limite de incorporação muito baixo eles podem ser removidos facilmente por decomposição em produtos gasosos a baixas temperaturas [13]. Ao utilizar os outros tipos de bases, no entanto, leva a um material cossubstituído pelos contraíons.

A liberação da chamada “água estrutural” no intervalo Ppt–300 °C pela decomposição do  $H_3O^+$  e de impurezas  $NH_4^+$  ocorre de acordo com as seguintes reações [35]:



Como resultado destas reações, espécies  $HA...H^+$  permanecem na rede substituindo o Ca mantendo a eletroneutralidade da estrutura e contribuindo com a abrupta contração na rede. Além disso, a concentração desta espécie aumenta de maneira gradual até 300 °C, assim como se pode observar pela redução no valor do parâmetro de rede a nesta faixa de temperatura.

A estabilização de água e  $NH_4^+$  na HA é favorecida como efeito da preservação da eletroneutralidade estrutural necessária devido a incorporação de outros grupos, tais como os carbonatos. Os mesmos são impurezas comuns tanto em amostras de HA sintéticas como nas biológicas em sistemas fisiológicos [2]. Eles podem ser incorporados em métodos que fazem uso de baixa temperatura de síntese em meio aquoso, mas também em metodologias a altas temperaturas envolvendo tratamentos térmicos. No primeiro caso, os carbonatos provêm da solubilização de  $CO_2$  atmosférico. Sabe-se que baixas concentrações dos mesmos já são suficientes para alterar as propriedades físico-químicas do material, como solubilidade, diminuição de ordenamento a longo alcance a inibição da cristalização das partículas [50]. Estes fatores ocorrem principalmente devido aos complexos mecanismos de estabilização dos carbonatos na estrutura, os quais ainda são o centro de discussões e pesquisas. De acordo com a literatura [13], existem dois tipos de carbonatos estruturais. O primeiro deles, chamado de tipo-A, ocupa a posição de uma hidroxila na estrutura (dentro dos canais hexagonais) e, por efeito de balanço de carga, gera também uma vacância de OH. Já o carbonato do tipo-B ocupa os sítios dos tetraedros de fosfato e é estabilizado pela formação de vacâncias de cálcio ou também nas hidroxilas. Entretanto, espécies catiônicas monovalentes oriundas dos precursores utilizados podem incorporar para balancear a estrutura, como  $Na^+$  e  $K^+$  no sítio do Ca [13]. Em amostras com substituição tipo-B demonstrou-se a presença de  $NH_4^+$  e  $H_2O$  estrutural como forma de estabilizar estas espécies [44]. Ademais, em condições e

precursores similares aos deste trabalho, verificou-se a substituição do tipo-AB, onde o  $\text{CO}_3^{2-}$  substitui ambos grupos  $\text{PO}_4$  e  $\text{OH}$ , e com a presença de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  [42].

O comportamento do parâmetro  $a$  em função da temperatura pode ser dividida em outras duas etapas: de 300 a 500 °C em que poucas alterações são observadas e de 500 a 800 °C onde os valores tendem a convergir ao referente a HA estequiométrica. Este aumento está relacionado ao incremento na perfeição da rede cristalina (aumento na ordem a longa distância). Por sua vez, a perfeição da matriz é associada a fatores como: estabilização das espécies Ca e  $\text{PO}_4$  em suas posições de equilíbrio, a decomposição dos grupos carbonatos tipo-A e parcialmente tipo-B, além da maior densidade de OH na estrutura. Nessa faixa de temperatura, reações envolvendo os grupos  $\text{HPO}_4$  também ocorrem. Todas essas transformações podem ocorrer com ou sem a participação de mais de uma impureza na rede. Abaixo na Tabela 5.3, seguem algumas das equações aceitas para essas transformações:

**TABELA 5.3 – Principais reações na rede da HA em função da temperatura.**

Equação	Temperatura	Ref.
$\text{CO}_3^{2-} + 2\text{HPO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_2 \uparrow + \text{H}_2\text{O} \uparrow$ (21)	<400 °C	[227]
$\text{CO}_3^{2-} + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{OH} + \text{CO}_2 \uparrow$ (22)	450–600 °C	[42]
$\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CO}_2 \uparrow + \text{O}^{2-}$ (23)	450–600 °C	[42,228]
$\text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{OH} + \text{CO}_2 \uparrow$ (24)	450–600 °C	[42,228]
$2\text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{H}_2\text{O}$ (25)	350–720 °C	[220,229]
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-} + 2\text{OH} \rightarrow 2\text{PO}_4^{3-} + \text{H}_2\text{O} \uparrow$ (26)	>650 °C	[230]
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow 2\text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_2 \uparrow$ (27)	750–950 °C	[42,228]
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-} + \text{O}^{2-} \rightarrow 2\text{PO}_4^{3-}$ (28)	>750 °C	[42,231]

Assim, com o aumento da temperatura (principalmente a partir de 500 °C) um gradual aumento de ordem estrutural é alcançado, uma vez que as impurezas são decompostas e as vacâncias suprimidas. Especificamente, o aumento na densidade de OH na estrutura pode ocorrer de acordo com as Equações 22 e 24, e também devido ao processo de hidroxilação pela hidrólise da água adsorvida na superfície proveniente da atmosfera [231]. Vacâncias em OH podem existir em cristais precipitados de HA devido aos carbonatos e também devido as condições de síntese. PASTERIS *et al.* [46] demonstraram que a HA sintetizada por precipitação e a biológica apresentam vacâncias em OH por desordem estrutural, e propuseram uma relação entre concentração de OH e o grau de ordem-desordem. Assim, quando o sistema tende a estar mais ordenado os canais hexagonais possuem maior densidade

de OH. Esse resultado corrobora com o observado no DRX e no refinamento. Entretanto, a comprovação desse resultado pode ser melhor avaliada por espectroscopia vibracional.

Em resumo, os tratamentos térmicos normalmente dão a energia necessária para que as espécies constituintes de uma fase cristalina se organizem da maneira termodinamicamente mais estável e também para a eliminação de espécies presas na rede. Isso aumenta a perfeição do cristal. Além disso, com a temperatura, partes amorfas presentes nas amostras são cristalizadas, acarretando em uma maior ordem estrutural [135]. Para a HA, a energia térmica inicialmente decompõe e elimina impurezas que estão mais fracamente ligadas à rede e, ao ocorrer esse evento, uma abrupta contração na rede é observada (Ppt–300 °C). Esse fato causa um aumento na desordem estrutural, pois os produtos das reações são vacâncias (por exemplo de OH) e espécies com raios iônicos inferiores às que constituem o cristal puro (HA...H<sup>+</sup>) que distorcem a rede cristalina. Este estado permanece até aproximadamente 500 °C. A partir dessa temperatura (500–800°C), as impurezas mais fortemente presas à rede são eliminadas, porém nesse caso refletindo em um aumento na ordem estrutural, pois temos como produto de reação espécies [PO<sub>4</sub>] e OH, que constituem a rede cristalina. Isso faz com que ocorra a supressão de vacâncias iônicas no material. Além disso, temos a estabilização das espécies na rede em suas posições de equilíbrio, eliminando vacâncias por distorção na rede previamente existentes como condição do procedimento experimental, e como efeito das impurezas que podem influenciar nas densidades eletrônicas de átomos vizinhos [197].

### 5.3.3 – Espectroscopia FTIR

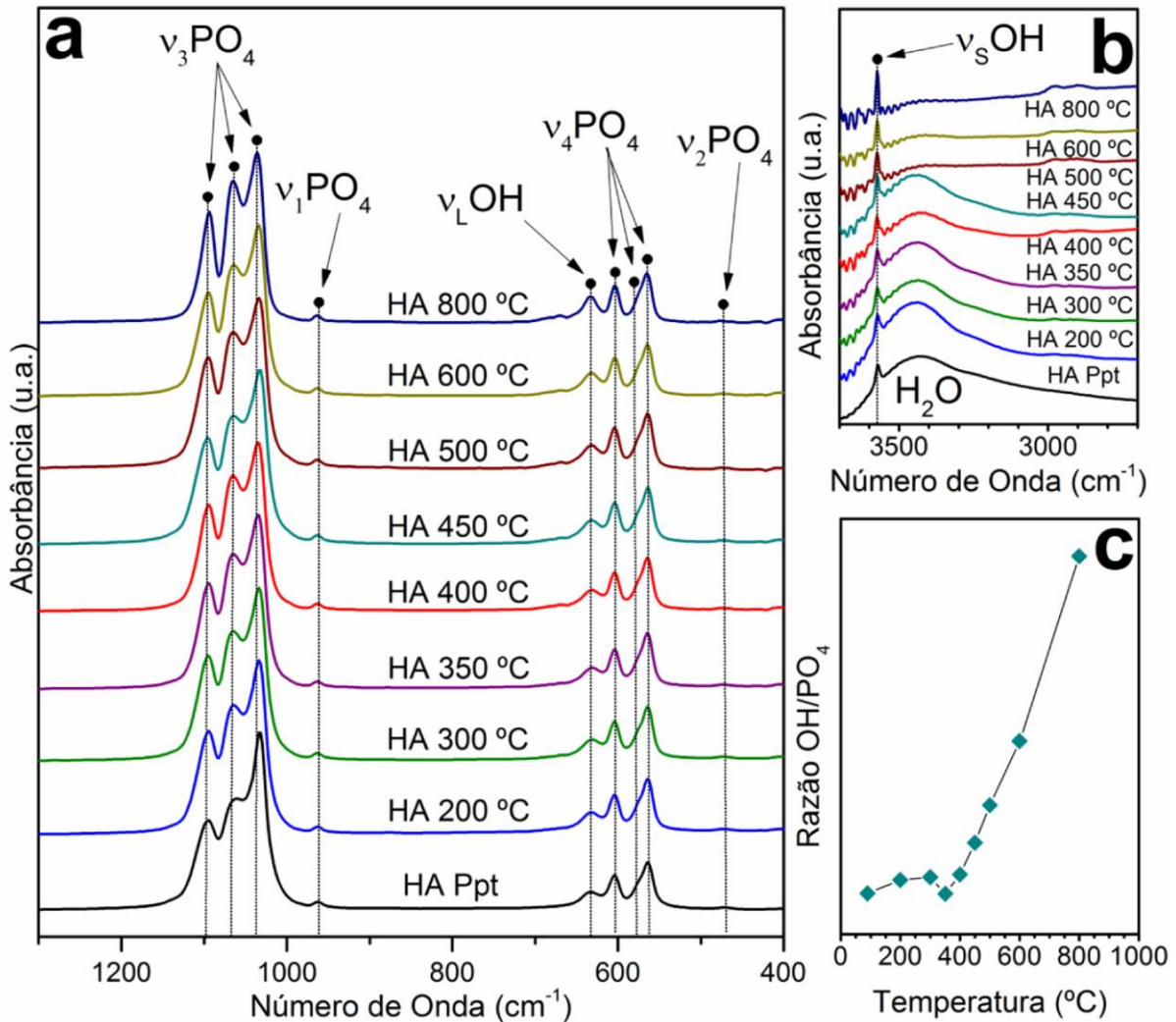
As técnicas de espectroscopia vibracional são cruciais na hora de caracterizar materiais, pois podem dar informações sobre composição química, fases cristalinas presentes e ordenamento estrutural a curto alcance. Em especial, a espectroscopia FTIR auxilia na identificação dos distintos ortofosfatos de cálcio e a incorporação de impurezas na rede [3]. As Figuras 5.6a e 5.6b ilustram os espectros obtidos para a amostra recém-preparada e tratada termicamente nas distintas temperaturas. Pode-se observar que os modos presentes nas amostras correspondem aos tipicamente encontrados na HA com diminuta variação em suas posições, incluindo as bandas relacionadas a vibrações do cluster [PO<sub>4</sub>] em 471 cm<sup>-1</sup>



( $\nu_2$ ), 563, 575 e 604  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ), 963  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ), 1033, 1063 e 1096  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ), bem como as bandas em 633 e 3568  $\text{cm}^{-1}$  associadas aos modos libracionais ( $\nu_L$ ) e de estiramento ( $\nu_S$ ) dos grupos OH, respectivamente [165]. Bandas referentes as outras possíveis fases de ortofosfatos não foram observadas em nenhum caso, confirmando a estabilidade estrutural do material na faixa de temperatura estudada. A banda ampla entre 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$  está associada a presença de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida [51].

Além da identificação das fases, os modos observados dos clusters  $[\text{PO}_4]$  nos dão informações quanto ao ordenamento das espécies na rede. Os mesmos são estreitos e bem definidos, e estão relacionados a amostras de HA com elevado grau de ordenamento a curta distância [232]. Essas bandas (especialmente as relacionadas aos modos  $\nu_3\text{PO}_4$ ) apresentam gradual evolução com a temperatura, tornando-se mais definidos. Os mesmos são singularmente definidos nas temperaturas de 600 e 800 °C, o que reflete o maior ordenamento a curto alcance entre todas as amostras analisadas.

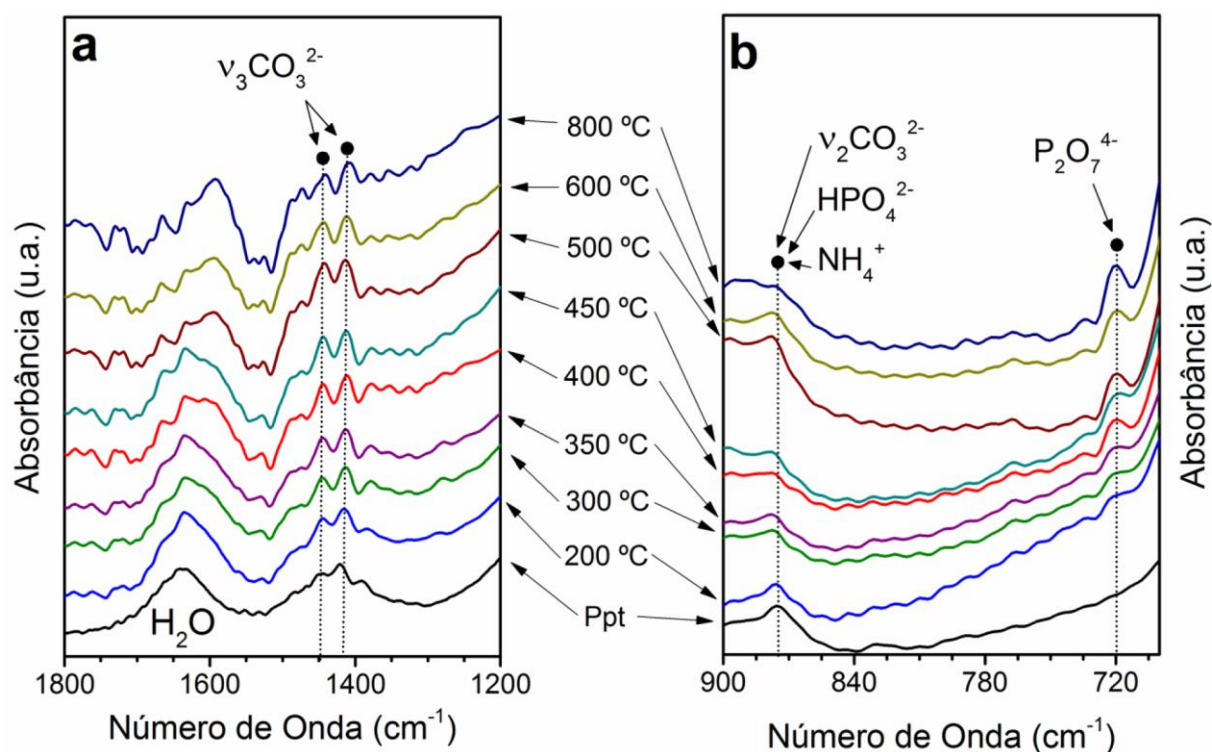
Por outro lado, pode-se observar na Figura 5.6b que a banda relacionada ao modo vibracional de estiramento da OH ( $\nu_S$ ) também aumenta de intensidade conforme há um incremento na temperatura do tratamento térmico. Essa é uma evidência do aumento na densidade de grupos OH na amostra [46,233]. Além disso, a banda de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida diminui expressivamente em 500–800 °C, evento que poderia estar associado a hidrólise das moléculas adsorvidas e incorporação de OH na estrutura. Para melhor avaliar o aumento na concentração de OH, pode-se estimar a quantidade relativa de OH na estrutura pelo cálculo da razão do modo libracional do OH ( $\nu_L$ ) em 633  $\text{cm}^{-1}$  e o modo  $\nu_4$  do  $[\text{PO}_4]$  em 604  $\text{cm}^{-1}$  [234]. A Figura 5.6c ilustra o resultado obtido. Nesse gráfico, maiores valores da razão OH/ $\text{PO}_4$  correspondem a maiores concentrações de grupos OH na estrutura. Pode-se observar que entre a amostra recém-preparada até 400 °C os valores são praticamente constantes. Entretanto, de 450 °C a 800 °C ocorre um gradual aumento na concentração de OH, evidenciando a maior ordem estrutural do material e consequente eliminação de vacâncias em OH.



**FIGURA 5.6** – Caracterização estrutural das amostras de HA por espectroscopia FTIR. (a) Região com os principais modos entre 1300–400  $\text{cm}^{-1}$ , (b) magnificação entre 3700–2700  $\text{cm}^{-1}$ , e (c) razão de intensidades OH/PO<sub>4</sub>.

Outras bandas de baixa intensidade podem ser observadas nos espectros obtidos para as amostras de HA. Apesar da dificuldade de suas atribuições por conta do ruído de fundo, pode-se diferenciar os modos referentes aos grupos CO<sub>3</sub> estruturais, assim como ilustra a Figura 5.7. De acordo com a literatura [51], as bandas observadas em 1418 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  estão associados aos modos  $\nu_3$  dos grupos CO<sub>3</sub> substituindo OH (tipo-A) e PO<sub>4</sub> (tipo-B), respectivamente, confirmando a presença da substituição tipo-AB. Já o modo  $\nu_2$  do CO<sub>3</sub> é observado em aproximadamente 875  $\text{cm}^{-1}$  e está relacionado a substituição tipo-AB [33,51]. As bandas nessa região também podem estar associadas a presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> [111,173]. Entretanto, outras informações como a liberação destes grupos em função de suas intensidades se torna impraticável devido à baixa concentração dos mesmos e consequente pouca

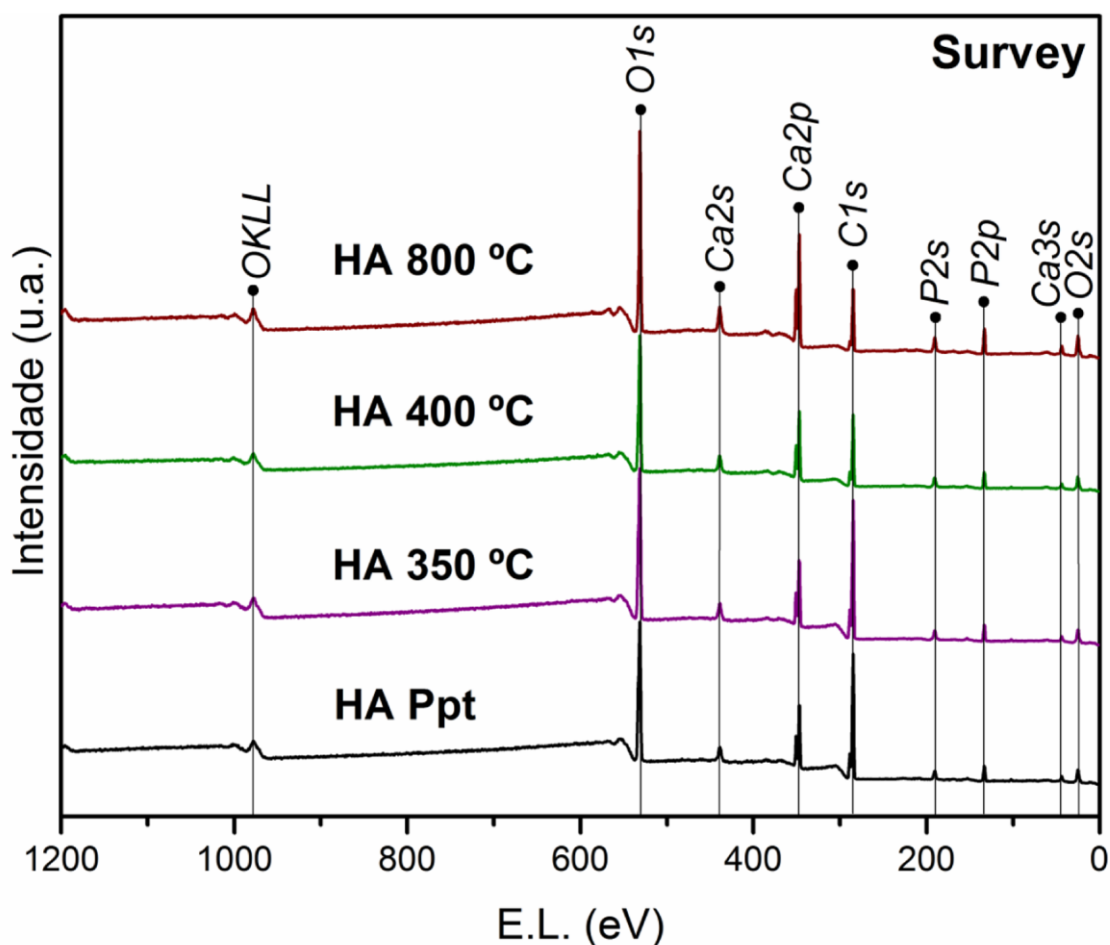
resolução e intensidade obtidos para esses modos. Por último, pode-se observar a presença da banda referentes ao grupo  $P_2O_7^{4-}$  em aproximadamente  $720\text{ cm}^{-1}$ , principalmente a partir de  $350\text{ °C}$  que surge como produto da Equação 25 [220]. Assim, pelo FTIR foi possível também obter evidências da presença de  $CO_3^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $NH_4^+$  e  $P_2O_7^{4-}$  dependendo da temperatura analisada.



**FIGURA 5.7** – Espectros de FTIR ilustrando a presença de bandas de espécies presas na rede cristalina da HA. (a) região entre  $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ , e (b) entre  $900\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ .

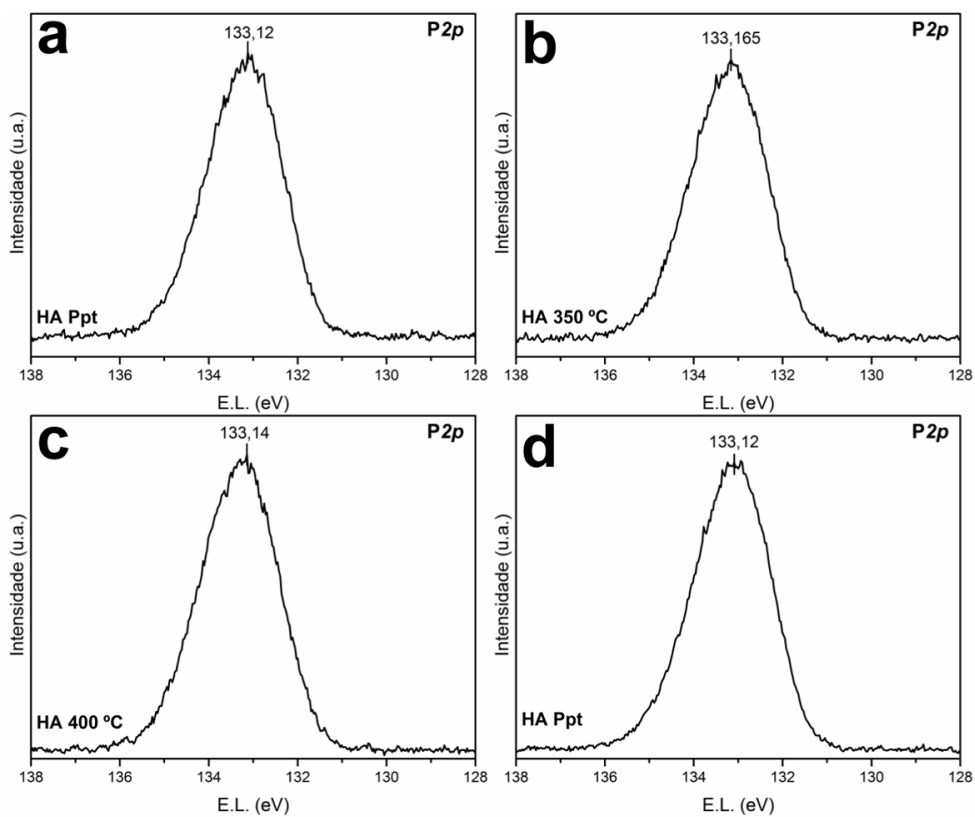
#### 5.3.4 – Análise estrutural e superficial por XPS

A técnica de XPS é uma poderosa ferramenta para caracterizar qualitativamente a composição da superfície em materiais bem como o estado de oxidação das espécies presentes. A Figura 5.8 ilustra os espectros obtidos pela varredura ampla (*survey*) de 0 a  $1200\text{ eV}$  para identificação dos principais elementos presentes nas amostras Ppt,  $350\text{ °C}$ ,  $400\text{ °C}$  e  $800\text{ °C}$ . A análise dos espectros apresentados na Figura 5.8 são similares aos tipicamente reportados para a HA [7,235]. Observa-se a presença dos elementos que compõem as amostras P ( $2s$  e  $2p$ ), Ca ( $2s$ ,  $2p$ ,  $3s$ ) e O ( $KLL$ ,  $1s$  e  $2s$ ), além do pico de carbono ( $1s$ ).

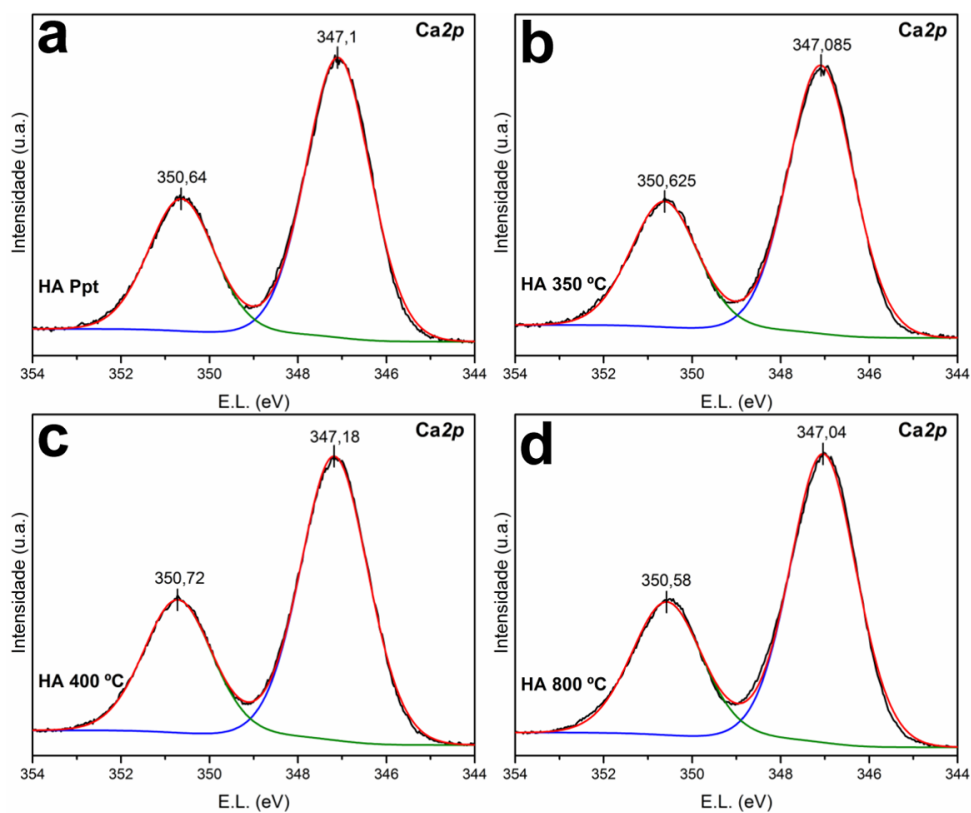


**FIGURA 5.8** – Espectros de XPS das amostras de HA precipitada quimicamente e tratada em diferentes temperaturas.

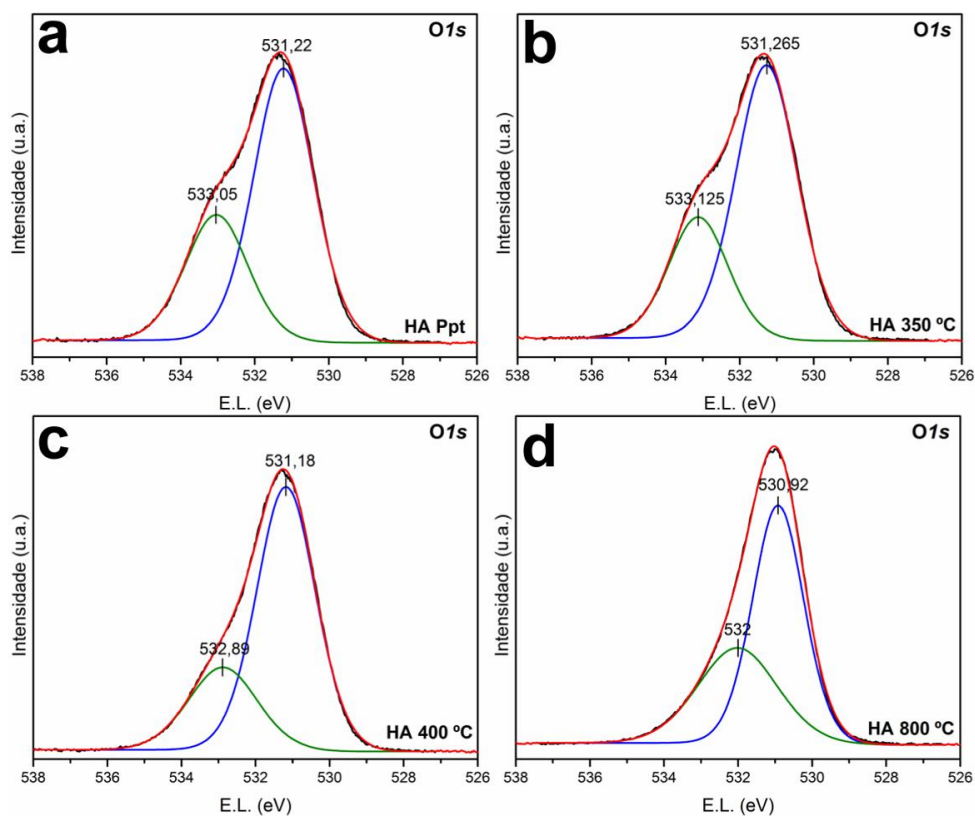
Os espectros de alta resolução nas regiões dos elementos principais  $P2p$ ,  $Ca2p$ ,  $O1s$  e  $C1s$  são apresentados nas Figuras 5.9, 5.10, 5.11 e 5.12, respectivamente. Segundo CHUSUEI *et al.* [236] e LU *et al.* [237], ao analisar os valores de energia dos níveis internos dos elementos constituintes das fases de ortofosfatos de cálcio por XPS em alta resolução, é possível fazer a diferenciação entre as mesmas. Com a finalidade de se determinar com maior precisão os valores de energia de ligação correspondente a cada um dos elementos identificados, os mesmos foram obtidos através do processo de ajuste utilizando uma função 70% Gaussiana e 30% Lorentziana com a linha de base sendo do tipo *Shirley*. Os valores de energia determinados através do processo de deconvolução dos picos, comparados com valores presentes na literatura, são apresentados na Tabela 5.4. Pode-se observar boa convergência entre estes valores, confirmando que a HA é a única fase presente em todas as amostras, assim como também observado através da análise dos dados de DRX, *Rietveld* e FTIR.



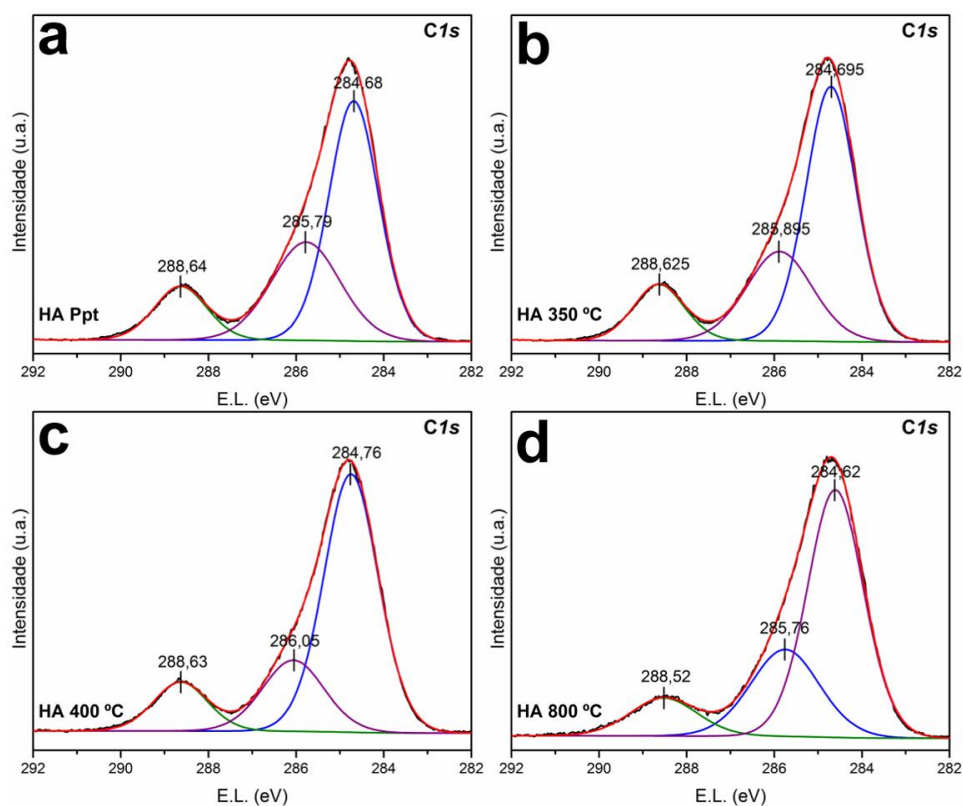
**FIGURA 5.9** – Espectros XPS de alta-resolução do *P2p*. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C.



**FIGURA 5.10** – Espectros XPS de alta-resolução do *Ca2p*. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C.



**FIGURA 5.11** – Espectros XPS de alta-resolução do O1s. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C.



**FIGURA 5.12** – Espectros XPS de alta-resolução do C1s. (a) Ppt, (b) 350 °C, (c) 400 °C, e (d) 800 °C.

**TABELA 5.4** – Energias de ligação obtidas através da deconvolução dos espectros XPS em alta resolução das amostras do presente estudo comparado com dados da fase HA presentes na literatura.

Ref.	<i>P2p</i>	<i>Ca2p</i>	<i>O1s</i>	<i>C1s</i>
<b>Ppt</b>	133,1	350,6 – 347,1	533,0 – 531,2	288,6 – 285,8 – 284,7
<b>350 °C</b>	133,2	350,6 – 347,1	533,1 – 531,3	288,6 – 285,9 – 284,7
<b>400 °C</b>	133,1	350,7 – 347,2	532,9 – 531,2	288,6 – 286,0 – 284,8
<b>800 °C</b>	133,1	350,6 – 347,0	532,0 – 530,9	288,5 – 285,8 – 284,6
[235]	133,0	350,4 – 347,5	533,7 – 531,5	– – 284,6
[236]	133,1	350,7 – 347,2	– 531,1	– –
[238]	133,6	– 347,6	533,6 – 531,6	289,3 – 286,6 – 285,0
[239]	133,6	351,1 – 347,5	534,0 – 532,1	288,8 – 285,6 – 284,5

Na maioria dos casos, poucas variações nos valores da energia são observadas, com exceção às energias referentes ao oxigênio. Assim, os picos simétricos presentes nas Figuras 5.9a–d estão associados à energia de ligação do *P*  $2p_{3/2}$  (133,1–133,2 eV) no cluster  $[PO_4]$  presente na HA. Nas Figuras 5.10a–d é possível observar duas componentes para o Ca, sendo estas referidas aos acoplamentos spin-órbita  $2p_{1/2}$  (350,6–350,7 eV) e  $2p_{3/2}$  (347,1–347,2 eV) do  $Ca^{2+}$  divalente.

No caso da região referente ao O (Figuras 5.11a–d), pode-se observar claramente que o pico possui um perfil assimétrico e é descrito por duas componentes. A origem destes picos foi previamente discutida na literatura e distintas atribuições foram publicadas para os mesmos. De uma maneira geral, o pico em 530,96–531,26 eV é atribuído ao oxigênio aniônico nos grupos OH e  $[PO_4]$ . Já o pico centrado em 532,00–533,12 eV a ligação O–C nos carbonatos estruturais  $[CO_3]$  e a água adsorvida [29,235,238,240]. O aumento e diminuição nas intensidades desses picos podem estar associados, respectivamente, à incorporação de grupos OH na estrutura e à menor quantidade de água adsorvida na amostra pela reação de hidrólise da mesma confirmando, assim, o observado nos dados de DRX e FTIR.

Os espectros de alta resolução para o *C1s* (Figura 5.12a e 5.12b) podem estar relacionados a distintas espécies de carbono presentes na amostra. Normalmente, a energia de ligação de 288,5–288,6 eV está associada à presença de carbonato, 285,8–286,0 eV a átomos de carbono- $\alpha$  e 284,6–284,8 eV a átomos de carbono alifático [239]. A explicação para a presença dessas espécies pode estar

associada aos grupos carbonatos estruturais, a CO<sub>2</sub> adsorvido e também à própria fita de carbono utilizada no procedimento experimental.

### 5.3.5 – Análise morfológica e estrutural por MEV e MET

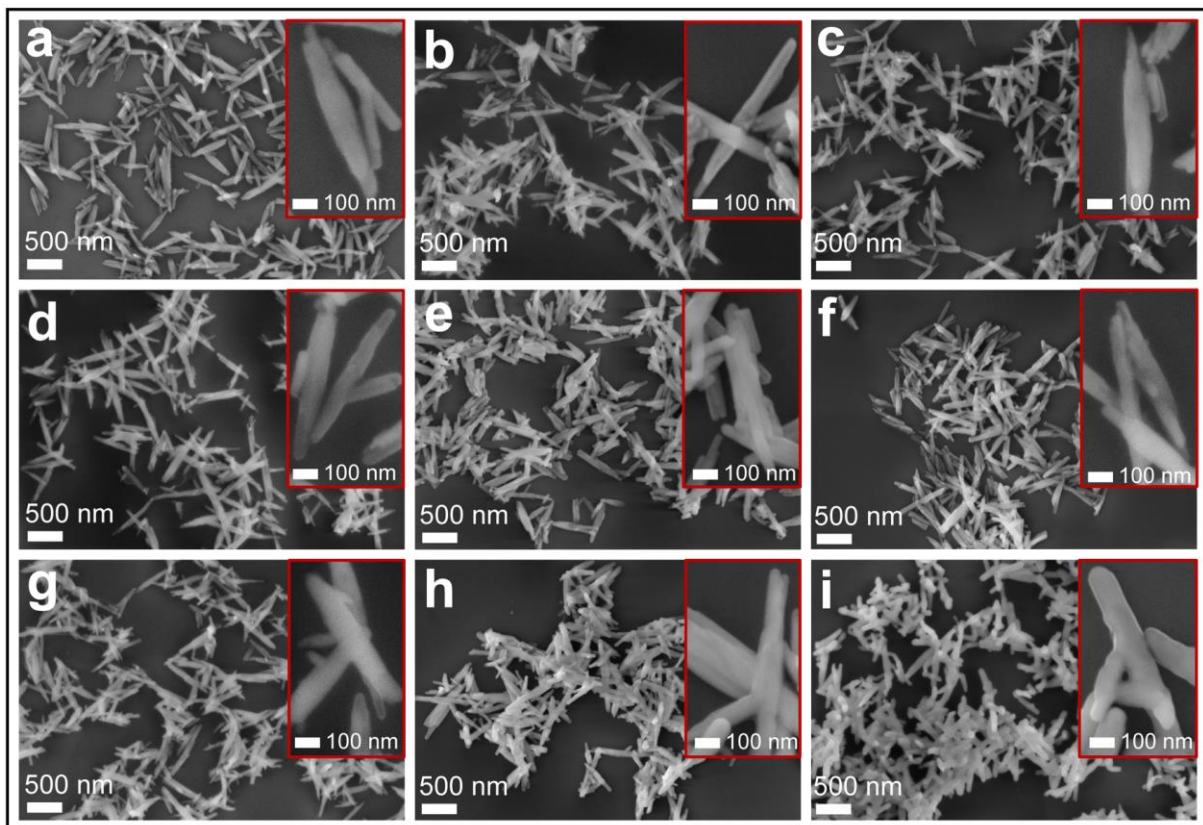
A análise por microscopia eletrônica é útil para o estudo morfológico das partículas, indicando a forma, tamanho e aglomeração das mesmas, bem como o efeito das variáveis utilizadas em um determinado estudo, como por exemplo a temperatura de tratamentos térmicos. A análise por DRX revelou a presença de picos bem definidos e pelo cálculo  $\chi_s$  o crescimento anisotrópico dos domínios no eixo-c. Em amostras de HA, estas características extraídas dos padrões de difração servem como uma forma inicial de identificar as distintas formas (esfera, arroz, bastão, fibra, etc.) e orientações cristalográficas preferenciais das partículas [3], já que possuem perfis e valores específicos para cada tipo. Assim, as características observadas na amostra Ppt remetem a nanobastões orientados no eixo-c que, com os tratamentos térmicos, tendem a experimentar um incremento no ordenamento a longo alcance e crescimento mais significativo na direção correspondente ao eixo-a do cristal. Nesse sentido, utilizou-se as técnicas de MEV, MET, MET em alta resolução e SAED para analisar as amostras de HA desse estudo.

As micrografias obtidas por MEV para as amostras estudadas são apresentadas nas Figuras 5.13a–i. Pode-se observar unicamente a presença de partículas com forma tipo bastão. As regiões destacadas em vermelho nas figuras se referem a maior magnificação dos bastões observados. As Figuras 5.14a e 5.14b ilustram os resultados obtidos pelo cálculo do tamanho dessas partículas. Para tal procedimento, utilizou-se um total de 100 partículas para cada temperatura e mediu-se em distintas direções (comprimento ou axial e largura ou radial). As dimensões das partículas da amostra Ppt e das amostras tratadas termicamente até a temperatura de 600 °C são similares, com valores de comprimento entre 150–900 nm (maior frequência em ~400 nm) e de largura entre 30–120 nm (maior frequência em ~70 nm). Essa significativa amplitude nos tamanhos se deve aos mecanismos de cristalização e maturação assim como descrito de maneira detalhada no ponto 4.3.5 do Capítulo 4. Por outro lado, os resultados nas Figuras 5.14a e 5.14b indicam um ligeiro aumento e diminuição nos valores médios de largura e comprimento, respectivamente, ao analisar a amostra de HA tratada termicamente a 800 °C. Este efeito pode ser melhor

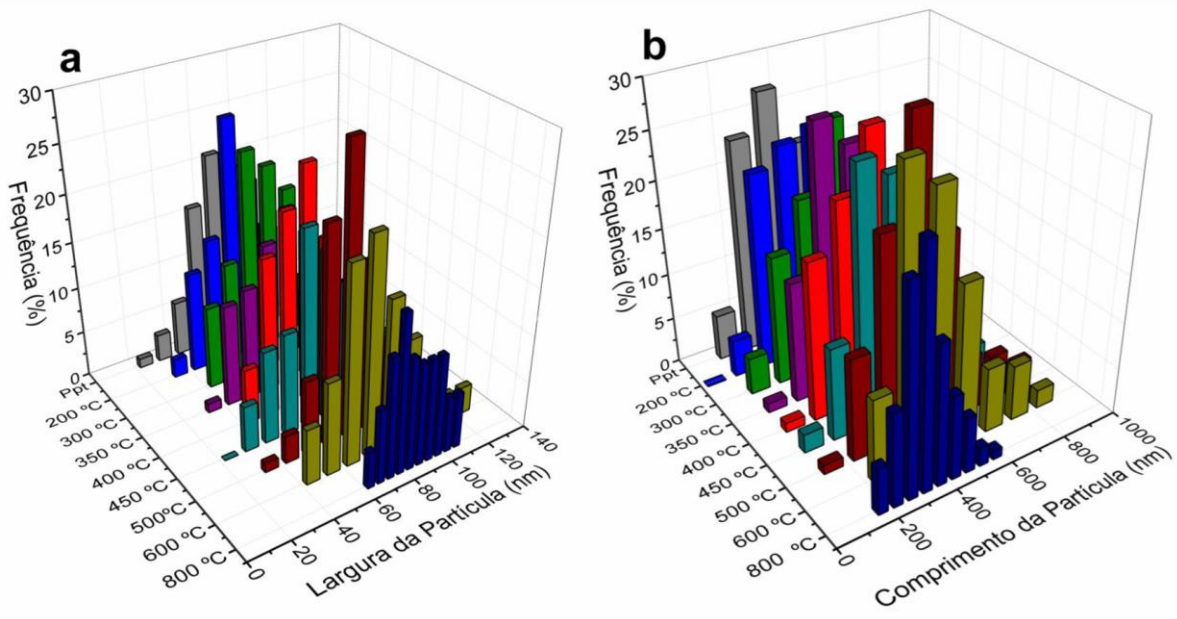


ilustrado pelo valor médio máximo do tamanho de partícula em função da temperatura, assim como disposto na Figura 5.15.

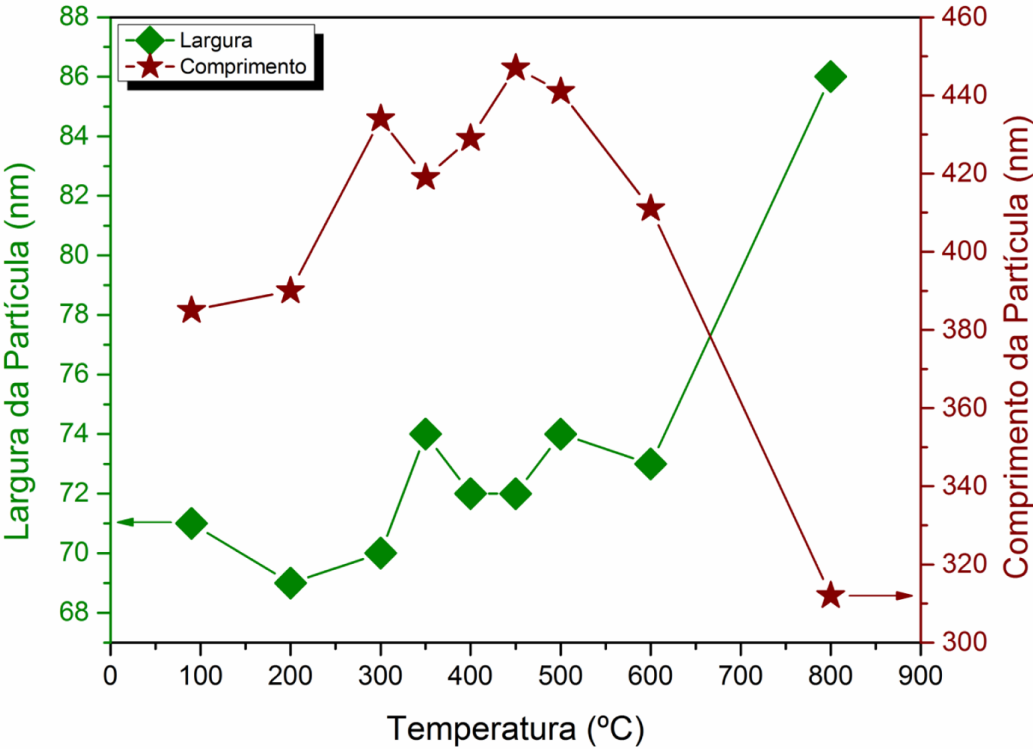
Os bastões de HA permanecem distribuídos de maneira uniforme e relativamente desaglomerados até a temperatura de 500 °C (Figura 5.13). A partir dessa temperatura, é possível observar a intensificação dos primeiros fenômenos de sinterização nas amostras que, ao serem tratados à temperatura de 800 °C, tornam-se mais evidentes. Segundo a literatura [241], a força motriz do primeiro estágio de sinterização da HA (400–700 °C) é a difusão superficial de matéria, o que acarreta na coalescência das partículas e formação de fronteiras de grão sem (ou com ligeira) densificação. Já no segundo estágio que se inicia em ~700 °C, a energia térmica cedida ao sistema é suficiente para que ocorra densificação por difusão no *bulk* ou nas fronteiras de grão formadas no primeiro estágio. Esse processo é acompanhado pela compactação e tendência de esferificação das partículas, originando uma estrutura porosa entre os bastões orientados aleatoriamente.



**FIGURA 5.13** – Micrografias obtidas por MEV para as distintas amostras estudadas. (a) Ppt, (b) 200 °C, (c) 300 °C, (d) 350 °C, (e) 400 °C, (f) 450 °C, (g) 500 °C, (h) 600 °C, e (i) 800 °C.



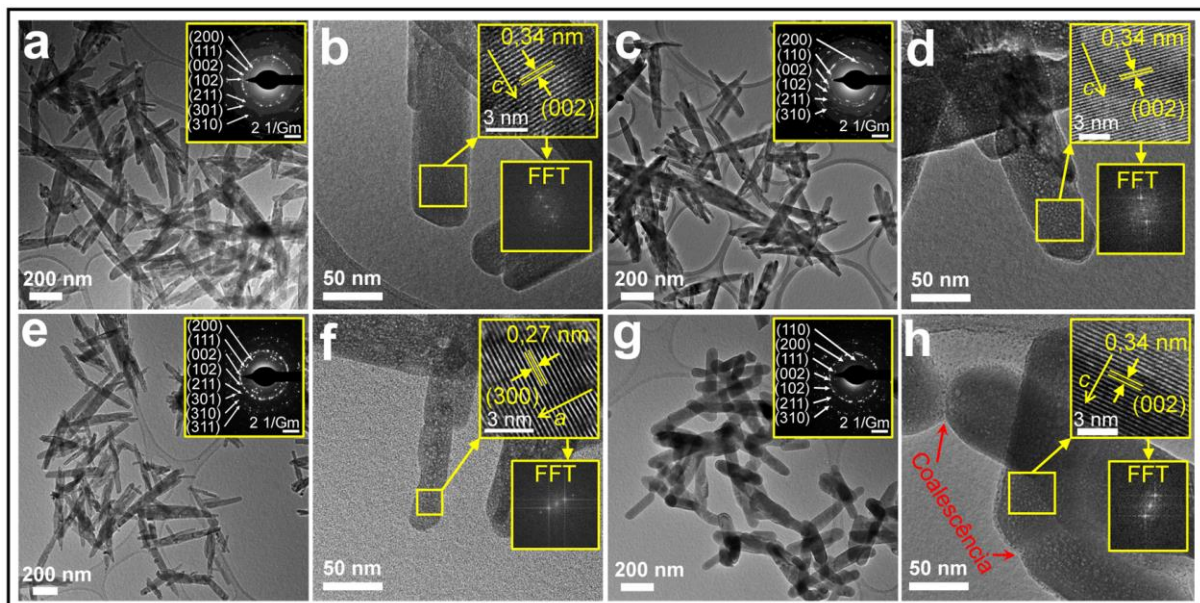
**FIGURA 5.14** – Estimativa do tamanho de partícula para a amostra de HA precipitada e tratada termicamente. (a) Largura da partícula, e (b) comprimento da partícula.



**FIGURA 5.15** – Valores de largura e comprimento da partícula em função da temperatura de tratamento térmico.

As Figuras 5.16a–h ilustram os resultados obtidos pela técnica de MET para as amostras Ppt, 350 °C, 400 °C e 800 °C. Pode-se observar nas Figuras 5.16a,c,e,g a presença de bastões com tendência de coalescência e formação de rede porosa em 800 °C, confirmando o descrito por MEV. Os *insets* presentes nas figuras

ilustram os padrões de difração de elétrons obtidos ao analisar essas regiões. Pode-se observar que os padrões não possuem nem a formação de pontos de difração definidos nem a formação de anéis concêntricos perfeitos, refletindo a presença de um material policristalino com significativo grau de ordenamento a longa distância. Em cada padrão SAED foram calculados os valores da distância interplanar ( $d$ ) dos anéis com maiores brilhos e mais próximos ao feixe incidente. Os valores encontrados correspondem a distintos planos da estrutura da HA de acordo com o padrão ICSD No. 26204 [36]. As Figuras 5.16b,d,f,h ilustram as micrografias obtidas a maiores magnificações para os bastões e os *insets* correspondem as imagens em modo de alta resolução. Nessas imagens, pode-se observar distâncias interplanares  $d$  de 0,34 nm e 0,27 nm, que correspondem aos planos (002) e (300), respectivamente, da estrutura hexagonal da HA. A orientação desses planos indica um crescimento preferencial das partículas na direção referente ao eixo-c do cristal.



**FIGURA 5.16** – Análise realizada por MET para as distintas amostras de HA. (a + b) Ppt, micrografia em baixa magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução, (c + d) 350 °C, micrografia em baixa magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução, (e + f) 400 °C, micrografia em baixa magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução, e (g + h) 800 °C, micrografia em baixa magnificação, SAED, micrografia em alta magnificação e em alta resolução.

De acordo com os resultados obtidos por MEV e ao analisar as imagens da amostra tratada a 800 °C no MET (Figuras 5.16g e 5.16h) podemos constatar que os processos de densificação e compactação dessa amostra ocorrem com uma

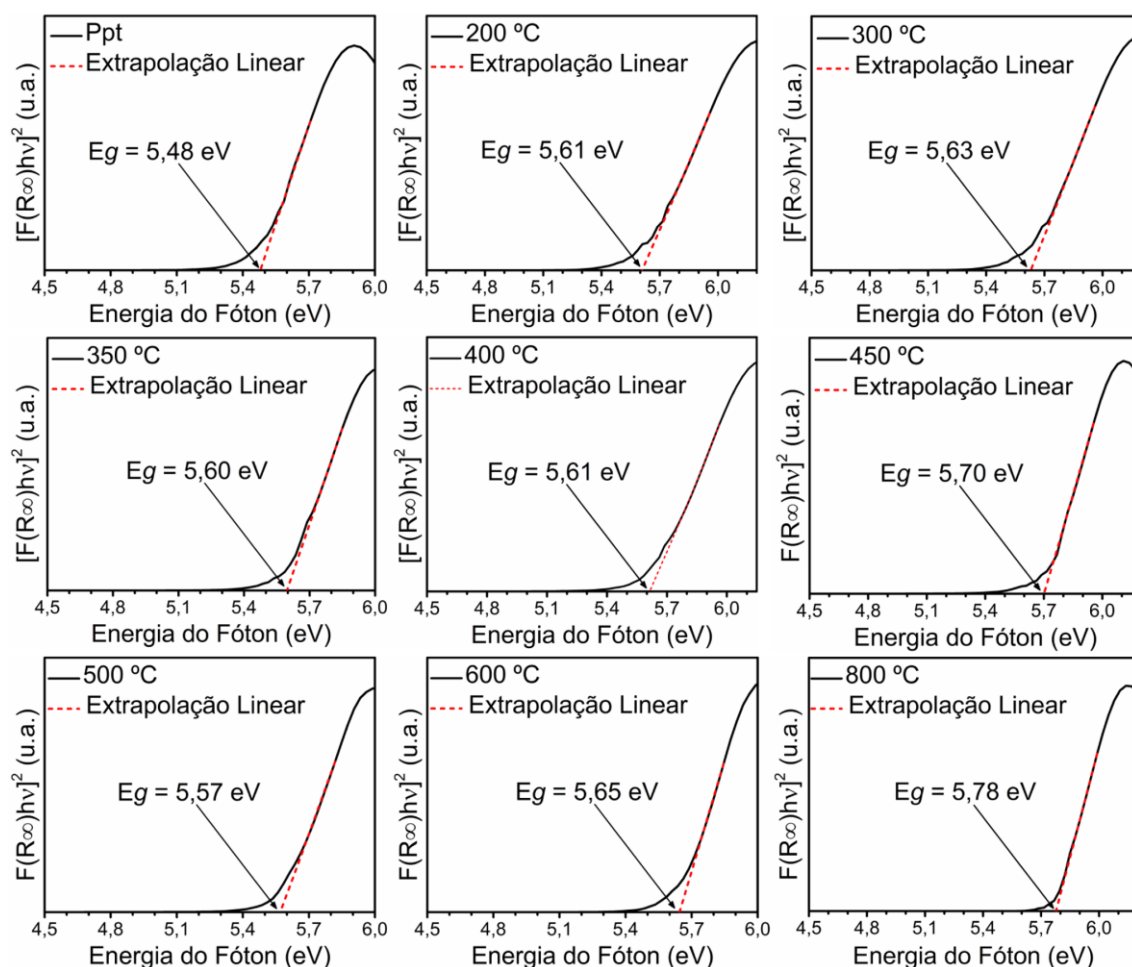
tendência de arredondamento das partículas e aumento da largura. Ou seja, com os processos de difusão de matéria, a diferença entre o comprimento e a largura das partículas diminui, evidenciando uma preferência da densificação nos planos {100}. Este fato é suportado pelo observado na Figura 5.3c, onde está presente um maior aumento de tamanho dos domínios de coerência cristalográfica no eixo-*a* e consequente diminuição de anisotropia. O processo de sinterização ocorre pela difusão de matéria (átomos ou íons) com o objetivo de diminuir as energias superficiais e interfaciais do sistema. No caso da HA, sabe-se que as superfícies correspondentes aos planos {100} possuem maiores energias que os {001} [242]. Neste sentido, a exposição desses planos pelo crescimento anisotrópico facilita o processo de sinterização e difusão pela energia superficial extra do sistema. WANG e SHAW [243] publicaram uma interessante estratégia baseada nesses efeitos onde conseguiram diminuir drasticamente a temperatura para obter um material denso de HA. Esses pesquisadores ainda observaram que a energia de ativação para a sinterização à baixa temperatura (<900 °C) é similar à energia de ativação para difusão de vacâncias de hidroxilas, e atribuíram que a grande concentração desses defeitos na superfície e a liberação de carbonatos facilita o processo de sinterização.

Em resumo, pode-se dividir o comportamento das amostras em quatro grupos bem definidos: (i) Ppt. HA fase única sintetizada por precipitação química com significativo ordenamento a curta e longa distância, porém com a presença de distintas espécies presas na rede ( $H_2O$ ,  $NH_4^+$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ) que causam uma expansão da cela unitária em relação a HA estequiométrica e pura, além da presença de vacâncias em OH. As partículas de HA possuem forma de bastões com crescimento preferencial no eixo-*c*.; (ii) Ppt–300°C. Eliminação de água estrutural fracamente ligada a rede e  $NH_4^+$  com consequente e abrupta contração na rede cristalina e deformação dos clusters  $[PO_4]$  e  $[CaO_9]$  e  $[CaO_7H]$ , o que favorece a presença de maior desordem estrutural principalmente a curta distância; (iii) 300–500°C. Região com apenas ligeiras alterações estruturais e morfológicas onde ocorre a liberação e incorporação parcial de carbonatos e OH, respectivamente, e início da densificação por difusão superficial de matéria; (iv) 500–800°C. A coalescência das partículas com ligeira densificação é observada, principalmente devido a difusão superficial de matéria e formação dos primeiros contornos de grão. A compactação das partículas ocorre por difusão nas superfícies, interfaces e no *bulk*. Esses processos são acompanhados do incremento na ordem a longa e curta distância, promovida pela estabilização dos

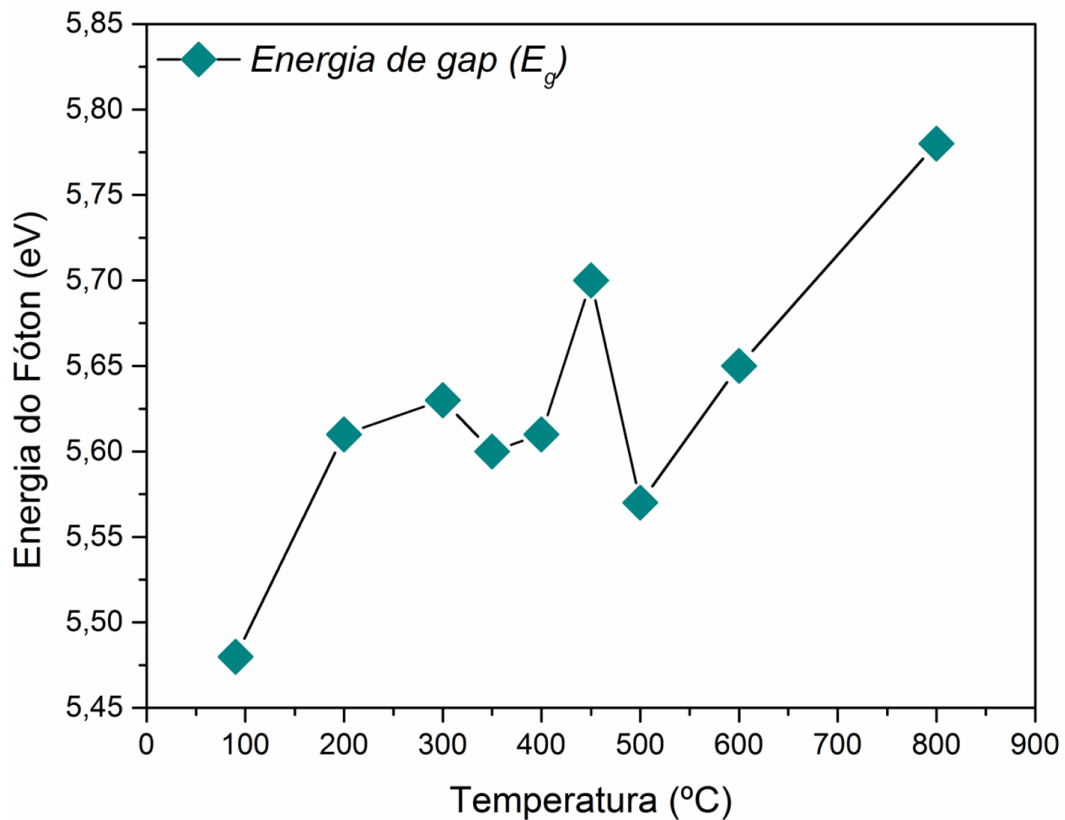
átomos dos clusters  $[\text{PO}_4]$  e  $[\text{CaO}_9]$  e  $[\text{CaO}_7\text{H}]$  em suas posições de equilíbrio, decomposição de impurezas e água fortemente presa na rede, assim como a significativa diminuição na densidade de vacâncias estruturais, destacando as vacâncias referentes aos grupos OH.

### 5.3.6 – Estrutura eletrônica e fotoluminescência da hidroxiapatita

As energias de *band gap* das amostras de HA precipitada e após os tratamentos térmicos foram obtidas por espectroscopia UV-Vis (Figura 5.17). A metodologia utilizada para esta estimativa é descrita no ponto 3.2.6 do Capítulo 3. Em todos os casos, valores entre 5,48 e 5,78 eV foram observados. De uma maneira geral, é possível evidenciar um incremento nos valores de  $E_g$  em função da temperatura (Figura 5.18), fato que demonstra o papel fundamental que a temperatura possui no relaxamento da rede e, por consequência, dos defeitos presentes nela (*bulk* e superfície), bem como o aumento na ordem estrutural da HA.



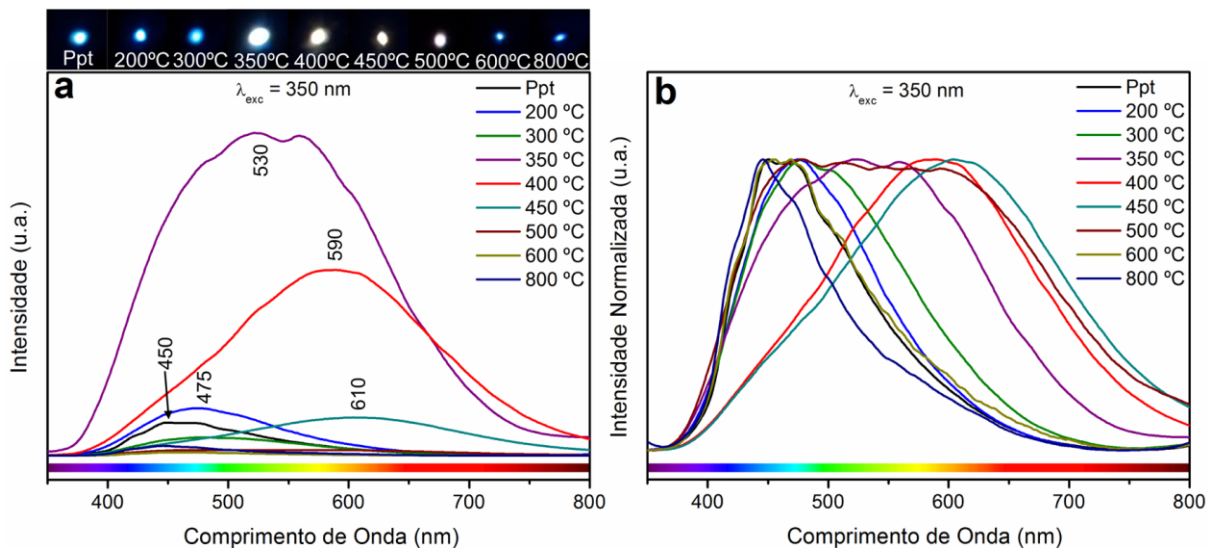
**FIGURA 5.17** – Espectros de UV-Vis obtidos para a amostra de HA Ppt e após a realização dos tratamentos térmicos a 200, 300, 350, 400, 450, 500, 600 e 800 °C.



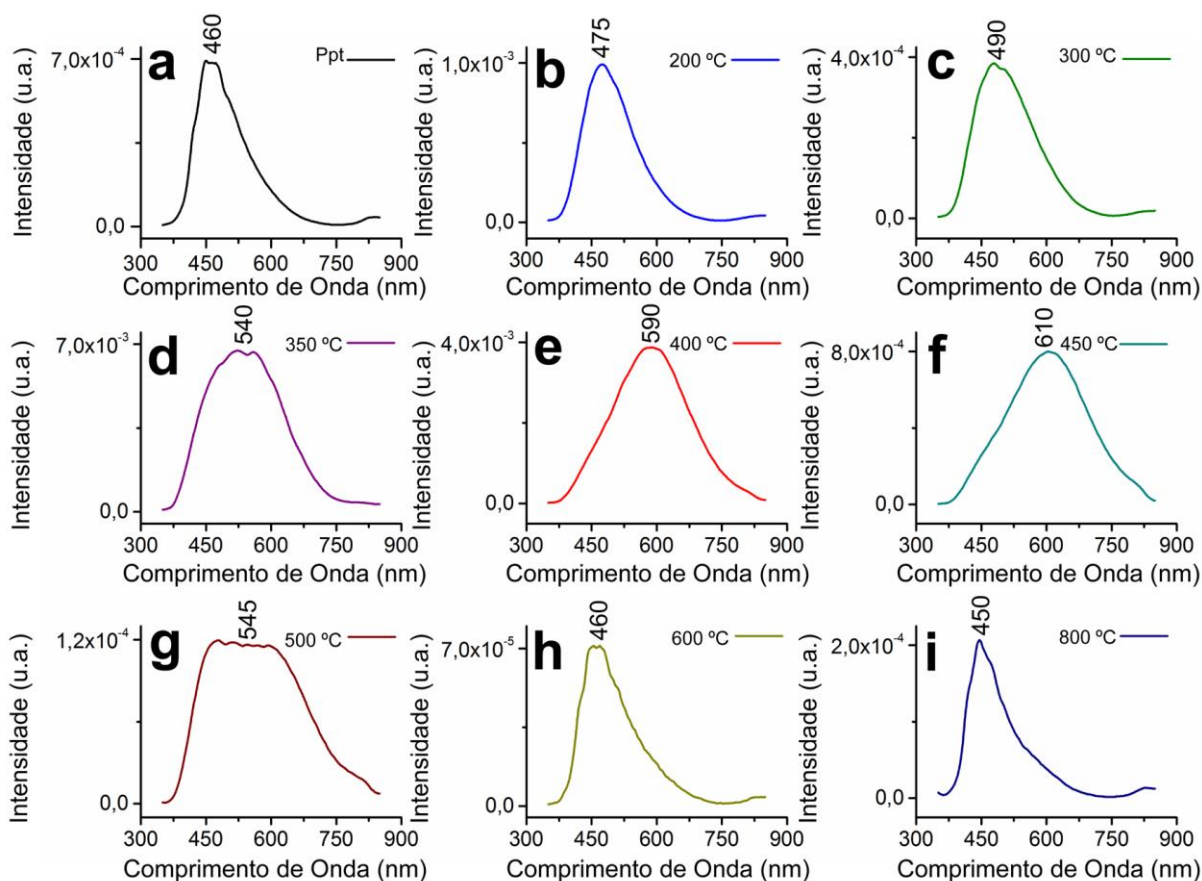
**FIGURA 5.18** – Valor de  $E_g$  para a amostra de HA Ppt e após a realização dos tratamentos térmicos a 200, 300, 350, 400, 450, 500, 600 e 800 °C.

Os espectros de FL das amostras de HA estão ilustrados nas Figuras 5.19 e 5.20. Em todos os casos, pode-se observar um perfil de emissão do tipo banda larga com características como máximo de emissão, intensidade e amplitude, sensivelmente dependentes da temperatura de tratamento térmico. Inicialmente, a banda larga de emissão da amostra Ppt possui máximo em aproximadamente 450 nm, resultando em uma cor azul (imagem digital na Figura 5.19a). Este perfil é similar aos normalmente reportados para a HA [7,73] e aos apresentados no ponto 4.3.6 no Capítulo 4, persistindo até 300 °C com apenas ligeira variação na intensidade e no valor do máximo (475 nm). Entretanto, novos tratamentos térmicos acima de 300 °C levam a importantes mudanças no comportamento da FL dos materiais. Dentre essas mudanças, pode-se destacar as que ocorrem na temperatura de 350 °C, onde o máximo de emissão se desloca para 530 nm, a intensidade aumenta consideravelmente (mais intensa do grupo estudado) e o perfil do tipo banda larga se incrementa, cobrindo agora uma ampla região no espectro visível (380 a 750 nm). Todas essas características levam a uma emissão de luz branca-azulada (imagem digital na Figura 5.19a).

Por outro lado, o pequeno aumento na temperatura de tratamento térmico de 350 °C a 400 °C é capaz de promover significativa variação na cor da FL observada de branca-azulada para branca-amarelada, assim como ilustram as imagens digitais na Figura 5.19a. Esta mudança corresponde às alterações no perfil de emissão onde o máximo está centrado em 590 nm. Nesta temperatura o perfil de banda ampla se mantém (380 a 800 nm), entretanto a intensidade diminui. Este perfil é estável apenas até 450 °C, ocorrendo ligeiro deslocamento para 610 nm e significativa supressão da emissão. A partir desta temperatura a supressão se incrementa consideravelmente, refletindo na baixa intensidade das emissões entre 500–800 °C. Ademais, neste intervalo de temperatura, os perfis de emissão tendem novamente a estarem na região visível do espectro eletromagnético correspondente a cor azul.



**FIGURA 5.19** – Comportamento óptico das amostras de HA em função da temperatura de tratamento térmico. Espectros de emissão ao excitar as amostras com  $\lambda_{exc} = 350$  nm. (a) Espectro não normalizado e imagens digitais mostrando a emissão das amostras no momento da excitação, e (b) espectros de emissão normalizados.



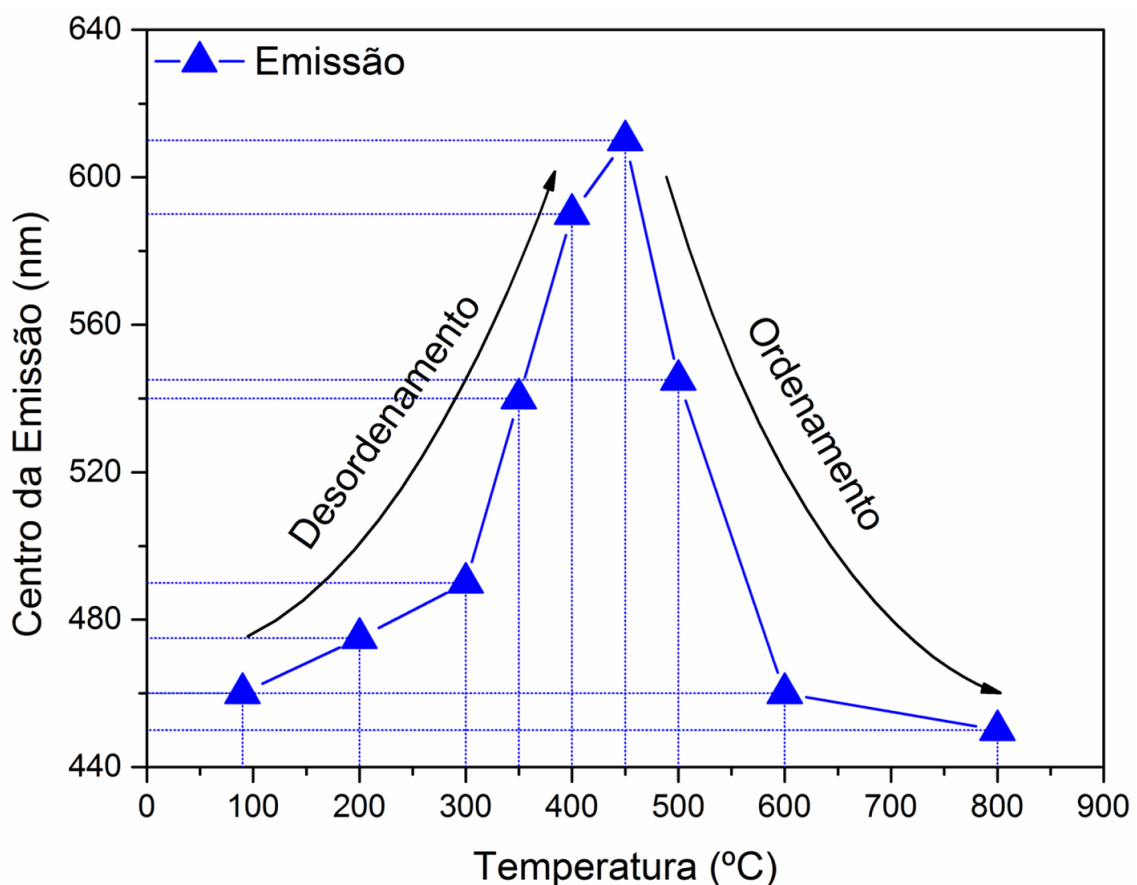
**FIGURA 5.20** – Espectros de emissão das amostras tratadas a distintas temperaturas ao excitar em  $\lambda_{exc} = 350$  nm. (a) Ppt, (b) 200 °C, (c) 300 °C, (d) 350 °C, (e) 400 °C, (f) 450 °C, (g) 500 °C, (h) 600 °C, e (i) 800 °C.

### 5.3.7 – Possíveis origens para a fotoluminescência intrínseca na hidroxiapatita tratada termicamente

Para estas amostras, é plausível assumir que as emissões observadas do tipo banda larga se originam de transições eletrônicas envolvendo a participação de inúmeros estados de energia dentro da região proibida ou *band gap*. Esta explicação é justificada pelo fato de que a fonte de excitação utilizada no presente estudo possui menor energia ( $\sim 3,54$  eV para a excitação em 350 nm) que os valores de  $E_g$  (de 5,48 a 5,78 eV) encontrados nas amostras de HA. Nos últimos anos, distintos mecanismos para a FL na região do azul para a HA foram propostos, como a presença de vacâncias, impurezas de  $CO_3^{2-}$ , assim como radicais  $CO_2^{\bullet-}$  [7,73]. Entretanto, estudos sobre o comportamento observado são escassos.



Segundo a literatura [122], os defeitos profundos são os principais responsáveis pelas emissões no amarelo/vermelho, estão localizados em regiões mais internas da zona proibida e são característicos de amostras mais desordenadas. Já os defeitos rasos estão localizados logo acima e abaixo da banda de valência e condução, respectivamente. Estes defeitos, por sua vez, são responsáveis pelas emissões mais energéticas no azul/violeta e são tipicamente observados em materiais com maior grau de ordem a médio alcance. A Figura 5.21 ilustra os máximos das emissões observadas em função da temperatura. Pode-se observar claramente duas regiões distintas: significativo deslocamento do azul para o amarelo na faixa de temperatura 90–450 °C e do amarelo para o azul em 450–800 °C. Estes eventos podem estar associados a um aumento na desordem seguido de um aumento na ordem estrutural a médio alcance, respectivamente.



**FIGURA 5.21** – Centro das emissões da HA em função da temperatura de tratamento térmico.

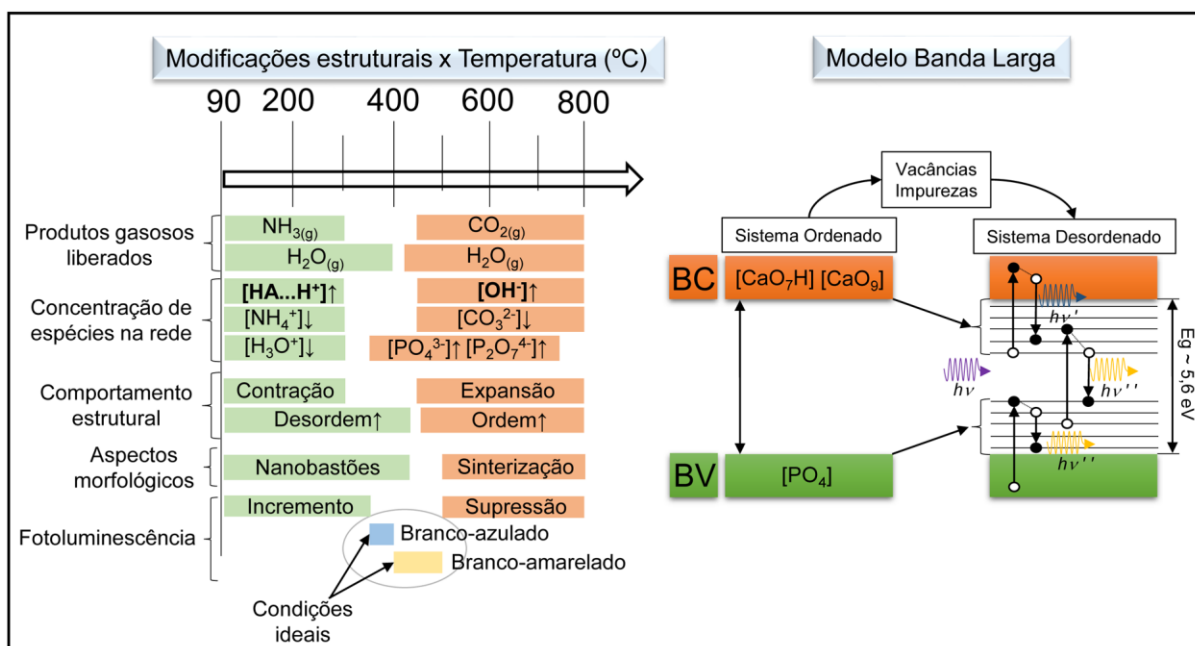
Como mencionado anteriormente, o arranjo dos clusters  $[\text{PO}_4]$  na estrutura da HA promove a existência de dois sítios cristalográficos para as espécies de Ca. O sítio Ca(1) possui nove átomos de O na sua esfera de coordenação pertencentes ao  $[\text{PO}_4]$ , originando os clusters  $[\text{CaO}_9]$ . Em contraste, o sítio Ca(2) é circundado por seis átomos de O dos clusters de  $[\text{PO}_4]$  e uma hidroxila dentro dos canais hexagonais da estrutura, levando a um cluster  $[\text{CaO}_7\text{H}]$ . Baseando-se nos presentes resultados, a formação e organização dos níveis de energia dentro do *band gap* estão diretamente associados ao processo de quebra de simetria [121] destes clusters (alterações nos comprimentos e ângulos das ligações P–O e Ca–O em respeito às suas posições de equilíbrio) induzidos pelos defeitos (impurezas, vacâncias e/ou desordem na rede) observados nas amostras de HA. Neste sentido, o comportamento causado pelo tratamento térmico aplicado na amostra Ppt pode estar relacionado a mudanças de ordem-desordem estrutural induzidas pela peculiaridade desta estrutura, em que existe uma grande densidade de impurezas e vacâncias presas na rede. Entretanto, apontar individualmente as espécies e fenômenos causadores deste comportamento é uma tarefa difícil e as distintas reações químicas na rede, modificações estruturais e morfológicas que ocorrem concomitantemente na HA podem contribuir as variações na organização dos níveis de energia na zona proibida. De fato, as propriedades físico-químicas e suas alterações na HA são normalmente atribuídas a combinação de fenômenos que nela ocorre [13].

Em especial, as espécies  $\text{HA}\dots\text{H}^+$  e vacâncias em OH podem exercer papel fundamental nas densidades eletrônicas de clusters Ca e P vizinhos as mesmas. Sabe-se que as espécies próximas e dentro dos canais hexagonais da estrutura da HA modificam significativamente as suas propriedades físico-químicas [16]. Além disso, as distorções na estrutura relacionadas a estas vacâncias promovem níveis semipreenchidos próximos a banda de valência ( $\text{HA}\dots\text{H}^+$ ) e condução (vacância de OH), fato que causa um incremento nos processos de recombinação radiativa elétron-buraco [86,156,197].

Em resumo, as reações químicas que ocorrem na rede até 300 °C possuem como produto vacâncias e espécies distintas às que constituem a rede da HA pura, onde o aumento na densidade de  $\text{HA}\dots\text{H}^+$  em especial promove uma maior desordem estrutural. Em 350 °C existe o equilíbrio ideal entre as vacâncias para a ocorrência de processos de recombinação radiativa com o aumento na intensidade e a ampliação da banda de emissão para regiões de menores energias, o que resulta

em uma emissão final branca-azulada. Entre 400–450 °C um elevado grau de desordem é observado com maior contribuição de níveis de energia profundos. Este comportamento pode ocorrer também devido a contribuição de níveis de energia pela decomposição de carbonatos e níveis defeituosos na superfície das partículas. Assim como demonstrado em outros estudos [87] e no Capítulo 4, estes níveis possuem papel crucial na distribuição eletrônica da HA, principalmente nas regiões profundas da zona proibida. Ao tratar termicamente a maiores temperaturas (450–800 °C), a perfeição cristalina aumenta significativamente como efeito da acomodação das espécies que compõem a HA em suas posições de equilíbrio. Este evento ocorre como efeito da decomposição de impurezas e principalmente da eliminação de vacâncias de OH na superfície e nos canais hexagonais. Esses fatores minimizam os níveis de energia por defeitos dentro do *band gap*, suprimindo as emissões de FL principalmente em regiões de menores energias (amarelo), mas também nas mais energéticas (azul). Isto faz com que a banda de emissão esteja centrada na região azul e com intensidade reduzida.

A Figura 5.22 ilustra os principais resultados observados no presente estudo quanto as espécies presentes na rede e liberadas em função da temperatura, assim como as mudanças de ordem-desordem e as propriedades FL da HA. A Figura 5.22 também ilustra a estrutura de bandas proposta para o presente estudo. A mesma está baseada em distintos trabalhos publicados [86,87,197,201,203], além do modelo de banda larga [121]. A estrutura eletrônica da HA perfeita e sem defeitos é constituída por níveis de energia provenientes dos clusters de [PO<sub>4</sub>] (banda de valência) e Ca (banda de condução) e com energia de gap similar aos apontados para amostras com caráter isolante. Com a presença dos defeitos estruturais e superficiais, a interação entre as densidades eletrônicas dos clusters constituintes da rede é alterada como efeito da quebra de simetria, o que dá origem a novos níveis de energia dentro do *band gap*. Esses níveis encontram-se semipreenchidos. Com isso, ao excitar a amostra com energia inferior (3,54 eV) ao valor do gap (5,6 eV) a recombinação par buraco-elétron é favorecida.



**FIGURA 5.22** – Esquema geral dos resultados obtidos no presente estudo. Resumo das modificações estruturais em função da temperatura (esquerda) dentro da faixa estudada (90–800 °C) e modelo proposto para a recombinação por  $e^-h^*$  na estrutura eletrônica da HA seguindo o modelo da banda larga para a FL (direita).

## 5.4 – Conclusões

No presente estudo, verificou-se o efeito de tratamentos térmicos nas propriedades estruturais e ópticas de nanobastões de hidroxiapatita precipitados quimicamente.

As caracterizações estruturais revelaram a presença de impurezas intrínsecas e defeitos nas amostras. Ao tratar termicamente, ocorrem reações tanto na rede quanto na superfície, modificando significativamente a estrutura da HA.

Dependendo da temperatura, foram observadas alterações nas intensidades e nos perfis das bandas de FL. As emissões auto ativadas mais intensas com excitação no ultravioleta foram obtidas a 350 e 400 °C com, respectivamente, emissões branca-azulada e branca-amarelada, comprovando, assim, que emissões em distintas regiões além da azul são possíveis para a estrutura da HA.

A FL intrínseca tem como origem processos de recombinação  $e^-h^*$  com participação de níveis dentro da região de *band gap* relacionados a defeitos estruturais. Este comportamento foi evidenciado ao se utilizar uma energia de excitação (~3,54 eV em 350 nm) inferior aos valores de  $E_g$  encontrados (5,48 a 5,78 eV).

O estudo relevou a possibilidade de obtenção de nanopartículas de HA com propriedades FL melhoradas a partir de uma metodologia simples e economicamente viável a partir da síntese por precipitação química seguida de tratamentos térmicos.



# CAPÍTULO 6 – HIDROXIAPATITA DOPADA COM $\text{Eu}^{3+}$ : DISTRIBUIÇÃO NA MATRIZ E INFLUÊNCIA DE TRATAMENTOS TÉRMICOS

## 6.1 – Introdução

Recentemente, a incorporação de  $\text{Eu}^{3+}$  à estrutura da hidroxiapatita tem atraído interesse no âmbito das aplicações biomédicas – conforme descrito ao longo da seção 2.6, do Capítulo 2 –, dadas as características de biocompatibilidade do sistema, e as estáveis emissões vermelha/laranja do  $\text{Eu}^{3+}$ , importantes para o campo da bioimagem. De maneira geral, a incorporação de lantanídeos a uma rede cristalina continua sendo um dos protocolos mais comuns utilizados para alcançar intensas emissões luminescentes [244]. Desta maneira, um profundo conhecimento da distribuição destas espécies em uma dada matriz se faz necessário no desenvolvimento de eficientes materiais ópticos.

Considerando que os orbitais  $4f^n$  nos lantanídeos são protegidos do entorno por orbitais  $5s$  e  $5p$  completamente preenchidos ( $5s^25p^6$ ) a luminescência originária das transições  $4f \rightarrow 4f$  são normalmente linhas estreitas, com extensos tempos de vida. Conseqüentemente, as propriedades espectrais dos lantanídeos trivalentes são pouco perturbadas pelo campo cristalino. Entretanto, mudanças nos sítios de simetria e força do campo podem afetar algumas propriedades das emissões, como resolução, intensidades relativas, desdobramentos e tempos de vida [126]. Todas estas características são fundamentais na obtenção de materiais ópticos e devem ser conhecidas a fundo. Neste sentido, estudos focados na identificação dos sítios do  $\text{Eu}^{3+}$  nas partículas de HA são relevantes à obtenção de materiais fotoluminescentes mais eficientes.

A distribuição do  $\text{Eu}^{3+}$  na estrutura da HA é essencialmente dependente da rota sintética utilizada para a sua preparação e realização de posteriores tratamentos térmicos. Como consequência, as propriedades luminescentes da HA podem sofrer variações ao modificar estes parâmetros. Entretanto, a distribuição do  $\text{Eu}^{3+}$  na HA ainda é causa de debates na comunidade científica. Em amostras preparadas a temperatura ambiente foi proposta a presença do  $\text{Eu}^{3+}$  em um entorno amorfo provido pelas nanopartículas de HA ou incorporado na posição Ca(1) [245,246]. Depois da realização de tratamentos térmicos (400–900 °C), foram sugeridos distintos mecanismos para as variações de distribuição do  $\text{Eu}^{3+}$

identificadas na HA em função da temperatura. Dentre eles, pode-se destacar a cristalização do entorno amorfo inicial em sítios Ca(1) ou Ca(2) referentes à rede cristalina da HA, e a migração do  $\text{Eu}^{3+}$  do sítio inicial Ca(1) para o sítio Ca(2) [28,247,248]. Esta migração também foi proposta em apatitas naturais [249,250]. Em amostras tratadas acima de 900 °C, o  $\text{Eu}^{3+}$  foi identificado em ambas as posições Ca(1) e Ca(2) [56,251].

Outro parâmetro menos explorado a ser considerado na distribuição do  $\text{Eu}^{3+}$  na estrutura da HA é a etapa de resfriamento após tratamentos térmicos. Quando a HA é tratada principalmente a partir 900 °C, um gradual processo de desidroxilação se torna relevante, em que o O e vacâncias substituem grupos OH dentro dos canais hexagonais [252,253]. Este processo é reversível, e uma etapa de resfriamento rápido pode promover uma maior concentração de vacâncias em H na HA. Outro efeito do resfriamento rápido consiste na incomum incorporação de óxidos de metais de transição nos canais da estrutura, como O-Cu-O para a HA [53] e O-Cu-O, O-Ni-O, O-Zn-O, O-Co-O para outras apatitas [254,255]. Este tratamento tem potencial para promover modificações também no entorno do  $\text{Eu}^{3+}$ . Ademais, o  $\text{Eu}^{3+}$  pode ser usado como uma sonda espectral para tais modificações.

No presente estudo, demonstra-se com resultados fotoluminescentes sítio-seletivos que as espécies de  $\text{Eu}^{3+}$  podem ocupar sítios Ca(2) quando a HA é sintetizada nas condições estudadas, e não somente a partir de tratamentos térmicos nas temperaturas entre 400–1100 °C [28,56,250]. Além disso, as espécies  $\text{Eu}^{3+}$  estão distribuídas em três entornos não equivalentes, todos referentes ao sítio Ca(2), não sendo identificados entornos referentes a ocupação do sítio Ca(1). Com posteriores tratamentos térmicos os entornos menos ordenados são minimizados em função da temperatura. Ao realizar resfriamento rápido após o tratamento térmico a 1100°C, a estabilização do  $\text{Eu}^{3+}$  por um único entorno na posição Ca(2) é favorecida significativamente.

## **6.2 – Objetivo**

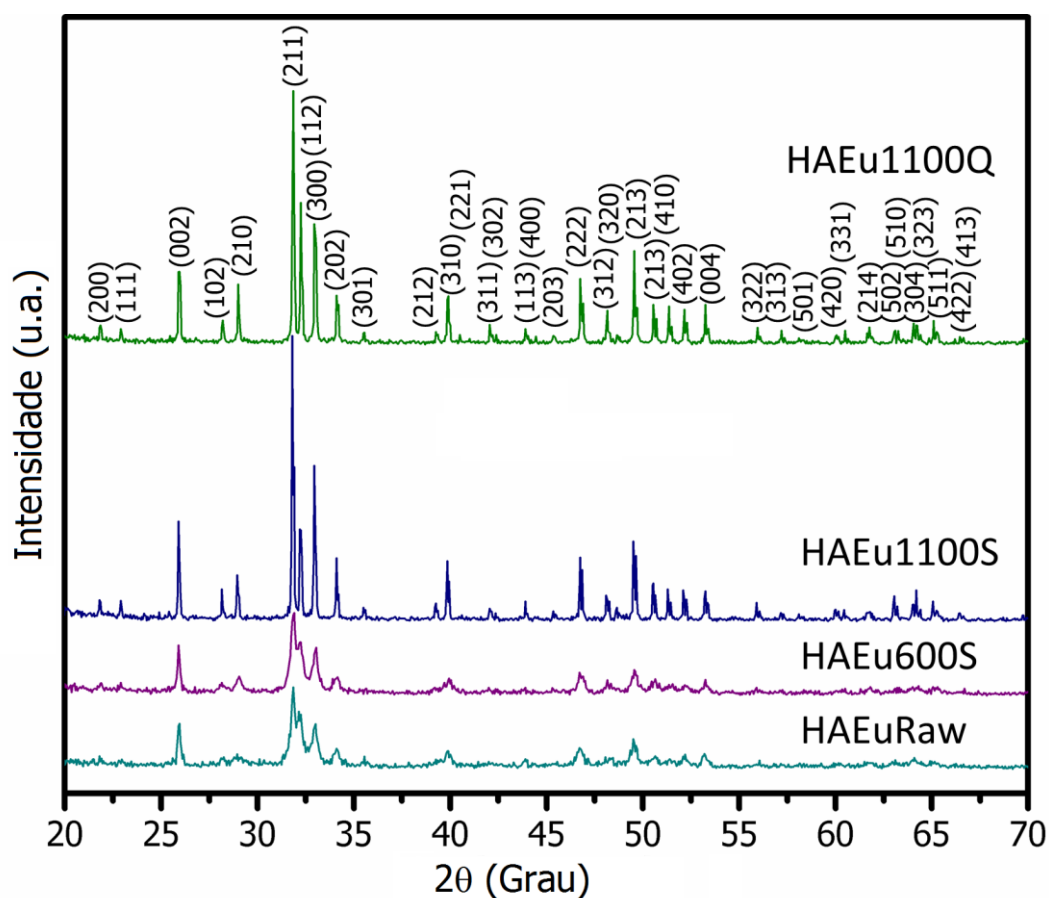
Sintetizar hidroxiapatita dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  através do método de precipitação química e verificar a influência de distintos tratamentos térmicos nas propriedades estruturais, composicionais, assim como nas propriedades fotoluminescentes do sistema. Realizar um estudo através de técnicas sítio-seletivas de caracterização fotoluminescente do  $\text{Eu}^{3+}$ .



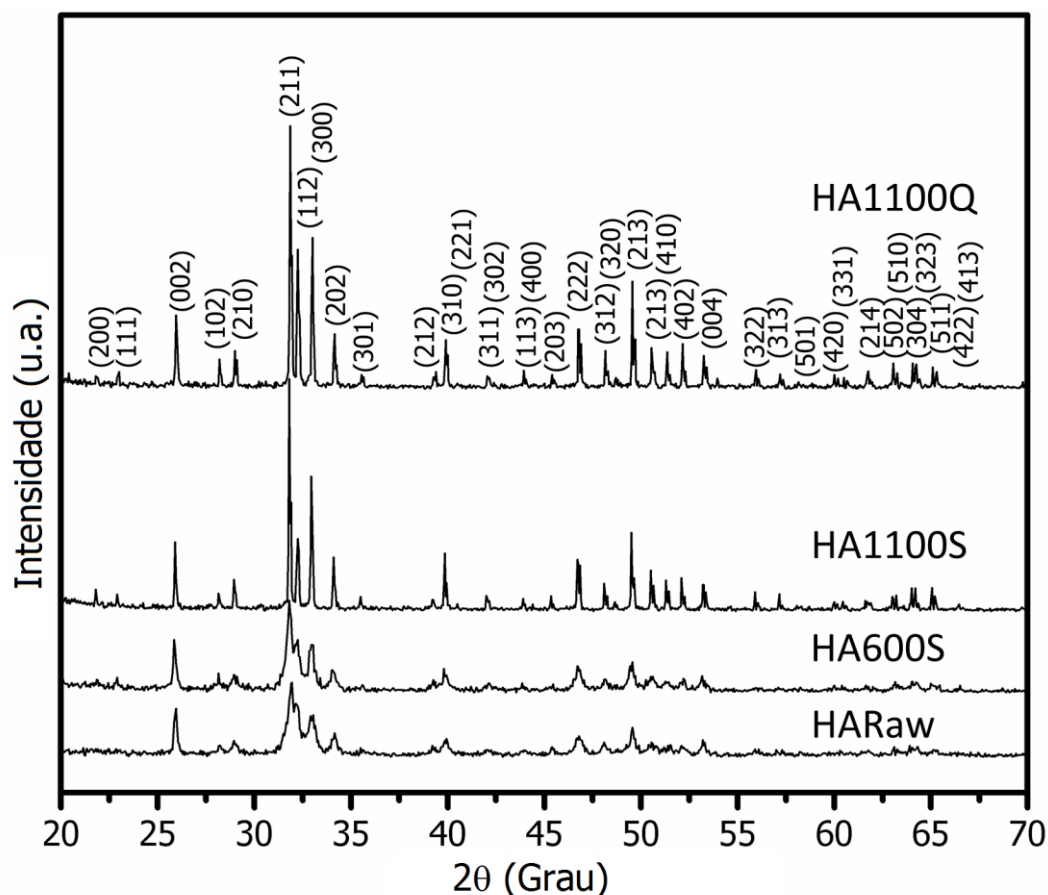
## 6.3 – Resultados e discussão

### 6.3.1 – Análise estrutural por DRX e FTIR

A metodologia de síntese para a amostra de HA pura e dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  é apresentada na seção 3.1.4 do Capítulo 3 e os parâmetros utilizados para os tratamentos térmicos são descritos na seção 3.1.5 do Capítulo 3. Os padrões de difração para os pós puros e dopados com  $\text{Eu}^{3+}$  são ilustrados nas Figuras 6.1 e 6.2, respectivamente. Todos os picos observados foram perfeitamente indexados à fase hexagonal da HA (grupo pontual  $P6_3/m$ ) de acordo com o padrão reportado na ICSD No. 26204 [36]. Não foram observadas fases secundárias contendo Ca ou Eu. Este resultado é ratificado por estudos presentes na literatura, nos quais concentrações similares ou superiores de  $\text{Eu}^{3+}$  levam à formação de fase única de HAEu em amostras tratadas termicamente até 900 °C [28,248,256]. Entretanto, observa-se no presente estudo que a estrutura cristalina permanece após tratamentos a 1100 °C com subsequente resfriamento lento ou rápido das amostras.



**FIGURA 6.1** – Padrões de DRX para a amostra de HA dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  preparada por precipitação a 90 °C (HAEuRaw), após tratamento térmico a 600 °C (HAEu600S), 1100 °C (HAEu1100S) e 1100 °C com resfriamento rápido em  $\text{N}_2$  líquido (HAEu1100Q).



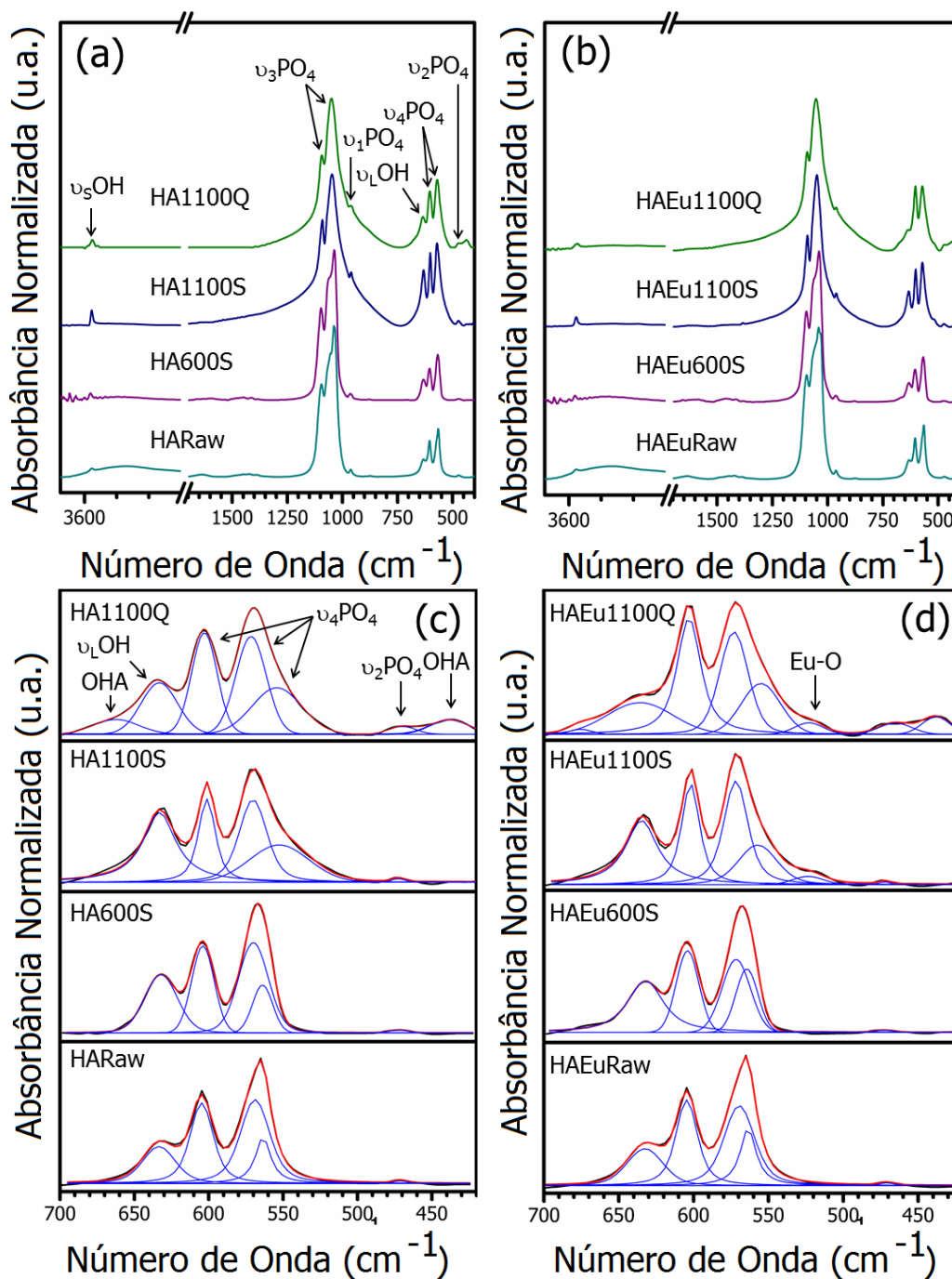
**FIGURA 6.2** – Padrões de DRX para a amostra de HA pura preparada por precipitação a 90 °C (HARaw), após tratamento térmico a 600 °C (HA600S), 1100 °C (HA1100S) e 1100 °C com resfriamento rápido em N<sub>2</sub> líquido (HA1100Q).

Os padrões de DRX nas Figuras 6.1 e 6.2 indicam que as principais diferenças que surgem ao aumentar a temperatura de tratamento térmico estão na intensidade e definição dos picos observados. As amostras dopadas com Eu<sup>3+</sup>, HAEuRaw e HAEu600S, e as puras, HARaw e HA600S, apresentam picos amplos e de baixa intensidade, convergindo com os observados para HA nanocristalina preparada em condições similares [49,98]. Após o tratamento a 1100 °C, os picos se tornam finos e bem definidos, indicando elevado grau de ordenamento a longo alcance nas amostras dopadas com Eu<sup>3+</sup>, HAEu1100S e HAEu1100Q, e nas puras, HA1100S e HA1100Q.

Conforme descrito anteriormente, distintos trabalhos experimentais [165,167] e teóricos [168] focaram no estudo do comportamento vibracional da estrutura da HA. Os principais modos ativos no infravermelho se devem aos grupos [PO<sub>4</sub>] e às hidroxilas. As Figuras 6.3a e 6.3b ilustram os espectros FTIR obtidos para as amostras puras e dopadas com Eu<sup>3+</sup>, respectivamente, e os principais modos

observados. Em todas as amostras, os modos referentes ao *cluster* [PO<sub>4</sub>] na estrutura da HA foram identificados: estiramento simétrico não degenerado  $\nu_1$  (962 cm<sup>-1</sup>), deformação duplamente degenerada  $\nu_2$  (474 e 476 cm<sup>-1</sup>), estiramento assimétrico triplamente degenerado  $\nu_3$  (1015–1110 cm<sup>-1</sup>) e duas componentes do modo de deformação triplamente degenerado  $\nu_4$  (570 e 602 cm<sup>-1</sup>). Além disso, o modo de estiramento  $\nu_s$  (3569 cm<sup>-1</sup>) e o modo libracional  $\nu_L$  (631 cm<sup>-1</sup>) da hidroxila também são observados.

As Figuras 6.3c e 6.3d ilustram a região expandida entre 400–700 cm<sup>-1</sup> e a deconvolução das bandas presentes para as amostras puras e dopadas com Eu<sup>3+</sup>, respectivamente. As deconvoluções foram realizadas com o software *PeakFit* [257]. Após este procedimento, é possível observar uma banda centralizada em 563 cm<sup>-1</sup> para as amostras recém-preparadas (HAEuRaw e HARaw) e tratadas a 600 °C (HAEu600S e HA600S), e outra banda centralizada em 555 cm<sup>-1</sup> para as amostras tratadas a 1100 °C (HAEu1100S e HA1100S) e com resfriamento rápido (HAEu1100Q e HA1100Q). Tais bandas estão relacionadas a mais uma componente do modo  $\nu_4$  para o grupo [PO<sub>4</sub>] [165]. Ademais, nas amostras onde se realizou o esfriamento rápido são observadas bandas em 436 e 672 cm<sup>-1</sup>. Estas bandas normalmente surgem durante o processo de desidroxilação da matriz [252], que leva a um aumento na quantidade de O livre nos canais hexagonais da estrutura. O material resultante é normalmente rotulado de oxihidroxiapatita (OHA, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2(1-x)</sub>O<sub>x</sub>⊗<sub>x</sub>, onde ⊗ é vacância de hidrogênio). Além disso, nota-se uma banda em 520 cm<sup>-1</sup> associada a vibração da ligação Eu–O nas amostras HAEu1100S e HAEu1100Q [258].

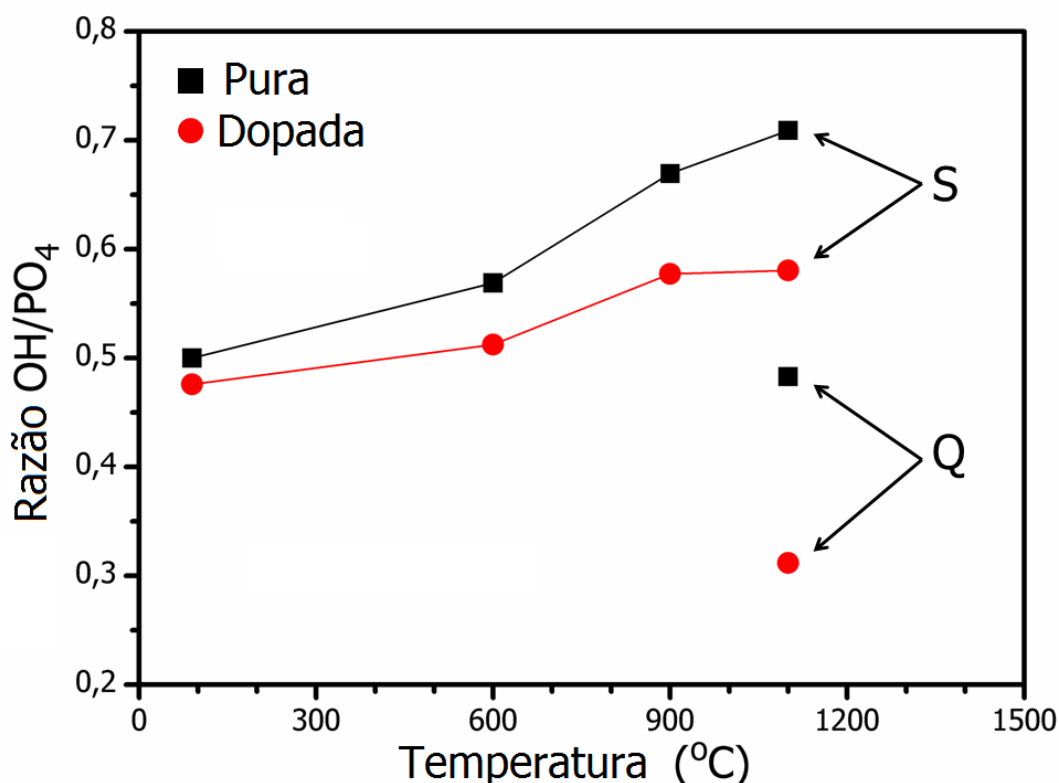


**FIGURA 6.3** – Espectros FTIR para (a) amostras puras de HA e (b) amostras de HA dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$ . A região ampliada entre  $420\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  com as correspondentes deconvoluções das bandas é mostrada para as amostras (c) puras e (d) dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$ .

Ao observar os resultados da espectroscopia FTIR, é possível identificar variações nas intensidades das bandas referentes aos grupos OH. Este comportamento está relacionado a distintas concentrações de OH na estrutura da HA [233]. Desta maneira, a quantidade relativa de OH foi calculada pela razão OH/ $\text{PO}_4$  usando a banda OH em  $633\text{ cm}^{-1}$  e a banda referente ao *cluster* [ $\text{PO}_4$ ] em  $602\text{ cm}^{-1}$ ,

de acordo com [234]. A Figura 6.4 ilustra os resultados obtidos. O menor valor na razão OH/PO<sub>4</sub> significa que uma quantidade relativamente menor de OH está presente na estrutura. Para um melhor entendimento do comportamento das amostras em relação à temperatura, submeteu-se as amostras HARaw e HAEuRaw a tratamentos térmicos a 900 °C por 4 h com taxa de aquecimento igual a 5 °C/min.

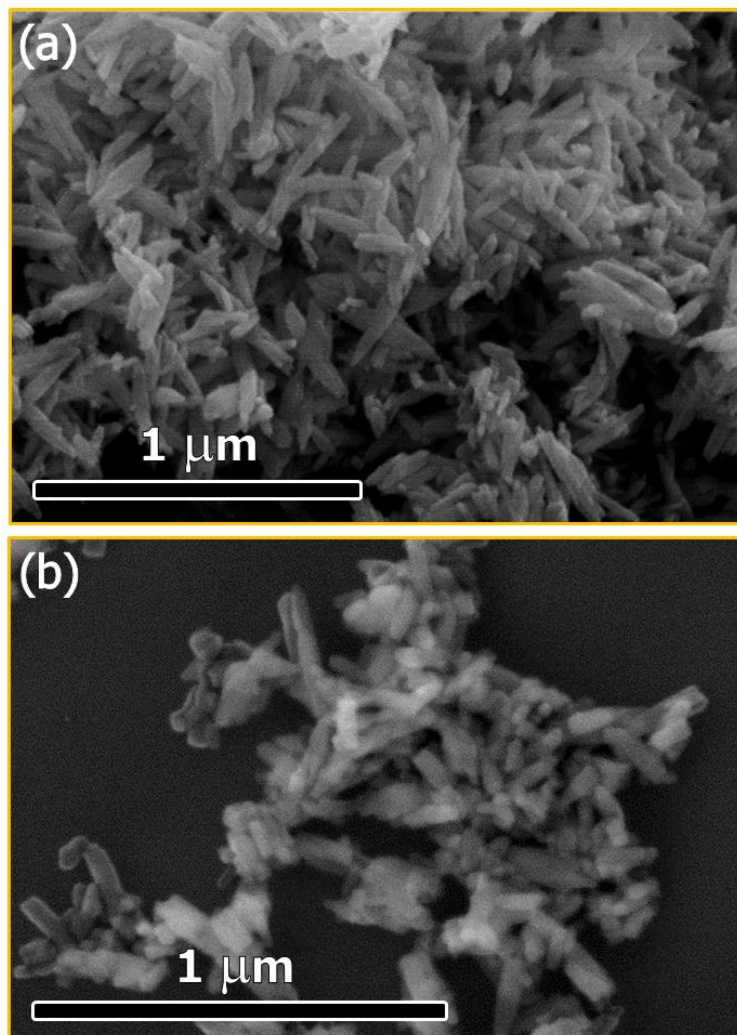
Nas amostras puras esfriadas lentamente, um aumento na quantidade relativa de OH com a temperatura é observada. Por outro lado, um significativo decréscimo na razão OH/PO<sub>4</sub> ocorre quando há resfriamento rápido (amostra HA1100Q). Nas amostras dopadas com Eu<sup>3+</sup> a quantidade relativa de OH é significativamente menor que para as amostras puras em todas as temperaturas. Este comportamento é mais notável com o aumento da temperatura do tratamento térmico e com o resfriamento rápido. As possíveis causas dos distintos comportamentos entre as amostras de HA puras e dopadas com Eu<sup>3+</sup> serão discutidas nas próximas seções deste capítulo.



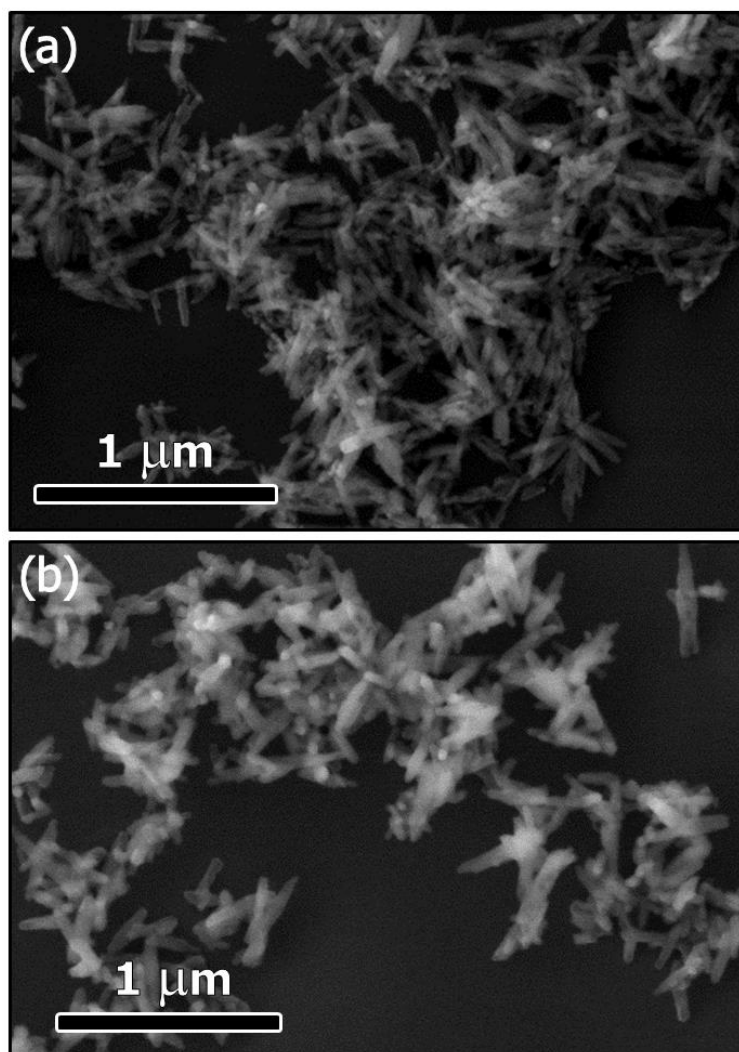
**FIGURA 6.4** – Diferenças no conteúdo relativo de OH na estrutura da HA e HAEu estimados pela razão OH/PO<sub>4</sub>. S = resfriamento lento e Q = resfriamento rápido com *quenching* em N<sub>2</sub> líquido.

### 6.3.2 – Estudo morfológico e composicional por MEV acoplado com EDS

As Figuras 6.5a e 6.5b ilustram as micrografias obtidas por MEV para as amostras HAEuRaw e HAEu600S, respectivamente, e as Figuras 6.6a e 6.6b ilustram para as amostras puras HARaw e HA600S. Pode-se observar que, em todos os casos, as nanopartículas apresentam forma de bastão. Assim, a natureza nanocristalina das partículas na amostra HAEuRaw e HARaw se mantem após o tratamento a 600 °C. Em todos os casos, não foram observados produtos secundários ou heterogeneidade química.



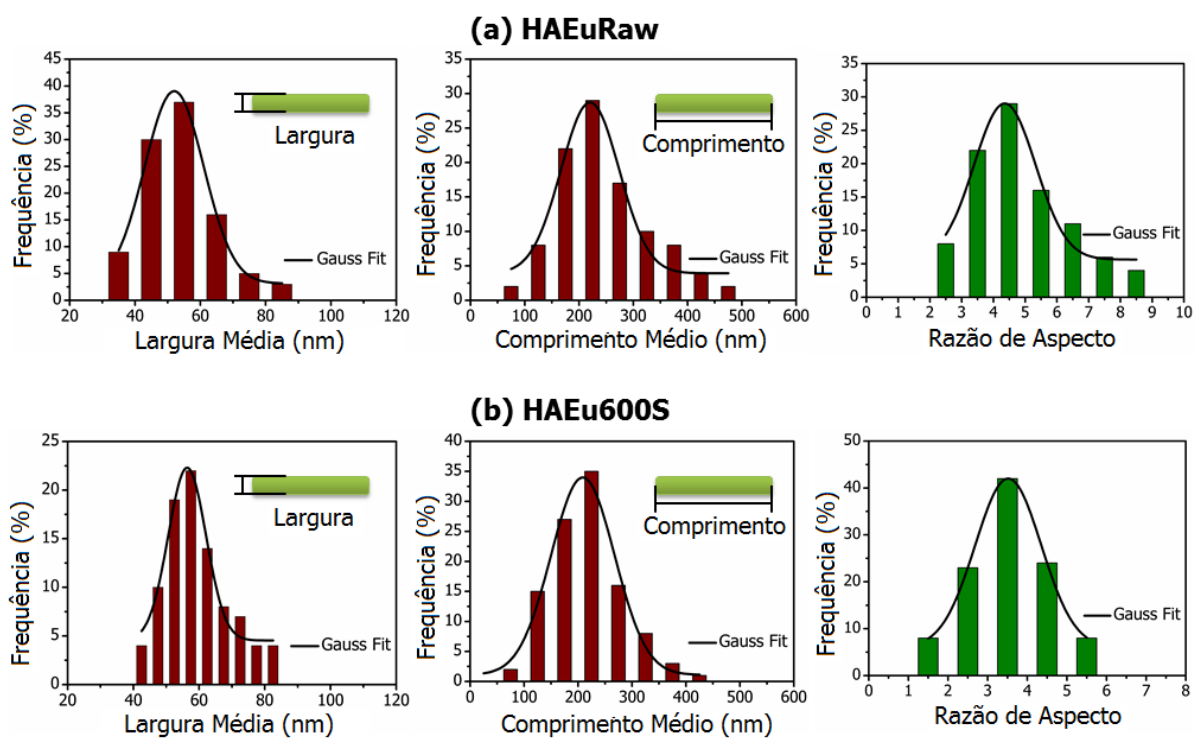
**FIGURA 6.5** – Micrografias obtidas por MEV para as amostras (a) HAEuRaw e, (b) HAEu600S.



**FIGURA 6.6** – Micrografias obtidas por MEV para as amostras (a) HARaw e, (b) HA600S.

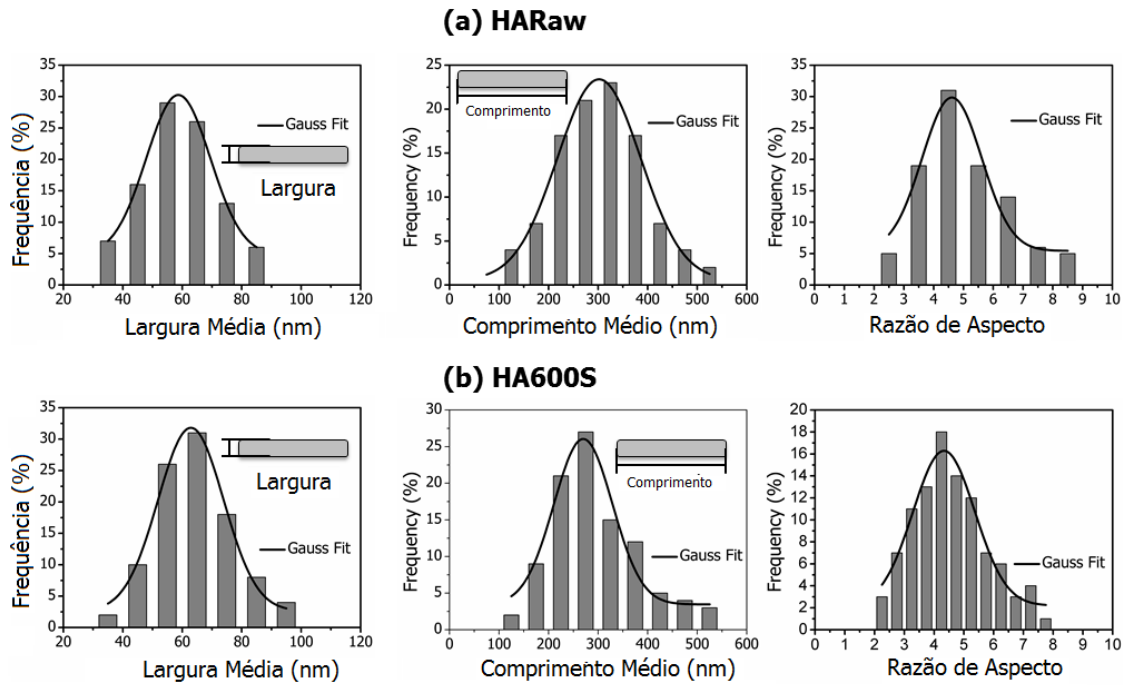
As Figuras 6.7a e 6.7b ilustram as medidas estatísticas do comprimento, largura e razão de aspecto (comprimento/largura) das nanopartículas presentes nas amostras HAEuRaw e HAEu600S, respectivamente. Nestes casos, as dimensões obtidas são similares, aproximadamente 210 nm em comprimento por 55 nm de largura. Nas amostras HARaw e HA600S (Figuras 6.8a e 6.8b, respectivamente) as dimensões são de aproximadamente 290 nm de comprimento por 60 nm de largura. Logo, os nanobastões das amostras dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$  são ligeiramente menores em largura e significativamente menores em comprimento em comparação com os presentes nas amostras de HA. A razão de aspecto também diminui em comparação com as amostras puras. Estes resultados indicam que o  $\text{Eu}^{3+}$  possui efeito inibitório no crescimento e cristalização das partículas de HA. Em outras publicações [30,256] um comportamento similar a este foi observado.

As micrografias obtidas por MEV para as amostras HAEu1100S e HAEu1100Q são apresentadas nas Figuras 6.9a e 6.9b, respectivamente. Estas amostras são compostas de partículas sinterizadas micrométricas sem segregações de fases. A composição obtida por EDS para as amostras HAEu1100S e HAEu1100Q são ilustradas nas Figuras 6.9c e 6.9d, respectivamente. As linhas representam os valores nominais da razão molar  $(Ca+Eu)/P = 1,667$  e  $Eu/Ca = 0,010$  e os pontos representam os valores obtidos para os distintos sítios analisados. É possível observar boa homogeneidade das amostras com poucas variações composicionais ao longo dos distintos sítios.

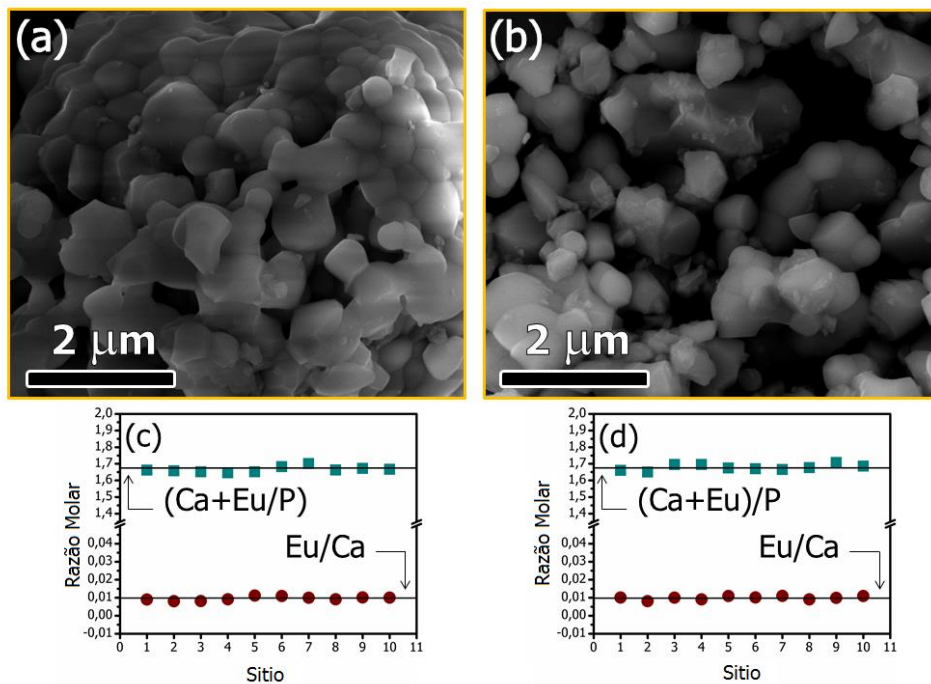


**FIGURA 6.7** – Análise estatística das dimensões das nanopartículas e suas razões de aspecto. (a) Largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HAEuRaw e, (b) largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HAEu600S.





**FIGURA 6.8** – Análise estatística das dimensões das nanopartículas e suas razões de aspecto. (a) Largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HARaw e, (b) largura média das partículas (nm), comprimento médio (nm) e razão de aspecto para a amostra HA600S.

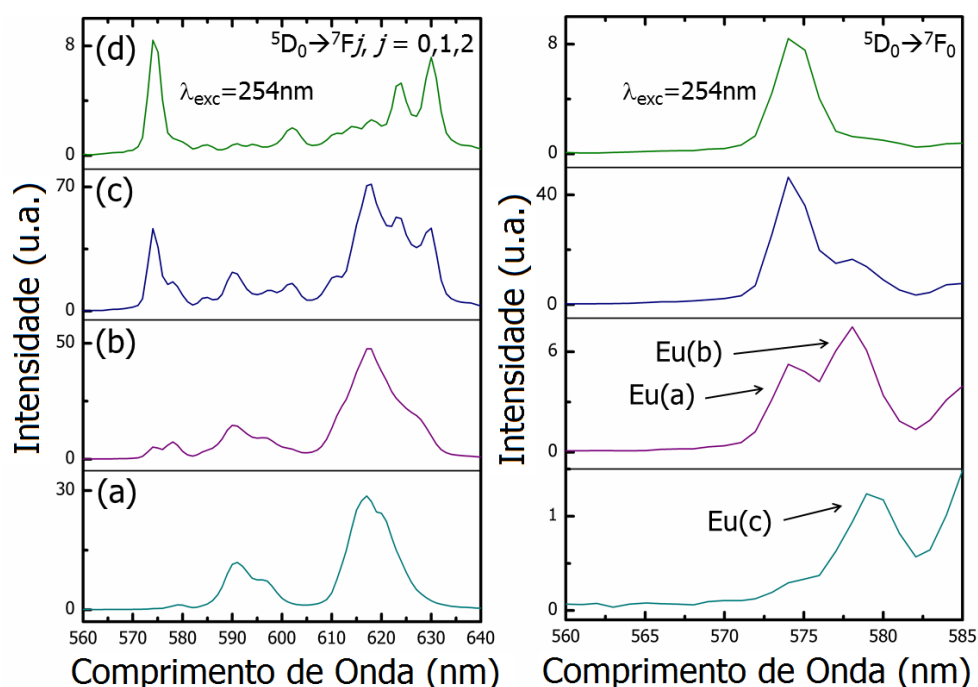


**FIGURA 6.9** – Micrografias obtidas pelo MEV e análise composicional por espectroscopia EDS. (a) Micrografia para a amostras HAEu1100S e (b) para a amostra HAEu1100Q. (c) Análise por EDS para a amostra HAEu1100S e (d) para a amostra HAEu1100Q. As linhas consistem nos valores ideais  $(Ca+Eu)/P = 1.667$  e  $Eu/Ca = 0.010$ .

### 6.3.3 – Propriedades fotoluminescentes: Excitação não sítio-seletiva

Os espectros de emissão para todas as amostras contendo  $\text{Eu}^{3+}$  obtidas por excitação não sítio-seletiva em 254 nm a 300 K são ilustradas na Figura 6.10. Na amostra HAEuRaw (Figura 6.10a) e HAEu600S (Figura 6.10b), os espectros são consistentes com outros obtidos na literatura para nanopartículas de HA [30,79,84,85,259]. Por outro lado, os espectros para as amostras HAEu1100S e HAEu1100Q possuem similaridades com os obtidos para HA tratada termicamente em temperaturas mais elevadas [56,59] e apatitas naturais [249].

As linhas observadas nos espectros de emissão podem ser designadas às transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$ . Especificamente, a região entre 570 e 580 nm é aonde a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  normalmente ocorre. No presente trabalho, um pequeno ombro em 579 nm pode ser observado na amostra HAEuRaw. Quando o tratamento térmico é empregado, esse ombro se decompõe em duas outras bandas com máximos em aproximadamente 573 e 577 nm. Uma vez que a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  é composta por níveis não-degenerados de energia, as bandas observadas podem estar relacionadas ao  $\text{Eu}^{3+}$  em distintos entornos. Os sítios correspondentes em 573, 577 e 579 nm serão denominados como Eu(A), Eu(B) e Eu(C), respectivamente.



**FIGURA 6.10** – Excitação não seletiva a 254 nm em temperatura ambiente das amostras dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$ . As linhas de emissão das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$   $j=0,1,2$  (esquerda) e  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  (direita) podem ser identificadas para as amostras (a) HAEuRaw, (b) HAEu600S, (c) HAEu1100S e, (d) HAEu1100Q.

A razão de intensidade entre as bandas Eu(A) e Eu(B), correspondente à transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ , varia com o aumento da temperatura de tratamento térmico e também com os distintos métodos de resfriamento. Na amostra resfriada rapidamente uma maior diferença de intensidade é observada. Este comportamento pode estar associado à preferência pelo entorno Eu(A) com a temperatura e com o resfriamento rápido.

As outras transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$  podem dar importantes informações sobre os sítios do Eu, como por exemplo o grupo de simetria e a intensidade do campo cristalino. Ademais, devido à hipersensibilidade das bandas  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ , o  $\text{Eu}^{3+}$  é particularmente interessante para monitorar mudanças em um material hospedeiro [124,127,260–262]. Entretanto, o estudo dessas bandas por caracterização não sítio-seletiva é custoso visto que ocorre a mistura das emissões dos distintos entornos. Assim, outras técnicas são necessárias em que informações sítio-seletiva possam ser reveladas.

#### 6.3.4 – Espectroscopia sítio-seletiva do $\text{Eu}^{3+}$ pela técnica de TRFLN

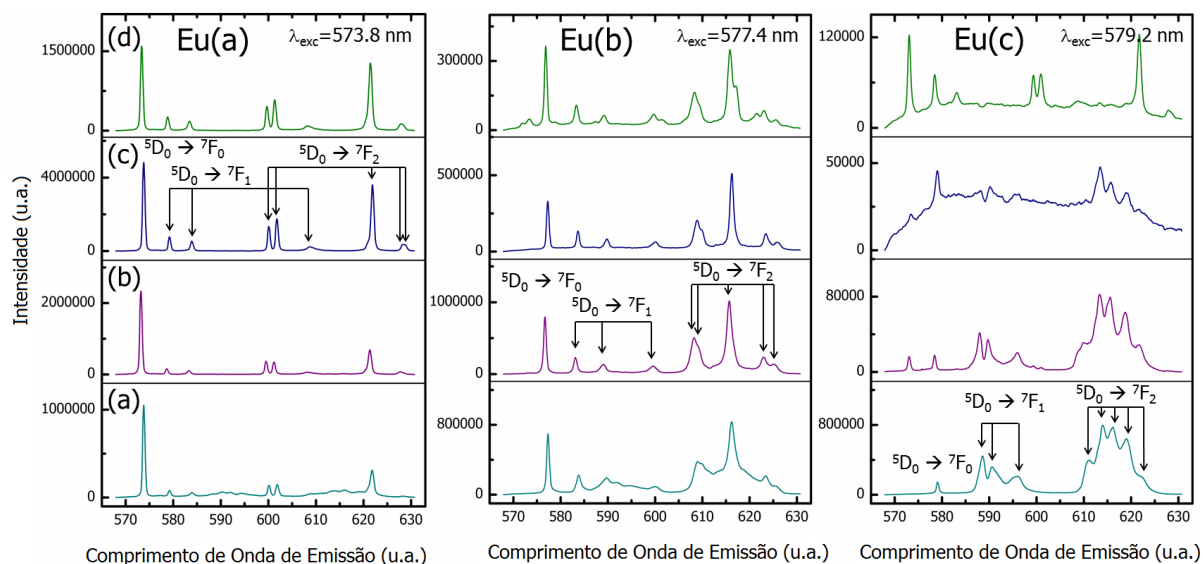
As propriedades ópticas do Eu trivalente são sensíveis ao entorno local. Uma vez que os estados  ${}^5D_0$  e  ${}^7F_0$  são não degenerados sobre nenhuma simetria, a estrutura da emissão  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$  é somente determinada pela separação dos níveis terminais causada pelo campo cristalino local. Além disso, o nível  ${}^7F_0$  também é não degenerado. Assim, a excitação sítio-seletiva na banda de absorção  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  pode ser realizada usando espectroscopia TRFLN com o intuito de discernir os distintos entornos do  $\text{Eu}^{3+}$ .

Os espectros TRFLN com linha ressonante resolvida no tempo para as transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  das amostras dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$  foram obtidas a 10 K, usando distintos comprimentos de onda ressonante na banda de absorção  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  com um tempo de *delay* igual a 10  $\mu\text{s}$ . Dependendo do comprimento de onda de excitação o espectro de emissão apresenta características diferentes, principalmente relacionadas à intensidade das transições e às suas separações. A Figura 6.11 ilustra os espectros correspondentes às transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  para todas as amostras ao excitar em 573,8, 577,4 e 579,2 nm. Nestes comprimentos de onda a intensidades das linhas alcançam os seus maiores valores, correspondendo aos entornos Eu(A), Eu(B) e Eu(C), respectivamente.

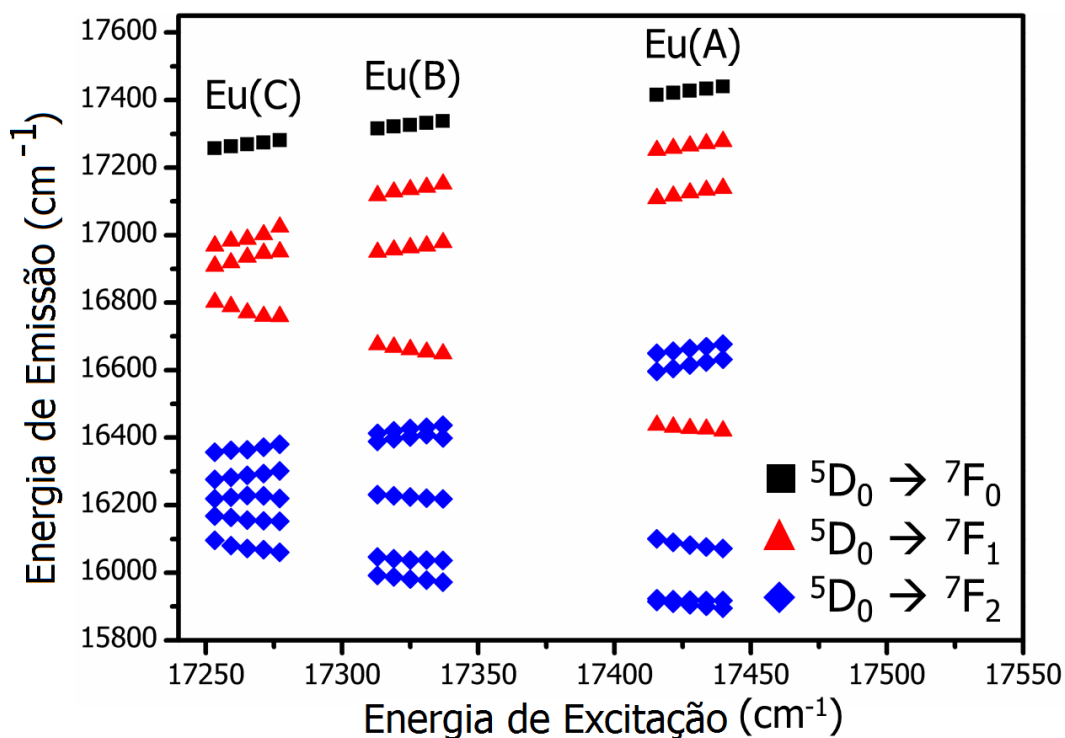
Conforme pode-se observar na Figura 6.11, os espectros com excitação em 573,8 nm (sítio A) mostram um comportamento similar aos observados em apatitas dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$  [245,263]. Nestes espectros, a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  possui alta intensidade e energia do nível  ${}^5D_0$ . Além disso, existe uma significativa separação das componentes *Stark* com sobreposição dos níveis  ${}^7F_1$  e  ${}^7F_2$ , indicando a presença de um campo cristalino amplo e assimétrico [56,251]. Os espectros obtidos com excitação em 577,4 nm (sítio B) mostram um comportamento distinto principalmente na separação, na posição das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  e as relativas intensidades. No caso do sítio A a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  é mais intensa quando comparada com a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ , enquanto que para o sítio B o oposto ocorre.

As características dos espectros obtidos pela excitação em 579,2 nm que corresponde ao sítio C variam de acordo com a amostra analisada assim como ilustrado na Figura 6.11. A emissão desse sítio é somente seletivamente resolvida para as amostras HAEuRaw e HAEu600S. Comparando esses espectros com os obtidos em 573,8 e 577,4 nm, as linhas são mais amplas e a intensidade da transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  é significativamente menor, indicando que a força do campo cristalino é reduzida. Este sítio não é observado para as amostras HAEu1100S e HAEu1100Q, o que sugere que o tratamento térmico a alta temperatura favorece as posições A e B para o  $\text{Eu}^{3+}$ . Para os três comprimentos de onda de excitação, três níveis *Stark* para a transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$  e cinco para a transição hipersensível  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  são observadas, indicando que o  $\text{Eu}^{3+}$  está localizado em sítios cristalinos com simetria  $C_{2v}$  ou inferior.

A Figura 6.12 ilustra a energia de emissão para as transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  em função da energia de excitação para os três sítios. Como se pode observar, a separação diminui do sítio A para o C. Além disso, a mistura dos níveis  ${}^7F_1$  e  ${}^7F_2$  somente é observada no sítio A, que corresponde ao campo cristalino mais assimétrico. A continuidade do deslocamento de frequência de emissão com a frequência de excitação indica uma boa coerência na atribuição de cada componente das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  nos três entornos majoritários para o  $\text{Eu}^{3+}$  [251].



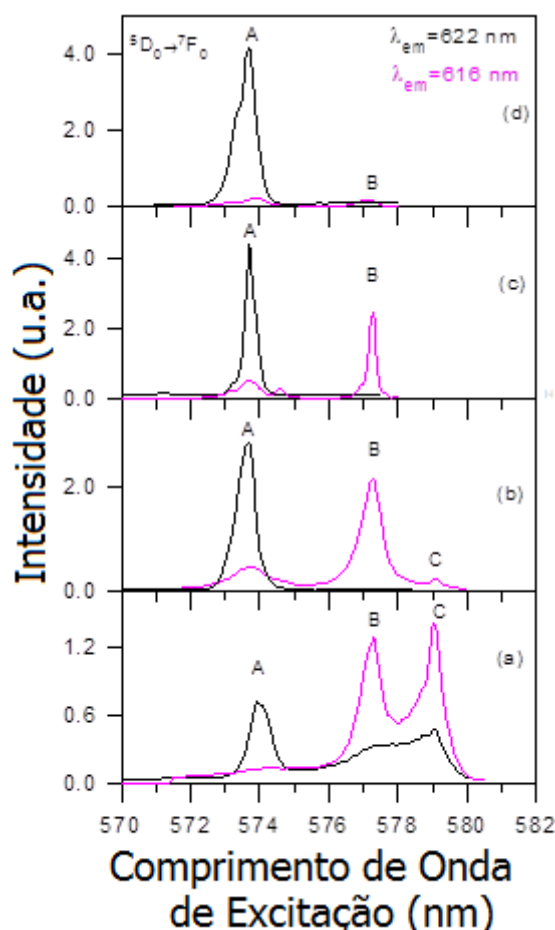
**FIGURA 6.11** – Emissões  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  para o  $\text{Eu}^{3+}$  obtidas em três comprimentos de excitação distintos na banda de absorção  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  para (a) HAEuRaw, (b) HAEu600S, (c) HAEu1100S, e (d) HAEu1100Q.



**FIGURA 6.12** – Energias das transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{0-2}$  do  $\text{Eu}^{3+}$  na amostra HAEuRaw em função da energia de excitação na banda de absorção  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ .

Os espectros de excitação correspondentes às transições  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  foram obtidas para todas as amostras coletando a luminescência em 622 e 616 nm que, por sua vez, correspondem às componentes *Stark* mais intensas para a emissão  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  nos sítios A e B, respectivamente. Conforme ilustrado na Figura 6.13, o espectro de excitação para a amostra HAEuRaw (Figura 6.13a) mostra que para

ambos os comprimentos de onda de emissão os três picos em 573,8, 577,4 e 579,2 nm, correspondentes aos três sítios para o  $\text{Eu}^{3+}$ , estão presentes. No caso da amostra HAEu600S (Figura 6.13b), o espectro obtido ao coletar a luminescência em 622 nm mostra o pico do entorno de 573,8 nm referente ao sítio A, ao passo que no caso do espectro obtido pela coleta da luminescência em 616 nm, os três picos correspondentes aos três sítios do  $\text{Eu}^{3+}$  estão presentes, onde o sítio B é o mais intenso. Os espectros de excitação para as amostras HAEu1100S e HAEu1100Q na Figuras 6.13c e 6.13d, respectivamente, não mostram o pico correspondente ao sítio C, corroborando os resultados nos espectros de emissão. Além disso, enquanto no caso da amostra HAEu1100S os sítios A e B estão presentes, a intensidade da banda correspondente ao sítio B é muito baixa na amostra HAEu1100Q, demonstrando que a ocupação do sítio A pelo  $\text{Eu}^{3+}$  é predominante para esta amostra.



**FIGURA 6.13** – Espectros de excitação a baixa temperatura (10 K) da transição  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  para todas as amostras obtidas ao coletar a luminescência na emissão  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ . (a) HAEuRaw, (b) HAEu600S, (c) HAEu1100S, e (d) HAEu1100Q.

A presença do  $\text{Eu}^{3+}$  em distintos entornos também é confirmada pela medida de tempo de vida do nível  $^5D_0$ . Tal como esperado, se existem distintos sítios para o  $\text{Eu}^{3+}$ , o tempo de vida do estado  $^5D_0$  depende do comprimento de onda de excitação. Neste sentido, o tempo de vida do estado  $^5D_0$  em distintos comprimentos de onda foi coletada na banda de luminescência da componente *Stark* de maior intensidade para a transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ . Os resultados são apresentados na Tabela 6.1 para as amostras HAEu600S, HAEu1100S e HAEu1100Q. Os decaimentos temporais obtidos com excitação em 573,8 nm (sítio A) e 577,4 nm (sítio B) nos quais os sítios A e B para o  $\text{Eu}^{3+}$  foram seletivamente resolvidos podem ser descritos por uma função monoexponencial. A partir da Tabela 6.1, é possível notar que em todos os casos o maior tempo de vida corresponde ao comprimento de excitação de 577,4 nm (Sítio B), ao passo que para a excitação em 573,8 nm (sítio A) o tempo de vida é menor. O decaimento observado ao excitar em 579,2 nm para a amostra HAEu600S pode ser descrita por uma função biexponencial. A componente mais longa do decaimento tem um tempo de vida de 1 ms enquanto que a componente rápida tem um decaimento com tempo de vida igual a 0,22 ms. Este comportamento sugere que neste comprimento de onda mais do que um único sítio é excitado.

**TABELA 6.1** – Tempos de vida para o nível  $^5D_0$  obtidos pela excitação a 573,8 nm, 577,4 nm e 579,2 nm e coletando a luminescência da emissão  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  para a amostra HAEu600S, HAEu1100S e HAEu1100Q.

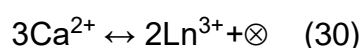
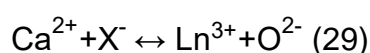
<b>Amostra</b>	<b>Eu(A)</b>	<b>Eu(B)</b>	<b>Eu(C)</b>
<b>HAEu600S</b>	0,95 ms	1,50 ms	0,22–1 ms
<b>HAEu1100S</b>	0,73 ms	1,03 ms	–
<b>HAEu1100Q</b>	0,69 ms	1,06 ms	–

### 6.3.5 – Preferências de entornos do $\text{Eu}^{3+}$ e mecanismos de estabilização

De acordo com os resultados por DRX, MEV e EDS, o  $\text{Eu}^{3+}$  foi incorporado à rede da HA em todas as amostras. Os estudos da FL revelaram que o  $\text{Eu}^{3+}$  está distribuído entre três sítios majoritários na HA: Eu(A), Eu(B) e Eu(C). De acordo com a bibliografia, os lantanídeos incorporam-se à estrutura da HA por substituição isomórfica das espécies de Ca da rede [264]. Especificamente, foi proposta a incorporação do  $\text{Eu}^{3+}$  em ambos os sítios cristalográficos Ca(1) e Ca(2) [28,56,248]. Entretanto, o aparecimento de todas as componentes dos estados  $^7F_1$  e  $^7F_2$  indicam uma simetria  $C_{2v}$  ou inferior para todos os sítios. Assim, a incorporação do

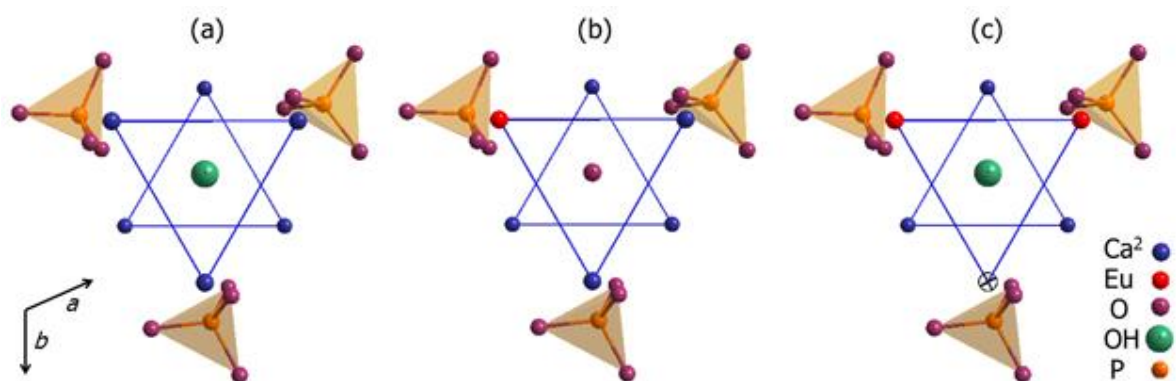
Eu<sup>3+</sup> na posição Ca(1) pode ser descartada desde as condições de síntese até os distintos tratamentos térmicos devido a sua simetria  $C_3$ . Por outro lado, a menor simetria ( $C_s$ ) para o sítio Ca(2) faz dele o entorno mais provável para o Eu<sup>3+</sup>.

Na estrutura da HA mecanismos de compensação de carga são necessários para estabilizar o Eu trivalente no lugar de um Ca divalente. Assim, é possível que existam distintas distribuições das espécies na vizinhança do Eu<sup>3+</sup>. Como resultado, distintos entornos em um mesmo sítio cristalográfico podem surgir para o Eu<sup>3+</sup>. Dois mecanismos são bem aceitos para lantanídeos na estrutura de apatitas e são representados pela Equação 29 e a Equação 30 [265]:



Onde Ln<sup>3+</sup> é uma espécie trivalente de lantanídeos, como o Eu<sup>3+</sup>, X pode ser Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> e OH<sup>-</sup>, e  $\otimes$  é vacância em Ca [56,249]. O mecanismo na Equação 29 leva a uma ligação Eu–O com significativo caráter covalente e possivelmente explica o forte e assimétrico campo cristalino para o Eu(A). Quando o Eu<sup>3+</sup> é estabilizado pela Equação 29, é plausível concluir que esta espécie ficará nas proximidades das espécies O que o estabiliza presentes nos canais hexagonais da HA. Esse fato indica a preferência do Eu<sup>3+</sup> pelo sítio Ca(2). Esta possível interpretação para o comportamento observado no presente estudo para o entorno Eu(A) foi previamente mencionada em trabalhos científicos centrados em estruturas do tipo apatita [251,263,266] e em algumas outras estruturas [267,268]. Por outro lado, o mecanismo na Equação 30 é mais aceitável para as características luminescentes observadas para o Eu(B). Uma interpretação similar foi obtida por KARBOWIAK e HUBERT [245] na FA. Neste caso, três espécies Ca(2) são substituídas por dois Eu<sup>3+</sup> deixando uma vacância em Ca(2). A Figura 6.14 ilustra um modelo geral para ambos os mecanismos.

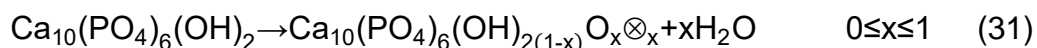




**FIGURA 6.14** – Modelos gerais para a alocação do  $\text{Eu}^{3+}$  na rede cristalina da HA. (a) representação dos canais hexagonais da HA mostrando os triângulos de espécies  $\text{Ca}(2)$ , o grupo OH dentro do canal formado e três tetraedros  $[\text{PO}_4]$  vizinhos. (b) consiste no mecanismo representado pela Equação 29 e, (c) a substituição pelo mecanismo representado pela Equação 30.

A principal força motriz para o sítio  $\text{Eu}(A)$  é a presença de espécies O desprotonadas na estrutura. De acordo com os estudos luminescentes, o aumento de temperatura promove uma preferência por este sítio. Os resultados obtidos por FTIR suportam esta interpretação. Assim como observado na Figura 6.4, existe um aumento na diferença entre a razão  $\text{OH}/\text{PO}_4$  em função da temperatura para as amostras resfriadas lentamente com  $\text{Eu}^{3+}$  em comparação com as puras, indicando que a quantidade de espécies  $\text{Eu}(A)$  estabilizadas pela Equação 29 aumenta no sentido  $\text{HAEuRaw} \rightarrow \text{HAEu600S} \rightarrow \text{HAEu1100S}$ .

Para as amostras com resfriamento rápido o entorno  $\text{Eu}(A)$  é fortemente favorecido, assim como observado pela luminescência e pela razão  $\text{OH}/\text{PO}_4$ . Acima de  $900\text{ }^\circ\text{C}$  processos de desidroxilação na HA se tornam significativos e se mantêm até aproximadamente  $1150\text{ }^\circ\text{C}$ . Essa reação é mostrada pela Equação 31 [45,252,253]:



Onde  $\otimes$  corresponde a uma vacância em H. Esse mecanismo é reversível e dependente da velocidade de resfriamento das amostras. Com o processo de resfriamento rápido, mais O desprotonado é mantido na estrutura, assim como observado na razão  $\text{OH}/\text{PO}_4$  para a amostra pura HA1100Q em comparação com a HA1100S com resfriamento lento. Com a presença de  $\text{Eu}^{3+}$ , a razão diminui significativamente (amostra HAEu1100Q) indicando um aumento da quantidade de O

desprotonado estabilizado na estrutura. Ao mesmo tempo, foi observado pela luminescência que o Eu(A) é favorecido nestas condições. Assim, os canais hexagonais mais ricos em O na amostra da HAEu1100Q promovem novas ligações Eu–O e, assim, modificam o entorno de B para A. O aumento na intensidade da banda Eu–O no FTIR com o esfriamento rápido também suportam estas interpretações.

O espectro de excitação na Figura 6.13 ainda revela a formação de um ombro em 573,2 nm na amostra HAEu1100Q. A presença deste ombro na banda correspondente ao entorno Eu(A) (573,8 nm) foi atribuída ao arranjo *cis/trans* de espécies Eu(A) próximas nos canais [251,269]. Já que mais espécies Eu<sup>3+</sup> são estabilizadas por ligações Eu–O como resultado do resfriamento rápido, estas distribuições são mais prováveis de acontecer.

O efeito do resfriamento no entorno do Eu é diferente ao encontrado quando se fazem substituições iônicas com outras espécies, como no caso do Cu [53]. Os resultados na luminescência presentes na Figura 6.11d (HAEu1100Q) não diferem significativamente das características da Figura 6.11c (HAEu1100S). Assim, o Eu<sup>3+</sup> provavelmente não incorporou nos canais hexagonais formando cadeias O–Eu–O. Entretanto, a distribuição do Eu<sup>3+</sup> nos entornos Eu(A) e Eu(B) claramente se alteram na amostra HAEu1100Q onde o entorno Eu(A) é preferenciado.

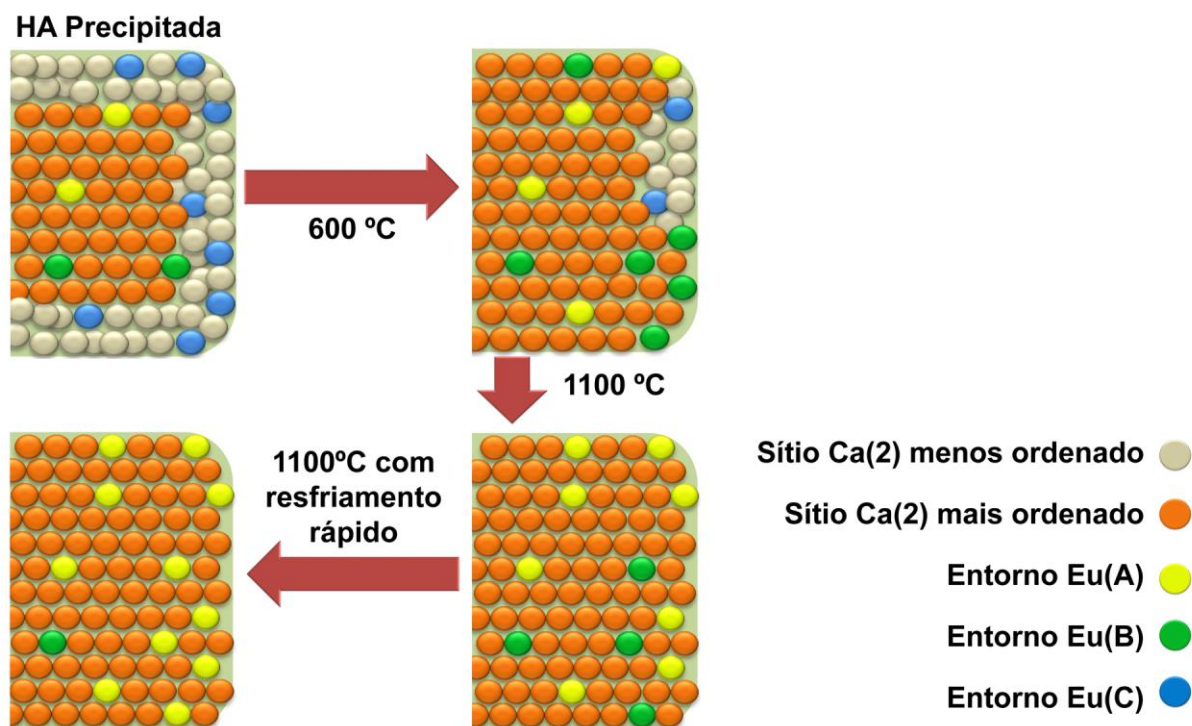
Por outro lado, a origem do sítio com transição  $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$  em aproximadamente 579 nm foi discutida previamente na literatura. Em FA precipitada a temperatura ambiente, este sítio foi atribuído à presença de Eu<sup>3+</sup> na posição Ca(1) [245]. Entretanto, HOLLIDAY *et al.* [246] mostraram evidências que este entorno pode estar associado ao acúmulo de Eu<sup>3+</sup> em partes amorfas presentes nas fronteiras de grão da HA de baixa cristalinidade. Em outro estudo [247], demonstrou-se que este entorno amorfo desaparece com o tratamento térmico a 700 °C, dando origem a três sítios com emissões características similares às encontradas ao Eu(A), Eu(B) e Eu(C). O primeiro sítio foi atribuído à incorporação de Eu<sup>3+</sup> na posição Ca(2). Os outros dois foram identificados como entornos transitórios não pertencentes à posição Ca(2), pois os autores somente observaram um desdobramento em 3 componentes e 4 componentes para as transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$  e  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ , respectivamente. Entretanto, os resultados demonstrados no presente trabalho indicam que todos os entornos são da posição Ca(2), pois todas as componentes possíveis das transições  $^5D_0 \rightarrow ^7F_{1,2}$  podem ser identificadas. Em estudos com outras apatitas foram obtidos espectros de emissão similares ao espectro seletivo do Eu(C) quando as amostras são submetidas a

tratamentos superiores a 1100 °C [270,271]. O perfil de emissão referente a este sítio foi atribuído ao campo cristalino obtido pela ocupação do  $\text{Eu}^{3+}$  na posição Ca(2). Isso reforça que este sítio, no nosso caso com a HA, também deva ser resultado da introdução do Eu no sítio Ca(2). Entretanto, na HA este sítio é transitório visto que a partir de 600 °C a sua presença é significativamente minimizada.

De maneira geral, a incorporação do  $\text{Eu}^{3+}$  no sítio Ca(2) para a HA é atribuída após a realização de tratamentos térmicos ou por sínteses a altas temperaturas [28,56,246,247]. É importante ressaltar a observação neste estudo da presença de todos os sítios referentes ao Ca(2) em amostras recém-preparadas por precipitação química em solução aquosa.

O campo cristalino ao redor do Eu(C) é reduzido levando em consideração a separação das bandas  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_{1,2}$ . Este fato, juntamente com a presença de bandas amplas e a baixa intensidade da transição  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$  indicam que o  $\text{Eu}^{3+}$  pode estar presente em sítios Ca(2) mais desordenados originários de distorções e vacâncias que o estabilizam na estrutura. Isto explicaria as similaridades espectrais e proximidade energética das bandas observadas com o Eu(B), que é estabilização por vacâncias assim como ilustra a Equação 30. Sabe-se que o fosfato amorfo atua como precursor na síntese da HA [181] e que a superfície das nanopartículas de HA possuem composição diferente e maior desordem em relação ao *bulk* [185,186,188,246]. Assim, resquícios de sítios menos ordenados poderiam estar presentes nas partículas dando origem ao sítio Eu(C). Outra hipótese é que o  $\text{Eu}^{3+}$  induza a uma amorfização local na superfície da matriz. Como este entorno é meramente transitório, o tratamento térmico aumenta a ocupação dos sítios Eu(B) estabilizados por vacâncias com um entorno mais ordenado e um campo cristalino mais forte atuando sobre ele. Com o aumento da temperatura também ocorre um aumento na presença de vacâncias em H com conseqüente favorecimento na estabilização do Eu por ligações Eu–O (sítio A) que é o entorno termodinamicamente mais estável.

A distribuição das espécies na faixa de temperatura estudada e com distintas etapas de resfriamento são resumidas na Figura 6.15. Primeiro, o  $\text{Eu}^{3+}$  tende a estar presente nos três sítios observados, porém majoritariamente no entorno Eu(C). Em temperaturas intermediárias, ocorre uma significativa supressão deste sítio. A altas temperaturas o sítio Eu(B) e Eu(A) coexistem com certa preferência por este último. Com a etapa de resfriamento rápido o sítio Eu(A) é significativamente favorecido.



**FIGURA 6.15** – Modelo geral para a ocupação de  $\text{Eu}^{3+}$  nos sítios Ca(2) presentes em amostras de HA obtidas por precipitação a 90 °C e após distintos tratamentos térmicos.

## 6.4 – Conclusões

Neste capítulo foram obtidas com êxito nanopartículas de HA dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$  pela metodologia de precipitação química. Os resultados por DRX, FTIR, MEV e o efeito inibitório do  $\text{Eu}^{3+}$  na cristalização e crescimento das nanopartículas de HA demonstram que o  $\text{Eu}^{3+}$  foi incorporado na estrutura cristalina da HA.

Os estudos da FL revelaram informações sítio-seletivas para os distintos entornos do  $\text{Eu}^{3+}$  presentes na estrutura. Na amostra recém-preparada foram observados três entornos chamados de Eu(A), Eu(B) e Eu(C) todos relacionados à ocupação do sítio Ca(2) da estrutura da HA. Além disso, foi demonstrado que todos estes entornos podem ocorrer em amostras recém-preparadas.

Com base nestes resultados pode-se propor o seguinte mecanismo para a ocupação do  $\text{Eu}^{3+}$  na estrutura da HA. O Eu(C) pode ser referente a sítios Ca(2) com maior grau de desordem e os sítios Eu(A) e Eu(B) em sítios mais ordenados. Os sítios Eu(C) e Eu(B) podem ser estabilizados por defeitos e vacâncias e o Eu(A) por ligações Eu–O com um forte caráter assimétrico de campo cristalino.

As amostras de HA dopadas com  $\text{Eu}^{3+}$  foram submetidas a estudos térmicos. Os resultados demonstraram que a estrutura da HAEu é estável até 1100 °C sem a presença de fases secundárias. O papel da temperatura nas mudanças estruturais da HA foram monitoradas pelas alterações na distribuição do  $\text{Eu}^{3+}$  nos possíveis sítios observados.

As principais alterações podem ser resumidas da seguinte maneira: (1) o tratamento térmico a 600 °C reduz a presença dos sítios menos ordenados Eu(C) e aumenta os entornos Eu(A) e Eu(B); (2) o aumento de temperatura a 1100 °C favorece o entorno Eu(A) pelo aumento de espécies estabilizadas por ligações Eu-O; (3) o resfriamento rápido da amostra após o tratamento térmico a 1100 °C promove um significativo aumento nas vacâncias em H e o sítio Eu(A) se torna majoritário.

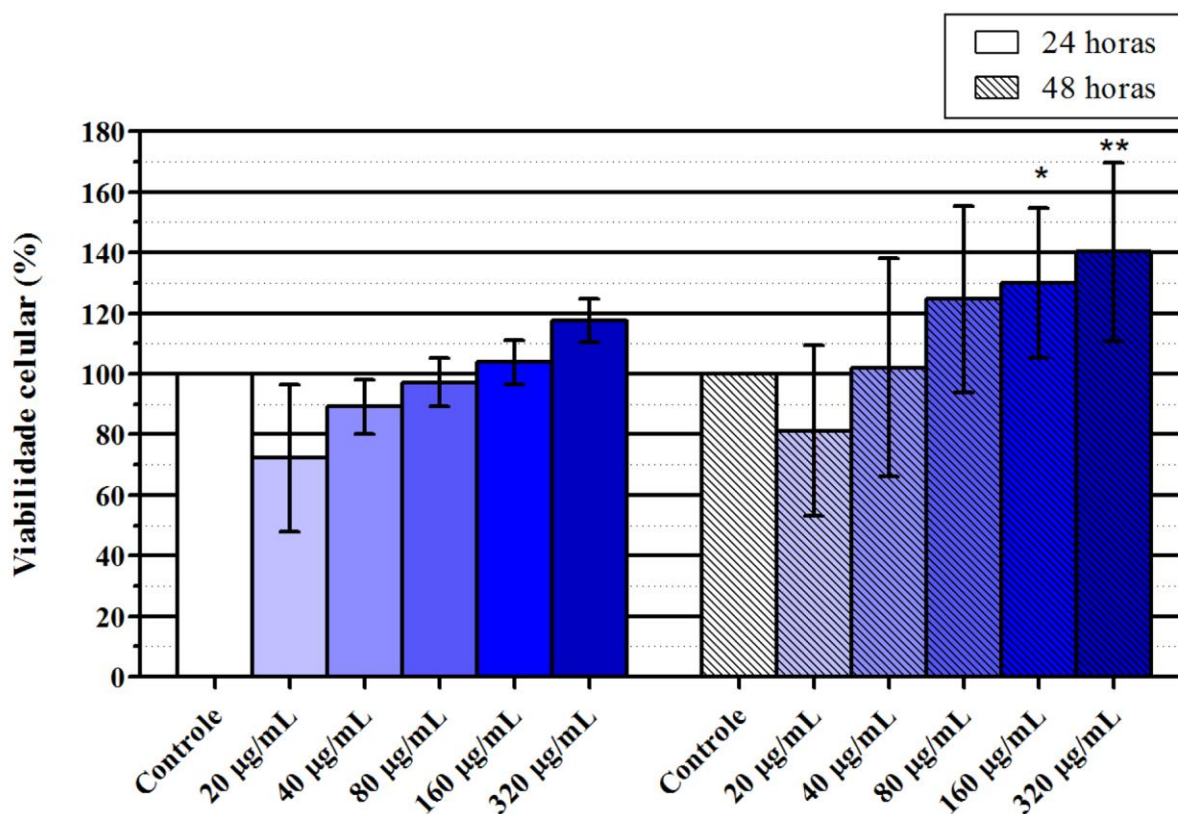


## CAPÍTULO 7 – RESULTADOS PRELIMINARES PARA FUTURAS APLICAÇÕES

O estudo descrito no Capítulo 5 demonstra um simples procedimento para se obter nanopartículas de HA com propriedades ópticas melhoradas. Uma vez que intensas emissões na HA com potencial de aplicação em bioimagem são normalmente obtidas ao se utilizar rotas sintéticas complexas e com vários aditivos orgânicos [7–10,272] ou pela dopagem com lantanídeos ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ , etc.) [11,12,273], os materiais obtidos na presente tese possuem potencial para serem utilizados como biomarcadores de custo reduzido, metodologia de síntese simples e elevada biocompatibilidade. Além disso, em procedimentos em que um dos objetivos é apresentar a localização das nanopartículas de HA, é comum o uso de corantes orgânicos para tal tarefa [274]. Com o presente procedimento, esta etapa de funcionalização com uma espécie cromófora orgânica pode ser evitada.

Assim, resultados preliminares são apresentados neste capítulo com o objetivo de demonstrar o possível uso das nanopartículas de HA pura com FL intrínseca melhorada em procedimentos de marcação celular, e avaliar a biocompatibilidade das mesmas. Para tanto, foi selecionada a amostra com melhor resposta de FL sintetizada por precipitação química e tratada termicamente a 350 °C, cujos resultados obtidos são apresentados no Capítulo 5.

Inicialmente, avaliou-se a viabilidade celular das nanopartículas de HA frente a cultura de células humanas. O estudo do impacto das mesmas em culturas *in vitro* de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (*HDFn*) foi realizada após um período de incubação de 24 e 48 h. No total, 5 concentrações de nanopartículas em solução foram estudadas pelo método de MTT (seção 3.2.13.2, Capítulo 3) e os resultados podem ser observados na Figura 7.1.



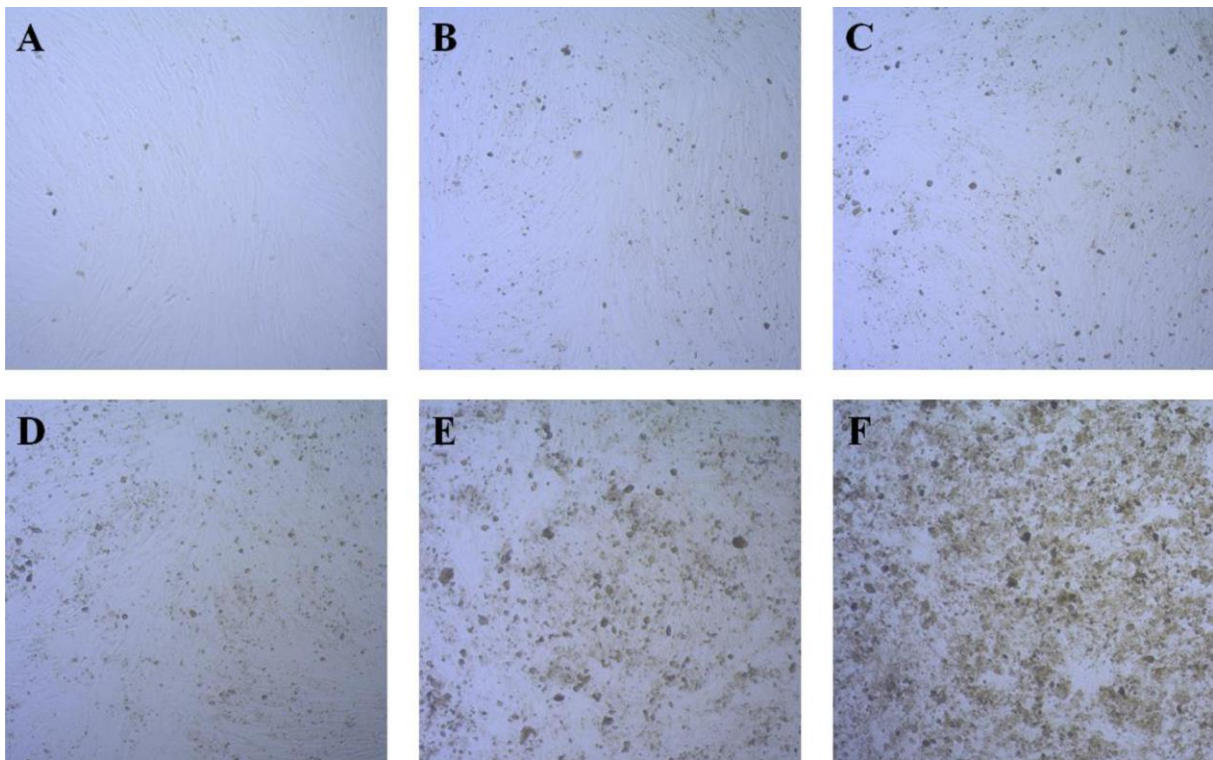
**FIGURA 7.1** – Viabilidade celular de fibroblastos que foram incubados com diferentes concentrações de nanopartículas de HA por 24 e 48 h. Os símbolos \* e \*\* indicam grupos que apresentaram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$  e  $p \leq 0,005$ , respectivamente) quando comparados com seu respectivo grupo controle.

Ao incubar as nanopartículas nas culturas celulares por um período de 24 h, observou-se que nenhuma das concentrações estudadas apresentou efeito citotóxico, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os valores de viabilidade dos grupos avaliados e o apresentado pelo grupo controle. O aumento do tempo de incubação das soluções para 48 h conservou o comportamento observado para 24 horas de incubação, excetuando-se os grupos expostos às soluções de 160 e 320 µg/mL (Figura 7.1). A utilização das duas maiores concentrações resultou em um aumento da atividade proliferativa dos fibroblastos dérmicos neonatais, que atingiram um valor médio de 130% e 140% de viabilidade celular ao serem comparados ao grupo que não foi exposto às nanopartículas de hidroxiapatita.

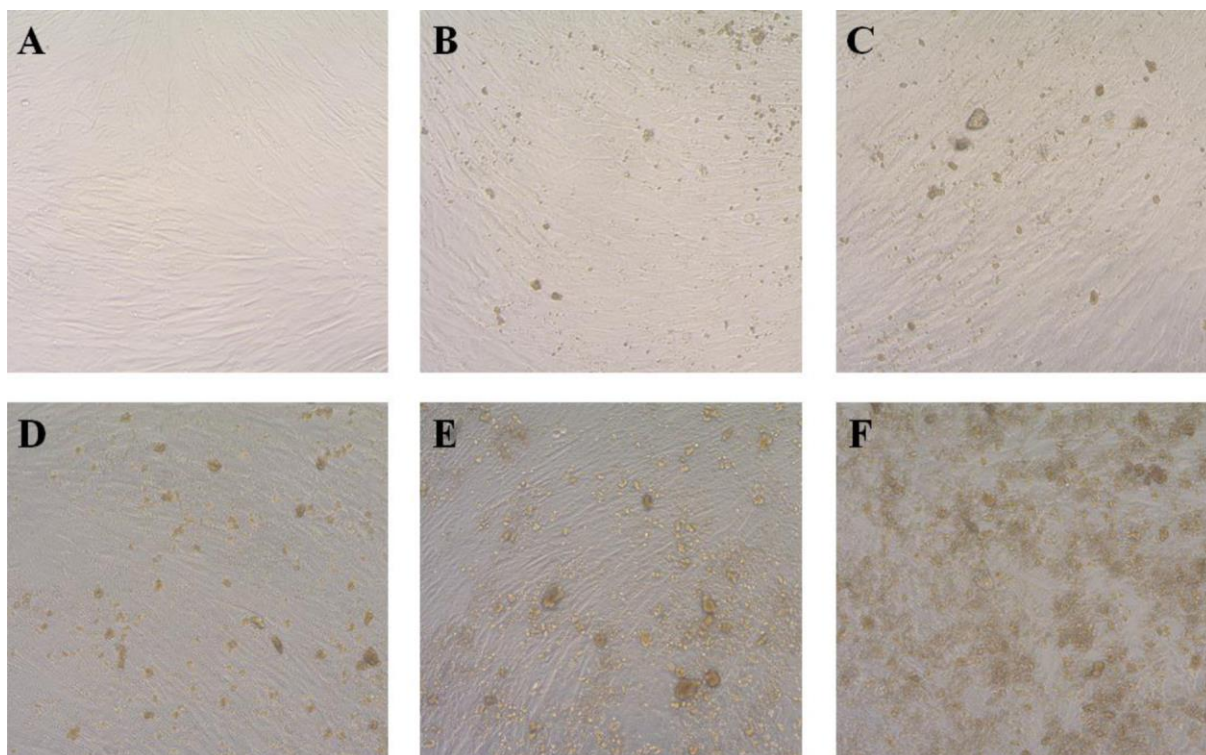
As imagens de microscopia com contraste de fase, tanto para 24 h de incubação quanto para 48 h (Figuras 7.2 e 7.3, respectivamente) indicam a presença de grânulos nos poços, mesmo quando utilizadas soluções de 20 µg/mL. Tais elementos, que são agregados das nanopartículas de HA, aumentam em tamanho e número com o aumento das concentrações empregadas nas amostras, porém não



aumentando com o período de contato com elas. A sua presença, no entanto, assim como as nanopartículas devidamente solubilizadas no meio, não indicam ter efeito sobre a morfologia das células, uma vez que as amostras incubadas com o material preservaram suas características morfológicas, como formato alongado e fusiforme, crescendo em forma de agregados com células paralelas entre si quando estão em elevada confluência.



**FIGURA 7.2** – Imagem de microscopia óptica com contraste de fase (aumento de 16X) de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (*HDFn*) incubados com: (a) meio de cultura e com soluções de nanobastões de hidroxiapatita de (b) 20, (c) 40, (d) 80, (e) 160 e (f) 320 µg/mL por 24 h.

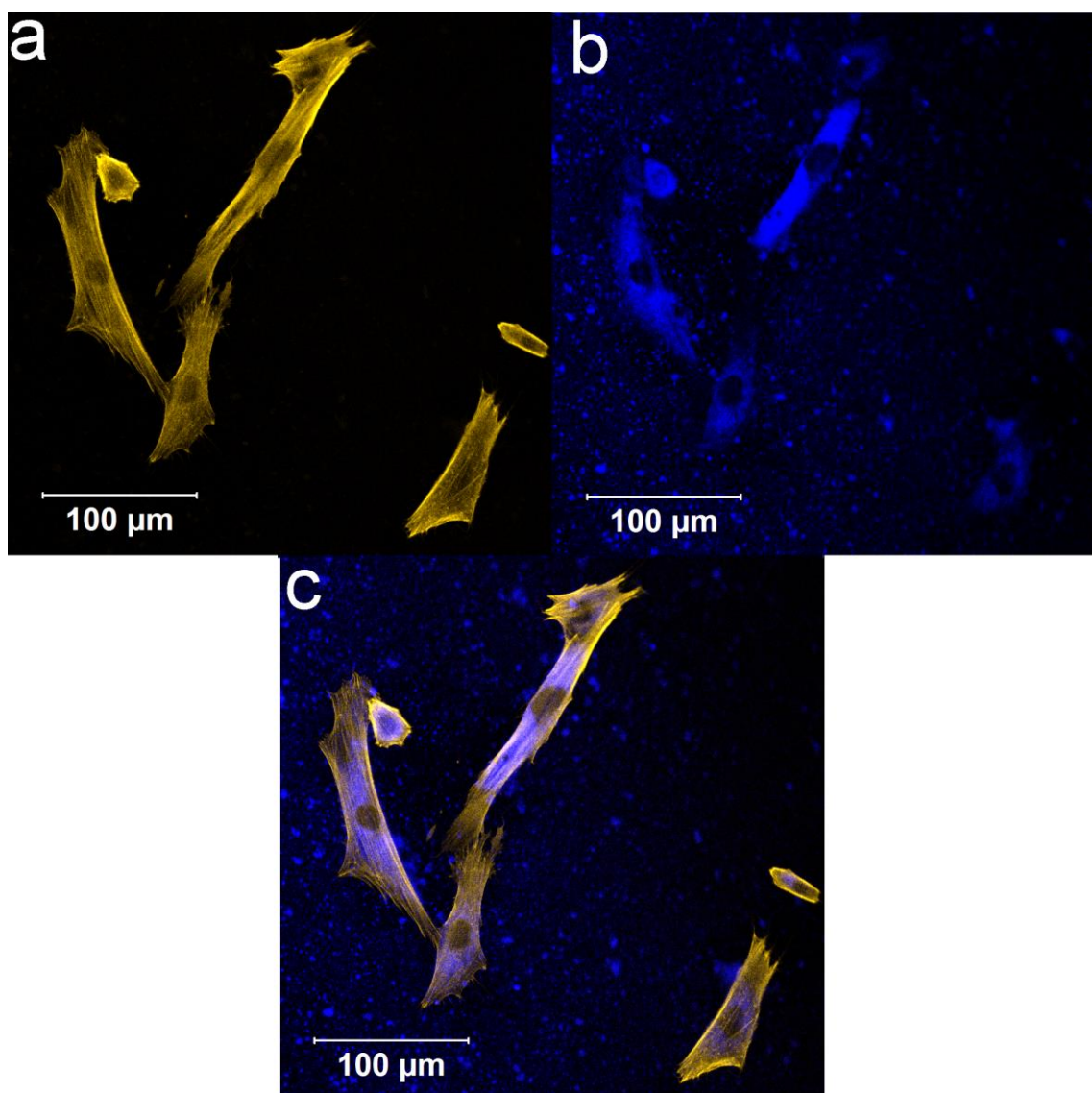


**FIGURA 7.3** – Imagem de microscopia óptica com contraste de fase (aumento de 16X) de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (*HDFn*) incubados com: (a) meio de cultura e com soluções de nanobastões de hidroxiapatita de (b) 20, (c) 40, (d) 80, (e) 160 e (f) 320 µg/mL por 48 h.

Para avaliar qualitativamente se o material estudado foi internalizado pelas células, imagens de microscopia confocal por fluorescência foram realizadas, sendo que as amostras foram incubadas com as nanopartículas (320 µg/mL) por 48 h e foi feita a marcação do citoesqueleto dos fibroblastos dérmicos através do uso da sonda fluorescente Alexa Fluor 532 Faloidina (Figura 7.4).

A microscopia confocal é uma técnica que permite realizar imagens de amostras mais espessas através da aquisição de imagens de um único ponto, evitando a interferência de grande parte da luz proveniente do espalhamento [275]. Através do uso da fluorescência de sondas, é possível observar diferentes estruturas e processos presentes em células. Como pode ser observado na Figura 7.4a, a marcação do citoesqueleto foi específica, evidenciada pela excitação da amostra com 514 nm, não havendo coloração amarela fora das células e havendo-se uma queda na intensidade da fluorescência que permite identificar a localização do núcleo. Alterando-se a excitação da amostra para 405 nm, pode-se observar a fluorescência das nanopartículas na coloração azul (Figura 7.4b). É possível observar o delineamento e citoplasma das células pela fluorescência mais intensa e uniforme no corpo celular. A estrutura nuclear torna-se mais evidente, uma vez que apresenta uma

intensidade de fluorescência menor. Verifica-se também a fluorescência de grânulos maiores, de diferentes tamanhos, nos espaços não ocupados pelos fibroblastos, evidenciando agregados de nanopartículas que não foram removidos da placa mesmo após as etapas de lavagem. A sobreposição das imagens do citoesqueleto e do material estudado evidencia uma colocalização de ambos, indicando que as nanopartículas são de fato internalizadas pelas células (Figura 7.4c). Somente pela sobreposição das imagens é possível observar que as nanopartículas não se distribuem de modo homogêneo pela célula, parecendo haver uma maior deposição na região mais próxima do núcleo e não em suas extremidades.



**FIGURA 7.4** – Imagens de microscopia confocal de fluorescência de fibroblastos dérmicos neonatais humanos (*HDFn*) incubados com nanopartículas de HA 320 µg/mL (azul) e marcados com Alexa Fluor 532 Faloidina (amarelo). Pode-se observar, no mesmo campo de imagem, a excitação (a) do marcador de citoesqueleto, (b) das nanopartículas e (c) a sobreposição da excitação da sonda e das nanopartículas de HA.

O retículo endoplasmático é uma organela intrinsicamente relacionada ao envelope nuclear e se distribui proximamente a ele, podendo representar um alvo para as nanopartículas, porém estudos com marcadores específicos para essa estrutura devem ser realizados para averiguar tal possibilidade. A fluorescência mais homogênea no interior das células é consistente com o conhecimento de que somente nanomateriais de menor tamanho são internalizados, sendo que os agregados maiores de nanopartículas permanecem no espaço extracelular.

Como conclusão deste estudo, evidenciou-se que a metodologia de síntese desenvolvida na tese é um método de obtenção de nanopartículas de HA biocompatíveis, com FL intrínseca melhorada e internalizáveis por células humanas. Assim, as nanopartículas de HA desenvolvidas no presente projeto possuem grande potencial para futuras aplicações em bioimagem. Entretanto, estudos mais detalhados devem ser futuramente realizados quanto à viabilidade do material frente aos sistemas fisiológicos.

## CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados e discussões descritos anteriormente, pode-se concluir que:

- Fases puras de HA com estrutura hexagonal foram sintetizadas pelo método de precipitação química, tanto para amostras com composição próxima ao da HA estequiometria como para a Ca-dHA e HA dopada com  $\text{Eu}^{3+}$ ;

- As propriedades morfológicas e estruturais das partículas de HA pura variam significativamente de acordo com o valor de pH de síntese e método de mistura dos precursores, bem como com a temperatura de tratamento térmico;

- Em especial, alterações nos parâmetros de síntese estudados levam a variações na densidade de defeitos em Ca, OH e protonação do cluster  $[\text{PO}_4]$ . Os parâmetros também alteraram o caminho químico e a cinética de cristalização das partículas, permitindo a formação de distintas formas, como bastões hexagonais, bastões, arrozos, fitas e agulhas;

- Já os tratamentos térmicos revelaram a presença de impurezas presas na rede, como  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  que, com a temperatura, são liberados ou decompostos, deixando na rede vacâncias e espécies  $\text{HA}\dots\text{H}^+$ , causando significativa contração na rede e aumento na desordem estrutural. A maiores temperaturas, uma elevada perfeição cristalina foi observada. Nestas condições, observa-se a decomposição de  $\text{CO}_3^{2-}$  e o importante aumento na densidade de OH na estrutura;

- As propriedades fotoluminescentes da HA mostraram-se dependentes das alterações na ordem-desordem estrutural das partículas induzidas por defeitos e nas variações morfológicas das mesmas.

- Com estas modificações, é possível aperfeiçoar as cores de emissão, partindo desde azul até branca-azulada e branca-amarelada. Estas duas últimas consistem nas melhores respostas fotoluminescentes e foram obtidas ao tratar a HA em temperaturas iguais a 350 e 400 °C;

- A amostra de HA pura tratada termicamente a 350 °C foi avaliada pelo método de MTT em linhagem de fibroblastos dérmicos neonatais humanos (*HDFn*), demonstrando a elevada viabilidade celular do sistema nanoparticulado. A capacidade de internalização das mesmas (*Uptake* celular) e de marcação celular pela FL intrínseca foram avaliadas por microscopia confocal, e demonstram serem

promissoras para aplicações em bioimagem. Neste sentido, evidenciou-se que a metodologia de síntese desenvolvida na tese é um método de obtenção de nanopartículas de HA biocompatíveis, com FL intrínseca melhorada e internalizáveis por células humanas.

- Por outro lado, a introdução de  $\text{Eu}^{3+}$  na mostrou-se eficiente no monitoramento das modificações estruturais ao longo dos distintos tratamentos térmicos;

- Através da técnica de espectroscopia TRFLN foi possível identificar com detalhe os entornos do  $\text{Eu}^{3+}$  na estrutura e como os mesmos variam de acordo com as condições do tratamento térmico.

- Em especial, identificou-se a presença de três entornos para a amostra precipitada, o que evidencia a sua maior desordem estrutural. A altas temperaturas e com a realização de *quenching* em  $\text{N}_2$ , é possível obter somente um entorno para o  $\text{Eu}^{3+}$ .

## CAPÍTULO 9 – PERSPECTIVAS DE NOVAS LINHAS DE PESQUISA

Como outras possíveis pesquisas pertinentes ao resultado obtido com o presente estudo, destaca-se:

- Estudo da FL da HA obtida em distintas temperaturas de síntese e a influência da conversão ACP → HA;
- Estudo da variação nos parâmetros de síntese (por exemplo concentração de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  no meio reacional) e condições de tratamento térmico (tempo e atmosfera dos tratamentos) para obter informações adicionais sobre o tipo de vacância e impureza responsável pela FL intrínseca da HA;
- Realização de cálculos teóricos focados na estrutura cristalina e eletrônica da HA para conciliar com os resultados empíricos;
- O efeito do modificador de rede na estrutura eletrônica e FL da HA através de substituições iônicas como Ca por Sr, Ba, Zn, Ag, etc;
- O efeito das espécies nos canais hexagonais ao comparar a FL de outras apatitas, como a flúorapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$ , cloroapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2]$  e bromoapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Br}_2]$ ;
- Estudo sítio-seletivo do  $\text{Eu}^{3+}$  na HA em função da concentração do dopante;
- Estudos sítio-seletivos de outras espécies de lantanídeos na HA, como o  $\text{Er}^{3+}$ ;





## APÉNDICE – RESUMEN EXTENSO DE LA TESIS

### **Título: Estudio, caracterización y propiedades de ortofosfatos multifuncionales**

#### **Objeto de estudio**

Propiedades estructurales, composicionales, morfológicas y fotoluminiscentes de la hidroxiapatita pura y dopada con  $\text{Eu}^{3+}$ .

#### **Objetivos de la investigación**

- Obtener por la metodología de precipitación química partículas de HA con distintas formas y composiciones, así como estudiar la fotoluminiscencia intrínseca de los materiales sintetizados;
- Sintetizar nanopartículas de HA por precipitación química y verificar la influencia de posteriores tratamientos térmicos en sus propiedades estructurales, composicionales y fotoluminiscentes intrínsecas;
- Sintetizar nanopartículas de HA substituidas con  $\text{Eu}^{3+}$  por la metodología de precipitación química y verificar la influencia de los tratamientos térmicos en las propiedades estructurales, composicionales y fotoluminiscentes del sistema. Realizar un estudio por técnicas sitio selectivas de caracterización de la fotoluminiscencia del  $\text{Eu}^{3+}$ .

Además de los objetivos primarios destacados anteriormente, la presente tesis tiene también como objetivo realizar un estudio preliminar que demuestre la posibilidad de utilización de los materiales desarrollados en futuras aplicaciones biomédicas, como en el campo de bioimagen.

#### **Planteamiento y metodología utilizados**

Con el objetivo de seleccionar la metodología de síntesis de los materiales, una profunda revisión de la literatura ha sido realizada cuanto a la

preparación de muestras de hidroxiapatita. De las que existen en los días actuales, se ha elegido la metodología de precipitación química acuosa. Esta es una ruta sintética que permite obtener materiales de una forma sencilla y barata, además de poder ser fácilmente utilizada para futuras producciones a larga escala de los materiales.

Específicamente, el primer objetivo de la tesis consiste en obtener partículas de HA distintas formas y composiciones. En la literatura, se sabe que estas características de la HA son sensiblemente dependientes de los parámetros utilizados en la síntesis por precipitación, como pH, temperatura, método de mezcla de los precursores, concentración de las soluciones iniciales, etc. En este sentido, esta técnica puede ser utilizada para introducir defectos de distintas naturalezas en la estructura de la HA, además de preparar partículas con distintas morfologías, con el objetivo de estudiar la influencia de tales variables en las propiedades fotoluminiscentes de las partículas. Así, después de probar las distintas variables de síntesis de la HA, se han seleccionados dos que proporcionan alteraciones considerables en los materiales finales. En este sentido, se ha estudiado la influencia del valor de pH y también la velocidad de adición del precursor de fosfato en el ordenamiento estructural (largo y corto alcance), propiedades morfológicas y fotoluminiscentes de la HA.

Las muestras han sido separadas en dos distintos grupos de estudio. El primer consiste en la síntesis con el control del valor de pH al añadir  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\text{pH}_{\text{final}} = 9,5-10,0$ ). Esta condición favorece la obtención de muestras de HA con composiciones cercanas a la relacionada a HA estequiométrica. Por otro lado, el segundo grupo consiste en la síntesis de los materiales en valores de pH más bajos ( $\text{pH}_{\text{final}} = 4,5-5,0$ ) al no añadir  $\text{NH}_4\text{OH}$ . En estas condiciones, muestras con concentraciones más elevadas de vacancias iónicas de Ca, OH pueden ser obtenidas. Además, se ha hecho un estudio variando el método de mezcla de los precursores, con el objetivo de verificar la influencia de este parámetro en la forma final de las partículas de cada grupo. Los métodos de mezcla son: (i) con el uso de una bomba de inyección (0,15 mL/min); (ii) bomba peristáltica (7,00 mL/min); (iii) verter una solución de los precursores sobre la otra (~600,00 mL/min). Primeramente, se preparó una solución acuosa con el precursor  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  99% (Sigma-Aldrich) y otra con el precursor  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  98+% (Strem Chemicals). A estas se llamaron solución 1 y 2, respectivamente. En el grupo en que se controló el pH se añadió  $\text{NH}_4\text{OH}$  (ACS, Acros) en ambas soluciones. Para la síntesis, se hizo la adición de la solución 2 sobre

la 1 de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Al realizar esta etapa, se obtuvo un precipitado blanco que fue envejecido en las mismas condiciones de síntesis por 2 horas. Las muestras fueron resfriadas en baño de hielo, lavadas por centrifugación con H<sub>2</sub>O y Álcool etílico y secadas en estufa por 24 horas a 80 °C. Las muestras fueron caracterizadas mediante espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia RAMAN, microscopia electrónica de barrido (MEB), espectroscopia óptica en las regiones ultravioleta/visible (UV-Vis) y espectroscopia fotoluminiscente (FL).

Una vez que al someter las partículas de HA sintetizadas por precipitación química a posteriores tratamientos térmicos puede llevar a distintos fenómenos, como gradual eliminación y descomposición de especies presas na rede (H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, etc.) introducción de nuevas especies de la atmósfera (OH<sup>-</sup>), aumento de orden estructural y procesos de sinterización, las propiedades estructurales y fotoluminiscentes intrínsecas de la HA pueden presentar potenciales alteraciones. Así, las características de la HA sintetizada por precipitación química no dependen solo de las variables de síntesis, sino que también de las condiciones de tratamiento térmico. En este sentido, el segundo objetivo de la tesis se cumplió al someter las nanopartículas de HA obtenidas en condiciones básicas con el uso de bomba peristáltica a distintas temperaturas de tratamientos térmicos. Las condiciones seleccionadas fueron: 200 °C, 300 °C, 350 °C, 400°C, 450 °C, 500 °C, 600 °C, y 800 °C durante 4 horas con velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Los tratamientos se realizaron en una mufla de caja sencilla en atmósfera ambiente no controlada. Las muestras fueron caracterizadas mediante DRX y refinamiento *Rietveld*, FTIR, RAMAN, MEB, microscopia electrónica de transmisión (MET), espectroscopia de fotoelectrón excitados por rayos X (XPS), UV-Vis espectroscopia FL.

El tercer objetivo de la tesis consiste en la síntesis y estudio de las propiedades estructurales, composicionales y fotoluminiscentes de nanopartículas de HA substituidas con Eu<sup>3+</sup>, ya que esta especie puede incrementar las propiedades ópticas de la HA. Sin embargo, para obtener materiales con emisiones significativas, es importante explorar e identificar los distintos entornos del Eu<sup>3+</sup> en la matriz, así como manipular la densidad de ocupación de los mismos. Además, la fotoluminiscencia del Eu<sup>3+</sup> tiene potencial en dar informaciones sobre la estructura del material huésped y sus transformaciones. En este sentido, la muestra de HAEu fue

preparada por precipitación química siguiendo la metodología descrita en la primera etapa del estudio para la preparación de nanobastones en pH básico con el auxilio de una bomba peristáltica. Para esta ruta, algunas adaptaciones fueron realizadas, como sustitución parcial de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Eu}^{3+}$  en la solución precursoras al disolver  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$  99,9% (Strem Chemicals) junto con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . La cantidad añadida fue calculada de acuerdo con el dopaje inicial estipulado de 1% molar (proporción molar inicial  $\text{Eu}/\text{Ca} = 0,01$ ).

La distribución del  $\text{Eu}^{3+}$  en una matriz sólida puede presentar dependencia de las condiciones de posteriores tratamientos térmicos, y la FL del mismo puede dar informaciones de la influencia de los tratamientos. La muestra precipita fue, de esta manera, sometida a la temperatura de 600 °C y 1100 °C en una mufla común sin control de atmósfera durante 4 y 24 horas, respectivamente, con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. En estas dos condiciones de tratamiento, las muestras fueron resfriadas lentamente de manera natural. Además, las muestras sometidas a tratamientos a 1100 °C también tuvieron una etapa de resfriamiento rápido al ponerlas en contacto con  $\text{N}_2$  líquido. Con esto, se realizó una etapa de “quenching” de temperatura después del patamar de tratamiento. Las muestras fueron caracterizadas mediante DRX, FTIR, MEB y espectroscopia FL. Además, con el objetivo de elucidar la naturaleza de los entornos del  $\text{Eu}^{3+}$  en la estructura de la HA, se realizaron estudios fotoluminiscentes sitio resueltos por la técnica de fluorescencia de estrechamiento de línea (TRFLN) a 10 K.

Por último, esta tesis tiene también como objetivo hacer pruebas biológicas preliminares para evaluar el potencial de utilizar los materiales desarrollados en el área de biomedicina. Para ello, se utilizó la muestra de HA pura tratada térmicamente a 350 °C con mejor respuesta de FL intrínseca. La viabilidad celular de esta muestra fue probada en fibroblastos dérmicos neonatales humanos (*HDFn*) por la metodología de MTT. Los valores incubación fueron 24 y 48 h en las concentraciones de nanopartículas igual a 20, 40, 80, 160 y 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Además, imágenes de microcopia confocal con las muestras conteniendo 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanopartículas fueron hechas con el objetivo de visualizar posible internalización en los fibroblastos por parte de las nanopartículas, bien como la marcación celular por la FL intrínseca de la HA.

## Aportaciones originales

- La posibilidad de obtener nanopartículas biocompatibles de HA con propiedades fotoluminiscentes intrínsecas mejoradas por una ruta sintética más sencilla y barata en comparación con las presentes en la literatura.
- La influencia del pH de reacción y velocidad de mezcla de los precursores, bien como el efecto de posteriores tratamientos térmicos en las propiedades estructurales, composicionales, morfológicas y fotoluminiscentes de las partículas de HA.
- Una nueva interpretación para los posibles mecanismos, centros fotoluminiscentes y estados de energía que llevan a las propiedades ópticas intrínsecas observadas en los materiales preparados.
- El promisor uso de las nanopartículas y la metodología desarrollada como un nuevo método de obtención de nanopartículas de HA biocompatible y internalizable por células humanas para aplicaciones en bioimagen.
- La interpretación de los entornos del  $\text{Eu}^{3+}$  en las partículas de HA. En este sentido, la comprobación de que son posibles tres entornos para el  $\text{Eu}^{3+}$ , todos relacionados a la presencia del mismo en el sitio del Ca(2).
- La presencia de los tres entornos en muestras recién preparadas al utilizar la metodología de precipitación química desarrollada en este estudio.
- La influencia de los tratamientos térmicos en la preferencia de los entornos del  $\text{Eu}^{3+}$ . La utilización de una etapa de resfriamiento rápido en  $\text{N}_2$  líquido para promover la presencia del  $\text{Eu}^{3+}$  en un único entorno en el sitio Ca(2).

## Conclusiones obtenidas

Basado en los resultados y discusiones descritos anteriormente, se puede concluir que:

- La metodología de precipitación química y los parámetros seleccionados permiten la obtención de fases puras de HA con estructura hexagonal, tanto para muestras con composición cercana a la asociada a HA estequiometría como para la HA deficiente en calcio.

- Las propiedades morfológicas y estructurales de las partículas puras de HA varían de manera significativa de acuerdo con el valor de pH de síntesis y el método de mezcla de los precursores.

- En especial, las alteraciones en los parámetros de síntesis estudiados (pH básico o ácido) llevarán a variaciones en la densidad de defectos de Ca, OH y a la protonación del *cluster* [PO<sub>4</sub>]. Este parámetro, juntamente con la variación en la velocidad de adición del precursor de fosfato sobre el de calcio (lenta-bomba de inyección, media-bomba peristáltica y rápida-vertida), alterarán el camino químico y la cinética de cristalización de las partículas, permitiendo la formación de partículas con distintas formas y tamaños, tales como bastones hexagonales, bastones, arrocés, cintas y agujas.

- Los materiales presentarán propiedades fotoluminiscentes intrínsecas con perfil de emisión del tipo banda ancha, con máximos de emisión localizados en regiones correspondientes al azul, verde y amarillo del espectro electromagnético. Las muestras presentarán valor de  $E_g$  (de 5,59 hasta 5,72 eV) que son superiores a las energías de las fuentes de excitación utilizadas (~3,54 y ~2,98 eV en 350 y 415 nm, respectivamente) en las medidas de FL.

- Este comportamiento fue atribuido a la presencia de una alta densidad de niveles de energía intermediarios en la zona prohibida o de *band gap* que contribuyen a la FL de la HA, debido a defectos en *bulk*, superficie e interface de las partículas. Se demostró que la intensidad y la variación en contribución de niveles

rasos o profundos en la banda de emisión final son dependientes de las alteraciones en el orden-desorden estructural y en las variaciones morfológicas.

- La muestra de HA pura en forma de bastón sintetizada en pH básico con bomba peristáltica es estable térmicamente al realizar posteriores tratamientos térmicos, no siendo observadas fases secundarias en las condiciones estudiadas (hasta 1100 °C).

- Los tratamientos térmicos y la caracterización estructural revelaran la presencia de impurezas presas en la red, como H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> que, con la temperatura, son liberados o descompuestos, dejando en la red vacancias y especies HA...H<sup>+</sup>, que causan significativa contracción en la red y aumento en el desorden estructural. A elevadas temperaturas (>450 °C), una creciente perfección cristalina (aumento del orden estructural a corto, medio y largo alcance) fue observada. En estas condiciones, se observa también la descomposición de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y un importante incremento en la densidad de OH en la estructura.

- La FL intrínseca se demostró dependiente de las modificaciones del orden-desorden estructural con la temperatura.

- Dependiendo de la temperatura, fueron observadas distintas intensidades y perfiles de bandas de FL. Las emisiones intrínsecas más intensas con excitación en el ultravioleta fueron obtenidas en 350 °C y 400 °C, con respectivamente, emisiones blanco-azulado y blanco-amarillento. Este resultado comprueba que emisiones en distintas regiones además de la azul son posibles para la HA.

- El estudio reveló la posibilidad de obtener nanopartículas de HA con propiedades FL mejoradas por una metodología sencilla y barata a partir de la síntesis por precipitación química seguida de tratamientos térmicos.

- La muestra de HA pura tratada térmicamente a 350 °C fue evaluada por el método de MTT, que demostró la elevada viabilidad celular del sistema nanoparticulado. La capacidad de internalización (*Uptake* celular) y de marcación por la FL intrínseca de las partículas de HA fueron promisoras para aplicaciones en

bioimagen. Así, se evidenció que la metodología de síntesis desarrollada en esta tesis es una metodología de obtención de nanopartículas de HA biocompatibles, con FL intrínseca mejorada e internalizables por células humanas.

- Por otro lado, se evidenció que por la metodología de precipitación química es posible obtener fase única de HA sustituida con  $\text{Eu}^{3+}$  y estable térmicamente (hasta 1100 °C).

- La introducción de  $\text{Eu}^{3+}$  se mostró eficiente en el monitoreo de las modificaciones estructurales con los tratamientos térmicos.

- A través de la técnica de fluorescencia de estrechamiento de líneas fue posible identificar con detalle los entornos del  $\text{Eu}^{3+}$  en la estructura y cómo los mismos varían de acuerdo con las condiciones de tratamiento térmico.

- En especial, se evidenció que en las condiciones de síntesis estudiadas es posible obtener muestras de HA con tres entornos distintos para el  $\text{Eu}^{3+}$ , todos referidos a la ocupación del sitio Ca(2). A altas temperaturas y con la realización de “quenching” en  $\text{N}_2$ , se demostró que es posible obtener un único entorno para el  $\text{Eu}^{3+}$ .

## **Futuras líneas de investigación**

Como otras posibles investigaciones pertinentes a los resultados obtenidos en el presente estudio, se destaca:

- Estudiar posibilidad en se utilizar las nanopartículas con FL intrínseca mejorada en aplicaciones en bioimagen y como fósforos de diodos emisores de luz.

- Demonstrar la posibilidad en se utilizar el estudio desarrollado como una nueva metodología de obtenido de nanopartículas de HA biocompatibles con FL intrínseca mejorada y internalizables por células humanas para aplicaciones biomédicas.



- Estudio de la FL intrínseca de la HA obtenida en distintas temperaturas de síntese y la influencia de la conversión ACP → HA.

- Estudio de la variación de los parámetros de síntesis (por ejemplo, concentración de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  en el medio de reacción) y condiciones de tratamiento térmico (tiempo y atmósfera de los tratamientos) con el objetivo de obtener informaciones adicionales sobre el tipo de vacancia y la impureza responsable por la FL intrínseca de la HA.

- Realización de cálculos teóricos sobre la estructura cristalina y electrónica de la HA con el objetivo de conciliar con los resultados empíricos.

- El efecto del modificador de red en la estructura electrónica y FL de la HA por la sustitución iónicas de Ca por Na, K, Sr, Ba, Zn, Ag, etc.

- El efecto de las especies en los canales hexagonales al comparar la FL de otras apatitas, como la fluorapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$ , cloroapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2]$  y bromoapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Br}_2]$ .

- Estudio sitio selectivo del  $\text{Eu}^{3+}$  en la HA en función de la concentración del dopante.

- Estudio sitio selectivo de otras especies de lantánidos en la HA, como el  $\text{Er}^{3+}$ .



## Referências Bibliográficas

- [1] MCDOWELL, D. L.; PANCHAL, J. H.; CHOI, H.-J.; SEEPERSAD, C.; ALLEN, J. K. & MESTREE, F. *Integrated Design of Multiscale, Multifunctional Materials and Products*. 1a ed. Amsterdão, Butterworth-Heinemann, 2010.
- [2] DOROZHKIN, S. V. "Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates". *Acta Biomater.* **6**, 715–734, 2010.
- [3] USKOKOVIC, V. & USKOKOVIC, D. P. "Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents". *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **96B**, 152–191, 2011.
- [4] WOLFBEIS, O.S. "An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging". *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4743–4768, 2015.
- [5] VALLET-REGÍ, M. & GONZÁLEZ-CALBET, J. M. "Calcium phosphates as substitution of bone tissues". *Prog. Solid State Chem.* **32**, 1–31, 2004.
- [6] SYAMCHAND, S. S. & SONY, G. "Multifunctional hydroxyapatite nanoparticles for drug delivery and multimodal molecular imaging". *Microchim. Acta.* **182** 1567–1589, 2015.
- [7] ZHANG, C.; YANG, J.; QUAN, Z.; YANG, P.; LI, C.; HOU, Z. & LIN, J. "Hydroxyapatite nano- and microcrystals with multiform morphologies: Controllable synthesis and luminescence properties". *Cryst. Growth Des.* **9**, 2725–2733, 2009.
- [8] SINGH, R. K.; KIM, T.-H.; PATEL, K. D.; KIM, J.-J. & KIM, H.-W. "Development of biocompatible apatite nanorod-based drug-delivery system with *in situ* fluorescence imaging capacity". *J. Mater. Chem. B.* **2**, 2039–2050, 2014.
- [9] WANG, C.; LIU, D.; ZHANG, C.; SUN, J.; FENG, W.; LIANG, X.-J.; WANG, S. & ZHANG, J. "Defect-related luminescent hydroxyapatite-enhanced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells via an ATP-induced cAMP/PKA pathway". *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **8**, 11262–11271, 2016.
- [10] PARK, S. Y.; KIM, K.-I.; PARK, S. P.; LEE, J. H. & JUNG, H. S. "Aspartic acid-assisted synthesis of multifunctional strontium-substituted hydroxyapatite microspheres". *Cryst. Growth Des.* **16**, 4318–4326, 2016.
- [11] YANG, P.; QUAN, Z.; LI, C.; KANG, X.; LIAN, H. & LIN, J. "Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier". *Biomaterials.* **29**, 4341–4347, 2008.
- [12] ZHENG, X.; LIU, M.; HUI, J.; FAN, D.; MA, H.; ZHANG, X.; WANG, Y. & WEI, Y. "Ln<sup>3+</sup>-doped hydroxyapatite nanocrystals: Controllable synthesis and cell imaging". *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 20301–20307, 2015.

- [13] ELLIOT, J. C. *Studies in Inorganic Chemistry. Vol 18. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates.* Amsterdão, Elsevier Publisher, 1994.
- [14] MCCUBBIN, F. M.; STEELE, A.; HAURI, E. H.; NEKVASIL, H.; YAMASHITA, S. & HEMLEY, R. J. "Nominally hydrous magmatism on the Moon". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 11223–11228, 2010.
- [15] DOROZHKIN, S. V. & EPPLE, M. "Biological and medical significance of calcium phosphates". *Angew. Chemie Int. Ed.* **41**, 3130–3146, 2002.
- [16] USKOKOVIC, V. "The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite". *RSC Adv.* **5**, 36614–36633, 2015.
- [17] HENCH, L.L. "Bioceramics: From concept to clinic". *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487–1510, 1991.
- [18] HUANG, J.; BEST, S. M.; BONFIELD, W.; BROOKS, R. A.; RUSHTON, N.; JAYASINGHE, S. N. & EDIRISINGHE, M. J. "*In vitro* assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite". *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15**, 441–445, 2004.
- [19] JARCHO, M. "Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics". *Clin. Orthop. Relat. Res.* **157**, 259–278, 1981.
- [20] DOROZHKIN, S. "Bioceramics of calcium orthophosphates". *Biomaterials.* **31**, 1465–1485, 2010.
- [21] LEGEROS, R. Z.; LIN, S.; ROHANIZADEH, R.; MIJARES, D. & LEGEROS, J. P. "Biphasic calcium phosphate bioceramics: Preparation, properties and applications". *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 201–209, 2003.
- [22] BOSE, S. & TARAFDER, S. "Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review". *Acta Biomater.* **8**, 1401–1421, 2012.
- [23] CHEN, F.; HUANG, P.; QI, C.; LU, B.-Q.; ZHAO, X.-Y.; LI, C.; WU, J.; CUI, D.-X. & ZHU, Y.-J. "Multifunctional biodegradable mesoporous microspheres of Eu<sup>3+</sup>-doped amorphous calcium phosphate: microwave-assisted preparation, pH-sensitive drug release, and bioimaging application". *J. Mater. Chem. B.* **2**, 7132–7140, 2014.
- [24] MA, B.; ZHANG, S.; QIU, J.; LI, J.; SANG, Y.; XIA, H.; JIANG, H.; CLAVERIE, J. & LIU, H. "Eu/Tb codoped spindle-shaped fluorinated hydroxyapatite nanoparticles for dual-color cell imaging". *Nanoscale.* **8**, 11580–11587, 2016.
- [25] GAO, X.; YANG, L.; PETROS, J. A.; MARSHALL, F. F.; SIMONS, J. W. & NIE, S. "*In vivo* molecular and cellular imaging with quantum dots". *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 63–72, 2005.

- [26] ESCOBEDO, J. O.; RUSIN, O.; LIM, S. & STROGIN, R. M. "NIR dyes for bioimaging applications". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 64–70, 2010.
- [27] FRUMOSU, F.; ICONARU, S. L. & PREDOI, D. "Europium concentration effect of europium doped hydroxyapatite on proliferation of osteoblast cells". *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* **6**, 1859–1865, 2011.
- [28] HAN, Y.; WANG, X.; DAI, H. & LI, S. "Synthesis and luminescence of Eu<sup>3+</sup> doped hydroxyapatite nanocrystallines: Effects of calcinations and Eu<sup>3+</sup> content". *J. Lumin.* **135**, 281–287, 2013.
- [29] POPA, C. L.; CIOBANU, C. S.; ICONARU, S. L.; STAN, M.; DINISCHIOTU, A.; NEGRILA, C. C.; MOTELICA-HEINO, M.; GUEGAN, R. & PREDOI, D. "Systematic investigation and *in vitro* biocompatibility studies on mesoporous europium doped hydroxyapatite". *Cent. Eur. J. Chem.* **12**, 1032–1046, 2014.
- [30] WAGNER, D. E.; EISENMANN, K. M.; NESTOR-KALINOSKI, A. L. & BHADURI, S. B. "A microwave-assisted solution combustion synthesis to produce europium-doped calcium phosphate nanowhiskers for bioimaging applications". *Acta Biomater.* **9**, 8422–8432, 2013.
- [31] HASNA, K.; KUMAR, S. S.; KOMATH, M.; VARMA, M. R.; JAYARAJ, M. K. & KUMAR, K. R. "Synthesis of chemically pure, luminescent Eu<sup>3+</sup> doped HAp nanoparticles: A promising fluorescent probe for *in vivo* imaging applications". *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 8106–8111, 2013.
- [32] WOPENKA, B. & PASTERIS, J. D. "A mineralogical perspective on the apatite in bone". *Mater. Sci. Eng. C.* **25**, 131–143, 2005.
- [33] KENDALL, J. B. *Biomaterials Research Advances*. 1a ed. Nova Iorque, Nova Science Publisher, 2008.
- [34] FLEET, M. *Carbonated Hydroxyapatite: Materials, Synthesis, and Applications*. Nova Iorque, Pan Stanford Publishing, 2015.
- [35] NARASARAJU, T.S.B. & PHEBE, D. E. "Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite". *J. Mater. Sci.* **31**, 1–21, 1996.
- [36] SUDARSANAN, K. & YOUNG, R. A. "Significant precision in crystal structural details: Holly springs hydroxyapatite". *Acta Crystallogr.* **B25**, 1534–1543, 1969.
- [37] KAY, M. I.; YOUNG, R. A. & POSNER, A. S. "Crystal structure of hydroxyapatite". *Nature.* **204**, 1050–1052, 1964.
- [38] LU, X.; ZHANG, H.; FUO, Y.; WANG, Y.; GE, X.; LENG, Y. & WATARI, F. "Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO<sub>2</sub> nanotubes under urea modulation". *CrystEngComm.* **13**, 3741–3749, 2011.
- [39] ELLIOT, J. C.; WILSON, R. M. & DOWKER, S. E. P. "Apatite structure". *Adv. X-Ray Anal.* **45**, 172–181, 2002.

- [40] BOANINI, E.; GAZZANO, M. & BIGI, A. "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature". *Acta Biomater.* **6**, 1882–1894, 2010.
- [41] REN, F.; XIN, R.; GE, X. & LENG, Y. "Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites". *Acta Biomater.* **5**, 3141–3149, 2009.
- [42] ZYMAN, Z. Z.; ROKHMISTROV, D. V.; GLUSHKO, V. I. & IVANOV, I. G. "Thermal impurity reactions and structural changes in slightly carbonated hydroxyapatite". *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**, 1389–1399, 2009.
- [43] LALA, S.; GHOSH, M.; DAS, P. K.; DAS, D.; KAR, T. & PRADHAN, S. K. "Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement". *Mater. Chem. Phys.* **170**, 319–329, 2016.
- [44] IVANOVA, T.I.; FRANK-KAMENETSKAYA, O. V.; KOL'TSOV, A. B.; UGOLKOV, V. L. "Crystal structure of calcium-deficient carbonated hydroxyapatite". Thermal decomposition, *J. Solid State Chem.* **160**, 340–349, 2001.
- [45] TÖNSUAADU, K.; GROSS, K. A.; PLUDUMA, L. & VEIDERMA. "A review on the thermal stability of calcium apatites". *J. Therm. Anal. Calorim.* **110**, 647–659, 2012.
- [46] PASTERIS, J. D.; WOPENKA, B.; FREEMAN, J. J.; ROGERS, K.; VALSAMI-JONES, E.; van der HOUWEN, J. A. M. & SILVA, M. J. "Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: Implications for bone and biomaterials". *Biomaterials.* **25**, 229–238, 2004.
- [47] LI, X.; SOGO, Y.; ITO, A.; MUTSUZAKI, H.; OCHIAI, N.; KOBAYASHI, T.; NAKAMURA, S.; YAMASHITA, K. & LEGEROS, R. Z. "The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation *in vivo*". *Mater. Sci. Eng. C.* **29**, 969–975, 2009.
- [48] WILSON, R. M.; ELLIOT, J. C.; DOWKER, S. E. P. & RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M. "Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite". *Biomaterials.* **26**, 1317–1327, 2005.
- [49] RODRÍGUEZ-LORENZO, L.M. & VALLET-REGÍ, M. "Controlled crystallization of calcium phosphate apatites". *Chem. Mater.* **12**, 2460–2465, 2000.
- [50] GIBSON, I. R. & BONFIELD, W. "Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite". *J. Biomed. Mater. Res.* **59**, 697–708, 2002.
- [51] MARKOVIC, S.; VESELINOVIC, L.; LUKIC, M. J.; KARANOVIC, L.; BRACKO, I.; IGNJATOVIC, N. & USKOKOVIC, D. "Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: A comparative study of crystal structure and morphology". *Biomed. Mater.* **6**, 045005, 2011.

- [52] BROWN, P. W. & CONSTANTZ, B. *Hydroxyapatite and Related Materials*. Londres, CRC Press, 1994.
- [53] KARPOV, A. S.; NUSS, J.; JANSEN, M.; KAZIN, P. E. & TRETYAKOV, Y. D. "Synthesis, crystal structure and properties of calcium and barium hydroxyapatites containing copper ions in hexagonal channels". *Solid State Sci.* **5**, 1277–1283, 2003.
- [54] KAZIN, P. E.; KARPOV, A. S.; JANSEN, M.; NUSS, J. & TRETYAKOV, Y. D. "Crystal structure and properties of strontium phosphate apatite with oxocuprate ions in hexagonal channels". *Zeitschrift Für Anorg. Und Allg. Chemie.* **629**, 344–352, 2003.
- [55] SUTTER, B.; MING, D. W.; CLEARFIELD, A. & HOSSNER, L. R. "Mineralogical and chemical characterization of iron-, manganese-, and copper-containing synthetic hydroxyapatite". *Soil Sci. Soc. Am. J.* **67**, 1935–1942, 2003.
- [56] TERNANE, R.; TRABELSI-AYEDI, M.; KBIR-ARIGUIB, N. & PIRIOU, B. "Luminescent properties of  $\text{Eu}^{3+}$  in calcium hydroxyapatite". *J. Lumin.* **81**, 165–170, 1999.
- [57] YASUKAWA, A.; GOTOH, K.; TANAKA, H. & KANDORI, K. "Physicochemical and engineering aspects preparation and structure of calcium hydroxyapatite substituted with light rare earth ions". *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **393**, 53–59, 2012.
- [58] YASUKAWA, A.; KANDORI, K.; TANAKA, H. & GOTOH, K. "Preparation and structure of carbonated calcium hydroxyapatite substituted with heavy rare earth ions". *Mater. Res. Bull.* **47**, 1257–1263, 2012.
- [59] GRAEVE, O. A. KANAKALA, R.; MADADI, A.; WILLIAMS, B. C. & GLASS, K. C. "Luminescence variations in hydroxyapatites doped with  $\text{Eu}^{2+}$  and  $\text{Eu}^{3+}$  ions". *Biomaterials.* **31**, 4259–4267, 2010.
- [60] LI, X.; ZHU, J.; MAN, Z.; AO, Y. & CHEN, H. "Investigation on the structure and upconversion fluorescence of  $\text{Yb}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$  co-doped fluorapatite crystals for potential biomedical applications". *Sci. Rep.* **4**, 4446, 2014.
- [61] ANSELME, K. "Osteoblast adhesion on biomaterials". *Biomaterials.* **21**, 667–681, 2000.
- [62] ASRI, R. I. M.; HARUN, W. S. W.; HASSAN, M. A.; GHANI, S. A. C. & BUYONG, Z. "A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals". *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **57**, 95–108, 2016.
- [63] CAI, Y.; LIU, Y.; YAN, W.; HU, Q.; TAO, J.; ZHANG, M.; SHI, Z. & TANG, R. "Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation". *J. Mater. Chem.* **17**, 3780–3787, 2007.
- [64] HENCH, L. L. & WILSON, J. *Advanced Series in Ceramics*. Vol 1. An

- Introduction to Bioceramics. Londres, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.
- [65] LEGEROZ, R. Z. "Calcium phosphate-based osteoinductive materials". Chem. Rev. **108**, 4742–4753, 2008.
- [66] WEINER, S. & WAGNER, H. D. "The material bone: Structure-mechanical function relations". Annu. Rev. Mater. Sci. **28**, 271–298, 1998.
- [67] CUI, F.-Z. & GE, J. "New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale". J. Tissue Eng. Regen. Med. **1**, 185–191, 2007.
- [68] PAN, H. B.; LI, Z. Y.; LAM, W. M.; WONG, J. C.; DARVELL, B. W.; LUK, K. D. K. & LU, W. W. "Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration". Acta Biomater. **5**, 1678–1685, 2009.
- [69] LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S.; SANDRI, M. & LOGROSCINO, G. "Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement". Acta Biomater. **3**, 961–969, 2007.
- [70] MIYAJI, F.; KONO, Y. & SUYAMA, Y. "Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite". Mater. Res. Bull. **40**, 209–220, 2005.
- [71] SAMANI, S.; HOSSAINALIPOUR, S. M.; TAMIZIFAR, M. & REZAIE, H. R. "In vitro antibacterial evaluation of sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn + Ag)-doped hydroxyapatite coatings against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". J. Biomed. Mater. Res. **101A**, 222–230, 2013.
- [72] IQBAL, N.; KADIR, M. R. A.; MAHMOOD, N. H.; SALIM, N.; FROEMMING, G. R. A.; BALAJI, H. R. & KAMARUL, T. "Characterization, antibacterial and in vitro compatibility of zinc-silver doped hydroxyapatite nanoparticles prepared through microwave synthesis". Ceram. Int. **40**, 4507–4513, 2014.
- [73] KUMAR, G. S. & GIRIJA, E. K. "Flower-like hydroxyapatite nanostructure obtained from eggshell: A candidate for biomedical applications". Ceram. Int. **39**, 8293–8299, 2013.
- [74] NIU, J.; WANG, X.; LV, J.; LI, Y. & TANG, B. "Luminescent nanoprobe for *in-vivo* bioimaging". Trends Anal. Chem. **58**, 112–119, 2014.
- [75] BRUCHEZ, M. Jr.; MORONNE, M.; GIN, P.; WEISS, S. & ALIVISATOS, A. P. "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels". Science. **281**, 2013–2016, 1998.
- [76] DURR, N. J.; LARSON, T.; SMITH, D. K.; KORGEL, B. A.; SOKOLOV, K. & BEN-YAKAR, A. "Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods". Nano Lett. **7**, 941–945, 2007.
- [77] XUE, Y.; DU, Y.; YAN, J.; LIU, Z.; MA, P. X.; CHEN, X. & LEI, B. "Monodisperse photoluminescent and highly biocompatible bioactive glass nanoparticles for



- controlled drug delivery and cell imaging". *J. Mater. Chem. B.* **3**, 3831–3839, 2015.
- [78] GAI, J.; LI, S.; YANG, C. & LIN, P. "Recent progress in rare earth micro/nanocrystals: Soft chemical synthesis, luminescent properties, and biomedical applications". *Chem. Rev.* **114**, 2343–2389, 2013.
- [79] CHEN, F.; HUANG, P.; ZHU, Y.-J.; WU, J.; ZHANG, C.-L. & CUI, D.-X. "The photoluminescence, drug delivery and imaging properties of multifunctional  $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$  dual-doped hydroxyapatite nanorods". *Biomaterials.* **32**, 9031–9039, 2011.
- [80] LIU, M.; LIU, H.; SUN, S.; LI, X.; ZHOU, Y.; HOU, Z. & LIN, J. "Multifunctional hydroxyapatite/ $\text{Na}(\text{Y}/\text{Gd})\text{F}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$  composite fibers for drug delivery and dual modal imaging". *Langmuir.* **30**, 1176–1182, 2014.
- [81] WEISSLEDER, R. "A clearer vision for *in vivo* imaging". *Nat. Biotechnol.* **19**, 316–317, 2001.
- [82] XIE, Y.; HE, W.; LI, F.; PERERA, T. S. H.; GAN, L.; HAN, Y.; WANG, X.; LI, S. & DAI, H. "Luminescence Enhanced  $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$  co-doped hydroxyapatite nanocrystals as imaging agents *in vitro* and *in vivo*". *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **8**, 10212-10219, 2016.
- [83] DOAT, A.; FANJUL, M.; PELLÉ, F.; HOLLANDE, E. & LEBUGLE, A. "Europium-doped bioapatite: A new photostable biological probe, internalizable by human cells". *Biomaterials.* **24**, 3365–3371, 2003.
- [84] HOU, Z.; YANG, P. LIAN, H.; WANG, L.; ZHANG, C.; LI, C.; CHAI, R.; CHENG, Z. & LIN, J. "Multifunctional hydroxyapatite nanofibers and microbelts as drug carriers". *Chem. A Eur. J.* **15**, 6973–6982, 2009.
- [85] CHEN, X.; JIN, X.; TAN, J.; LI, W.; CHEN, M.; YAO, L. & YANG, H. "Large-scale synthesis of water-soluble luminescent hydroxyapatite nanorods for security printing". *J. Colloid Interface Sci.* **468**, 300–306, 2016.
- [86] BYSTROV, V. S.; COUTINHO, J.; BYSTROVA, A. V.; DEKHTYAR, Y. D.; PULLAR, R. C.; PORONIN, A.; PALCEVSKIS, E.; DINDUNE, A.; ALKAN, B.; DURUCAN, C. & PARAMONOVA, E. V. "Computational study of hydroxyapatite structures, properties and defects". *J. Phys. D. Appl. Phys.* **48**, 195302, 2015.
- [87] ROSENMAN, G.; ARONOV, D.; OSTER, L.; HADDAD, J.; MEZINSKIS, G.; PAVLOVSKA, I.; CHAIKINA, M. & KARLOV, A. "Photoluminescence and surface photovoltage spectroscopy studies of hydroxyapatite nano-bio-ceramics". *J. Lumin.* **122-123**, 936–938, 2007.
- [88] DAI, C.; DUAN, J.; ZHANG, L.; JIA, G.; ZHANG, C. & ZHANG, J. "Biocompatibility of defect-related luminescent nanostructured and microstructured hydroxyapatite". *Biol. Trace Elem. Res.* **162**, 158–167, 2014.
- [89] SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M.-T.; DINPANAH-KHOSHDARGI, E. &

- JAMSHIDI, A. "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures". *Acta Biomater.* **9**, 7591–7621, 2013.
- [90] LIN, K.; WU, C. & CHANG, J. "Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape". *Acta Biomater.* **10**, 4071–4102, 2014.
- [91] JAGANNATHAN, R. & KOTTAISAMY, M. "Eu<sup>3+</sup> luminescence: a spectral probe in M<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>X apatites (M = Ca or Sr ; X = F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> or OH<sup>-</sup>)". *J. Phys. Condens. Matter.* **7**, 8453–8466, 1995.
- [92] GUO, X.; YAN, H.; ZHAO, S.; LI, Z.; LI, Y. & LIANG, X. "Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature". *Adv. Powder Technol.* **24**, 1034–1038, 2013.
- [93] NAKANO, T.; TOKUMURA, A. & UMAKOSHI, Y. "Control of hydroxyapatite crystallinity by mechanical grinding method". **2**, 703–706, 2001.
- [94] SAMBUDI, N. S.; CHO, S. & CHO, K. "Porous hollow hydroxyapatite microspheres synthesized by spray pyrolysis using a microalga template: preparation, drug delivery, and bioactivity". *RSC Adv.* **6**, 43041–43048, 2016.
- [95] LAK, A.; MAZLOUMI, M.; MOHAJERANI, M.; KAJBAFVALA, A.; ZANGANEH, S.; ARAMI, H. & SADRNEZHAAD, S. K. "Self-assembly of dandelion-like hydroxyapatite nanostructures via hydrothermal method". *J. Am. Ceram. Soc.* **91**, 3292–3297, 2008.
- [96] NEIRA, I. S.; KOLEN'KO, Y. V.; LEBEDEV, O. I.; VAN TENDELOO, G.; GUPTA, H. S.; GUITIÁN, F. & YOSHIMURA, M. "An effective morphology control of hydroxyapatite crystals via hydrothermal synthesis". *Cryst. Growth Des.* **9**, 466–474, 2009.
- [97] PANG, Y. X. & BAO, X. "Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles". *J. Eur. Ceram. Soc.* **23**, 1697–1704, 2003.
- [98] PHAM, T. T. T.; NGUYEN, T. P.; PHAM, T. N.; VU, T. P.; TRAN, D. L.; THAI, H. & DINH, T. M. T. "Impact of physical and chemical parameters on the hydroxyapatite nanopowder synthesized by chemical precipitation method". *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **4**, 035014, 2013.
- [99] POINERN, G. E.; BRUNDAVANAM, R. K.; MONDINOS, N. & JIANG, Z.-T. "Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method". *Ultrason. Sonochem.* **16**, 469–474, 2009.
- [100] SONG, J.; LIU, Y.; ZHANG, Y. & JIAO, L. "Mechanical properties of hydroxyapatite ceramics sintered from powders with different morphologies". *Mater. Sci. Eng. A.* **528**, 5421–5427, 2011.
- [101] AL-KATTAN, A.; DUFOUR, P.; DEXPERT-GHYS, J. & DROUET, C. "Preparation and physicochemical characteristics of luminescent apatite-based colloids". *J. Phys. Chem. C.* **114**, 2918–2924, 2010.

- [102] ANDRÉ, R. S.; PARIS, E. C.; GURGEL, M. F. C.; ROSA, I. L. V.; PAIVA-SANTOS, C. O.; LI, M. S.; VARELA, J. A. & LONGO, E. "Structural evolution of Eu-doped hydroxyapatite nanorods monitored by photoluminescence emission". *J. Alloys Compd.* **531**, 50–54, 2012.
- [103] NATARAJAN, U. V. & RAJESWARI, S. "Influence of calcium precursors on the morphology and crystallinity of sol–gel-derived hydroxyapatite nanoparticles". *J. Cryst. Growth.* **310**, 4601–4611, 2008.
- [104] ITO, N.; KAMITAKAHARA, M.; YOSHIMURA, M. & IOKU, K. "Importance of nucleation in transformation of octacalcium phosphate to hydroxyapatite". *Mater. Sci. Eng. C.* **40**, 121–126, 2014.
- [105] ITO, N.; KAMITAKAHARA, M. & IOKU, K. "Preparation and evaluation of spherical porous granules of octacalcium phosphate/hydroxyapatite as drug carriers in bone cancer treatment". *Mater. Lett.* **120**, 94–96, 2014.
- [106] LI, C.; GE, X.; LI, G.; GAO, Q. & DING, R. "A facile hydrothermal method for synthesis of submillimeter-long octacalcium phosphate and hydroxyapatite as drug carriers with sustained release behaviors" *Adv. Powder Technol.* **25**, 1661–1666, 2014.
- [107] ESCUDERO, A.; CALVO, M. E.; RIVERA-FERNÁNDEZ, S.; DE LA FUENT, J. M. & OCAÑA, M. "Microwave-assisted synthesis of biocompatible europium-doped calcium hydroxyapatite and fluoroapatite luminescent nanospindles functionalized with poly(acrylic acid)". *Langmuir.* **29**, 1985–1994, 2013.
- [108] RANGE, S.; HAGMEYER, D.; ROTAN, O.; SOKOLOVA, V.; VERHEYEN, J.; SIEBERS, B. & EPPLE, M. "A continuous method to prepare poorly crystalline silver-doped calcium phosphate ceramics with antibacterial properties". *RSC Adv.* **5**, 43172–43177, 2015.
- [109] WELZEL, T.; MEYER-ZAIKA, W. & EPPLE, M. "Continuous preparation of functionalised calcium phosphate nanoparticles with adjustable crystallinity". *Chem. Commun.* 1204–1205, 2004.
- [110] GOMEZ-MORALES, J.; TORRENT-BURGUES, J. & RODRIGUEZ-CLEMENTE, R. "Crystal size distribution of hydroxyapatite precipitated in a MSMR reactor". *Cryst. Res. Technol.* **36**, 1065–1074, 2001.
- [111] RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D. & THOMAS, P. "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders". *Biomaterials.* **23**, 1065–1072, 2002.
- [112] ROPP, R. C. *Luminescence and the Solid State*. 1a ed. Amsterdão, Elsevier Publisher, 1991.
- [113] Disponível em: <http://www.universoracionalista.org/redshift-e-efeito-doppler/>. Acessado em 15/04/2016.

- [114] BLASSE, G. & GARBMAIER, C. *Luminescent Materials*. Berlim, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994.
- [115] ZHANG, C. & LIN, J. "Defect-related luminescent materials: synthesis, emission properties and applications". *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7938–7961, 2012.
- [116] GERSTEN, J. I. & SMITH, F. W. "The Physics and Chemistry of Materials. Nova Iorque, Wiley, 2001.
- [117] REZENDE, S.M. *Materiais e Dispositivos Eletrônicos*. 2a ed. São Paulo, Editoria Livraria da Física, 2004.
- [118] CANHAM, L. T. "Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers". *Appl. Phys. Lett.* **57**, 1046–1048, 1990.
- [119] KORZHIK, M. V.; PAVLENKO, V. B.; TIMOSCHENKO, T. N.; KATCHANOV, V. A.; SINGOVSKII, A. V.; ANNENKOV, A. N.; LINGUN, V. A.; SOLSKII, I. M. & PEIGNEUX, J.-P. "Spectroscopy and origin of radiation centers and scintillation in PbWO<sub>4</sub> single crystals". *Phys. Status Solidi.* **154**, 779–788, 1996.
- [120] LEONELLI, R. & BREBNER, J. L. "Time-resolved spectroscopy of the visible emission band in strontium titanate". *Phys. Rev. B.* **33**, 8649–8656, 1986.
- [121] ANICETE-SANTOS, M.; ORHAN, E.; de MAURERA, M. A. M. A.; SIMÕES, L. G. P.; SOUZA, A. G.; PIZANI, P. S.; LEITE, E. R.; VARELA, J. A.; ANDRÉS, J.; BELTRÁN, A. & LONGO, E. "Contribution of structural order-disorder to the green photoluminescence of PbWO<sub>4</sub>". *Phys. Rev. B.* **75**, 165105, 2007.
- [122] LONGO, V. M.; CAVALCANTE, L. S.; de FIGUEIREDO, A. T.; SANTOS, L. P. S.; LONGO, E.; VARELA, J. A.; SAMBRANO, J. R. PASKOCIMAS, C. A.; de VICENTES, F. S. & HERNANDES, A. C. "Highly intense violet-blue light emission at room temperature in structurally disordered SrZrO<sub>3</sub> powders". *Appl. Phys. Lett.* **90**, 091906, 2007.
- [123] CAVALCANTE, L. S.; GURGEL, M. F. C.; SIMÕES, A. Z.; LONGO E.; VARELA, J. A.; JOYA, M. R. & PIZANI, P. S. "Intense visible photoluminescence in Ba(Zr<sub>0.25</sub>Ti<sub>0.75</sub>)O<sub>3</sub> thin films". *Appl. Phys. Lett.* **90**, 011901, 2007.
- [124] BINNEMANS, K. "Lanthanide-based luminescent hybrid materials". *Chem. Rev.* **109**, 4283–4374, 2009.
- [125] RONDA, C. *Luminescence: From Theory to Applications*. 1a ed. Wienheim, Wiley-VCH, 2007.
- [126] ELISEEVA, S. V. & BÜNZLI, J. -C. G. "Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences". *Chem. Soc. Rev.* **39**, 189–227, 2010.
- [127] GÖRLLER-WALRAND, C. & BINNEMANS, K. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*. Vol. 23. Amsterdão, Elsevier Publisher, 1996.
- [128] TANNER, P. A. "Some misconceptions concerning the electronic spectra of tri-

- positive europium and cerium" *Chem. Soc. Rev.* **42**, 5090–5101, 2013.
- [129] JIA, G.; WANG, C. & XU, S. "Local site symmetry determination of scheelite-type structures by  $\text{Eu}^{3+}$  spectroscopy". *J. Phys. Chem. C.* **114**, 17905–17913, 2010.
- [130] YAN, C. -H.; SUN, L. -D.; LIAO, C. -S.; ZHANG, Y. -X.; LU, Y. -Q.; HUANG, S. -H.; LÜ, S. -Z. " $\text{Eu}^{3+}$  ion as fluorescent probe for detecting the surface effect in nanocrystals". *Appl. Phys. Lett.* **82**, 3511–3513, 2003.
- [131] REISFELD, R.; ZIGANSKY, E. & GAFT, M. "Europium probe for estimation of site symmetry in glass films, glasses and crystals". *Mol. Phys.* **102**, 1319–1330, 2004.
- [132] LIU, Y.; TU, D.; ZHU, H. & CHEN, X. "Lanthanide-doped luminescent nanoprobe: controlled synthesis, optical spectroscopy, and bioapplications". *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6924–6958, 2013.
- [133] CARLOS, L. D. & VIDEIRA, A. L. L. "Emission spectra and local symmetry of the  $\text{Eu}^{3+}$  ion in polymer electrolytes". *Phys. Rev. B.* **49**, 11721–11728, 1994.
- [134] FUJII, S.; OKADA, M. & FURUZONO, T. "Hydroxyapatite nanoparticles as stimulus-responsive particulate emulsifiers and building block for porous materials". *J. Colloid Interface Sci.* **315**, 287–296, 2007.
- [135] WEST, A. R. *Solid State Chemistry and Its Applications*. 1a ed. Chichester, John Wiley & Sons, 1984.
- [136] SHIBA, K.; MOTOZUKA, S.; YAMAGUCHI, T.; OGAWA, N.; OTSUKA, Y.; OHNUMA, K.; KATAOKA, T. & TAGAYA, M. "Effect of cationic surfactant micelles on hydroxyapatite nanocrystal formation: An investigation into the inorganic-organic interfacial interactions". *Cryst. Growth Des.* **16**, 1463–1471, 2016.
- [137] LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G. & SPRIO, S. "Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites". *J. Eur. Ceram. Soc.* **20**, 2377–2387, 2000.
- [138] LARSON, A.C. & VON DREELE, R. B. *General structure analysis system (GSAS)*, 2004.
- [139] RIETVELD, H. M. "A profile refinement method for nuclear and magnetic structures". *J. Appl. Crystallogr.* **2**, 65–71, 1969.
- [140] THOMPSON, P.; COX, D. E. & HASTINGS, J. B. "Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron x-ray data from  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ". *J. Appl. Crystallogr.* **20**, 79–83, 1987.
- [141] FINGER, L. W.; COX, D. E. & JEPHCOAT, A. P. "A correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence". *J. Appl. Crystallogr.* **27**, 892–900, 1994.

- [142] STEPHENS, P. W. "Phenomenological model of anisotropic peak broadening in powder diffraction". *J. Appl. Crystallogr.* **32**, 281–289, 1999.
- [143] Disponível em: <http://www.labsphere.com>. Acessado em 15/02/2016.
- [144] WOOD, D. L. & TAUC, J. "Weak absorption tails in amorphous semiconductors". *Phys. Rev. B.* **5**, 3144–3151, 1972.
- [145] KUBELKA, P. & MUNK, F. "Ein beitrage zur optik der farbanstriche". *Zeitschrift Für Tech. Phys.* **12**, 593–601, 1931.
- [146] Disponível em: <http://www.casaxps.com/> Acessado em 09/07/2016.
- [147] CIAPETTI, G.; CENNI, E. & PIZZOFERRATO, A. "*In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay". *Biomaterials.* **14**, 359–364, 1993.
- [148] Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox1bul.pdf> Acessado em 26/07/2016.
- [149] GREEN, W. H.; LE, K. P.; GREY, J.; AU, T. T. & SAILOR, M. J. "White phosphors from a silicate-carboxylate sol-gel precursor that lack metal activator ions". *Science.* **276**, 1826–1828, 1997.
- [150] GUPTA, S. K.; GHOSH, P. S.; PATHAK, N. & TEWARI, R. "Nature of defects in blue light emitting CaZrO<sub>3</sub>: Spectroscopic and theoretical study, *RSC Adv.* **5**, 56526–56533, 2015.
- [151] JAKOB, A. M. & SCHMEDAKE, T. A. "A novel approach to monodisperse, luminescent silica spheres". *Chem. Mater.* **18**, 3173–3175, 2006.
- [152] GOUVEIA, A. F.; SCZANCOSKI, J. C.; FERRER, M. M.; LIMA, A. S.; SANTOS, M. R. M. C.; LI, M. S.; SANTOS, R. S.; LONGO, E. & CAVALCANTE, L. S. "Experimental and theoretical investigations of electronic structure and photoluminescence properties of  $\beta$ -Ag<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> microcrystals". *Inorg. Chem.* **53**, 5589–5599, 2014.
- [153] BOTELHO, G.; SCZANCOSKI, J. C.; ANDRES, J.; GRACIA, L. & LONGO, E. "Experimental and theoretical study on the structure, optical properties, and growth of metallic silver nanostructures in Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>". *J. Phys. Chem. C.* **119**, 6293–6306, 2015.
- [154] LONGO, V. M.; de FIGUEIREDO, A. T.; CAMPOS, A. B.; ESPINOSA, J. W. M.; HERNANDES, A. C.; TAFT, C. A.; SAMBRANO, J. R.; VARELA, J. A. & LONGO, E. "Different origins of green-light photoluminescence emission in structurally ordered and disordered powders of calcium molybdate". *J. Phys. Chem. A.* **112**, 8920–8928, 2008.
- [155] MARQUES, A. P. A.; PICON, F. C.; MELO, D. M. A.; PIZANI, P. S.; LEITE, E. R.; VARELA, J. A. & LONGO, E. "Effect of the order and disorder of BaMoO<sub>4</sub> powders in photoluminescent properties". *J. Fluoresc.* **18**, 51–59, 2008.

- [156] BYSTROV, V. S.; PICCIRILLO, C.; TOBALDI, D. M.; CASTRO, P. M. L.; COUTINHO, J.; KOPYL, S. & PULLAR, R. C. "Oxygen vacancies, the optical band gap ( $E_g$ ) and photocatalysis of hydroxyapatite: Comparing modelling with measured data". *Appl. Catal. B Environ.* **196**, 100–107, 2016.
- [157] BYSTROVA, A. V.; DEKHTYAR, Y. D.; POPOV, A. I.; COUTINHO, J. & BYSTROV, V. S. "Modified hydroxyapatite structure and properties: Modeling and synchrotron data analysis of modified hydroxyapatite structure". *Ferroelectrics*. **475**, 135–147, 2015.
- [158] DEMBSKI, S.; MILDE, M.; DYRBA, M.; SCHWEIZER, S.; GELLERMANN, C. & KLOCKENBRING, T. "Effect of pH on the Synthesis and Properties of Luminescent  $\text{SiO}_2/\text{Calcium Phosphate:Eu}^{3+}$  Core-Shell Nanoparticles". *Langmuir*. **27**, 14025–14032, 2011.
- [159] SURYANARAYANA, C. & NORTON, M. G. *X-ray Diffraction: A Practical Approach*. 1a ed. Nova Iorque, Plenum Press, 1998.
- [160] SCZANCOSKI, J. C. *Estudo das Propriedades Ópticas e Morfológicas de Pós de  $\text{SrMoO}_4$  Processados em Sistemas Hidrotérmicos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2011.
- [161] CAVALCANTE, L. S.; MARQUES, V. S.; SCZANCOSKI, J. C.; ESCOTE, M. T.; JOYA, M. R.; VARELA, J. A.; SANTOS, M. R. M. C.; PIZANI, P. S. & LONGO, E. "Synthesis, structural refinement and optical behavior of  $\text{CaTiO}_3$  powders: A comparative study of processing in different furnaces". *Chem. Eng. J.* **143**, 299–307, 2008.
- [162] CENGIZ, B.; GOKCE, Y.; YILDIZ, N.; AKTAS, Z. & CALIMLI, A. "Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles". *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **322**, 29–33, 2008.
- [163] KOUMOULIDIS, G. C.; KATSOUNLIDIS, A. P.; LADAVOS, A. K.; POMONIS, P. J.; TRAPALIS, C. C.; SDOUKOS, A. T. & VAIMAKIS, T. C. "Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route". *J. Colloid Interface Sci.* **259**, 254–260, 2003.
- [164] WANG, L.; NEMOTO, R. & SENNA, M. "Three-dimensional porous network structure developed in hydroxyapatite-based nanocomposites containing enzyme pretreated silk fibroin". *J. Nanoparticle Res.* **6**, 91–98, 2004.
- [165] FOWLER, B.O. "Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution." *Inorg. Chem.* **13**, 194–207, 1974.
- [166] PENEL, G.; LEROY, G.; REY, C. & BRES, E. "Microraman spectral study of the  $\text{PO}_4$  and  $\text{CO}_3$  vibrational modes in synthetic and biological apatites". *Calcif. Tissue Int.* **63**, 475–481, 1998.
- [167] LEUNG, Y.; WALTER, M. A. & LEGEROS, R. Z. "Second derivative infrared spectra of hydroxyapatite". *Spectrochim. Acta.* **46A**, 1453–1459, 1990.

- [168] CORNO, M.; BUSCO, C.; CIVALLERI, B. & UGLIENGO, P. "Periodic *ab initio* study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 2464–2472, 2006.
- [169] NOGUEIRA, I. C. Fotoluminescência dos Compostos  $(\text{Ba}_{1-x}\text{Sr}_x)\text{MoO}_4$  Sintetizados com Diferentes Solventes. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2013.
- [170] GIBSON, I. R.; REHMAN, I.; BEST, S. M. & BONFIELD, W. "Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to B-tricalcium phosphate". *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **12**, 799–804, 2000.
- [171] DROUET, C.; BOSCH, F.; BANU, M.; LARGEOT, C.; COMBES, C.; DECHAMBRE, G.; ESTOURNES, C.; RAIMBEAUS, G. & REY, C. "Nanocrystalline apatites: From powders to biomaterials". *Powder Technol.* **190**, 18–122, 2009.
- [172] REHMAN, I.; BONFIELD, W. "Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy". *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **8**, 1–4, 1997.
- [173] FOWLER, B.O.; MARKOVIC, M. & BROWN, W. E. "Octacalcium phosphate. 3. Infrared and raman vibrational spectra". *Chem. Mater.* **5**, 1417–1423, 1993.
- [174] BHAT, S. S.; WAGHMARE, U. V. & RAMAMURTY, U. "First-principles study of structure, vibrational, and elastic properties of stoichiometric and calcium-deficient hydroxyapatite". *Cryst. Growth Des.* **14**, 3131–3141, 2014.
- [175] WINAND, L. & DALLEMAGNE, M. J. "Hydrogen bonding in the calcium phosphates". *Nature.* **193**, 369–370, 1962.
- [176] BERRY, E.E. The structure and composition of some calcium-deficient apatites-II, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **29**, 1585–1590, 1967.
- [177] KUHL, V. G. & NEBERGALL, H. "Hydrogenphosphat-und carbonatapatite". *Zeitschrift Für Anorg. Und Allg. Chemie.* **324**, 313–320, 1963.
- [178] KIM, D. W.; CHO, I. S.; KIM, J. Y.; JANG, H. L.; HAN, G. S.; RYU, H. S.; SHIN, H.; JUNG, H. S.; KIM, H. & HONG, K. S. "Simple large-scale synthesis of hydroxyapatite nanoparticles: *In situ* observation of crystallization process". *Langmuir.* **26**, 384–388, 2010.
- [179] CHUNG, S. -Y.; KIM, Y. -M.; KIM, Y. -G. & KIM, Y.-J. "Multiphase transformation and Ostwald's rule of stages during crystallization of a metal phosphate". *Nat. Phys.* **5**, 68–73, 2009.
- [180] FEENSTRA, T. P. & de BRUYN, P. L. "The ostwald rule of stages in precipitation from highly supersaturated solutions: A model and its application to the formation of the nonstoichiometric amorphous calcium phosphate precursor phase". *J. Colloid Interface Sci.* **84**, 66–72, 1981.



- [181] LIU, C.; HUANG, Y.; SHEN, W. & CUI, J. "Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11". *Biomaterials*. **22**, 301–306, 2001.
- [182] WANG, L. & NANCOLLAS, G. H. "Calcium orthophosphates: Crystallization and dissolution". *Chem. Rev.* **108**, 4628–4669, 2008.
- [183] LYNN, A. K. & BONFIELD, W. "A novel method for the simultaneous, titrant-free control of pH and calcium phosphate mass yield". *Acc. Chem. Res.* **38**, 202–207, 2005.
- [184] OLIVEIRA, C. R. de. *Estudos em Crescimento Orientado de Nanocristais em Colóides*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2005.
- [185] JÄGER, C.; WELZEL, I.; MEYER-ZAIKA, W. & EPPLE, M. "A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite". *Magn. Reson. Chem.* **44**, 573–580, 2006.
- [186] REY, C.; COMBES, C.; DROUET, C.; SFIHI, H. & BARROUG, A. "Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials". *Mater. Sci. Eng. C*. **27**, 198–205, 2007.
- [187] CAZALBOU, S.; COMBES, C.; EICHER, D. & REY, C. "Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates". *J. Mater. Chem.* **14**, 2148–2153, 2004.
- [188] TAO, J.; PAN, H.; ZENG, Y.; XU, X. & TANG, R. "Roles of amorphous calcium phosphate and biological additives in the assembly of hydroxyapatite nanoparticles". *J. Phys. Chem. B*. **111**, 13410–13418, 2007.
- [189] CORNO, M.; RIMOLA, A.; BOLIS, V. & UGLIENGO, P. "Hydroxyapatite as a key biomaterial: Quantum-mechanical simulation of its surfaces in interaction with biomolecules". *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 6309–6329, 2010.
- [190] ZHAN, J.; TSENG, Y. -H.; CHAN, J. C. C. & MOU, C. -Y. "Biomimetic formation of hydroxyapatite nanorods by a single-crystal-to-single-crystal transformation". *Adv. Funct. Mater.* **15**, 2005–2010, 2005.
- [191] BOISTELLE, R. & LOPEZ-VALERO, I. "Growth units and nucleation: The case of calcium phosphates". *J. Cryst. Growth*. **102**, 609–617, 1990.
- [192] BROWN, W. E.; SMITH, J. P.; LEHR, J. R. & FRAZIER, A. W. "Frazier, Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite". *Nature*. **196**, 1050–1055, 1962.
- [193] BROWN, W. E. "Octacalcium phosphate and hydroxyapatite". *Nature*. **196**, 1048–1050, 1962.
- [194] TERPSTRA, R. A. & BENNEMA, P. "Crystal morphology of octacalcium phosphate: Theory and observation". *J. Cryst. Growth*. **82**, 416–426, 1987.

- [195] LIJIMA, M.; TOHDA, H. & MORIWAKI. "Growth and structure of lamellar mixed crystals of octacalcium phosphate and apatite in a model system of enamel formation" *J. Cryst. Growth.* **116**, 319–326, 1992.
- [196] YACOBI, B.G. *Semiconductor Materials: An Introduction to Basic Principles.* Nova Iorque, Kluwer Academic Publishers, 2006.
- [197] MATSUNAGA, K. & KUWABARA, A. "First-principles study of vacancy formation in hydroxyapatite". *Phys. Rev. B.* **75**, 014102, 2007.
- [198] JAY, E. E.; MALLINSON, P. M.; FONG, S. K.; METCALFE, B. L. & GRIMES, R. W. "Divalent cation diffusion in calcium fluorapatite". *J. Mater. Sci.* **46**, 7459–7465, 2011.
- [199] KRÖGER, F. A. & VINK, H. J. "Relations between the concentrations of imperfections in crystalline solids". *Solid State Phys.* **3**, 307–435, 1956.
- [200] CICOIRA, F.; SANTATO, C. *Organic Electronics: Emerging Concepts and Technologies.* Weinheim, Wiley-VHC, 2013.
- [201] BHAT, S. S.; WAGHMARE, U. V. & RAMAMURTY, U. "First-principles study of structure, vibrational, and elastic properties of stoichiometric and calcium-deficient hydroxyapatite". *Cryst. Growth Des.* **14**, 3131–3141, 2014.
- [202] TOLVAJ, L.; MITSUI, K. & VARGA, D. "Validity limits of Kubelka-Munk theory for DRIFT spectra of photodegraded solid wood". *Wood Sci. Technol.* **45**, 135–146, 2011.
- [203] SLEPKO, A. & DEMKOV, A. A. "First-principles study of the biomineral hydroxyapatite". *Phys. Rev. B.* **84**, 134108, 2011.
- [204] CALDERÍN, L.; STOTT, M. J. & RUBIO, A. "Electronic and crystallographic structure of apatites". *Phys. Rev. B.* **67**, 134106, 2003.
- [205] LINH, N. T. T.; TUAN, P. D. & van DZUNG, N. "The shifts of band gap and binding energies of Titania/Hydroxyapatite material". *J. Compos.* **2014**, 283034, 2014.
- [206] TSUKADA, M.; WAKAMURA, M.; YOSHIDA, N. & WATANABE, T. "Band gap and photocatalytic properties of Ti-substituted hydroxyapatite: Comparison with anatase-TiO<sub>2</sub>". *J. Mol. Catal. A Chem.* **338**, 18–23, 2011.
- [207] MCCLUSKEY, M. D. & HALLER, E. E. *Dopants and Defects in Semiconductors.* Londres, Taylor & Francis, 2012.
- [208] ROUT, S. K.; CAVALCANTE, L. S.; SCZANCOSKI, J. C.; BADAPANDA, T.; PANIGRAHI, S.; LI, M. S. & LONGO, E. "Photoluminescence property of Ba(Zr<sub>0.25</sub>Ti<sub>0.25</sub>)O<sub>3</sub> powders prepared by solid state reaction and polymeric precursor method, *Phys. B.* **404**, 3341–3347, 2009.
- [209] PENN, R. L. & BANFIELD, J. F. "Imperfect oriented attachment: Dislocation

- generation in defect-free nanocrystals". *Science*. **281**, 969–971, 1998.
- [210] BRILLSON, L. J. *Surfaces and Interfaces of Electronic Materials*. Weinheim, Wiley-VHC, 2012.
- [211] HERBERT, F. W.; KRISHNAMOORTHY, A.; VAN VLIET, K. J.; YILDIZ, B. "Quantification of electronic band gap and surface states on FeS<sub>2</sub>(100)". *Surf. Sci.* **618**, 53–61, 2013.
- [212] ARAI, Y. *Chemistry of Powder Production*. Londres, Chapman & Hall, 1996.
- [213] PAULEAU, Y. *Materials Surface Processing by Direct Energy Techniques*. Amsterdã, Elsevier, 2006.
- [214] TU, K.-N. *Electronic Thin-Film Reliability*. Nova Iorque, Cambridge University Press, 2011.
- [215] HULL, R.; PARISI, J.; OSGOOD, R. M. & WARLIMONT, H. *Springer Series in Materials Science*. Berlim, Springer-Verlag, 2006.
- [216] MONROE, E. A.; VOTAVA, W.; BASS, D. B. & MCMULLEN, J. "New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants". *J. Dent. Res.* **50**, 860–861, 1971.
- [217] MUKHERJEE, B.; VISWANATH, B. & RAVISHANKAR, N. "Functional nanoporous structures by partial sintering of nanorod assemblies". *J. Phys. D. Appl. Phys.* **43**, 455301, 2010.
- [218] LEGEROS, R. Z.; BONEL, G. & LEGROS, R. "Types of "H<sub>2</sub>O" in human enamel and in precipitated apatites". *Calcif. Tissue Res.* **26**, 111–118, 1978.
- [219] RAYNAUD, S. & CHAMPION, E. "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering". *Biomaterials.* **23**, 1073–1080, 2002.
- [220] MORTIER, A.; LEMAITRE, J. & ROUXHET, P. G. "Temperature-programmed characterization of synthetic calcium-deficient phosphate apatites". *Thermochim. Acta.* **143**, 265–282, 1989.
- [221] SALIMI, M. N.; BRIDSON, R. H.; GROVER, L. M. & LEEKE, G. A. "Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles". *Powder Technol.* **218**, 109–118, 2012.
- [222] SWAIN, S. K.; DOROZHKIN, S. V. & SARKAR, D. "Synthesis and dispersion of hydroxyapatite nanopowders". *Mater. Sci. Eng. C.* **32**, 1237–1240, 2012.
- [223] TÕNSUAADU, K.; PELD, M. & BENDER, V. "Thermal analysis of apatite structure". *J. Therm. Anal. Calorim.* **72**, 363–371, 2003.
- [224] YOUNG, R. A. & HOLCOMB, D. W. "Role of acid phosphate in hydroxyapatite lattice expansion". *Calcif. Tissue Int.* **36**, 60–63, 1984.

- [225] DOI, Y.; MORIWAKI, Y.; AOBA, T.; OKAZAKI, M.; TAKAHASHI, J. & JOSHIN, K. "Carbonate apatites from aqueous and non-aqueous media studied by ESR, IR, and X-ray diffraction: Effect of  $\text{NH}_4^+$  ions on crystallographic parameters". *J. Dent. Res.* **61**, 429–434, 1982.
- [226] SIMPSON, D. R. "Substitutions in apatite: I. Potassium-bearing apatite". *Am. Mineral.* **53**, 432–444, 1968.
- [227] APFELBAUM, F.; DIAB, H.; MAYER, I. & FEATHERSTONE, J. D. B. "An FTIR study of carbonate in synthetic apatites". *J. Inorg. Biochem.* **45**, 277–282, 1992.
- [228] DOWKER, S. E. P. & ELLIOTT, J. C. "Infrared treated study of trapped apatites carbon dioxide in thermally treated apatites". *J. Solid State Chem.* **47**, 164-173, 1983.
- [229] GEE, A. & DEITZ, V. R. "Pyrophosphate formation upon ignition of precipitated basic calcium phosphates". *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2961–2965, 1955.
- [230] BERRY, E. E. "The structure and composition of some calcium-deficient apatites". *J. Inorg. Nucl. Chem.* **29**, 317-327, 1967.
- [231] TROMBE, J. C. & MONTEL, G. "Some features of the incorporation of oxygen in different oxidation states in the apatitic lattice-II On the synthesis and properties of calcium and strontium peroxyapatites". *J. Inorg. Nucl. Chem.* **40**, 23–26, 1978.
- [232] ANTONAKOS, A.; LIAROKAPIS, E. & LEVENTOURI, T. "Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites". *Biomaterials.* **28**, 3043–3054, 2007.
- [233] KIJIMA, T. & TSUTSUMI, M. "Preparation and thermal properties of dense polycrystalline oxyhydroxyapatite". *J. Am. Ceram. Soc.* **62**, 455–460, 1979.
- [234] LIU, Y. & SHEN, Z. "Dehydroxylation of hydroxyapatite in dense bulk ceramics sintered by spark plasma sintering". *J. Eur. Ceram. Soc.* **32**, 2691–2696, 2012.
- [235] BHARATH, G.; NALDONI, A.; RAMSAIT, K. H.; ABDEL-WAHAB, A.; MADHU, R.; ALSHARAEH, E. & PONPANDIAN, N. "Enhanced electrocatalytic activity of gold nanoparticles on hydroxyapatite nanorods for sensitive hydrazine sensors". *J. Mater. Chem. A.* **4**, 6385–6394, 2016.
- [236] CHUSUEI, C. C.; GOODMAN, D. W.; van STIPDONK, M. J.; JUSTES, D. R. & SCHWEIKERT, E. A. "Calcium phosphate phase identification using XPS and time-of-flight cluster SIMS". *Anal. Chem.* **71**, 149–153, 1999.
- [237] LU, H. B.; CAMPBELL, C. T.; GRAHAM, D. J. & RATNER, B. D. "Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS". *Anal. Chem.* **72**, 2886–2894, 2000.
- [238] KACIULIS, S.; MATTOGNO, G.; PANDOLFI, L.; CAVALLI, M.; GNAPPI, G. & MONTENERO, A. "XPS study of apatite-based coatings prepared by sol-gel

- technique". *Appl. Surf. Sci.* **151**, 1–5, 1999.
- [239] XU, J. L. & KHOR, K. A. "Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method". *J. Inorg. Biochem.* **101**, 187–195, 2007.
- [240] DAS, P & JANA, N. R. "Length-controlled synthesis of calcium phosphate nanorod and nanowire and application in intracellular protein delivery". *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **8**, 8710-8720, 2016.
- [241] CHAMPION, E. "Sintering of calcium phosphate bioceramics". *Acta Biomater.* **9**, 5855–5875, 2013.
- [242] FILGUEIRA, M. R. T.; MKHONTO, D. & de LEEUW, N. H. "Computer simulations of the adsorption of citric acid at hydroxyapatite surfaces". *J. Cryst. Growth.* **294**, 60–68, 2006.
- [243] WANG, J. & SHAW, L. L. "Morphology-enhanced low-temperature sintering of nanocrystalline hydroxyapatite". *Adv. Mater.* **19**, 2364–2369, 2007.
- [244] SHANG, C.; JIANG, H.; SHANG, X.; LI, M. & ZHAO, L. "Investigation on the luminescence improvement of nanosized  $\text{La}_2\text{O}_3/\text{Eu}^{3+}$  phosphor under charge-transfer excitation". *J. Phys. Chem. C.* **115**, 2630–2635, 2011.
- [245] KARBOWIAK, M. & HUBERT, S. "Site-selective emission spectra of  $\text{Eu}^{3+}:\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ". *J. Alloys Compd.* **302**, 87–93, 2000.
- [246] HOLLIDAY, K.; HANDLEY-SIDHU, S.; DARDENNE, K.; RENSHAW, J.; MACASKIE, L.; WALTHER, C. & STUMPF, T. "A new incorporation mechanism for trivalent actinides into bioapatite: a TRILFS and EXAFS study". *Langmuir.* **28**, 3845–3851, 2012.
- [247] HOLLIDAY, K.; DARDENNE, K.; WALTHER, C. & STUMPF. "The incorporation of europium into apatite: A new explanation". *Radiochim. Acta.* **101**, 267–272, 2012.
- [248] LONG, M.; HONG, F.; LI, W.; LI, F.; ZHAO, H.; LV, Y.; LI, H.; HU, F.; SUN, L.; YAN, C. & WEI, Z. "Size-dependent microstructure and europium site preference influence fluorescent properties of  $\text{Eu}^{3+}$ -doped  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  nanocrystal, *J. Lumin.* **128**, 428–436, 2008.
- [249] MARTIN, P.; CARLOT, G.; CHEVARIER, A.; DEN-AUWER, C. & PANCZER, G. "Mechanisms involved in thermal diffusion of rare earth elements in apatite". *J. Nucl. Mater.* **275**, 268–276, 1999.
- [250] GAFT, M.; REISFELD, R.; PANCZER, G.; SHOVAL, S.; CHAMPAGNON, B. & BOULON, G. " $\text{Eu}^{3+}$  luminescence in high-symmetry sites of natural apatite". *J. Lumin.* **72-74**, 572–574, 1997.
- [251] PIRIOU, B.; FAHMI, D.; DEXPERT-GHYS, J.; TAITAI, A. & LACOUT, J. L. "Unusual fluorescent properties of  $\text{Eu}^{3+}$  in oxyapatites". *J. Lumin.* **39**, 97–103,

1987.

- [252] LIAO, C.-J.; LIN, F.-H.; CHEN, K.-S. & SUN, J.-S. "Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere". *Biomaterials*. **20**, 1807–1813, 1999.
- [253] CIHLAR, J.; BUCHAL, A. & TRUNEC, M. "Kinetics of thermal decomposition of hydroxyapatite bioceramics". *J. Mater. Sci.* **34**, 6121–6131, 1999.
- [254] KAZIN, P. E.; GAZIZOVA, O. R.; KARPOV, A. S.; JANSEN, M. & TRET'YAKOV, Y. D. "Incorporation of 3d-metal ions in the hexagonal channels of the  $\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  apatite". *Solid State Sci.* **9**, 82–87, 2007.
- [255] KAZIN, P. E.; ZYKIN, M. A.; TRET'YAKOV, Y. D.; JANSEN, M. "Synthesis and Properties of Colored Copper-Containing Apatites of Composition  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cu}_y\text{O}_{y+\delta}(\text{OH})_{0.5-y-\delta}\text{X}_{0.5}$  ( $\text{X} = \text{OH}, \text{F}, \text{Cl}$ )". *Russ. J. Inorg. Chem.* **53**, 362–366, 2008.
- [256] HUANG, S.; ZHU, J. & ZHOU, K. "Effects of  $\text{Eu}^{3+}$  ions on the morphology and luminescence properties of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by one-step hydrothermal method". *Mater. Res. Bull.* **47**, 24–28, 2012.
- [257] Disponível em: <http://www.systat.com/products/PeakFit/> Acessado em 07/06/2015.
- [258] ESCOBAR, M. E. & BARAN, E. J. "Kristallographische daten und schwingungsspektren einiger oxoapatite der seltenen erden des typs  $\text{Ca}_8\text{Ln}_2(\text{PO}_4)_2\text{O}_2$ ". *Monatshefte Für Chemie.* **113**, 43–48, 1982.
- [259] AL-KATTAN, A.; DUFOUR, P.; DEXPERT-GHYS, J. & DROUET, C. "Preparation and physicochemical characteristics of luminescent apatite-based colloids". *J. Phys. Chem. C.* **114**, 2918–2924, 2010.
- [260] BLASSE, G.; BRIL, A. & NIEUWPOORT, W. C. "On the  $\text{Eu}^{3+}$  fluorescence in mixed metal oxides". *J. Phys. Chem. Solids.* **27**, 1587–1592, 1966.
- [261] BLASSE, G. "The  $\text{Eu}^{3+}$  luminescence as a measure for chemical bond differences in solids". *Chem. Phys. Lett.* **20**, 573–574, 1973.
- [262] MYINT, T.; GUNAWIDJAJA, R. & EILERS, H. "Light-induced structural changes in Eu-doped  $(\text{Pb},\text{La})(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$  ceramics". *Appl. Phys. Lett.* **98**, 171906, 2011.
- [263] VORONKO, Y. K.; MAKSIMOVA, G. V. & SOBOL, A. A. "Anisotropic luminescence centers of  $\text{TR}^{+3}$  ions in fluoroapatite crystals". *Opt. Spectrosc.* **70**, 203–206, 1991.
- [264] ARDANOVA, L. I.; GET'MAN, E. I.; LOBODA, S. N.; PRISEDSKY, V. V.; TKACHENKO, T. V.; MARCHENKO, V. I.; ANTONOVICH, V. P.; CHIVIREVA, N. A.; CHEBISHEV, K. A. & LYASHENKO, A. S. "Isomorphous substitutions of rare earth elements for calcium in synthetic hydroxyapatites". *Inorg. Chem.* **49**, 10687–10693, 2010.

- [265] RAKOVAN, J. & REEDER, R. J. "Intracrystalline rare earth element distributions in apatite: Surface structural influences on incorporation during growth". *Geochim. Cosmochim. Acta.* **60**, 4435–4445, 1996.
- [266] BOYER, L.; PIRIOU, B.; CARPENA, J. & LACOUT, J. L. "Study of sites occupation and chemical environment of  $\text{Eu}^{3+}$  in phosphate-silicates oxyapatites by luminescence". *J. Alloys Compd.* **311**, 143–152, 2000.
- [267] CHEN, X. Y. & LIU, G. K. "The standard and anomalous crystal-field spectra of  $\text{Eu}^{3+}$ ". *J. Solid State Chem.* **178**, 419–428, 2005.
- [268] BEAURY, O.; FAUCHER, M. & CARO, P. "Crystal structure and fluorescence spectrum of  $3\text{Y}_2\text{O}_3, \text{WO}_3:\text{Eu}^{3+}$ ". *Mater. Res. Bull.* **13**, 175–185, 1978.
- [269] TERNANE, R.; PANCZER, G.; COHEN-ADAD, M. T.; GOUTAUDIER, C.; BOULON, G.; KBIR-ARIGUIB, N. & TRABELSI-AYEDI, M. "Relationships between structural and luminescence properties in  $\text{Eu}^{3+}$ -doped new calcium borohydroxyapatite". *Opt. Mater.* **16**, 291–300, 2001.
- [270] ZOUNANI, A.; ZAMBON, D. & COUSSEINS, J. C. "Spectroscopic study of  $\text{Eu}^{3+}$  in the fluorapatite  $\text{Sr}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$ ". *J. Alloys Compd.* **207/208**, 94–98, 1994.
- [271] ZOUNANI, A.; ZAMBON, D. & COUSSEINS, J. C. "Optical properties of  $\text{Eu}^{3+}$ -activated  $\text{Sr}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$  elaborated by coprecipitation". *J. Alloys Compd.* **188** (1992) 82–86.
- [272] ZHANG, C.; LI, C.; HUANG, S.; HOU, Z.; CHENG, Z.; YANG, P.; PENG, G. & LIN, J. "Self-activated luminescent and mesoporous strontium hydroxyapatite nanorods for drug delivery". *Biomaterials.* **31**, 3374–3383, 2010.
- [273] HUI, J.; ZHANG, X.; ZHANG, Z.; WANG, S.; TAO, L.; WEI, Y. & WANG, X. "Fluoridated  $\text{HAp}:\text{Ln}^{3+}$  ( $\text{Ln} = \text{Eu}$  or  $\text{Tb}$ ) nanoparticles for cell-imaging, *Nanoscale.* **4**, 6967–6970, 2012.
- [274] WILLIAMS, R. L.; HADLEY, M. J.; JIANG, P. J.; ROWSON, N. A.; MENDES, P. M.; RAPPOPORT, J. Z. & GROVER, L. M. "Thiol modification of silicon-substituted hydroxyapatite nanocrystals facilitates fluorescent labelling and visualisation of cellular internalisation". *J. Mater. Chem. B.* **1**, 4370–4378, 2013.
- [275] WEBB, R. H. "Confocal optical microscopy". *Reports Prog. Phys.* **59**, 427–471, 1999.