



CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS

**INFLUÊNCIA DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NO POTENCIAL ZETA DE
HIDROXIAPATITA DOPADAS COM ZINCO E CARBONATO**

Rio de Janeiro

2011

Alejandro Cristians Rios Cuadros

**INFLUÊNCIA DA ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NO POTENCIAL ZETA DE
HIDROXIAPATITA DOPADAS COM ZINCO E CARBONATO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Física do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), como requisito para obtenção do título Mestre em Física.

Orientador: Alexandre Rossi Malta

Rio de Janeiro

2011

*Esta dissertação é dedicada
à minha mãe, Rosa, e à meu pai Humberto.*

Agradecimentos

Os agradecimentos principalmente para o Senhor meu Deus que sempre esta ajudando e ensinando na minha vida.

A minha família que apesar pela distância são uma parte importante em meu coração, torcendo pelos sucessos de cada um deles: Donald, Vicky, Susana, Pierre, Claudia, (os magníficos) Bruno e Sebastian, e minhas irmãs Andrea e Pamela.

A minha namorada e amiga Ada Gabriela, que faz que fique tranqüilo cada vez que converso com ela (espero que sempre aconteça isso), pelo amor e por ter vindo nas ultimas festas 2011 a Brasil.

Ao professor Alexandre Rossi meu orientador desta dissertação, pela oportunidade, orientação, confiança e paciência na explicação dos resultados diversos na minha investigação.

A todos meus amigos e colegas do CBPF neste tempo do mestrado. A ordem da lista não é discriminatória: Bruno Gomes, Edward Quijada, Edson Pereira, Luis Durand, Fernanda Deus, Thamys Abrahão, Cesar Raitz, Guillermo Dueñas, Justiniano Quispe, Max Jáuregui, Enrique Arias, Elvis López, Carlos Ospina, Azucena Rivasplata.

Às secretarias da área de Física Aplicada Gil e Monica pelas inumeráveis vezes que me ajudaram para Xerox de algum trabalho, envio de documentos, material de oficina, etc. A Maria Elena que chegou como caída do céu para a discussão sobre os dados de potencial zeta. Ao pessoal do grupo de biomateriais: Cleonice, Silvia, Carlos Leoni, Jessica, Fabio, Nicola que ajudaram com seus conhecimentos e experiências em química e na preparação dos materiais de hidroxiapatita. Todo meu carinho a Elena Mavropoulos pela amizade e Andrea Costa pela ajuda na redação de minha dissertação e entendimento das análises de Potencial Zeta e de Dicroísmo Circular.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

O potencial zeta, $P(\zeta)$, é uma grandeza importante para o estudo de sistemas nanoestruturados coloidais, pois ele informa sobre a carga da superfície de partículas em suspensão. Medidas de potencial zeta têm sido pouco utilizadas para caracterizar as superfícies de biomateriais coloidais tais como a hidroxiapatita. Neste trabalho, investigou-se o comportamento do potencial zeta em função do pH de hidroxiapatitas sintetizadas em temperaturas de 90°C e 37°C e a 37°C substituídas com Zn^{2+} e CO_3^{2-} , antes e após a adsorção das proteínas albumina e insulina. Para isto, utilizou-se uma solução com uma concentração molar de 1mM de KCl e como agentes modificadores do pH: HCl 0,01M e NaOH 0,01M. Os resultados mostraram que o $P(\zeta)$ não é afetado pela diminuição da cristalinidade da HAp em pHs ácidos, indicando que a mudança na superfície não modifica a atividade dos íons fosfatos e hidroxilas. Em pH maiores que o ponto isoelétrico, IEP, o $P(\zeta)$ diminuiu com o pH. Este resultado revela que os sítios dos íons Ca^{2+} são os mais ativos e os mais sensíveis às variações da estrutura da superfície da HAp. A substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} produz uma diminuição do $P(\zeta)$ para valores do pH maiores que o ponto isoelétrico confirmando que a carga da dupla camada da superfície é determinada pelos sítios catiônicos (Ca^{2+} and Zn^{2+}). A substituição do PO_4^{3-} pelo CO_3^{2-} não altera os valores do $P(\zeta)$ em toda a faixa de pH analisado devido a estabilidade dos sítios dos íons fosfatos. A adsorção das proteínas, albumina e da insulina, na superfície da HAp produz pequena diminuição do $P(\zeta)$ da HAp e da HAp substituída com CO_3^{2-} . Este efeito pode ser atribuído a aglomeração das proteínas na superfície da HAp. A substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} produz um grande decréscimo dos valores do $P(\zeta)$ em todo o intervalo de pH estudado. Os valores negativos do $P(\zeta)$ podem ser explicados pela mudança da estrutura conformacional das proteínas devido à interação com o zinco na superfície da HAp. Esta interação desnatura as proteínas aumentando a sua área ocupada na superfície da HAp.

Abstract

The zeta potential, $P(\zeta)$, is an important physical parameter for the study of nanostructured colloidal systems because it characterizes the surface charge of suspended particles. Zeta potential measurements have been used to characterize colloidal surfaces of biomaterials such as hydroxyapatite. In this paper, we investigated the zeta potential as a function of pH of hydroxyapatites synthesized at temperatures of 90°C and 37°C and HAp 37°C doped with Zn^{2+} and CO_3^{2-} , before and after adsorption of the proteins albumin and insulin. For this, we used a solution 1 mM KCl and pH modifying agents such as HCl (0,01M) and NaOH (0,01M). The results showed that the $P(\zeta)$ was not affected by the decrease of HAp crystallinity in acidic pHs. At pH higher than the isoelectric point, IEP, the $P(\zeta)$ decreases with pH. This result showed that Ca^{2+} sites were more active and more sensitive to variation of HAp structure. The replacement of Ca^{2+} for Zn^{2+} induced a decrease on $P(\zeta)$ for pH higher than the isoelectric point, indicating that the HAp surface charge was mainly due to the cationic sites (Ca^{2+} and Zn^{2+}). The replacement of the CO_3^{2-} , PO_4^{3-} did not change the zeta potential throughout the studied pH range because the stability of the phosphate sites. The adsorption of proteins, albumin and insulin, on HAp surface produced a small decrease of $P(\zeta)$ of HAp and HAp substituted for CO_3^{2-} . This effect was attributed to agglomeration of proteins on the surface of HAp. The replacement of Ca^{2+} for Zn^{2+} produced a large decrease on $P(\zeta)$ in the whole pH range studied. The negative $P(\zeta)$ values was explained by changes on the protein conformational structure due to interaction with the zinc on the HAp surface. This interaction induced the protein denaturation, which increased their coating area on the HAp surface.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Ilustração do efeito Tyndall para duas soluções (esquerda) dispersão coloidal (direita) solução.....	20
Figura 2.2: Ilustração dos mecanismos de estabilização de suspensões: (a)estabilização eletrostática, (b) estabilização estérica e (c) estabilização eletroestérica	20
Figura 2.3: Ilustração da dupla camada elétrica numa superfície positiva	22
Figura 2.4: Variação do potencial elétrico ao longo da distancia, desde a superfície da partícula	23
Figura 2.5: Variação da concentração dos íons ao longo da distancia, desde a superfície da partícula	24
Figura 2.6: O comprimento de Debye-Hückel decai em função da concentração e tipo de eletrólito	26
Figura 2.7: Ilustração da dupla camada elétrica em uma superfície positiva	27
Figura 2.8: Ilustração da dupla camada elétrica em uma superfície positiva identificando o potencial zeta $P(\zeta)$	28
Figura 2.9: Forças que agem sobre uma partícula coloidal numa solução aquosa com um campo elétrico	30
Figura 2.10: Diagrama da dupla camada elétrica ao redor de uma pequena carga coloidal.....	31
Figura 2.11: Forças que atuam em um elemento de fluido próximo a uma superfície carregada	32
Figura 2.12: Diagrama de bloco da parte ótica Heterodyne utilizada para medição de potencial zeta no equipamento Zeta Plus da Brookhaven Instruments Corporation.....	35

Figura 2.13: Estrutura da HAp mostrando a célula unitária hexagonal contendo 10 íons Ca^{2+} ocupando duas posições diferentes: seis no sítio Ca(1), alinhados em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c, e quatro no sítio Ca(2), alinhados em coluna; triângulos equiláteros de íons O^{2-} e de íons Ca^{2+} estão ligados entre si por dois íons fosfato situados em planos perpendiculares à direção c e outros dois paralelos a esta direção	39
Figura 2.14: Estrutura da hidroxiapatita substituída com zinco. Os átomos nos sítios $\text{Ca}(I)$, $\text{Ca}(II)$, O, H e Zn são mostrados como: esferas amarelas, azul, vermelho, preto e verde, respectivamente. Os grupos fosfatos são mostrados em tetraedros cinza	40
Figura 2.15: Mostra a ocupação do carbonato nos sítios de fósforo	42
Figura 2.16: Mostra o modelo de preenchimento espacial da molécula de albumina do soro com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e resíduos neutros em amarelo. (A) vista frontal, (B) vista traseira, (C) lado esquerda, (D) lado direito.....	43
Figura 2.17: Ilustração esquemática do processo de eventos que acontece depois da implantação de um biomaterial.....	44
Figura 3.1: Descrição do modelo de Bragg para planos formados com distintos tipos de átomos	50
Figura 3.2: Modos de vibração da molécula de água.....	52
Figura 3.3: Modos de vibração do PO_4^{3-}	52
Figura 3.4: Espectrômetro de FTIR acoplado ao microscópio AIM8800.....	53
Figura 4.1: Difratoograma de XRD da amostra HAp sintetizada a 90°C.	56
Figura 4.2 Largura da linha na orientação (002) da HAp sintetizada 90°C.	57
Figura 4.3: Espectro do infravermelho da HAp sintetizada a 90°C.	57
Figura 4.4: Difratoograma de XRD da amostra HAp sintetizada a 37°C.....	58
Figura 4.5: Largura da linha na orientação (002) da HAp sintetizada 37 °C.....	59

Figura 4.6: Espectro do infravermelho da HAp Sintetizada a 37°C.	59
Figura 4.7: Variação do potencial zeta da HAp com o pH (T=25 °C)	61
Figura 4.8: Variação do potencial zeta da HAp com varias concentrações de (PPa),(O)Não modificado, (◇)2, (△)4, e (□)6	62
Figura 4.9: Variação do potencial zeta da HAp com o pH (T=25 °C)	62
Figura 4.10: Variação do potencial zeta da HAp com o pH na ausência e na presença de diferentes dispersantes	63
Figura 4.11: Potencial zeta das amostras HAp90 e HAp37 em função do pH.	64
Figura 4.12: Difratoograma de XRD da amostra HAp:Zn ²⁺ sintetizada a 37°C.	68
Figura 4.13: Largura da linha na orientação (002) da HAp:Zn ²⁺ sintetizada 37 °C.....	68
Figura 4.14: Espectro de infravermelho da HAp:Zn ²⁺ sintetizada a 37°C.	69
Figura 4.15: Potencial zeta para pH 7.4 por quantidade de massa de Zinco na hidroxiapatita.....	70
Figura 4.16: Potencial zeta das amostras da HAp37 e HAp:Zn ²⁺ em função do pH.....	70
Figura 4.17: Difratoograma da HAp:CO ₃ ²⁻ sintetizada a 37°C.	73
Figura 4.18: Largura da linha na orientação (002) da HAp:CO ₃ ²⁻ sintetizada a 37°C.	73
Figura 4.19: Espectro de infravermelho da HAp:CO ₃ ²⁻ sintetizada a 37°C.	74
Figura 4.20: Potencial zeta da HAp e CHA vs pH.	75
Figura 4.21: Potencial zeta das amostras de HAp:CO ₃ ²⁻ e HAp37 em função do pH.	76
Figura 4.22: Adsorção da BSA e da insulina (24 horas) na HAp37, HAp:Zn ²⁺ e HAp:CO ₃ ²⁻ sintetizadas a 37° C em pH 7,4. Massa inicial de BSA e insulina na solução igual a 78,96 mg e 117,6 mg, respectivamente.	77
Figura 4.23: Espectro de infravermelho da HAp37, HAp37+BSA e HAp+INS.....	78

Figura 4.24: Espectro de Infravermelho da HAp:Zn^{2+} , $\text{HAp:Zn}^{2+}+\text{BSA}$, $\text{HAp:Zn}^{2+}+\text{INS}$	79
Figura 4.25: Espectro de Infravermelho da HAp:CO_3^{2-} , $\text{HAp:CO}_3^{2-}+\text{BSA}$, $\text{HAp:CO}_3^{2-}+\text{INS}$	79
Figura 4.26: (a) Isotermas de adsorção da BSA e (b) Potencial zeta da HAp sintetizada pelo método de BATCH T=25 °C e microreator (O)Batch.....	81
Figura 4.27: Potencial zeta da amostra de HAp37 com adsorção da albumina (BSA) em função do pH.....	82
Figura 4.28: Potencial zeta da amostra de HAp37 com adsorção com Insulina (INS) em função do pH.....	83
Figura 4.29: Potencial zeta da amostra de HAp:CO_3^{2-} com adsorção da albumina (BSA) em função do pH.....	84
Figura 4.30: Potencial zeta da amostra de HAp:CO_3^{2-} com adsorção da Insulina (INS) em função do pH.....	85
Figura 4.31: Potencial zeta da HAp:Zn^{2+} com adsorção da albumina (BSA) em função do pH.....	86
Figura 4.32: Potencial zeta da amostra da HAp:Zn^{2+} com adsorção da Insulina (INS) em função do pH.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Mostra as diferentes propriedades entre os tipos de sistemas	21
Tabela 2.2: Relação Ca/P das fases de apatita	37
Tabela 2.3: Valores de tamanho de cristalitos da HAp substituída com 5% molar de zinco nas direções (002) e (300)	41
Tabela 4.1: Valores do ponto isoelétrico (IEP), razão Ca/P, tamanho médio dos cristais e aglomerados	66
Tabela 4.2: Valores do ponto isoelétrico, razão Ca/P e tamanho médio dos cristais e aglomerados das amostras HApZn ²⁺ , HAp37	71
Tabela 4.3: Valores do ponto isoelétrico, razão Ca/P e tamanho médio dos cristais e aglomerados das amostras, HAp37 e HApCO ₃ ²⁻	75
Tabela 4.4: Ponto isoelétrico, IEP e Tamanho médio dos aglomerados da amostra HAp37 antes e após da adsorção de albumina (BSA) e insulina (INS).....	82
Tabela 4.5: Ponto isoelétrico (IEP) e Tamanho médio dos aglomerados da amostra HAp:CO ₃ ²⁻ antes e após da adsorção de albumina (BSA) e insulina (INS).....	84
Tabela 4.6: Ponto isoelétrico (IEP) e Tamanho médio dos aglomerados da amostra HAp:Zn ²⁺ antes e após da adsorção de albumina(BSA) e insulina(INS).....	87

Sumário

Capítulo 1-Introdução

1.1	Apresentação do Trabalho.....	13
1.2	Objetivos	16

Capítulo 2- Revisão Bibliográfica

2.1	Introdução aos Colóides	17
2.2	A Dupla Camada Elétrica	20
2.3	Teoria de Gouy-Chapman	21
2.4	Aproximação de Debye-Hückel.....	24
2.5	A Camada de Stern.....	25
2.6	O Fenômeno Eletrocinético	26
2.7	Equação de Hückel ($\kappa a < 0,1$).....	27
2.8	Equação de Smoluchowski ($\kappa a > 100$)	29
2.9	Equação de Henry	31
2.10	Potencial Zeta	32
2.11	Técnica LDV (Laser Doppler Velocimetry).....	33
2.12	Distribuição do Tamanho de Partícula por Espalhamento Dinâmico de Luz	34
2.13	Cerâmicas de Fosfato de Cálcio.....	34
2.14	Hidroxiapatita	35
2.15	Estrutura da Hidroxiapatita	36
2.16	Substituição na Hidroxiapatita: Zinco e Carbonato	38

2.16.1 O Zinco	38
2.16.2 O Carbonato	39
2.17 Adsorção de Proteínas.....	41

Capítulo 3- Materiais e Métodos

3.1 Síntese da Hidroxiapatita (HAp).....	44
3.1.1 Condições de Precipitação.....	45
3.1.2 Filtração, Lavagem e Secagem do Precipitado da HAp	45
3.2 Síntese da Hidroxiapatita Substituída com Zn^{2+} (HAp: Zn^{2+})	45
3.3 Síntese de Hidroxiapatita Substituída com Íons Carbonato. HAp: CO_3^{2-}	46
3.4 Sorção da Albumina e Insulina na HAp.....	46
3.5 Caracterização por Difração de Raios X (XRD)	47
3.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).	49
3.7 Distribuição do Tamanho das Partículas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta por (LDV).....	51

Capítulo 4- Resultados e Discussões

4.1 Hidroxiapatita Sintetizadas em Diferentes Temperaturas	
4.1.1 Caracterização Estrutural	54
4.1.2 Potencial Zeta	58
4.2 Hidroxiapatita Substituída por Zinco (HAp: Zn^{2+})	
4.2.1 Caracterização Química e Estrutural	64
4.2.2 Potencial Zeta (HAp: Zn^{2+})	67
4.3 Hidroxiapatita Substituída por Carbonato (HAp: CO_3^{2-})	

4.3.1	Caracterização Estrutural	70
4.3.2	Potencial Zeta da HAp:CO ₃ ²⁻	72
4.4	Potencial Zeta da HAp e da HAp Substituída por Zinco e Carbonato, Após a Adsorção da Albumina e Insulina	
4.4.1	Adsorção das Proteínas	74
4.4.2	Potencial Zeta da HAp37, Após a Adasorçãoda Albumina (BSA) e Insulina (INS)	78
4.4.3	Potencial Zeta da HAp:CO ₃ ²⁻ Após a Adasorçãoda Albumina (BSA) e Insulina (INS).....	81
4.4.4	Potencial Zeta da (HAp:Zn ²⁺) Após a Adsorçãoda Albumina (BSA) e Insulina (INS).....	83
	Capítulo 5- Conclusões.....	86
	Anexo I	88
	Capítulo 6- Referências Bibliográficas	93

Capítulo 1

Introdução

1.1 Apresentação do Trabalho

A Hidroxiapatita (HAp) com fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é uma molécula nanoestruturada em determinadas condições e que em solução apresenta-se na forma coloidal. Suas partículas possuem dimensões menores que 100nm e são extremamente reativas. Interagem com um grande número de metais e moléculas, em especial as proteínas e peptídeos.

O conhecimento das propriedades da superfície da HAp é de grande importância para o entendimento das interações deste biomaterial com o meio biológico e para as aplicações biomédicas. Devido a forte interação da superfície da HAp com várias moléculas orgânicas, a HAp tem sido proposta como agente carreador e liberador de drogas. Para o uso do material nestas aplicações deve-se conhecer a estrutura e carga da superfície da HAp em diferentes condições do meio, como por exemplo, pH e força iônica. Estas informações são fundamentais para se compreender determinadas características do material nanoparticulado como a tendência de formar agregados de nanopartículas. Esta última característica pode ser um fator limitante para o uso da HAp como matriz carreadora de moléculas. A literatura propõe duas abordagens para

melhorar a estabilidade de suspensões coloidais a longo prazo. A primeira abordagem envolve o conceito da repulsão eletrostática entre as cargas de superfície das nanopartículas, a segunda, envolve o efeito de estabilização estérica alcançado através da adsorção de moléculas orgânicas com cadeias longas, por exemplo, surfactantes (LI *et al.*, 2010).

O potencial zeta, $P(\zeta)$, é uma das grandezas físicas que informa sobre a força de repulsão que experimentam as partículas suspensão num meio. Quando determinado para diferentes condições de pH e força iônica do meio o potencial zeta pode trazer informações sobre o papel dos diferentes sítios da superfície do material nos processos de interação com constituintes do meio. O seu conhecimento pode explicar os mecanismos de interação da superfície com íons e moléculas, assim como indicar as melhores condições para diminuir a agregação do material.

O estudo do potencial zeta da hidroxiapatita não é simples porque o material pode ser sintetizado por diferentes rotas obtendo-se fases cristalinas e amorfas com estequiometria e características de superfície muito variável. Além disto, o material libera Ca^{2+} e PO_4^{3-} fósforo para o meio quando suspenso numa solução. Vários trabalhos foram realizados sobre o potencial zeta da HAp (KANDORI *et al.*, 2009, ZHU *et al.*, 2006, HAYAKAWA *et al.*, 2007, ZHANG *et al.*, 2005) e grandes variações foram obtidas. O entendimento sobre as causas destas variações é ainda limitado devido a complexidade da superfície da HAp e da sua reatividade em meios complexos. As informações são ainda mas limitadas quando o material estudado é uma HAp com substituição aniônica ou catiônica, ou ainda uma HAp após a adsorção de moléculas.

Neste trabalho estudou-se o comportamento do potencial zeta em duas amostras de HAp com razão Ca/P similar, mas com cristalinidades diferentes. Posteriormente, avaliou-se a influência da substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} e pelo CO_3^{2-} no comportamento do $P(\zeta)$, em diferentes pHs. A contribuição dos íons da superfície, Ca^{2+} e pelo PO_4^{3-} e OH^- foi discutida. Finalmente, avalia-se a influência da adsorção das proteínas albumina e insulina no valor de $P(\zeta)$. Estas proteínas possuem grande importância na medicina regenerativa e estão presentes no meio biológico onde os biomateriais são implantados.

Este trabalho está organizado em cinco capítulos e um anexo. Segue-se uma breve descrição de cada capítulo:

No capítulo 1 é uma descrição da HAp na forma estrutural e coloidal, além disso, comenta sobre as aplicações possíveis da HAp na área médica.

No capítulo 2 é um pequeno resumo sobre as características de um colóide a formação da dupla camada elétrica numa solução. Descreve sucintamente as teorias sobre o potencial zeta e sua medição. Faz uma revisão sobre a estrutura da hidroxiapatita, sua capacidade de substituição parcial por íons e a explicação da adsorção de proteínas.

No capítulo 3 descrevem-se os procedimentos e técnicas experimentais empregadas nas sínteses dos materiais e na adsorção de proteínas nas hidroxiapatitas; detalham-se as técnicas analíticas que foram usadas na caracterização das amostras.

No capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos para o potencial zeta de duas amostras de HA sintetizadas em 37°C e 90°C e com amostras de HA onde o Ca^{2+} e o PO_4^{3-} foram substituídos pelo Zn^{2+} e pelo CO_3^{2-} . Posteriormente apresenta-se os resultados das medidas do $P(\zeta)$ na amostra HAp sintetizada em 37°C, após a adsorção da albumina e da insulina.

No capítulo 5 resumem-se as principais conclusões deste trabalho.

No capítulo 6 registra as referências bibliográficas dos trabalhos citados no corpo desta dissertação.

1.2 Objetivos

Esta tese tem como objetivo medir o potencial zeta, $P(\zeta)$, de hidroxiapatitas na forma de partículas em suspensão em um meio com força iônica controlada, e em diferentes pHs.

Objetivos específicos

1. Medir o $P(\zeta)$, em amostras de hidroxiapatita com estequiometrias similares, mas sintetizadas em temperaturas de 37°C e 90°C.
2. Medir o $P(\zeta)$, em amostras de HAp com substituição parcial do Ca^{2+} e do PO_4^{3-} pelos íons Zn^{2+} e CO_3^{-2} , respectivamente.
3. Medir o $P(\zeta)$, em amostras de HAp e HAp substituídas com Zn^{2+} e CO_3^{-2} , após a adsorção das proteínas albumina (BSA) e insulina (INS).
4. Obter informações sobre os sítios ativos da superfície da HAp, após as substituições catiônicas e aniônicas.
5. Obter informações sobre mudanças na carga da dupla camada da superfície da HAp, após a adsorção de proteínas.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Introdução aos Colóides

Um sistema de dois ou mais componentes onde um deles é constituído por partículas submicroscópicas (1nm a 1 μ m) é chamado de coloidal. As propriedades das dispersões coloidais estão diretamente relacionadas com a elevada área superficial da fase dispersa bem como com a natureza química da superfície dessa fase (SHAW D., 1992). A desaglomeração do material da fase dispersa representa um problema por tratar se de partículas que aglomeram com facilidade. A **Tabela 2.1** mostra as diferentes propriedades para uma solução, dispersão coloidal e suspensões. Além disso, quando observamos um colóide sol (sólido em água) pelo microscópio, notamos que as partículas possuem um movimento browniano, nome em memória ao botânico inglês Robert Brown quem observou a suspensão de grãos de pólen no microscópio. Apesar das partículas coloidais serem tão pequenas que a dispersão pareça uniforme sob um microscópio, elas são grandes o suficiente para desviar a luz de modo eficiente, este efeito é chamado efeito Tyndall. A **Figura 2.1** mostra uma Ilustração do efeito Tyndall para uma solução e uma dispersão coloidal.



Figura 2.1: Ilustração do efeito Tyndall para duas soluções (esquerda) dispersão coloidal (direita) solução. Figura adaptada da pagina web de AVEBURYBOOKS: <http://aveburybooks.com/faraday/catalog.html>

Na literatura encontramos três maneiras de dispersar as partículas coloidais. Uma delas é a dispersão eletrostática devida à formação de uma dupla camada elétrica na superfície das partículas coloidais. Outra forma de dispersar as partículas é por meio da dispersão estérica. Neste tipo de dispersão são usados dispersantes poliméricos (aniônicos ou catiônicos) que recobrem a superfície das partículas impedindo a interação entre as partículas coloidais. A escolha do polímero depende da natureza da partícula coloidal. A última forma é a dispersão eletroestérica que combina os dois tipos de dispersão. **Figura 2.2** mostra as possíveis conformações de estabilização de uma suspensão (HOTZA D., 1997).

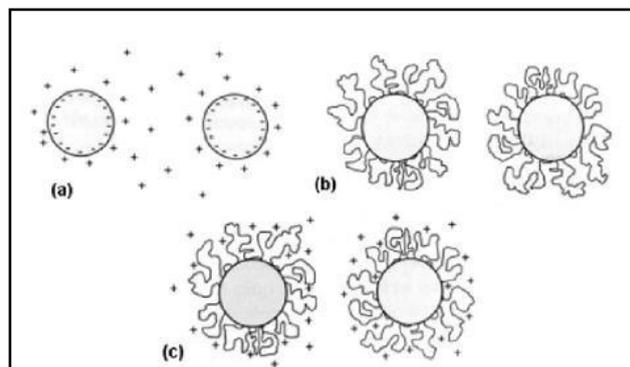


Figura 2.2: Ilustração dos mecanismos de estabilização de suspensões: (a)estabilização eletrostática, (b) estabilização estérica e (c) estabilização eletroestérica. Adaptado do CASTRO A., *et al* (2009).

Tabela 2.1: Mostra as diferentes propriedades entre os tipos de sistemas. Tabela adaptada da pagina web tutorvista. [www.tutorvista.com/content/sciencie/sciencie - i/matter-around-pure/types solutions.php#top](http://www.tutorvista.com/content/sciencie/sciencie-i/matter-around-pure/types%20solutions.php#top).

Propriedades	Solução	Dispersão Coloidal	Suspensão
Visibilidade das partículas	Não são visíveis a olho nu	Invisível para o olho nu. Visível sob um microscópio potente	As partículas em suspensão são grandes. Visíveis a olho nu
Tamanho médio da partícula	Menor que 1nm	Maior que 1nm e menor que 1 μ m	Muito maior que 1 μ m
Sedimentação das partículas	Não sedimentam	Sedimentam sob alta centrifugação	Sedimentam devido à força de gravidade
Filtração através de um papel filtro	Nenhum resíduo é formado	Nenhum resíduo é formado	Resíduo é formado
Aparência	Transparente	Translucido	Opaco
Natureza	Homogêneo	Heterogêneo	Heterogêneo

2.2 A Dupla Camada Elétrica

Toda partícula carregada sólida suspensa num meio líquido polar pode adquirir uma carga superficial. Os íons de cargas opostas (contra-íons) presentes na solução são atraídos para a superfície da partícula e os íons da mesma carga (co-íons) são afastados da superfície. A camada de contra-íons próximos à superfície do colóide é denominada camada de Stern. E os co-íons repelidos pelos contra-íons geram a camada difusa. Essa camada difusa conjuntamente com a camada de Stern forma a dupla camada elétrica (JIM W., 2009). A **Figura 2.3** mostra as duas camadas formadas de uma partícula coloidal numa solução. A teoria da dupla camada elétrica lida com esta distribuição de íons e, por tanto, com as magnitudes dos potenciais elétricos que ocorrem nas proximidades da superfície da partícula coloidal. Este é o primeiro passo para a compreensão de muitas observações experimentais sobre as propriedades eletrocinética, estabilidade, etc., de sistemas coloidais carregados (SHAW D., 1992).

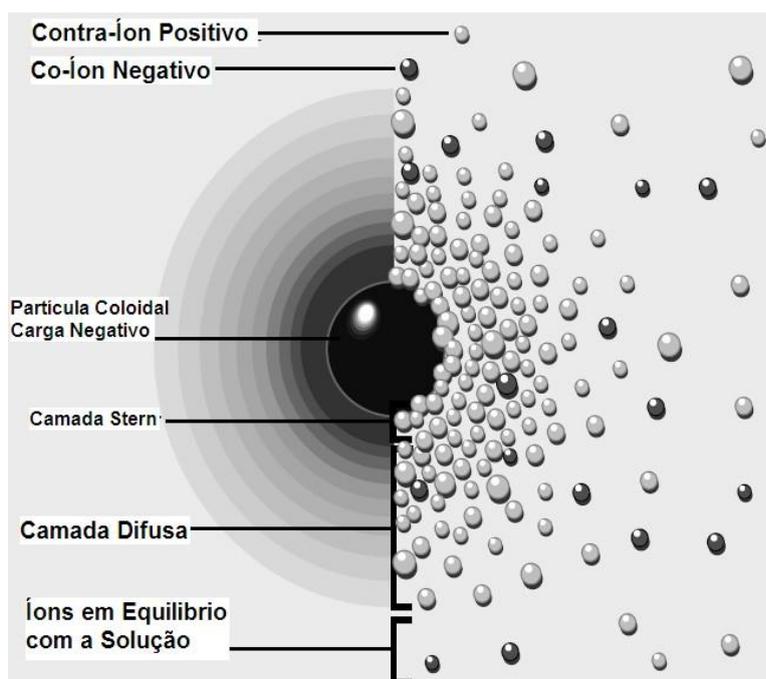


Figura 2.3: Ilustração da dupla camada elétrica numa superfície positiva. Figura adaptada da página web <http://www.zeta-meter.com/5min.pdf> ultimo acesso (01/06/2011).

2.3 Teoria de Gouy-Chapman

Um modelo quantitativo para entender os fenômenos que ocorrem na camada difusa foi desenvolvido pelos cientistas Gouy (1910) e Chapman (1913). O modelo é baseado nas seguintes hipóteses:

- 1 Os íons na camada difusa da dupla camada elétrica são cargas pontuais e estão distribuídas de acordo com a distribuição de Boltzmann.
- 2 A constante dielétrica do meio aquoso é o único capaz de influenciar a dupla camada elétrica e ela é considerada constante na camada difusa.
- 3 Considera-se um eletrólito simétrico na solução coloidal Z:Z,(i.e. 1:1, 2:2, 3:3, onde Z=1, 2, 3).
- 4 A superfície da partícula é assumida como plana e com uma distribuição de cargas uniforme.

No modelo de Gouy–Chapman a superfície da partícula tem um potencial elétrico ψ_0 , o que descreve uma exponencial em função distância em relação à superfície da partícula mostrado na **Figura 2.4**. Logo, a concentração dos contra-íons terá uma diminuição ao longo da distância e a concentração dos co-íons terá um aumento ao afastar-se da superfície da partícula como é mostrado na **Figura 2.5**. Além disso, a concentração dos íons atingirá num valor n_0

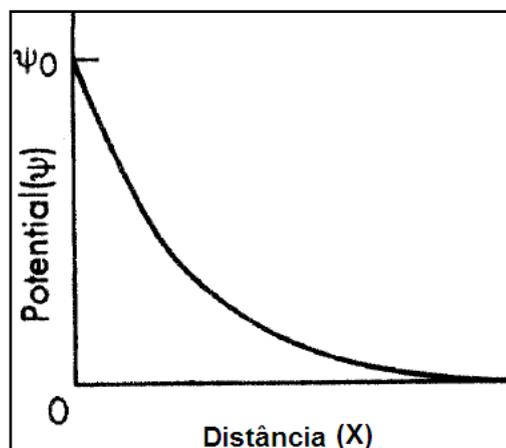


Figura 2.4: Variação do potencial elétrico ao longo da distancia, desde a superfície da partícula. Figura adaptada do livro de SHAW D., (1992).

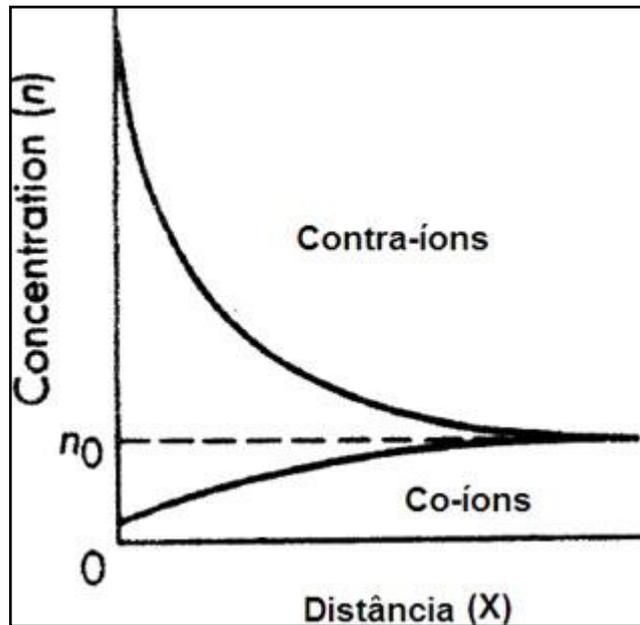


Figura 2.5: Variação da concentração dos íons ao longo da distancia, desde a superfície da partícula. Figura adaptada do livro de SHAW D., (1992).

Aplicando-se a equação de Boltzmann, a concentração iônica é dada pelas seguintes expressões:

$$\eta_+ = \eta_0 \exp\left(-\frac{ze\psi(x)}{kT}\right) \quad \eta_- = \eta_0 \exp\left(+\frac{ze\psi(x)}{kT}\right)$$

Onde η_+ e η_- são as concentrações dos íons positivos e negativos, respectivamente, para pontos onde o potencial é $\psi(x)$, η_0 a concentração inicial da solução, k a constante de Boltzmann e a T temperatura.

A densidade de carga do volume total ρ para pontos onde o potencial é $\psi(x)$, é dada pela seguinte equação:

$$\rho = ze(\eta_+ - \eta_-) \tag{1}$$

Como as concentrações são dadas em função do potencial elétrico para uma distância x pode-se calcular a densidade de carga em função do potencial elétrico pela expressão abaixo:

$$\rho = ze \left(\eta_0 \exp\left(-\frac{ze\psi(x)}{KT}\right) - \eta_0 \exp\left(+\frac{ze\psi(x)}{KT}\right) \right) \quad (2)$$

$$\rho = -2ze\eta_0 \sinh\left(\frac{ze\psi(x)}{KT}\right) \quad (3)$$

Para compreender os fenômenos que ocorrem na superfície de uma partícula carregada num meio líquido ionizado utiliza-se o potencial elétrico dado pela Lei de Poisson. A equação de Poisson numa dimensão para uma superfície plana carregada é dada por:

$$\frac{d^2\psi(x)}{dx^2} = -\frac{\rho(x)}{\epsilon} \quad (4)$$

Onde o potencial elétrico para uma distância x da superfície da partícula é $\psi(x)$ e ϵ a constante dielétrica do meio. A combinação das equações 4 e 3 modificará a equação de Poisson dando origem à equação de Poisson-Boltzmann

$$\frac{d^2\psi(x)}{dx^2} = \frac{-2ze\eta_0}{\epsilon} \sinh\left(\frac{ze\psi(x)}{KT}\right) \quad (5)$$

A solução da equação de Poisson-Boltzmann com as seguintes condições de contorno é escrita da seguinte forma:

$$\psi(x) = \psi_0, \quad x = 0 \quad (6)$$

$$\psi(x) = \frac{d\psi}{dx} = 0, \quad x = \infty \quad (7)$$

$$\psi(x) = \frac{-2KT}{ze} \ln\left(\frac{1 + \gamma \exp(-\kappa x)}{1 - \gamma \exp(-\kappa x)}\right) \quad (8)$$

Onde o valor de $\gamma = \frac{\exp\left(\frac{ze\psi_0}{KT}\right) - 1}{\exp\left(\frac{ze\psi_0}{KT}\right) + 1}$ e $\kappa^2 = \frac{2e^2\eta_0\epsilon^2}{\epsilon KT}$. Nesse ponto, recorre-se a

um novo parâmetro, κ^{-1} , definido como o comprimento de Debye (SHAW D., 1992).

2.4 Aproximação de Debye-Hückel

Debye e Hückel resolveram a equação de Poisson-Boltzmann **Eq. 5** para um caso limite, quando o potencial é muito baixo ($\frac{ze\psi_0}{2kT} \ll 1$). Esta aproximação faz que $\exp\left(\frac{ze\psi_0}{2kT}\right) \approx 1 + \frac{ze\psi_0}{2kT}$ podendo-se então ser usado na **Eq. 8**. Utilizando essa condição encontra-se a função que descreve o comportamento do potencial elétrico da dupla camada de uma partícula coloidal em um meio aquoso:

$$\psi(x) = \psi_0 e^{-\kappa x} \quad (9)$$

O significado físico do comprimento de Debye fica então evidenciado: como o expoente κx é adimensional, κ^{-1} tem unidade de comprimento e é constantemente chamado de comprimento da dupla camada. A **Figura 2.6** mostra os efeitos do comprimento de Debye em relação dos parâmetros concentração e tipo de eletrólito do meio aquoso.

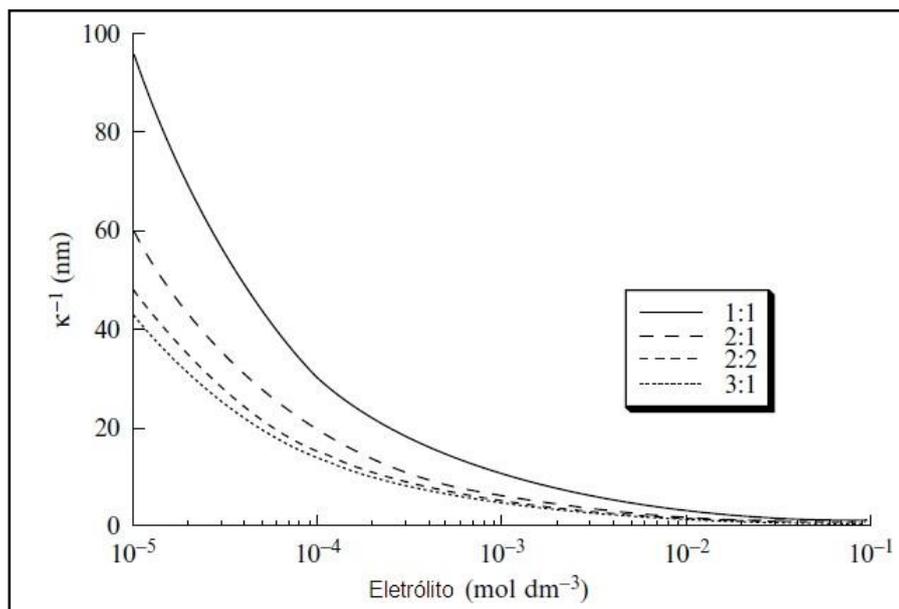


Figura 2.6: O comprimento de Debye-Hückel decai em função da concentração e tipo de eletrólito. Figura adaptada do livro de JIM W., (2004).

2.5 A Camada de Stern

A dupla camada elétrica explicada na secção 2.3 é baseada na hipótese de cargas pontuais numa solução eletrolítica. No entanto, os íons na solução aquosa têm tamanhos finitos o que limita a parte interna da dupla camada elétrica, pois o centro de um íon só pode aproximar-se da superfície da partícula dentro do seu raio hidratado sem tornar-se especificamente adsorvido. Stern (1924) propôs um modelo no qual a dupla camada elétrica seja dividida em duas partes separadas por um plano (o plano Stern). Ele considerou que: i) a partícula coloidal teria potencial elétrico ψ_0 na superfície, ii) haveria uma distância mínima “d” entre a superfície do colóide e os íons de carga contrária, onde o potencial elétrico decresceria linearmente até ψ_d . A **Figura 2.7** mostra a dupla camada elétrica numa superfície positiva.

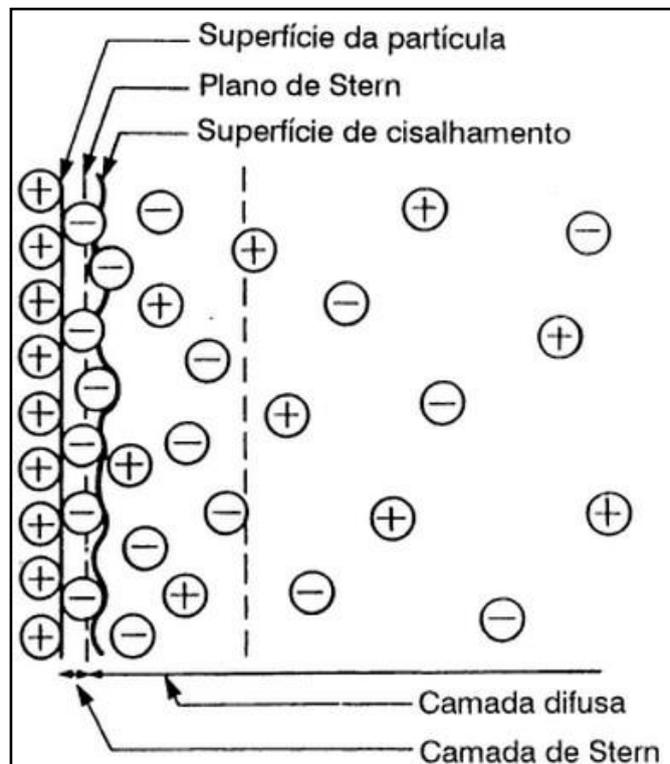


Figura 2.7: Ilustração da dupla camada elétrica em uma superfície positiva HOTZA D., (1997).

Logo após da camada de Stern, o potencial elétrico diminuiria de forma exponencial, passando pelo plano de cisalhamento da região em que o potencial elétrico é chamado de potencial zeta $P(\zeta)$. A **Figura 2.8** ilustra a variação do potencial elétrico da superfície da partícula coloidal até uma distância longo da superfície.

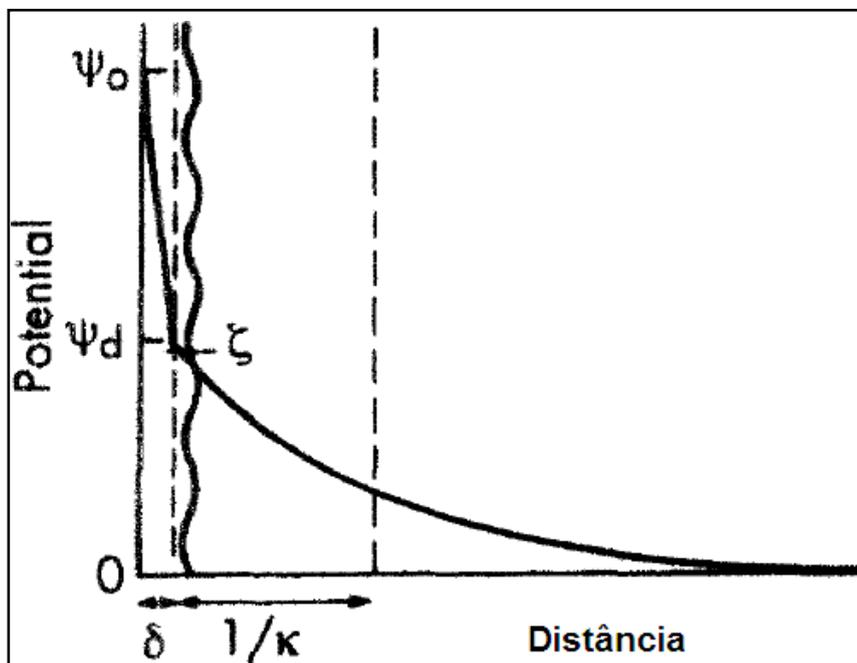


Figura 2.8: Ilustração da dupla camada elétrica em uma superfície positiva identificando o potencial zeta $P(\zeta)$. Figura adaptada do livro de SHAW D., (1992).

2.6 O Fenômeno Eletrocinético

A magnitude do potencial eletrostático ψ_0 na superfície das partículas coloidais é um fator determinante da estabilidade de suspensões coloidais, sob certas condições eletrolíticas. Na prática a determinação dessa quantidade não é feita de forma exata, mas estimada por diversas técnicas, usando-se principalmente medidas baseadas nos fenômenos eletrocinéticos (PASHLEY R., 2004). Um dos fenômenos mais importantes é a eletroforese, que se refere ao movimento de uma partícula carregada, sob a atuação de um campo elétrico (HIROYUKI O., 2006). A quantidade determinável é a eletromobilidade da partícula (μ), definida como a velocidade da partícula dividida pelo campo elétrico aplicado.

A partir dos valores de eletromobilidade pode-se estimar o potencial eletrostático da superfície carregada. Na verdade, o que é determinado é o potencial eletrostático no plano de cisalhamento, já que foi obtido num método cinético. Esse potencial é chamado potencial zeta, e seu valor não é medido diretamente, mas calculado, como mostrado nas próximas seções (JIM W., 2009).

Alguns modelos foram desenvolvidos para a determinação do potencial zeta a partir da mobilidade eletroforética. Cada modelo se aplica a um sistema específico, já que considerações foram feitas no desenvolvimento matemático com base nas características físicas desses sistemas. O modelo de Hückel se aplica a sistemas cuja relação $\kappa\alpha < 0,1$ e o modelo de Smoluchowski a sistemas cuja relação $\kappa\alpha > 100$, sendo α o raio da partícula e κ^{-1} o comprimento de Debye. Henry obteve uma relação geral que cobre todos os valores de $\kappa\alpha$ (SHAW D., 1992).

2.7 Equação de Hückel ($\kappa\alpha < 0,1$)

Consideraremos $\kappa\alpha$ suficientemente pequeno para que uma partícula esférica seja tratada como uma carga pontual de raio a , dentro de uma solução com carga superficial Q , viscosidade η e permitividade relativa ϵ_r . Dentro da solução gera-se um campo elétrico \vec{E} fazendo com que a partícula tenha um movimento com velocidade constante \vec{U} . A partícula sofrerá duas forças: a força elétrica, **Eq. 10**, na direção da velocidade e a força de viscosidade, **Eq. 11**, na direção contrária a velocidade. Cada força segue a seguinte expressão:

$$F_e = QE \quad (10)$$

$$F_d = 6\pi\eta aU \quad (11)$$

Onde U é o módulo da velocidade e E é o módulo do campo elétrico. O equilíbrio de forças entre a força elétrica, **Eq.10**, e a força de viscosidade, **Eq.11**, é apresentado na **Eq. 12**, da qual podemos encontrar a razão entre a velocidade e o campo elétrico. **Eq. 13**. Esta razão é chamada de mobilidade eletroforética simbolizado por μ .

A **Figura 2.9** mostra as forças que agem sobre uma partícula coloidal na presença de um campo elétrico.

$$QE = 6\pi\eta aU \quad (12)$$

$$\frac{U}{E} = \frac{Q}{6\pi\eta a} = \mu \quad (13)$$

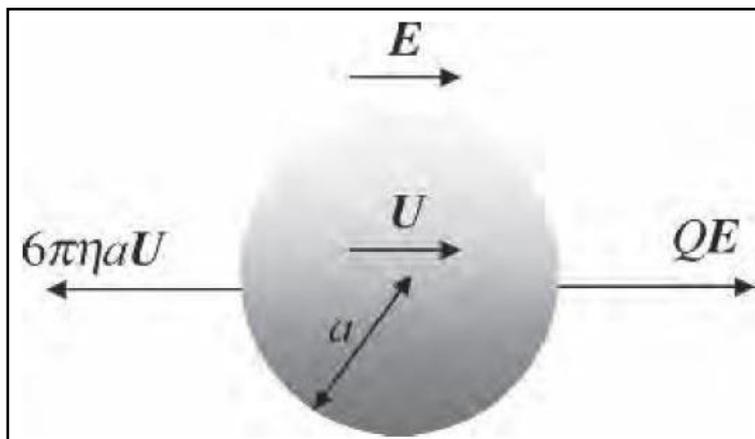


Figura 2.9: Forças que agem sobre uma partícula coloidal numa solução aquosa com um campo elétrico. Figura adaptada do livro de HIROYUKI O., (2006).

Assumimos que o potencial de superfície ψ_o da partícula é dado pelo potencial de Coulomb.

$$\psi_o = \frac{Q}{4\pi\epsilon_1\epsilon_o a} \quad (14)$$

Das **Eq.13 e Eq.14** e considerando que ψ_o é igual ao potencial zeta $P(\zeta)$, obtemos a relação entre a mobilidade eletroforética e o potencial zeta **Eq. 16**.

$$\mu$$

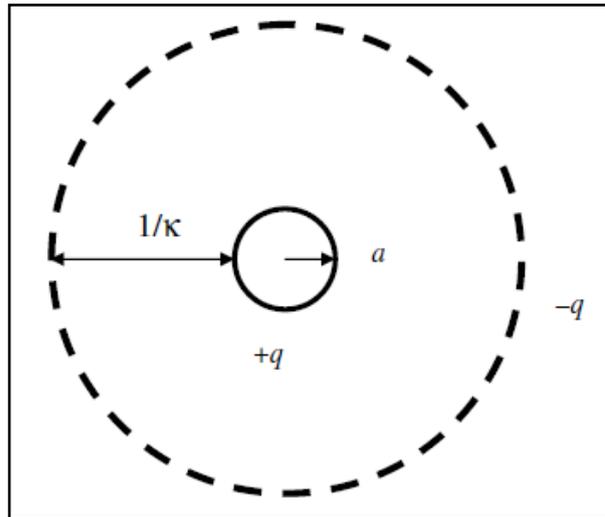


Figura 2.10: Diagrama da dupla camada elétrica ao redor de uma pequena carga coloidal. Figura adaptada de PASHLEY R., (2004).

A **Eq.16** é usada para o caso limite onde a partícula de raio “a” é menor que a espessura da dupla camada $1/\kappa$. Em este resultado a condição de pequenas partículas “o qual é difícil de conseguir” é requerida. A **Figura 2.10** apresenta uma partícula coloidal com raio menor que a dupla camada elétrica.

2.8 Equação de Smoluchowski ($\kappa a > 100$)

O modelo de Smoluchowski foi desenvolvido para os casos em que o raio da partícula é muito maior que o comprimento de Debye da solução do eletrólito ($\kappa a \gg 1$) *i.e* > 100 , Nesse caso, a superfície da partícula pode ser considerada como plana em relação à espessura da dupla camada. Considera-se o movimento do líquido na parte difusa da dupla camada elétrica de uma partícula coloidal plana, quando um campo elétrico E é aplicado paralelamente à superfície. Cada plano do líquido rapidamente atinge uma velocidade relativa e paralela à superfície, com forças elétricas e viscosas balanceadas.

As forças equilibradas são expressas na **Eq. 18**. A **Figura 2.11** mostra as forças que atuam num elemento de fluido sob a ação de um campo elétrico.

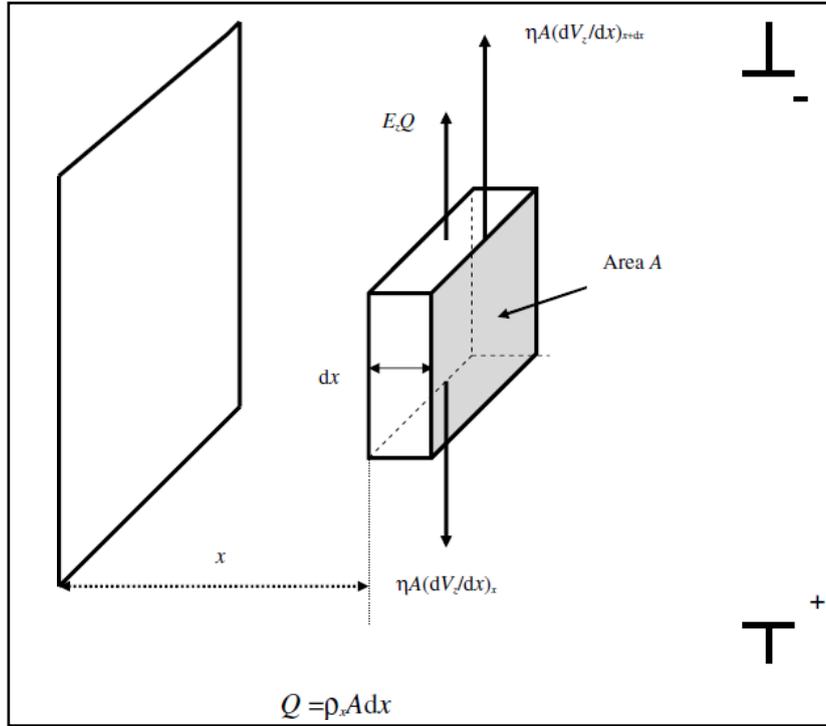


Figura 2.11: Forças que atuam em um elemento de fluido próximo a uma superfície carregada. Figura adaptada de PASHLEY R., (2004).

$$E_z \rho_x A dx = \eta A \left(\frac{dV_z}{dx} \right)_{x+dx} - \eta A \left(\frac{dV_z}{dx} \right)_x \quad (17)$$

Ou

$$E_z \rho_x A dx = -\eta A \left(\frac{d^2 V_z}{dx^2} \right) dx \quad (18)$$

A velocidade do fluido paralela à superfície é dada por V_z η é a viscosidade do fluido, A é a área do elemento de fluido considerado, E_z o campo elétrico aplicado e ρ_x a densidade de carga inicial em relação ao eixo x

a densidade de carga ρ_x obtida da **Eq.18** pode ser substituída na equação de Poisson-Boltzmann **Eq.5**, obtendo-se uma relação entre o potencial elétrico e a velocidade do fluido paralela à superfície. A **Eq.19** mostra essa relação entre estes parâmetros:

$$E_z \varepsilon \frac{d^2 \psi(x)}{dx^2} dx = \eta \left(\frac{d^2 V_z}{dx^2} \right) dx \quad (19)$$

È fácil observar que para se obter o valor do potencial elétrico, cujo valor é importante na estabilidade da partícula numa solução, será preciso integrar duas vezes à **Eq. 19**. Na primeira integração obtemos a seguinte expressão:

$$E_z \varepsilon \frac{d\psi(x)}{dx} = \eta \left(\frac{dV_z}{dx} \right) + c_1 \quad (20)$$

Usando a condição $\frac{d\psi}{dx} = 0$ quando $\frac{dV_z}{dx} = 0$ obtém-se que a constante de integração c_1 resulta ser zero. No entanto para obter o valor do potencial elétrico $\psi(x)$ é preciso integrar por uma segunda vez e usar os limites de integração apropriados. O resultado é mostrado na **Eq 22**:

$$\int_{\psi=0}^{\psi=} E_z \varepsilon \frac{d\psi}{dx} dx$$

$$E_z \varepsilon$$

Relacionando à velocidade do fluido à velocidade da partícula $V_{\text{partícula}} = -V_z$ e usando a definição de eletromobibilidade (μ), obtém-se a equação de Smoluchowski para o cálculo do potencial zeta.

2.9 Equação de Henry

Os modelos de Hückel e Smoluchowski não se aplicam em muitos casos por não ter as condições requeridas. Uma melhor estimativa para as dispersões coloidais na faixa de $1 < \kappa a < 100$ obtém-se por um modelo obtido pelo cientista D. C. Henry (SHAW D., 1992).

Para valores limites em que $\kappa\alpha \rightarrow 0$, a equação de Henry se reduz à equação de Hückel e nesse caso $f(\kappa\alpha)$ é igual a 1. No limite quando $\kappa\alpha \rightarrow \infty$, a equação de Henry se reduz à equação de Smoluchowski e $f = (\kappa\alpha)$ é igual a 1,5.

A equação de Henry baseia-se em algumas considerações: a aproximação de Hückel é utilizada, a atmosfera iônica não é afetada pelo campo externo e a viscosidade e a permissividade elétrica do fluido são consideradas constantes ao longo da dupla camada. A função $f = (\kappa\alpha)$ apresenta duas expressões como mostrado abaixo, considerando $\kappa\alpha = \alpha$.

Para $\alpha < 1 \rightarrow f(\alpha)$

$$= \left(1 + \frac{1}{16}\alpha^2 - \frac{5}{48}\alpha^3 - \frac{1}{96}\alpha^4 - \frac{1}{96}\alpha^5 - \left[\frac{1}{8}\alpha^4 - \frac{1}{96}\alpha^6 \right] e^\alpha \int_\infty^\alpha \frac{e^{-t}}{t} dt \right) \quad (25)$$

$$\textit{Para } \alpha > 1 \rightarrow f(\alpha) = \left(\frac{3}{2} - \frac{9}{2}\alpha^{-1} + \frac{75}{2}\alpha^{-2} - 330\alpha^{-3} \right) \quad (26)$$

2.10 Potencial Zeta

O potencial zeta é uma grandeza no estudo da estabilidade de suspensões coloidais, principalmente no que diz respeito ao mecanismo eletrostático de estabilização. Sua magnitude é bastante sensível às variações no meio, e serve como poderosa ferramenta para definição das melhores condições de trabalho. Seu valor depende do pH e da força iônica do meio, sendo normalmente positivo em regiões ácidas, e negativo em regiões básicas. O valor de pH para o qual o potencial zeta é nulo é denominado ponto isoelétrico (IEP). A região em torno desse valor corresponde à região de menor estabilidade das suspensões do ponto de vista eletrostático (SHAW D., 1992).

Os íons do meio podem ser adsorvidos, ou não, na superfície da partícula coloidal. No caso em que eles são adsorvidos pela interação com os sítios da partícula pode-se chegar a um ponto de saturação. A adição de íons que não são adsorvidos pela superfície da partícula tem o efeito de diminuir a mobilidade eletroforética (logo, potencial zeta), sem mudar o ponto isoelétrico do sistema. Neste caso, a quantidade de

íons H^+ ou OH^- necessária para ‘neutralizar’ a carga superficial não varia porque as partículas coloidais não adsorvem os íons da solução.

2.11 Técnica LDV (Laser Doppler Velocimetry)

Como já foi explicada nas seções anteriores, a determinação do potencial zeta é realizada de forma indireta pelo cálculo da mobilidade eletroforética, obtida das velocidades das partículas coloidais frente à aplicação de um campo elétrico.

As técnicas baseadas em LDV (Laser Doppler Velocimetry) usam a natureza ondulatória da luz como ferramenta para determinação da velocidade das partículas no fluido. O cruzamento de dois feixes de lasers de mesmo comprimento de onda produz um padrão plano de interferência com regiões construtivas e destrutivas. A velocidade das partículas no fluido é medida quando essas atravessam o padrão de interferência, espalhando a luz em todas as direções. A luz espalhada é coletada por um detector, sendo que a frequência dessa luz corresponde ao deslocamento Doppler que é proporcional a componente da velocidade das partículas perpendicular ao plano do padrão de interferência. A medida nas três direções resulta da utilização de três padrões de interferência diferentes (THARWAT F., 2005). A **Figura 2.12** mostra um diagrama da parte óptica utilizada para medir o potencial zeta do equipamento Zeta Plus da empresa Brookhaven.

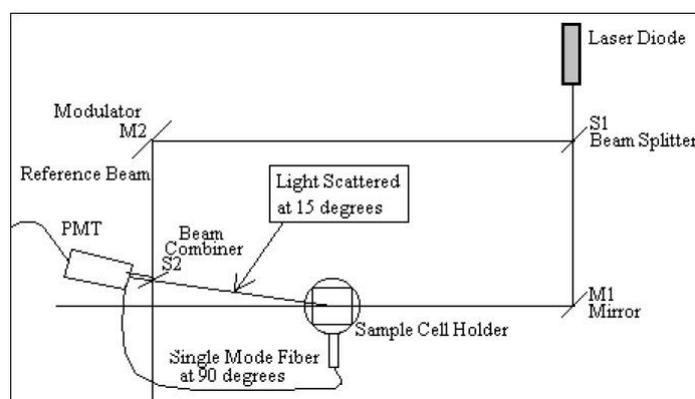


Figura 2.12: Diagrama de bloco da parte óptica Heterodyne utilizada para medição de potencial zeta no equipamento Zeta Plus da Brookhaven Instruments Corporation, (adaptado do manual “Instruction Zeta Plus”).

2.12 Distribuição do Tamanho de Partícula por Espalhamento Dinâmico de Luz

Uma grande parte das aplicações de materiais particulados é realizada com fases altamente monodispersas. Nestes casos, os métodos de caracterização são de grande importância, seja na seleção do material adequado para determinado processo, seja no controle de qualidade do produto fabricado. O tamanho e a distribuição de tamanho de partícula afetam as propriedades importantes dos colóides, como reologia de suspensões, área superficial e densidade de empacotamento. Quando um feixe de luz atinge as partículas suspensas em um meio, esse feixe é espalhado e muda de direção em relação ao feixe incidente. A intensidade da luz espalhada em um dado ângulo depende do comprimento de onda da luz incidente, do tamanho e forma das partículas, das propriedades ópticas das mesmas e do ângulo de observação (JIM W., 2004).

É importante ressaltar que a medida de tamanho de partícula depende do índice de refração do material, dado a ocorrência de difração do laser (Brookhaven Instruments Corporation 90Plus/BI-MAS). Um parâmetro muito importante nos resultados de espalhamento dinâmico é o índice de polidispersividade. Para índices acima de 0,7 os resultados obtidos para espalhamento dinâmico não são confiáveis, pois se relacionam a amostras bastante polidispersas. Índices abaixo de 0,08 compreendem materiais quase monodispersos. A técnica DLS, assim como todas as técnicas granulométricas, pode ser usada para monitorar a aglomeração das partículas. Nesse caso o que é determinado é o tamanho do aglomerado, e não da partícula individual, sendo uma importante ferramenta na investigação do grau de dispersão de suspensões.

2.13 Cerâmicas de Fosfato de Cálcio

As biocerâmicas de fosfato de cálcio têm sido amplamente utilizadas durante as últimas décadas em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas. Em termos de morfologia esses materiais são processados como materiais densos e porosos, para a reposição e reparação do tecido ósseo, e recobrimentos em implantes metálicos (HERRERA *et al.*, 2007). A grande biocompatibilidade dos fosfatos de cálcio deve-se à

sua similaridade química com a fase mineral do tecido ósseo, que é constituída por uma hidroxiapatita carbonatada com baixa cristalinidade, contendo traços de vários elementos químicos (Na, K, Fe, Zn, etc) (BECKER *et al.*, 1968).

Uma forma conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (Ca/P), a qual varia de 1 a 2,0 conforme mostra a **Tabela 2.2**. Os fosfatos de cálcio podem ser sintetizados a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , sob condições alcalinas ou ácidas por métodos em via úmida de: sol-gel (SOPYAN *et al.*, 2008), Hidrotermal (MURAKAMI, *et al.*, 2008), Biomimético (ROVERI *et al.*, 2010), Coloidal (TIAN *et al.*, 2007).

Tabela 2.2: Relação Ca/P das fases de apatita (BUDDY D., 2004).

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ca/P
Dicalcio de fosfato dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato de dicálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato tricálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatita (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0

2.14 Hidroxiapatita

Uma das principais características da hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é sua alta biocompatibilidade, osteointegração e osteocondutividade. Além da aplicação como substituinte do tecido ósseo, a hidroxiapatita é utilizada no tratamento de células tumorais através da substituição parcial dos íons Ca^{2+} por íons Fe^{2+} , e em sistemas de liberação controlada de drogas *in situ* (LIU *et al.*, 2003); muitos autores (HOU *et al.*, 2009), (KRISANAPIBOON *et al.*, 2006). (TAKASHIMA *et al.*, 2002) e (EIJ *et al.*, 2006) sugerem o uso de nanopartículas de hidroxiapatitas para remoções de proteínas patogênicas na terapia de purificação do sangue.

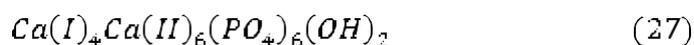
O uso da hidroxiapatita não se restringe à área médica como material biocompatível, a hidroxiapatita também é empregada na área de controle ambiental, como absorvedor de metais pesados em solos e águas poluídas (SHAFEI *et al.*, 2004), e na área de catálise, como catalisador de reação (TSUCHIDA *et al.*, 2008).

Os reagentes utilizados para sintetizar a hidroxiapatita são otimizados de acordo com cada aplicação; varia-se a densidade, razão Ca/P, composição química, tamanho da partícula, tamanho de poros (VÁZQUEZ *et al.*, 2010). Por outro lado, a facilidade de substituir os íons da hidroxiapatita é estudada por diversos grupos de pesquisas para observar as mudanças nos parâmetros de rede, cristalinidade, morfologia, e eventuais novas aplicações.

2.15 Estrutura da Hidroxiapatita

Conforme os dados cristalográficos, a hidroxiapatita pertence ao sistema hexagonal, com um grupo espacial P63/m. Os parâmetros da rede da célula unitária são próximos de $a = 0,943 \text{ nm}$ e $c = 0,688 \text{ nm}$. O parâmetro b , pela definição do sistema hexagonal, é igual ao parâmetro a .

O sistema hexagonal da HAp contém 10 íons cálcio localizados em dois sítios não equivalentes, 4 no sítio I (CaI) e 6 no sítio II (CaII). Os íons de cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons de cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura. Os cátions do sítio I estão coordenados a seis átomos de oxigênio, pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 e também a três outros átomos de oxigênio, relativamente distantes. Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (eixo c) (BROWN *et al.*, 2000), (MALZAC A., 2008). A representação da fórmula molecular na célula unitária é a seguinte:



Em um modelo simplificado da superfície, pode-se representar a HAp como um conjunto de grupos funcionais, onde os pares de íons cálcio são carregados positivamente, constituindo os sítios cálcio (Ca^{+2}), e como aglomerados de átomos de

oxigênio carregados negativamente que, por sua vez, constituem os sítios fosfato (PO_4^{-3}). As hidroxilas OH^- , assim como os grupos fosfatos, se apresentam distribuídas sobre a superfície da hidroxiapatita, podendo se comportar como sítios básicos. A **Figura 2.13** mostra a célula unitária da HAp.

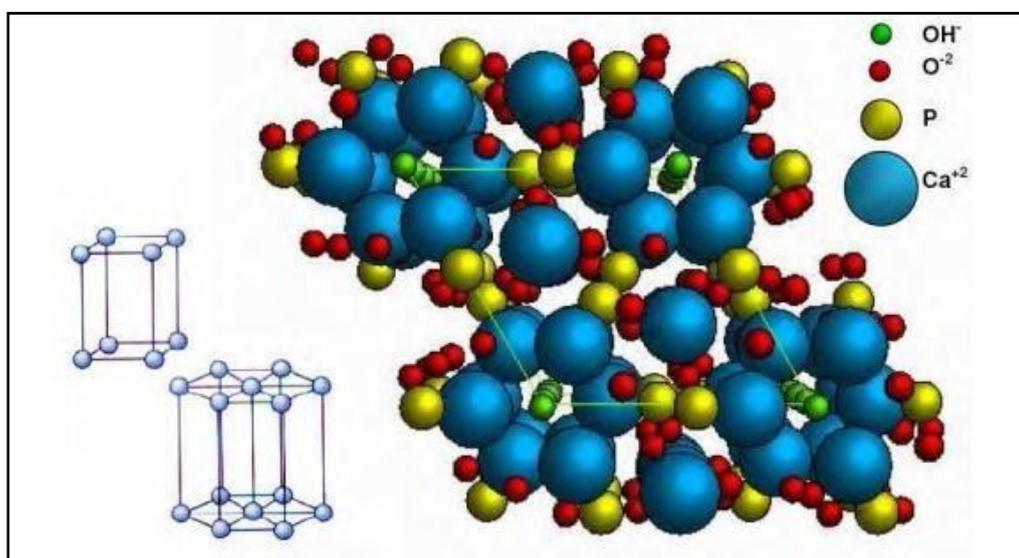


Figura 2.13: Estrutura da HAp mostrando a célula unitária hexagonal contendo 10 íons Ca^{2+} ocupando duas posições diferentes: seis no sítio Ca(1), alinhados em triângulos eqüiláteros perpendiculares à direção c , e quatro no sítio Ca(2), alinhados em coluna; triângulos eqüiláteros de íons O^{2-} e de íons Ca^{2+} estão ligados entre si por dois íons fosfato situados em planos perpendiculares à direção c e outros dois paralelos a esta direção. Figura adaptada da dissertação de doutorado de Santos 2010, (ELLIOTT, 1994).

2.16 Substituição na Hidroxiapatita: Zinco e Carbonato.

2.16.1 O Zinco

O zinco é um elemento essencial para todas as forma de vida (BHOWMIK *et al.*, (2010), sendo importante na nutrição e na saúde humana. Uma das conseqüências clínicas geradas pela deficiência do zinco é o atraso do crescimento, distúrbios neurofisiológicos, alterações no desenvolvimento fetal, além de diarreia e pneumonia. Este elemento é considerado de grande importância para a divisão celular e a síntese de DNA proteínas.

Miyaji *et al.*, (2005) relataram que o zinco foi capaz de substituir nos sítios do Ca^{2+} na hidroxiapatita sob algumas condições experimentais. Tang *et al.*, (2009) mostraram pela técnica de DFT (Density function theory) que o zinco prefere os sítios $\text{Ca}(II)$, aos sítios de $\text{Ca}(I)$, na **Figura 2.14** mostra-se a estrutura da hidroxiapatita substituída com zinco.

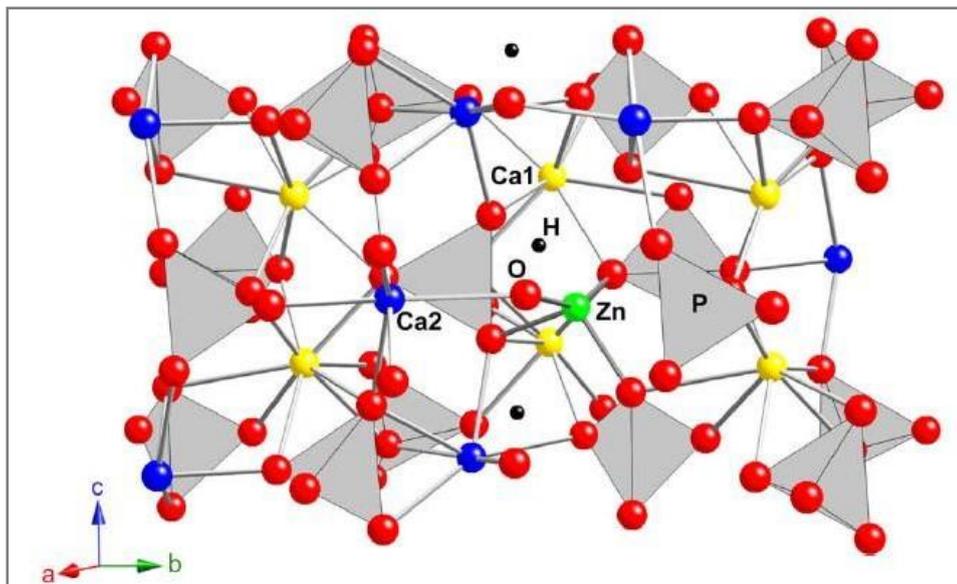


Figura 2.14: Estrutura da hidroxiapatita substituída com zinco. Os átomos nos sítios $\text{Ca}(I)$, $\text{Ca}(II)$, O, H e Zn são mostrados como: esferas amarelas, azul, vermelho, preto e verde, respectivamente. Os grupos fosfatos são mostrados em tetraedros cinza. Figura adaptada de TANG *et al.*, (2009).

Bigi *et al.*, (1995) relataram que a presença do zinco na hidroxiapatita provoca uma redução da razão Ca/P. Segunda Costa A., (2004) os valores de tamanho do cristal ao longo da direção (002) e (300) da hidroxiapatita substituída parcialmente de zinco foram inferiores aos da hidroxiapatita e é mostrado na **Tabela 2.3**

Tabela 2.3: Valores de tamanho de cristalitos da HAp substituída com 5% molar de zinco nas direções (002) e (300) (COSTA A., 2004)

Amostras	(002)	(300)
HAp	12,3 nm	17,6 nm
ZnHAp	11,2 nm	7,8 nm

Estudos de adsorção de albumina na HAp e na HAp substituída com Zinco (Mavrououlos *et al.*, 2010) concluíram que a presença do zinco na hidroxiapatita aumenta em cerca de 40% a adsorção da albumina, independentemente da distribuição preferencial do metal na superfície ou no bulk.

2.16.2 O Carbonato

Zhou *et al.*, (2007) relataram que o teor de carbonato no osso natural está ao redor de 4-8%, e é comprovado que a concentração de carbonato no tecido ósseo é dependente da idade. Segundo os autores, ocorre uma variação na forma estrutural predominante de carbonato apatita no tecido ao longo dos anos, sendo a carboapatita tipo A encontrada em maior concentração nos ossos velhos, e da carboapatita tipo B nas pessoas jovens.

Um estudo preliminar realizado por Takashima *et al.*, (2002) indicou que a carboapatita tem maior capacidade de adsorção da β_2 microglobulina, patógeno encontrado na sangue, comparado com a as amostras de HAp. Além disso, a presença de carbonato está diretamente relacionada ao processo de adsorção dessa molécula; o aumento do teor de carbonato aumenta a capacidade de adsorção do material. A partir

destes resultados o autor sugere aplicação do material em sistemas de purificação de sangue.

Doi *et al.*, (2003) sintetizaram com sucesso carboapatita e confirmaram, tanto em condições *in vitro* como *in vivo*, a sua reabsorção pelos osteoclastos. Por outro lado, os autores verificaram que não ocorreu reabsorção na amostra de hidroxiapatita estequiométrica. De acordo com a literatura, a carboapatita apresenta uma alta dissolução em comparação com a hidroxiapatita estequiométrica em soluções com tampão pH=5,5 e em SBF (KOVALEKA *et al.*, 2008). O aumento da razão da dissolução pode estar relacionado com as microtensões intrínsecas da substituição e do raio iônico efetivo do carbonato no sítio dos grupos fosfatos. Estes resultados podem explicar a propriedade de reabsorção do material em relação a HAp.

Em termos estruturais, estudos de Miyaji *et al.*, (2005) indicaram que o carbonato pode substituir tanto os grupos OH^- como o PO_4^{3-} , e dependendo desta substituição os parâmetros da rede da hidroxiapatita apresentam modificações. A substituição no sítio da OH^- produz uma expansão no eixo-a e uma diminuição no eixo-c, por outro lado, a substituição no sítio do PO_4 produz uma diminuição no eixo-a e uma expansão no eixo-c. A **Figura 2.15** mostra a ocupação do carbonato no sítio de fosfato, na estrutura de uma hidroxiapatita parcialmente substituída com Na.

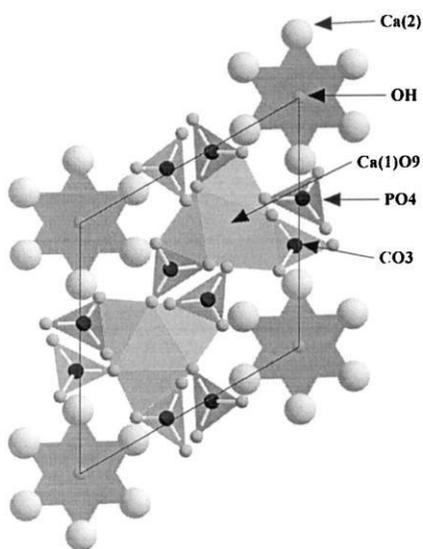


Figura 2.15: Mostra a ocupação do carbonato nos sítios de fósforo. Figura adaptada de EL FEKI *et al.*, (2000).

2.17 Adsorção de Proteínas

As proteínas são formadas por longas cadeias de aminoácidos que apresentam nas extremidades grupamentos funcionais amina NH_2 e carboxila $COOH$. Quando em solução, tais grupos tendem a se ionizar por efeito do pH do meio produzindo grupamentos NH_3^+ e COO^- . O grau de ionização dessas espécies está diretamente ligado ao ponto isoelétrico característico de cada proteína. Quando o pH do meio encontra-se abaixo do ponto isoelétrico, as proteínas tendem a se carregarem positivamente exibindo predominantemente grupos NH_3^+ . Ao contrário, quando o pH do meio está acima do ponto isoelétrico, as proteínas exibem em sua maioria grupos COO^- . No ponto isoelétrico ($pH = \text{ponto isoelétrico} = IEP$) o balanço total de cargas é zero (LUO *et al.*, 1998). A **Figura 2.16** mostra o modelo espacial da molécula de albumina de soro com os resíduos básicos, ácidos e neutros.

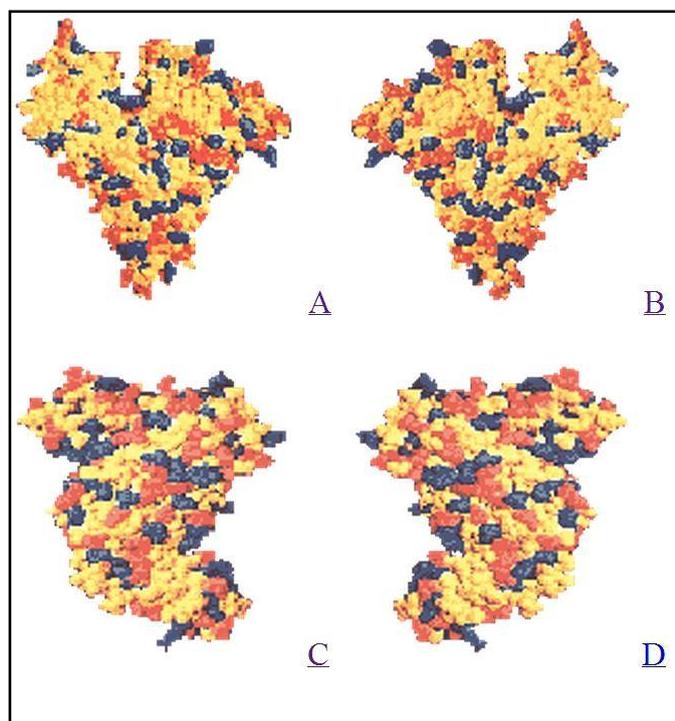


Figura 2.16: Mostra o modelo de preenchimento espacial da molécula de albumina do soro com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e resíduos neutros em amarelo. (A) vista frontal, (B) vista traseira, (C) lado esquerda, (D) lado direito. Figura Adaptada de CARTER *et al.*, (1994).

Os estudos de adsorção de proteínas na superfície de biomateriais ajudam a esclarecer alguns dos eventos que ocorrem após a implantação de um biomaterial no organismo. Na realidade, podemos resumir esses eventos em três estágios: a) interação biomaterial-fluido biológico (adsorção de íons), b) interação biomaterial-proteínas (formação de camada proteica na superfície do biomaterial) e c) interação células-camada proteica, a **Figura 2.17** ilustra estes eventos. Além da formação de uma interface entre o implante e o tecido, a adsorção de proteínas também ocorre de uma forma natural no organismo como, por exemplo, na formação de uma película de esmalte que protege os dentes contra microorganismos (HUGHES *et al.*, 1994).

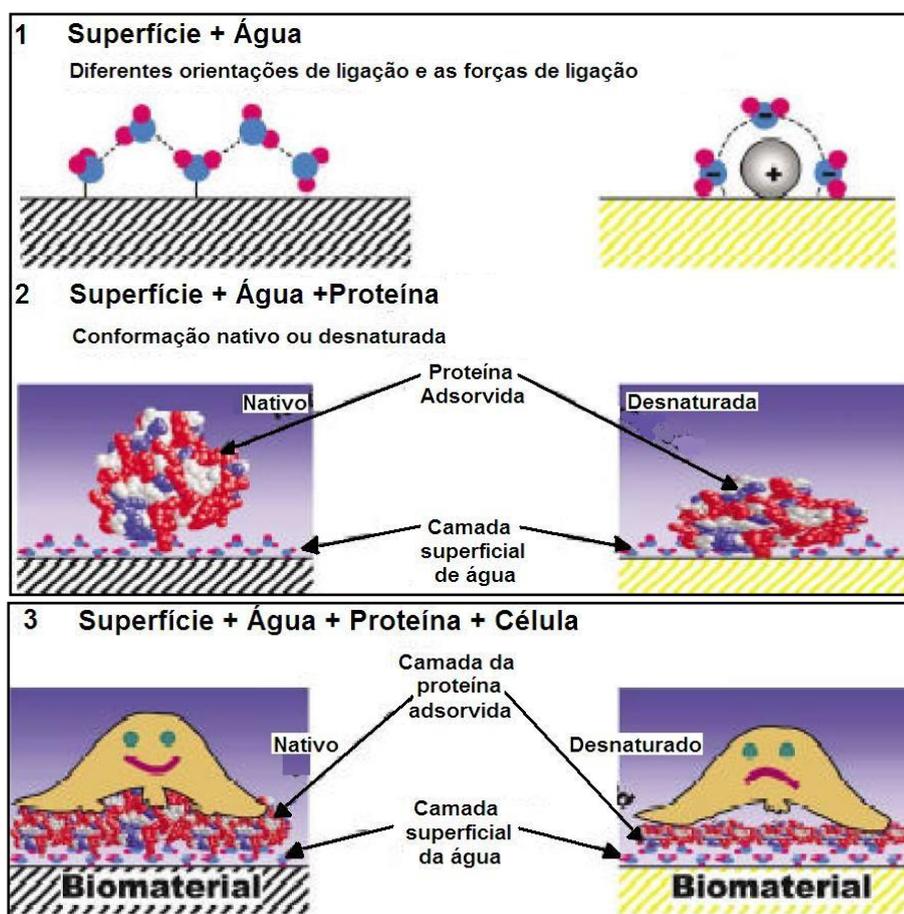


Figura 2.17: Ilustração esquemática do processo de eventos que acontece depois da implantação de um biomaterial. Figura adaptada de KASEMO B., (1998).

Yin et al. (2001) estabeleceram muito bem que as moléculas biológicas interagem com a superfície da hidroxiapatita por forças de ligação eletrostáticas, sendo este um fator determinante nos processos de adsorção. Os resíduos ácidos da proteína são adsorvidos nos sítios C- da hidroxiapatita e os resíduos básicos são adsorvidos nos sítios P- da hidroxiapatita. Assim como a proteína, a hidroxiapatita também apresenta ponto isoelétrico, pois sua superfície possui grupos polares sujeitos a dissociação e a protonação, o que reforça a teoria que o fator determinante na adsorção seria a interação eletrostática. Uma forma de investigar a interação de proteínas pela HAp é através do estudo do potencial zeta, antes e após a adsorção de uma proteína pela superfície da HAp.

A Albumina (BSA) foi utilizada como proteína modelo em sistemas biomiméticos (Bezerra et al., 2003). É a proteína mais abundante no sangue bovino (Concentração típica de 50 mg/mL) e possui uma estrutura similar à estrutura da Albumina dos seres humanos (HSA). A BSA é uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios. A BSA é capaz de formar dímeros, principalmente em altas concentrações ou na forma cristalizada. O ponto isoelétrico (PI) da BSA está em torno de 4,7-5 sendo carregado positivamente para $\text{pH} < \text{PI}$ (Vasconcelos 2007).

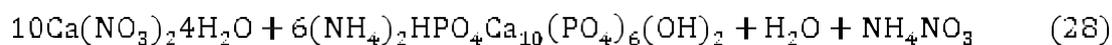
A insulina (INS) é a hormona responsável pela redução da glicemia (taxa de glicose no sangue), ao promover o ingresso de glicose nas células. Esta é também essencial no consumo de carboidratos, na síntese de proteínas e no armazenamento de lipídios (gorduras). O ponto isoelétrico (PI) da INS está em torno de 5,5 sendo carregado negativa para $\text{pH} > \text{PI}$ (Farinas C., 2001).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Síntese da Hidroxiapatita (HAp)

A síntese das HAp foi realizada através de precipitação por via úmida a partir de duas soluções aquosas: o nitrato de cálcio tetra hidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ como primeira solução (solução A) e o fosfato de diamônio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como segunda solução (solução B).



A concentração dos reagentes foi fixada para a produção de uma Hidroxiapatita estequiométrica com razão Ca/P de 1,67. A solução de cálcio foi mantida dentro do meio reacional, enquanto que a solução de fósforo foi gotejada sobre a primeira solução. Uma solução de hidróxido de amônio concentrado foi utilizada para manter o pH do meio reacional alcalino. Os parâmetros de precipitação, tais como a temperatura de síntese, pH, velocidade de adição e de agitação dos reagentes e tempo de digestão foram controlados durante a síntese.

3.1.1 Condições de Precipitação

- ❖ Temperatura: 90°C - 37°C (sistema misto de aquecimento e dedo frio via troca de calor por dupla camisa de óleo de silicone no reator).
- ❖ Para manter o pH: 10-11 foi usado hidróxido de amônio concentrado ou hidróxido de potássio a um fluxo de 6.0 ml/min em Bomba Masterflex).
- ❖ Adição de solução B: Fluxo de 30.0 ml/min em Bomba Masterflex.
- ❖ Agitação mecânica: agitador Ika com aproximadamente 240 rpm de agitação.
- ❖ Digestão: Ao fim da reação, a solução é mantida por 2 horas apenas em agitação mecânica na mesma rotação.

3.1.2 Filtração, Lavagem e Secagem do Precipitado da HAp

Após o período de digestão, o precipitado passa pela etapa de filtração, onde se utiliza um funil Buchner, um Kitassato e uma bomba de vácuo Edwards. O precipitado é lavado até alcançar o pH de 7,0. Após a lavagem o precipitado é seco em estufa a 100° C por 24 horas. Passada a etapa de secagem, o pó é macerado, com grau e pistilo, e peneirado em dimensões de aproximadamente 210 micra. Ao final deste processamento o material é estocado em dessecador a fim de evitar a absorção de umidade.

3.2 Síntese da Hidroxiapatita Substituída com Zn²⁺ (HAp:Zn²⁺)

Os pós da biocerâmica de HAp:Zn²⁺ foram produzidos de forma similar da HAp, através de uma solução contendo nitrato de zinco, Zn(NO₃)₂.6H₂O, e nitrato de cálcio, Ca(NO₃)₂.4H₂O. Posteriormente esta solução é gotejada em um recipiente contendo solução de fosfato de amônio dibásico.

Soluções de nitrato de cálcio e nitrato de zinco com concentração total de cátions de 0,2M são utilizadas, a fim de produzir amostras de HAp:Zn²⁺ com a concentração molar de aproximadamente 5%, mol% de Zn²⁺, calculadas pela razão molar $\left(\frac{Zn}{Zn+Ca}\right)$. Estas porcentagens são calculadas a fim de obter o produto final em forma de pó de $Ca_{10-x}Zn_x(PO_4)_6OH_2$, onde x indica a fração de Zn incorporada na solução.

3.3 Síntese de Hidroxiapatita Substituída com Íons Carbonato.

HAp:CO₃²⁻

A preparação da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada foi realizada por via úmida, a partir da adição de uma mistura de 0,25M de fosfato dibásico de amônio ((NH₄)₂HPO₄) e de 0,053M de carbonato de amônio ((NH₄)₂CO₃), com auxílio de uma bomba peristáltica, sobre uma solução de nitrato de cálcio 0,42M (Ca(NO₃)₂ · 4H₂O). A temperatura de síntese utilizada foi de 37°C, mantendo-se o pH igual a 12 por gotejamento de uma solução de KOH 10 mol/l com auxílio de uma bomba peristáltica. Estes dois parâmetros foram rigorosamente controlados.

Ao fim da adição, a mistura permaneceu em temperatura constante e sob agitação por 2 horas. Após a digestão, o material foi filtrado a vácuo e lavado com H₂O Milli-Q para retirar o excesso de base e qualquer carbonato que não tenha reagido até que o pH do filtrado ficasse em aproximadamente 7. O sólido obtido foi seco em estufa a 100°C por 24 horas. Esse procedimento foi realizado na preparação de todas as amostras, finalmente o sólido foi macerado e peneirado em peneira < 74 micra.

3.4 Sorções das Proteínas nas Amostras

Amostras Utilizadas

- ❖ HAp sintetizada a 37°C;
- ❖ HAp:Zn²⁺ sintetizada a 37°C;
- ❖ HAp:CO₃²⁻ sintetizada a 37°C.

Proteínas Utilizadas

- ❖ Albumina (BSA) e Insulina (INS)

Método de sorção das proteínas

- ❖ As duas proteínas foram utilizadas em solução com concentrações a 1mg/ml.
- ❖ A BSA é estocada na forma de pó, então, pesou-se 0,100g de BSA e avolumou-se até 100,00ml em balão volumétrico.
- ❖ A insulina é estocada em solução com concentração original de 10mg/ml. Logo foi diluída 5:50.
- ❖ As amostras HAp, HAp:Zn²⁺, HAp:CO₃²⁻ ficaram em estufa durante 24h para retirar a umidade e então, pesou-se 0,200g de cada amostra.
- ❖ O tempo de sorção foi de 24h, sob agitação, com uma proporção de 1:8 HAp :proteína.
- ❖ A quantificação do teor sorvido foi feito em espectrofotômetro de UV-VISIVEL. ($\lambda=278\text{nm}$) tanto para BSA, como para INSULINA.
- ❖ A razão entre a massa da amostra e o volume da solução foi de 0,200g para 16,00 ml.
- ❖ Após a sorção de 24h, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 5min, logo foi retirada uma alíquota do sobrenadante e reservado para posterior quantificação.
- ❖ O pó foi lavado com água Milli-q por mais 1h. Novamente foi centrifugado e sobrenadante descartado. As amostras permaneceram em estufa com temperatura controlada (37°C) por 4 dias para secagem.

3.5 Caracterização por Difração de Raios X (XRD)

As amostras foram preparadas por trituração dos aglomerados e posteriormente, através do peneiramento obteve-se uma granulométrica menor ou igual a 210 μm .

Nos processos de interação dos raios X com a matéria os feixes de radiação são desviados mudando só as direções da onda incidente quando eles passam por espaços

próximos aos do tamanho do comprimento de onda λ da radiação. A **Figura 3.1**, mostra uma secção de um cristal com seus átomos dispostos em um conjunto de planos paralelos **A, B** separados por uma distância d_{hkl} . Estes raios X ao interagir com o material será observada difração quando ocorrer interferência construtiva entre os raios difratados. Esta condição será satisfeita quando a diferença do comprimento dos caminhos entre raios X adjacentes for igual a um número inteiro (n) de comprimentos de onda (λ). A relação que demonstra esta condição é a equação de Bragg.

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (29)$$

Esta lei de Bragg, a **Eq. 29** é a base para as análises de cristalografia dos materiais, sendo usada para a identificação das posições angulares dos picos de difração e a localização dos planos cristalográficos, determinando assim as possíveis fases presentes nela. A partir dela também é possível determinar parâmetros microestruturais do material, tais como o tamanho médio dos cristalitos e as tensões presentes nos cristalitos. **Figura 3.1** apresenta o modelo de Bragg.

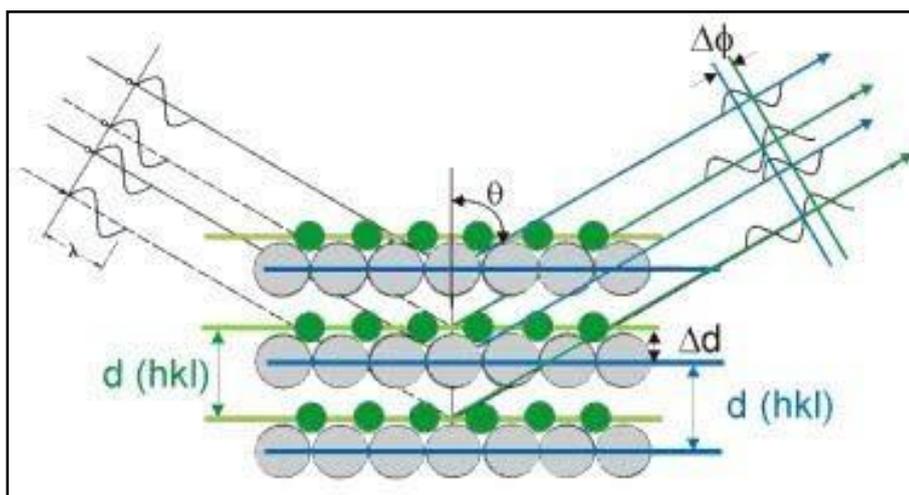


Figura 3.1: Descrição do modelo de Bragg para planos formados com distintos tipos de átomos. Figura adaptada da página virtual do Departamento de Cristalografia do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). <http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/>

A equação de Scherrer (B.D. Cullity 1967), **Eq. 30**, estabelece a relação entre a *largura de linha* (β), associada a um pico em uma dada *reflexão* (hkl) e o tamanho médio dos cristais (D_{hkl}) segundo a referida direção. θ_β é o ângulo de Bragg para a reflexão hkl e λ o comprimento de onda da radiação X.

$$D_{hkl} = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos \theta_\beta} \quad (30)$$

A largura e a forma dos picos de um difratograma é o resultado da combinação de fatores instrumentais além dos fatores baseados na microestrutura das amostras. Os fatores instrumentais estão relacionados com o caráter monocromático, divergências no feixe e largura das janelas, entre outros. As características estruturais das amostras contribuem para as larguras de linha dos picos; cristalitos com tamanhos da ordem entre 10 e 500nm produzem padrões de difração bem definidos, enquanto cristais menores que 10nm produzem reflexões difusas e com maior largura nos picos, chegando a ser difícil distinguir-se suas intensidades frente ao nível da radiação de fundo. Foi utilizado neste trabalho um difratômetro da marca X'Pert Pro Panalytical do CBPF, com feixe de radiação $K\alpha$ do Cu ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) operando no regime 45 kV/40 mA, no intervalo de varredura 2θ entre 10° e 80° . fenda incidente e divergente de 1° , e passos de 0.05° .

3.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para este estudo foram confeccionadas pastilhas de KBr com 1% de cada tipo de pó cerâmico. As pastilhas foram prensadas em prensa mecânica com força de 8 toneladas por 8 minutos.

As técnicas espectroscópicas são usadas para estudar a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia dos átomos ou moléculas. Normalmente as transições eletrônicas são situadas na região do ultravioleta ou visível, enquanto as vibrações moleculares na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas. A região do infravermelho (100 a 10000 cm^{-1}) pode ser dividida em regiões quanto a seu número de

onda, sendo a região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) a mais usada em medidas de espectroscopia.

As vibrações moleculares também podem ser classificadas em deformação axial (ou de estiramento) e deformação angular, e podem ser simétricas ou assimétricas, **Figura 3.2** e **Figura 3.3** apresentam os modos de vibração da molécula da água e do grupo fosfato.

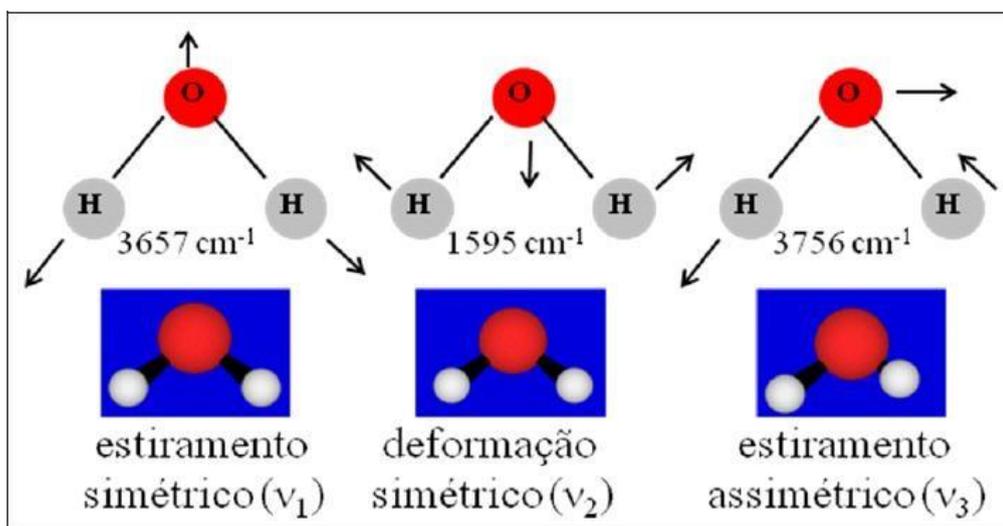


Figura 3.2: Modos de vibração da molécula de água.

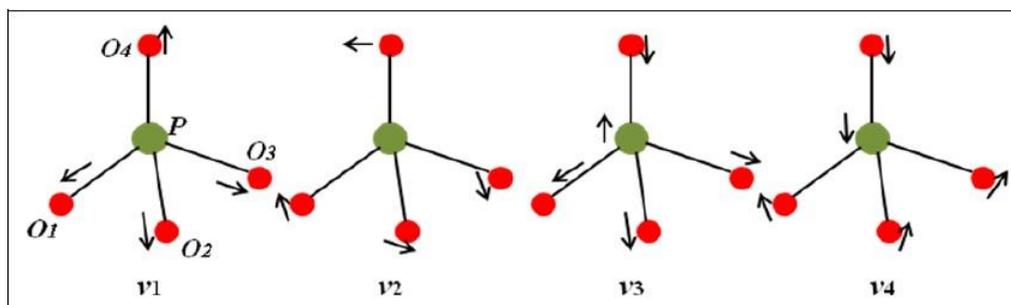


Figura 3.3: Modos de vibração do PO_4^{3-} .

Na **Figura 3.4** mostra-se o espectrômetro Shimadzu, modelo IR-PRESTIGE-21 do CBPF, operando no modo de transmissão que foi utilizado nas medidas de FTIR das amostras na forma de pó e pastilhas.



Figura 3.4: Espectrômetro de FTIR acoplado ao microscópio AIM8800.

A importância em aplicar-se o FTIR em materiais como a HAp deve-se ao fato de esta técnica pode identificar os grupos funcionais através da comparação dos modos vibracionais com padrões existentes na literatura. Além disso, a espectroscopia FTIR permite identificar alterações na composição da hidroxiapatita e possíveis modificações nos diferentes grupos moleculares, devido à modificação das superfícies das nanopartículas. Esta técnica pode identificar a substituição dos grupos OH^- e $(\text{PO}_4)^{-3}$ pelos grupos $(\text{CO}_3)^{-2}$ através da presença das bandas de absorção características (ELLIOT, 1994).

3.7 Distribuição do Tamanho das Partículas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta por (LDV).

Para as medidas do tamanho das partículas e do potencial foi utilizando o equipamento ZetaPlus / Brookhaven Instruments, que baseia-se na técnica LDV (Laser Doppler Velocimetry) para medidas de potencial zeta e DLS (Dynamic Light Scattering)

para medidas de tamanho de partícula. As medidas foram realizadas utilizando-se soluções contendo 10mg da amostra em 10 ml de KCl 1mM, depositadas em tubos corning com capacidade de 50 ml, a importância deste comprimento é garantir a homogeneidade das partículas dispersar no sobrenadante. As amostras passaram por um tratamento de ultrassom de alta potência por 3 minutos para desaglomerar as partículas. Após o tratamento, as soluções eram deixadas em repouso por duas horas a fim de retirar das suspensões o material particulado mais pesado. Para verificar a reprodutibilidade do experimento e avaliar os erros de medida foram realizadas 03 medidas de cada amostra. O potencial zeta de cada amostra foi medido em 05 valores de pH, no intervalo de pH=5 a pH=9. O pH das soluções foram ajustados pela adição de NaOH (0,01M) e HCl (0,01M) à solução.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

A técnica de medida do potencial zeta, $P(\zeta)$, tem sido pouco explorada por grupos brasileiros que trabalham com fosfatos de cálcio e suas aplicações como biomaterial. Esta técnica é de suma importância no estudo de sistemas coloidais tal como a hidroxiapatita, pois ela é capaz de detectar modificações na superfície de nanopartículas de HAp quando suspensas em meios com diferentes composições, pHs e forças iônicas. Ela permite ainda detectar a influência de moléculas tais como amino ácidos e proteínas na carga da superfície da hidroxiapatita. Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização estrutural – XDR e IFTR – dos pós nanoestruturados da hidroxiapatita e hidroxiapatita substituída parcialmente com os íons CO_3^{-2} e Zn^{+2} , antes e após a adsorção de albumina e insulina. Posteriormente, são apresentadas e discutidas as medidas de potencial zeta realizadas nas amostras, tendo como base os resultados previamente obtidos na literatura com amostras de fosfatos de cálcio. (LANDI *et al.*, 2003), (EIJI *et al.*, 2006)

4.1 Hidroxiapatita Sintetizadas em Diferentes Temperaturas

4.1.1 Caracterização Estrutural

Hidroxiapatita Sintetizada a 90°C

O difratograma de XRD do pó da amostra de HAp sintetizada a 90°C é mostrado na **Figura 4.1**. Observa-se a presença dos picos característicos da estrutura hexagonal da hidroxiapatita com alto grau de cristalinidade. A posição dos picos do padrão XRD experimental é similar a posição das reflexões do difratograma da HA p correspondente a ficha ICDD-PDF-09-0432. Não foram detectadas reflexões referentes a outras fases cristalinas de fosfatos de cálcio.

A **Figura 4.2** mostra o padrão de difração na região de θ entre 22° e 32°. O pico $\theta = 25.86^\circ$ foi usado para determinar o tamanho médio dos cristais segundo o plano (002). Usando-se a equação de Scherrer, **Eq.30**, o valor obtido para o tamanho médio de um cristal segundo o plano (002) foi de 84nm, já sendo corrigido o erro instrumental pelo do equipamento usando o difratograma do Si640C (BURCU *et al.*, 2008).

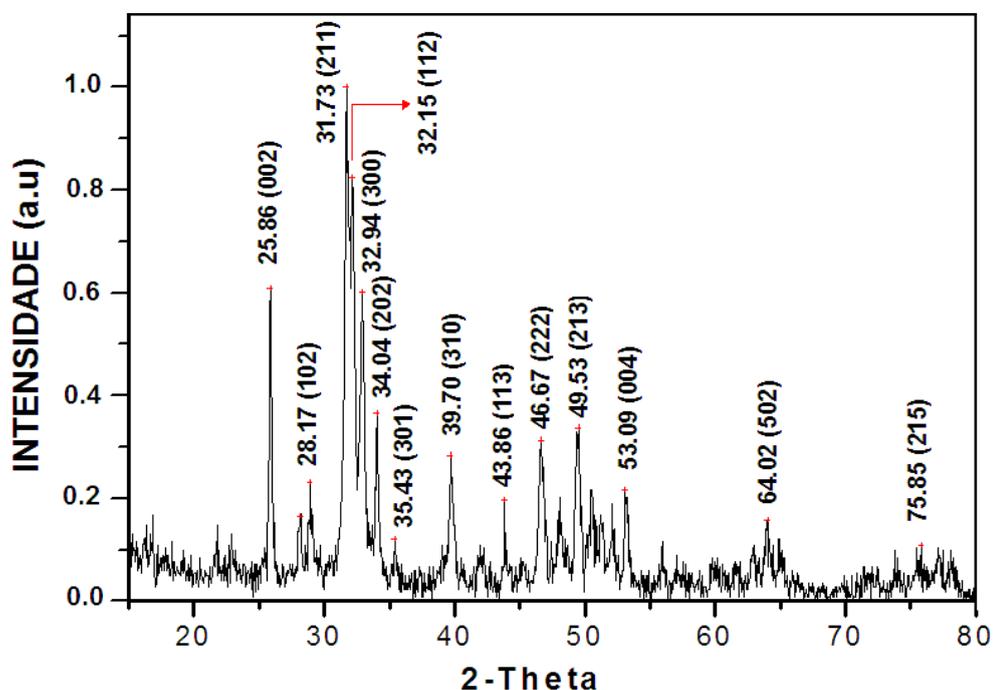


Figura 4.1: Difratograma de XRD da amostra HAp sintetizada a 90°C.

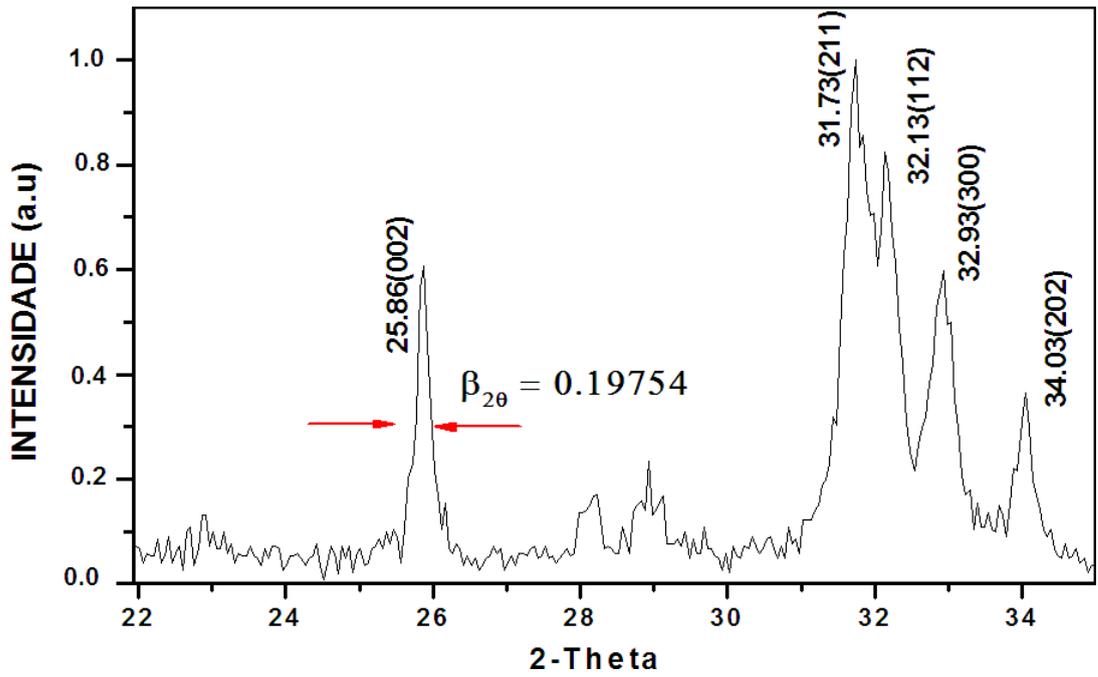


Figura 4.2 Largura da linha na orientação (002) da HAp sintetizada 90°C.

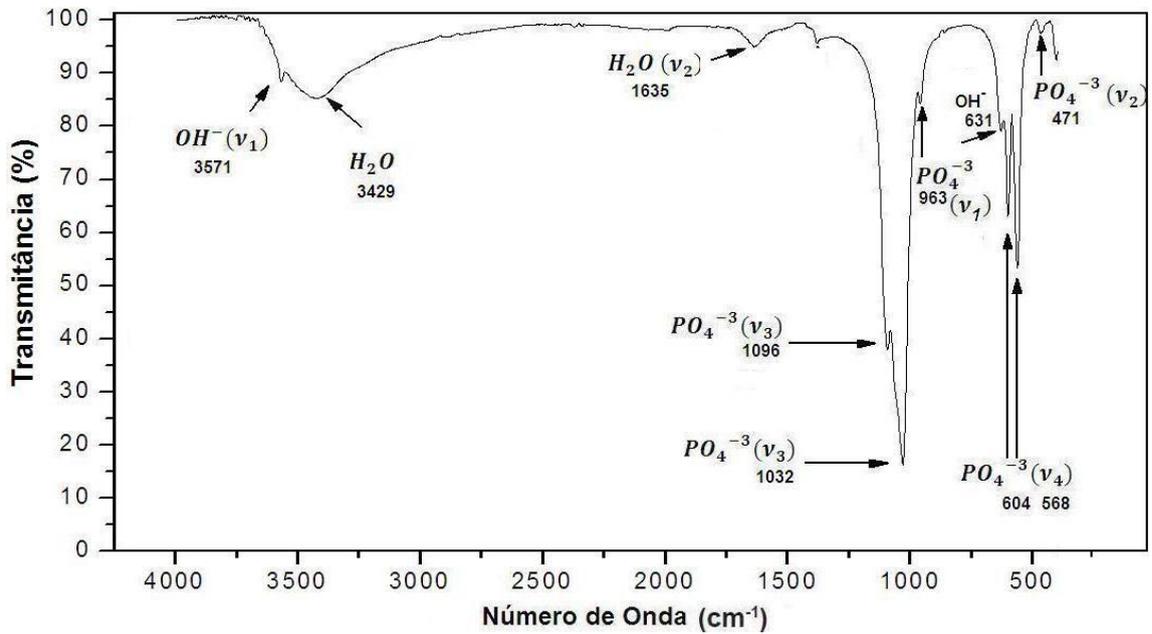


Figura 4.3: Espectro do infravermelho da HAp sintetizada a 90°C.

O espectro de infravermelho da hidroxiapatita sintetizada a 90°C, **Figura 4.3**, mostra banda em 3571 cm^{-1} indicando a presença do estiramento da ligação O-H estrutural e o modo de vibração livre dos grupos OH^- associado a banda em 631 cm^{-1} (KOUTSOPOULOS 2002); bandas em 1096, 1032, 963, 604, 568, 471 cm^{-1} indicando a presença dos grupos PO_4^{3-} . Estas bandas são características da HAp (JEVTIC *et al.*, 2008). A presença de uma banda larga em torno de 3429 cm^{-1} e outra banda de 1635 cm^{-1} aponta a presença da água adsorvida na estrutura da HAp90 (KOUTSOPOULOS 2002).

Hidroxiapatita Sintetizada a 37°C

O padrão de difração da amostra sintetizada a 37°C é mostrado na **Figura 4.4**. Ele também apresenta reflexões típicas da hidroxiapatita conforme ficha ICDD-PDF-09-0432. Picos relativos a outras fases cristalinas não são detectados. Observa-se um grande alargamento dos picos de difração em relação a amostra sintetizada a 90°C indicando que o abaixamento da temperatura de síntese leva a um desordenamento da estrutura e uma diminuição da cristalinidade do material. A **Figura 4.5** mostra o pico em $\theta = 25.86^\circ$ usado para se obter o tamanho médio dos cristalitos segundo o plano (002). Usando-se a equação de Scherrer **Eq.30** encontramos um valor para o tamanho médio dos cristalitos de 39nm, já sendo corrigido o erro instrumental do equipamento usando o difratograma do Si640C (BURCU *et al.*, 2008).

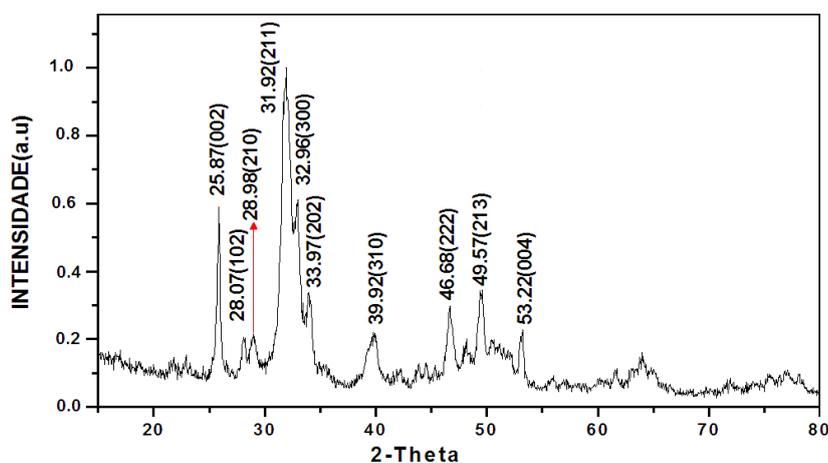


Figura 4.4: Difratograma de XRD da amostra HAp sintetizada a 37°C.

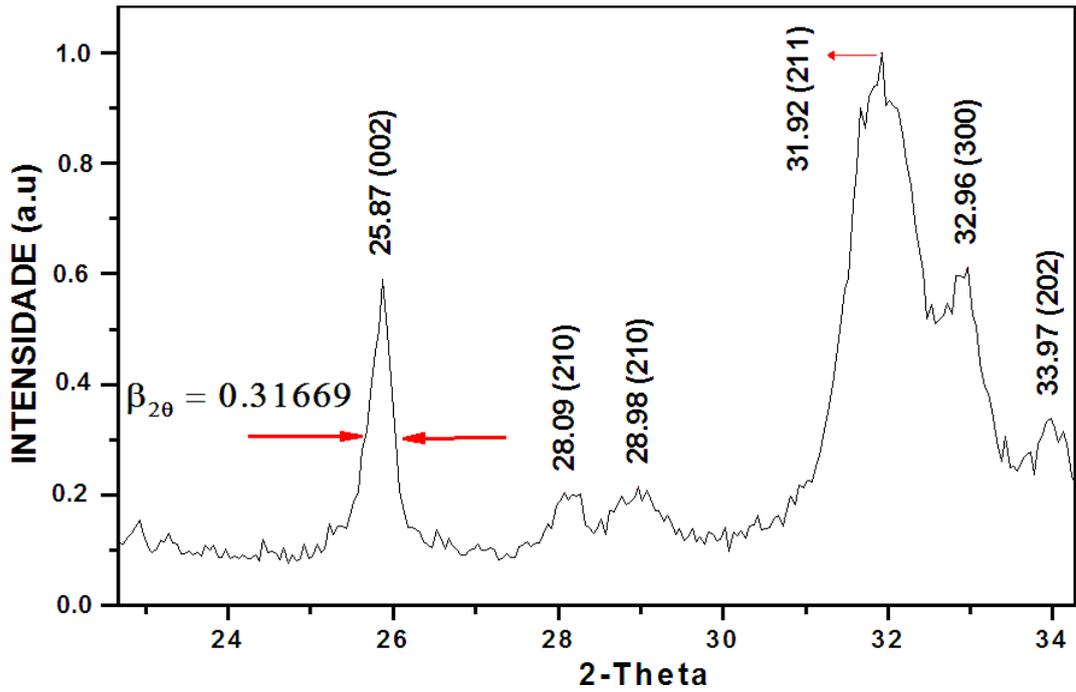


Figura 4.5: Largura da linha na orientação (002) da HAp sintetizada 37°C

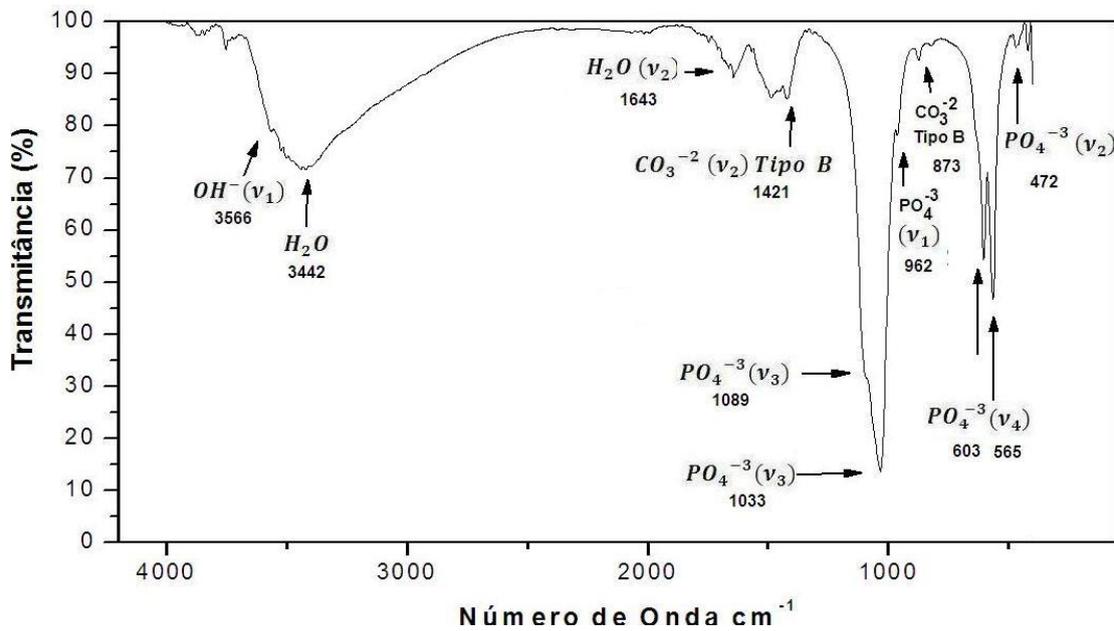


Figura 4.6: Espectro do infravermelho da HAp Sintetizada a 37°C.

O espectro de infravermelho da hidroxiapatita sintetizada a 37°C, **Figura 4.6**, apresenta bandas em posições similares à amostra sintetizada em 90° C: bandas em 3566cm^{-1} indicando a presença do estiramento da ligação O-H estrutural; 1089, 1033, 962, 603, 565, 472cm^{-1} indicando a presença dos grupos PO_4^{-3} (JEVTIC *et al.*, 2008) e bandas largas em 3442cm^{-1} e 1643cm^{-1} devido à água adsorvida.

A existência de uma banda em 1421cm^{-1} e 873cm^{-1} deve-se a presença do grupo CO_3^{-2} substituindo os grupos PO_4^{-3} . Estas bandas são características da hidroxiapatita carbonatada do tipo B (ELLIOT *et al.*, 1994). A incorporação de grupos carbonatos na hidroxiapatita é bem conhecida e é favorecida pelo método de produção do material: precipitação por via úmida com adição controlada dos reagentes (FLEET *et al.*, 2005). Estudos demonstram que as bandas de carbonato na HAp estão intimamente relacionadas com mudanças na forma e no tamanho dos cristais, já que a substituição do CO_3^{-2} em sítios de PO_4^{-3} , causa a contração do eixo-a e expansão do eixo-c da cela unitária (COSTA A., 2004).

4.1.2 Potencial Zeta

Muitos artigos têm sido publicados na literatura envolvendo medidas do potencial zeta da hidroxiapatita. Os resultados apresentam grande variabilidade porque as amostras estudadas são produzidas em diferentes condições experimentais e as medidas são realizadas em meios com diferentes forças iônicas. Além disto, são utilizadas amostras de hidroxiapatita com diferentes características físico-químicas (cristalinidade, Ca/P, etc). Deve-se também levar em conta que a HAp é sistema dinâmico; quando colocado em um meio aquoso o material apresenta dissolução de seus componentes básicos (Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^-). Esta característica pode alterar o comportamento do potencial zeta do material. Alguns exemplos que ilustram este fato são apresentados a seguir e servirão como base para a discussão dos resultados obtidos nesta dissertação, que teve como foco a determinação do potencial zeta e do ponto isoelétrico de amostras de HAp com diferentes cristalinidades (HAp90, HAp37) e substituições, antes e após a adsorção de proteínas.

A hidroxiapatita sintetizada em $T = 70^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 10$ foi estudada por Kyriaki *et al.*, (2006). Os autores obtiveram uma HAp com razão Ca/P de $1,71 \pm 0,05$, área superficial específica de $23\text{m}^2/\text{g}$, e tamanho médio dos aglomerados de $8,3\mu\text{m}$. As partículas eram formadas por aglomerados de cristais de 50nm a 150nm . O potencial zeta foi medido em solução de $0,01\text{M KNO}_3$. O ponto isoelétrico, IEP, da HAp situou-se próximo à $\text{pH} = 6$ e a função que descreve seu comportamento com o pH seguiu a curva experimental da **Figura 4.7**.

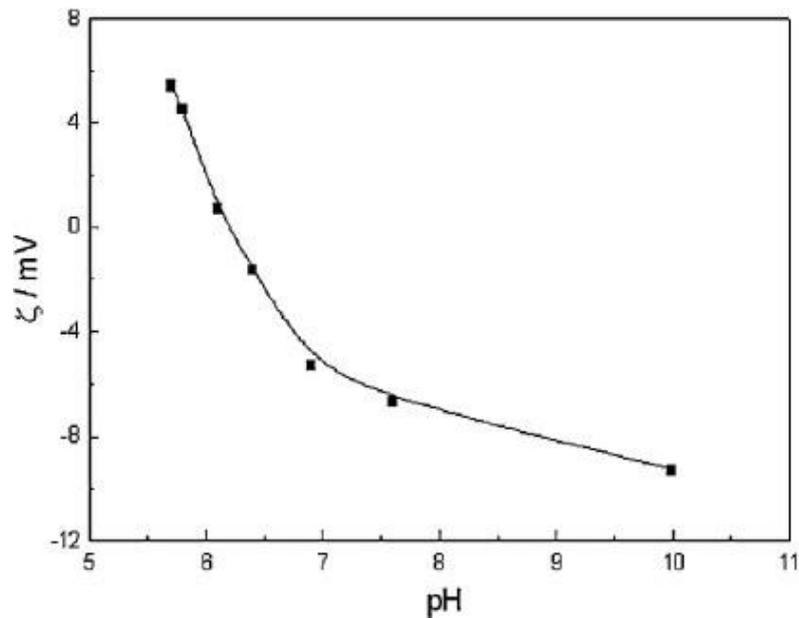


Figura 4.7: Variação do potencial zeta da HAp com o pH ($T = 25^{\circ}\text{C}$). Figura adaptada do artigo de KYRIAKI *et al.*, (2006).

Kandori *et al.*, (2007) mediram $P(\zeta)$ em função do pH de amostras de HAp não tratada e tratada com ácido pirofosfórico (PPa). A HAp foi sintetizada por via úmida, adição dos reagentes por 24 horas, temperatura de síntese de 25°C e secagem em estufa por 48 h a 100°C . O material apresentou leve deficiência em cálcio (razão molar de Ca/P = 1,64) e uma área superficial específica de $93,1\text{m}^2/\text{g}$. A **Figura 4.8** mostra que a HAp não apresenta carga positiva da dupla camada e um ponto isoelétrico na região $5 < \text{pH} < 12$. Os resultados obtidos pelos autores divergem daqueles obtidos por Kyriaki *et al.*, (2006).

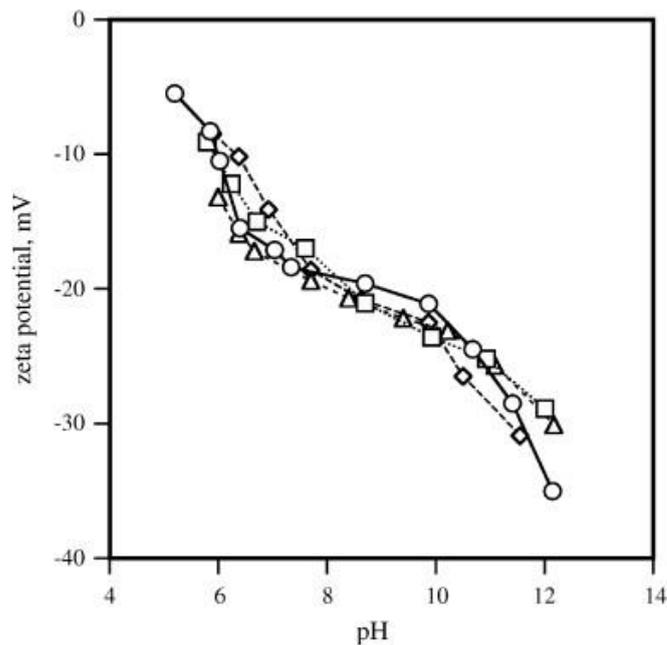


Figura 4.8: Variação do potencial zeta da HAp com varias concentrações de (PPa),(O)Não modificado, (◇)2, (Δ)4, e (□)6. Figura adaptada do artigo de KANDORI *et al.*, (2007).

Zhang *et al.*, (2006) mediram o $P(\zeta)$ de uma hidroxiapatita com um alto grau de cristalinidade utilizando uma solução com força iônica de 0,001M de KCl. O ponto isoelétrico encontrado foi de pH= 7,0 e o comportamento do potencial zeta com o pH, **Figura 4.9**, apresenta diferença com os encontrados Kandori *et al.*, (2007). O ponto isoelétrico obtido por Zhang *et al.*, (2006) difere do de Kyriaki *et al.*, (2006).

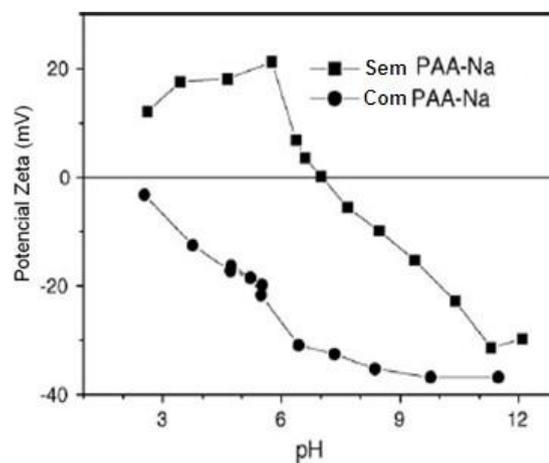


Figura 4.9: Variação do potencial zeta da HAp com o pH (T=25°C). Figura adaptada do artigo de ZHANG *et al.*, (2006).

Rodríguez *et al.*, (2000) sintetizaram uma HAp a 90° C, pH 10 sem dispersantes no meio reacional e com dispersantes de diferentes naturezas. O material apresentou uma razão molar de Ca/P = 1,67 e área superficial específica que foi 51m²/g. O potencial zeta da HAp foi determinado em diferentes pH baixo uma força iônica de 0,001M de KCl. A curva do potencial zeta com o pH é mostrada na **Figura 4.10** abaixo. O ponto isoelétrico do material foi de pH=7,3.

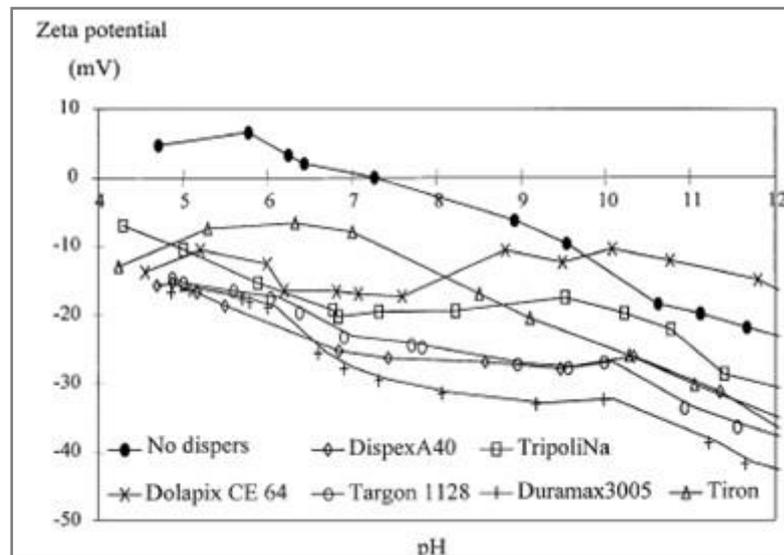


Figura 4.10: Variação do potencial zeta da HAp com o pH na ausência e na presença de diferentes dispersantes. Figura adaptada do artigo de RODRIGUEZ et al., (2000).

As amostras analisadas neste trabalho de dissertação passaram por um processo de desaglomeração (ver item 3.7) antes das medidas do potencial zeta, pois a reprodutibilidade e incerteza dos resultados dependem da distribuição do tamanho das partículas em suspensão na solução. Quanto menor for o tamanho dos aglomerados e mais estreita for a distribuição de tamanho das partículas, mais preciso será o valor do $P(\zeta)$. No anexo I são apresentados os valores dos tamanhos médios dos aglomerados de todas as amostras. As amostras HAp90 e HAp37 foram colocadas em suspensão na solução de 1mM de KCl por duas horas, antes da medida de $P(\zeta)$. Este procedimento visou assegurar que o equilíbrio iônico (intercambio de íons com a solução) havia sido atingido. A **Figura 4.11** mostra os valores experimentais do $P(\zeta)$ das amostras HAp90 e HAp37 em função do pH da solução.

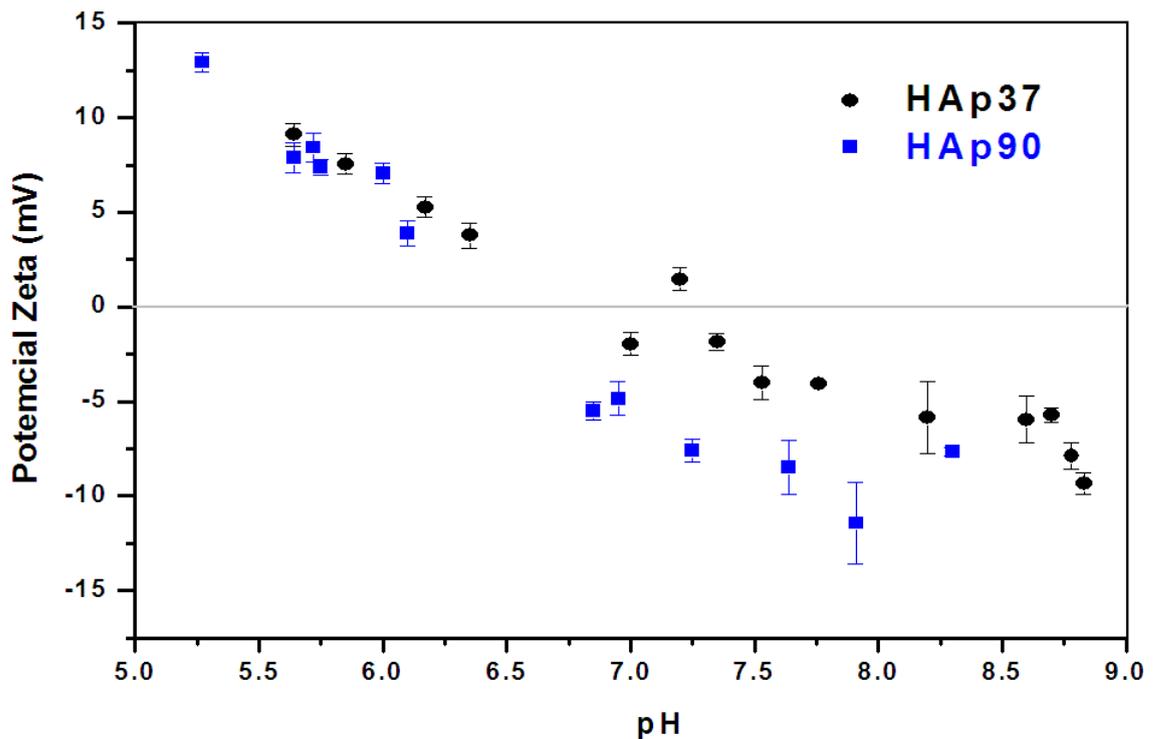


Figura 4.11: Potencial zeta das amostras HAp90 e HAp37 em função do pH.

A **Figura 4.11** revela que o potencial zeta da amostra de HAp90, possui valor muito positivo para baixos pH (pH = 5.27) comparado com RODRIGUEZ et al., (2000). Isto indica uma adsorção de íons H^+ da solução pelos sítios negativos da superfície da hidroxiapatita, formando uma dupla camada com polaridade positiva. A medida que o pH aumenta, a superfície da hidroxiapatita começa a adsorver mais íons OH^- da solução fazendo com isto que o $P(\zeta)$ diminua até chegar ao ponto isoeletrico ($P(\zeta) = 0$) do material, que para a HAp37 ocorre em $pH = 7 \pm 0,6$ obtido de um ajuste da curva experimental com uma função polinomial de ordem 3. Nesta condição, existe um equilíbrio entre as cargas negativas e positivas na dupla camada. Para pH maiores do ponto isoeletrico a contribuição dos íons OH^- predomina e a superfície da HAp (dupla camada) se torna mais negativa. A interação das espécies iônicas da superfície da HAp com os íons H^+ e OH^- da solução pode ser descrita pela seguintes equações (VUČINIĆ et al., 2010):



A existência de regiões de pH onde o $P(\zeta)$ é negativo e positivo indica que a superfície da HAp possui sítios de adsorção negativos e positivos. O comportamento do $P(\zeta)$ com o pH da amostra sintetizada a 90°C possui um perfil semelhante aos obtidos por Kyriaki *et al.*, (2006) e Rodríguez *et al.*, (2000) mas com uma variação negativa do $P(\zeta)$ mais assintótica para valores de pH maiores que 6.5. O ponto isoelétrico da amostra HAp90 é $6,40 \pm 0,5$ próximo ao da HAp estudada por Kyriaki *et al.*, (2006), mais baixo do obtido por Rodríguez *et al.*, (2000). Este resultado indica uma maior exposição dos sítios positivos na superfície da HAp sintetizada a 90°C que nas superfícies das amostras estudadas por Rodríguez *et al.*, (2000).

O potenciais zeta da amostra sintetizada em 37 C apresenta um padrão de comportamento com o pH similar à amostra sintetizada em 90°C. Os valores de $P(\zeta)$ são similares para pHs abaixo do ponto isoelétrico ($pH < 6,5$), **Figura.4.11**. Entretanto, o $P(\zeta)$ da amostra HAp37 apresenta valores superiores à HAp90 para pHs entre 6.75 e 8.0. Este comportamento do $P(\zeta)$ pode ser explicado através das reações 31-34, para baixos pHs ambas as superfícies da hidroxiapatita atingem uma condição de saturação de cargas positivas ($pH=5$), isto é, rica em H^+ (ácido). Neste caso, é observada a menor diferença entre os valores do $P(\zeta)$ das amostras e todos os sítios superficiais nas amostras HAp90, HAp37 estão na forma descrita pela equação 31-33. Os sítios de $(OH)^-$, e $(PO_4)^{3-}$ controlam a carga da superfície para pHs abaixo de 6,5 tornando a dupla camada positiva. Para estes pH (ácidos) os valores do $P(\zeta)$ são iguais nas amostras HAp90 e HAp37, que possuem diferentes cristalinidades e provavelmente diferentes estequiometria de superfície. Portanto, pode-se concluir que os sítios dos íons fosfatos e hidroxilas são pouco sensíveis à variações da cristalinidade e estequiometria da superfície para $pH < 6,5$.

A variação do $P(\zeta)$ das amostras com o pH, **Figura.4.11**, indica que a diminuição da temperatura de síntese produziu uma superfície mais negativa em regiões de pH maiores que 7,0. Para valores de pH maiores que IEP a reação dos íons OH^- com os sítios do Ca^{2+} (equação 34) é que determina a carga da dupla camada da superfície. A **Figura 4.11** mostra que para altos pHs, a superfície da amostra HAp37 apresenta menor módulo de $P(\zeta)$ que o da amostra HAp90, formando um dupla camada menos negativa que esta última amostra. Este resultado indica que o sítio do Ca^{2+} é responsável pelas variações do potencial zeta com a cristalinidade da amostra sendo mais sensível às mudanças da estequiometria e da superfície que os sítios dos íons $(\text{OH})^-$ e $(\text{PO}_4)^{3-}$. A diminuição do $P(\zeta)$ para $\text{pH} > \text{IEP}$ pode estar relacionado à menor cristalinidade da amostra $\text{Cristalinidade}(\text{HAp90}) > \text{Cristalinidade}(\text{HAp37})$. A **Tabela 4.1**, mostra os IEP e o tamanho médio dos aglomerados das duas amostras na solução de 1mM de KCl.

Tabela 4.1: Valores do ponto isoelétrico (IEP), razão Ca/P, tamanho médio dos cristais e aglomerados.

Amostras	* IEP	Razão Ca/P	Tamanhos Cristais (002)	** Tamanho Médio Aglomerados
HAp37	$7 \pm 0,6$	1,67	39nm	$3,4\mu\text{m}$
HAp90	$6,4 \pm 0,5$	1,66	84nm	$2,9\mu\text{m}$

* Valores de IEP obtido por um ajuste da curva experimental com uma função polinomial de 3 ordem.

** Valores do tamanho médio aglomerados no anexo I

4.2 Hidroxiapatita Substituída por Zinco (HAp:Zn²⁺)

4.2.1 Caracterização Química e Estrutural

A análise química elementar da amostra HAp:Zn²⁺ por fluorescência de raios-X mostrou que a concentração de zinco na amostra foi de 2.2 % molar. O padrão de difração da amostra HAp:Zn²⁺ tem os picos característicos de uma hidroxiapatita com

baixo grau de cristalinidade. Foram realizados refinamentos Rietveld do padrão de difração obtido por raios-X de fonte de radiação sincrotron, com energia de 9 keV. Os refinamentos (comunicação pessoal da Dra. Gabriela Avilez da B. Gonzáles, Dep. de Física, DePaul University, Chicago, IL.) indicaram que a HAp: Zn²⁺ possui parâmetros de rede de a=b= 9,4208 e c= 6,8694 com uma concentração de 1,6% molar de Zn²⁺ substituindo o Ca²⁺. A diminuição dos parâmetros de rede da HAp com a substituição do cálcio pelo zinco podem ser explicadas pelo raio iônico do Zn²⁺ que é menor que o raio iônico do Ca²⁺.

Comparando-se os padrões de XRD das amostras HAp e HAp:Zn²⁺ sintetizadas a 37°C (**Figura. 4.4 e Figura. 4.12**) verifica-se que a HAp substituída com Zn²⁺ apresenta picos mais largos que a da HAp e, por consequência, menor cristalinidade. A observação de que a cristalinidade das apatitas diminuiu com o aumento da substituição de zinco na estrutura da HAp já havia sido feita por diversos autores tais como Bigi *et al.*, (1995) e Miyaji *et al.*, (2005). A **Figura. 4.13** mostra a largura de 0.3885 do pico 25,92 graus correspondente à reflexão (002). Usando-se a equação de Scherer chega-se a um valor de 30nm para o tamanho médio de cristal. Este valor é inferior ao tamanho médio de cristal da amostra HAp (39nm) sintetizada na mesma temperatura.

As **Figuras 4.6 e 4.14** mostram os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de HAp37 e HAp:Zn²⁺. Não foram verificadas diferenças significativas nos espectros do infravermelho das duas amostras. A existência de uma banda em 1421cm⁻¹ e 869cm⁻¹ deve-se a presença do grupo CO₃⁻² substituindo o sitio dos grupos PO₄⁻³, característicos da hidroxiapatita carbonatada do tipo B (ELLIOT *et al.*, 1994). O espectro de infravermelho da HAp:Zn²⁺ mostra bandas em torno de: 3566cm⁻¹ indicando a presença do estiramento da ligação O-H estrutural; 1093, 1033, 962, 634, 601, 472cm⁻¹ indicando a presença dos grupos PO₄⁻³, que são típicas àquelas descritas para a Hidroxiapatita (JEVTIC *et al.*, 2008). A presença de uma banda larga em torno de 3437 cm⁻¹ e outra banda de meia intensidade de 1639 cm⁻¹ aponta a presença da água adsorvida.

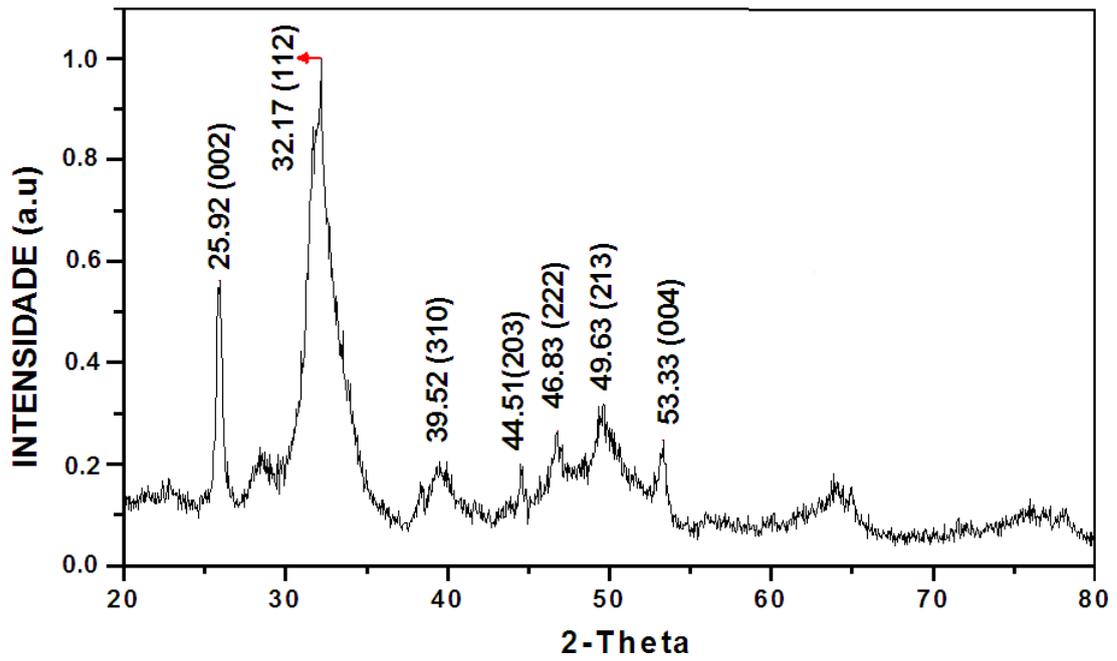


Figura 4.12: Difratoograma de XRD da amostra HAp:Zn²⁺ sintetizada a 37°C.

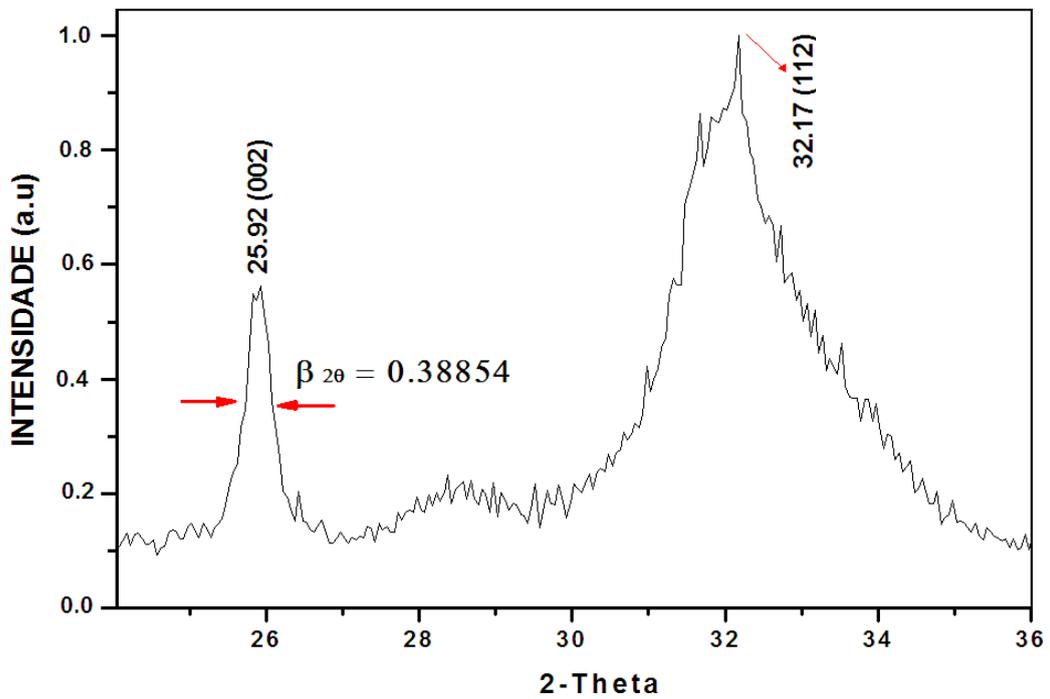


Figura 4.13: Largura da linha na orientação (002) da HAp:Zn²⁺ sintetizada 37°C

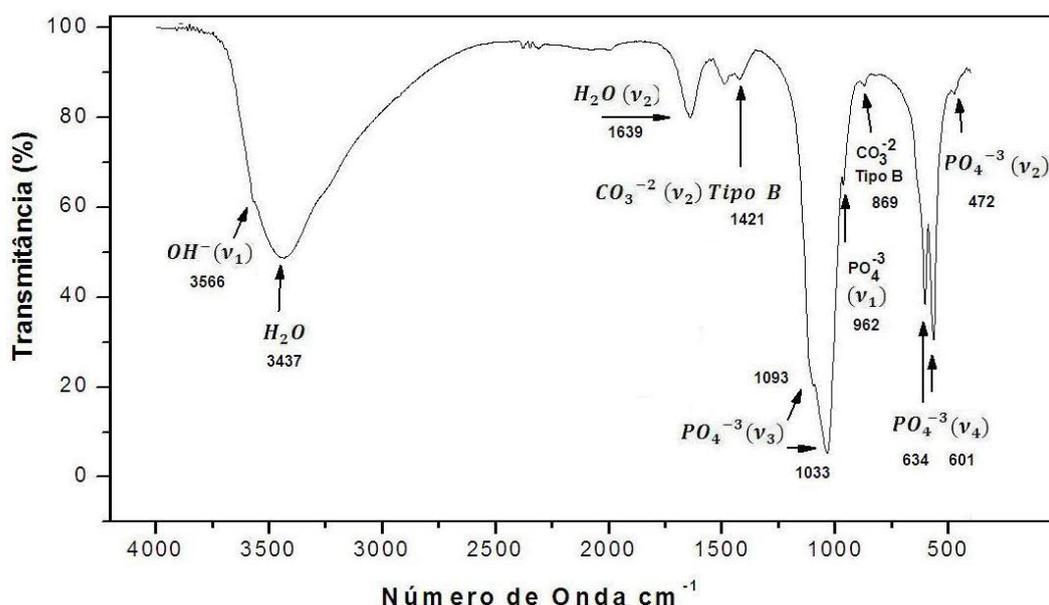


Figura 4.14: Espectro de infravermelho da HAp:Zn²⁺ sintetizada a 37 °C.

4.2.2 Potencial Zeta (HAp:Zn²⁺)

O potencial zeta, $P(\zeta)$, da superfície de hidroxiapatita substituída por zinco tem sido pouco estudado por grupos de pesquisa, internacionais e nacionais. Pode-se citar o trabalho realizado por Eiji *et al.*, (2006) que sintetizaram a hidroxiapatita ($T= 60^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=10$) com substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} em concentrações de zinco entre 1% a 6% em massa. Os autores mediram o potencial zeta das amostras em $\text{pH}= 7.4$ e verificaram que o $P(\zeta)$ aumentava positivamente com a substituição de até 2% em massa do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} , conforme mostra a **Figura 4.15**. Para valores maiores que 2% ocorre, segundo dados dos autores uma diminuição gradual do $P(\zeta)$. Os autores não realizaram medidas do $P(\zeta)$ com o pH . A **Figura 4.16** apresenta os valores de $P(\zeta)$ para a amostra HAp:Zn²⁺ para diferentes pH . Observa-se que a presença de Zn^{2+} na superfície da HAp não provoca uma mudança do potencial zeta para valores de pH menores que 6,4. **Tabela 4.2**. Isto equivale a dizer que a substituição de Ca^{2+} por 2.2% molar de Zn^{2+} não modifica a carga da dupla camada formada na superfície da HAp em $\text{pHs} < 6,4$.

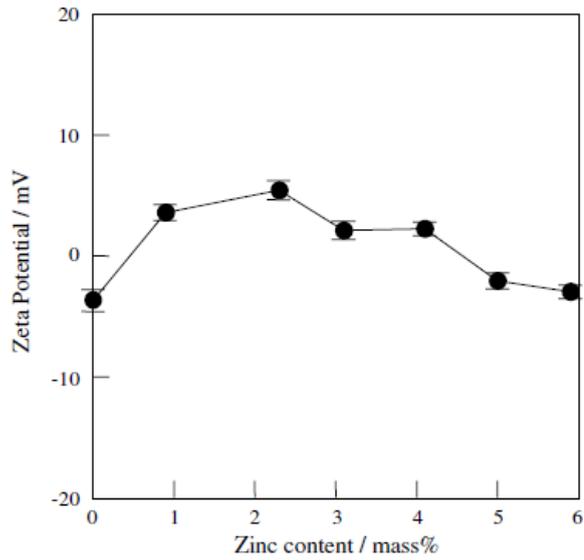


Figura 4.15: Potencial zeta para pH 7.4 por quantidade de massa de Zinco na hidroxiapatita. Figura adaptada de EIJ *et al.*, (2006).

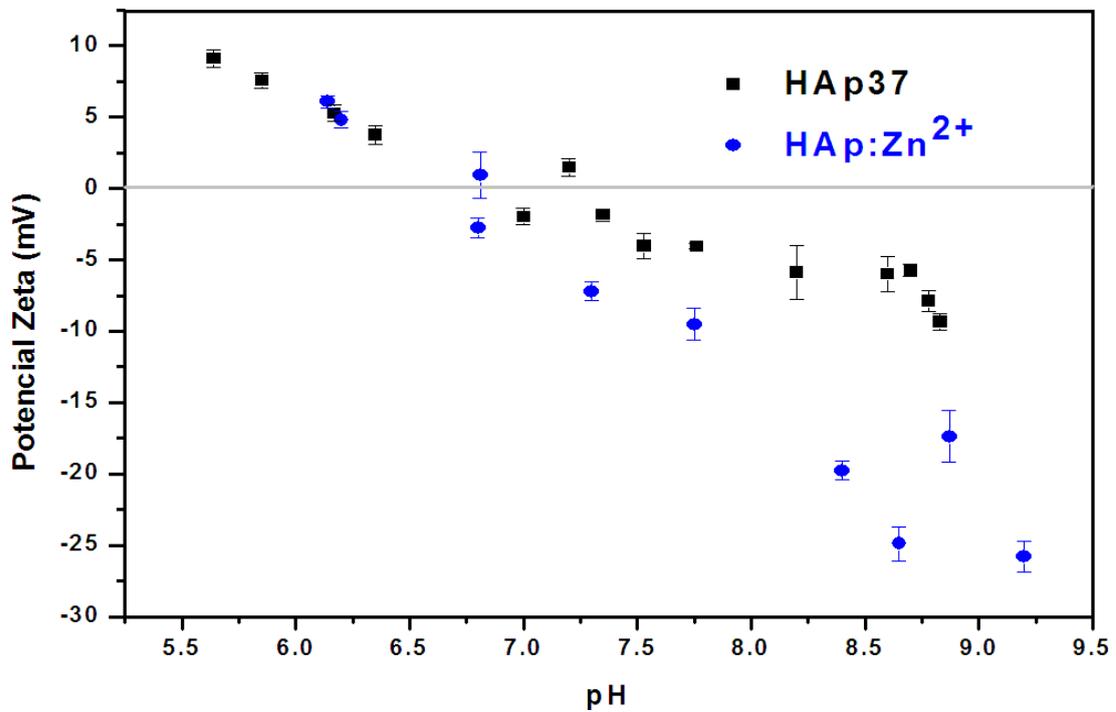


Figura 4.16: Potencial zeta das amostras da HAp37 e HAp:Zn²⁺ em função do pH.

Tabela 4.2: Valores do ponto isoelétrico, razão Ca/P e tamanho médio dos cristais e aglomerados das amostras HApZn²⁺, HAp37.

Amostras	* IEP	Razão Ca/P	Tamanhos Cristais (002)	** Tamanho Médio Aglomerados
HAp:Zn ²⁺	6.6 ± 0,6	1,63	29nm	1,9µm
HAp37	7 ± 0,6	1,67	39nm	3,4µm

* Valores de IEP obtido por um ajuste da curva experimental com uma função polinomial de 3 ordem.

** Valores do tamanho médio aglomerados no anexo I

Tal como foi discutido no item 4.1.2, os valores de $P(\zeta)$ para pHs ácidos são determinados pelas interações dos grupos H^+ e OH^- com os sítios dos fosfatos e hidroxilas (equações 31-33). E estes sítios são poucos sensíveis às variações de cristalinidade e estequiometria da amostra, como foi visto em 4.1.2. Por outro lado, a substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} não afeta os sítios de $(OH)^-$ e de $(PO_4)^{3-}$. Estes argumentos explicam por que a substituição do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} não afeta os valores de $P(\zeta)$ em pHs baixos.

O comportamento do $P(\zeta)$ muda para pHs maiores que IEP, pois a carga da dupla camada da superfície da HAp:Zn²⁺ é controlada pela reação dos íons OH^- no sítio catiônico. Para pHs altos (ver discussão no item 4.1.2) o valor do $P(\zeta)$ é muito sensível à mudanças no sítio do Ca^{2+} . Portanto, a diminuição do $P(\zeta)$ observada na amostra HAp:Zn²⁺ pode ser explicada pela cristalinidade ou pela característica mais covalentes do Zn^{2+} em relação ao Ca^{2+} , facilitando a ligação com os grupos OH^- e contribuindo para tornar a superfície mais negativa. Como já mostrado nas reações 31-34 (VUČINIĆ *et al.*, 2010) a superfície da hidroxiapatita apresenta diferentes espécies ionizáveis que podem se ligar com grupos H^+ e OH^- . Considerando que a HAp:Zn²⁺ é constituída também por íons de Zn^{2+} é possível reescrever as reações 35-39 tendo-se em conta a presença deste íon na superfície:



4.3 Hidroxiapatita Substituída por Carbonato (HAp:CO₃²⁻)

4.3.1 Caracterização Estrutural

A substituição do fosfato pelo carbonato (PO₄³⁻ por CO₃²⁻) forma defeitos pontuais (vacâncias) na estrutura da hidroxiapatita. Para a compensação de cargas e neutralidade da estrutura, a substituição PO₄³⁻ por CO₃²⁻ na HAp induz a formação de vacâncias de Ca²⁺ e OH⁻ (KOVALEVA *et al.*, 2006) e facilita a incorporação de água na estrutura (IVANOVA *et al.*, 2001). A substituição modifica os parâmetros da rede cristalina, diminuindo o parâmetro c e aumentando os parâmetros a e b (BARRALET *et al.*, 2002).

O difratograma da amostra HAp:CO₃²⁻ sintetizada a 37 °C, **Figura. 4.17**, é característico de uma hidroxiapatita com baixo grau de cristalinidade. Os alargamentos dos picos impediram que o padrão de XRD fosse refinado pelo método de Rietveld. Entretanto, foi determinado o tamanho médio dos cristalitos segundo o plano (002) da HAp:CO₃²⁻ usando-se a equação de Scherrer. O valor calculado foi de 12nm, muito abaixo daqueles obtidos para as amostras HAp e HAp:Zn²⁺ sintetizadas na mesma temperatura. Já sendo corrigido o erro instrumental do equipamento.

A **Figura 4.19** mostra o espectro de infravermelho obtido para a amostra HAp:CO₃²⁻. As bandas dos grupamentos funcionais da HAp estão todas presentes no espectro da amostra. A ausência da banda de OH⁻ em 3571 cm⁻¹ e 630 cm⁻¹ indica que o CO₃²⁻ substituiu o grupo PO₄³⁻ na estrutura da hidroxiapatita, pois a substituição no

sítio B gera uma vacância de Ca^{2+} e de OH^- . A existência de bandas intensas na região de 1421cm^{-1} e 873cm^{-1} revela uma forte substituição dos grupos CO_3^{2-} no sítio dos grupos PO_4^{-3} , o que é característico da hidroxiapatita carbonatada do tipo B (JEVTIC *et al.*, 2008). As bandas largas e pouco definidas de fosfato nas regiões $590\text{-}610\text{cm}^{-1}$ e 1000cm^{-1} indicam que o material possui baixa cristalinidade. A presença de umas bandas largas em 3437cm^{-1} e em 1641cm^{-1} aponta a presença da água de cristalização na estrutura do material.

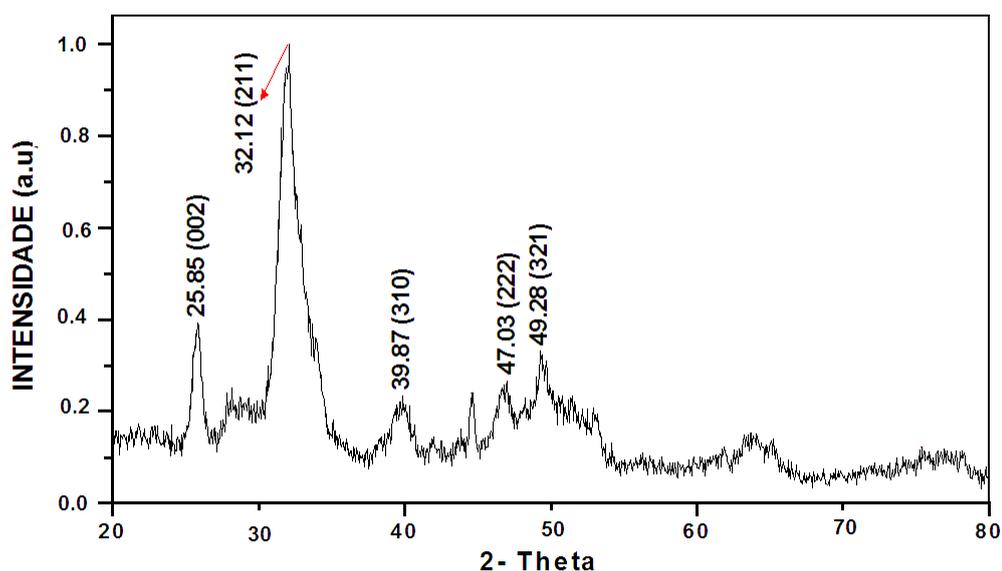


Figura 4.17: Difratograma da $\text{HAp}:\text{CO}_3^{2-}$ sintetizada a 37°C .

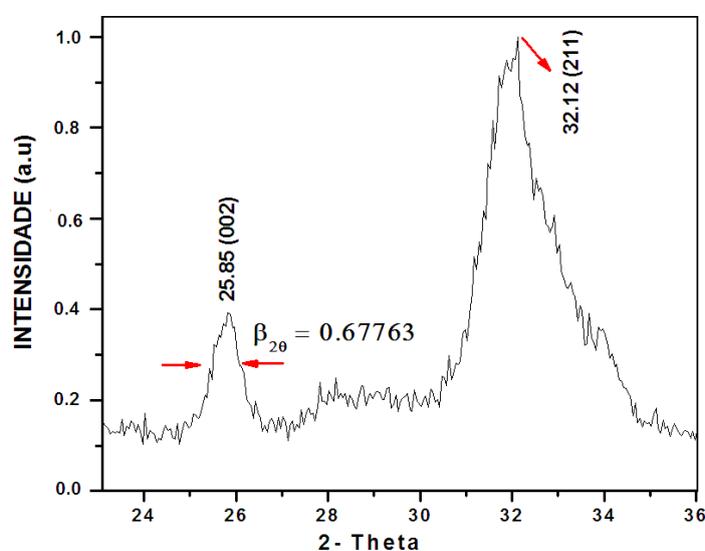


Figura 4.18: Largura da linha na orientação (002) da $\text{HAp}:\text{CO}_3^{2-}$ sintetizada a 37°C .

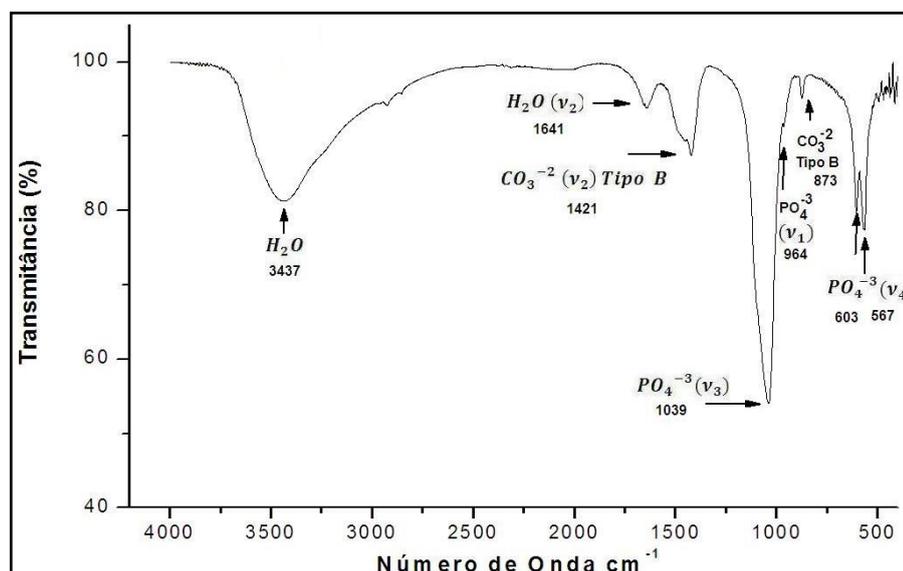


Figura 4.19: Espectro de infravermelho da HAp:CO₃²⁻ sintetizada a 37°C.

4.3.2 Potencial Zeta da HAp:CO₃²⁻

Existem poucos trabalhos que relatam o comportamento do $P(\zeta)$ em hidroxiapatitas carbonatadas. Um destes estudos foi realizado por Landi *et al.*, (2003) onde os autores sintetizaram uma carboapatita (CHA) ($T=90^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} > 11$), com razão $\text{Ca}/\text{P} = 2,01$, área específica superficial $51 \text{ m}^2/\text{g}$. O potencial zeta foi determinado pela técnica eletroacústica em solução com força iônica de $0,01\text{M}$. O ponto isoelétrico da amostra situou-se entre $\text{pH}=8$ e $\text{pH}=9$. O comportamento electrocinético da suspensão da carboapatita foi comparado com amostras de HAp com diferentes graus de cristalinidade (X_c) e área superficial específica (s.s.a), HALA: temperatura de síntese de 35°C , s.s.a= $120 \text{ m}^2/\text{g}$ e $X_c=20\%$; HAHA: temperatura de síntese de 95°C s.s.a= $35 \text{ m}^2/\text{g}$ e $X_c=80\%$. Os autores concluíram que o $P(\zeta)$ da CHA possui um comportamento em função de pH da solução similar ao da HAp menos cristalina (amostra HALA). O grau de estabilidade da HAHA tem um valor maior que a CHA, os pontos isoelétricos da HALA e CHA são maiores que HAHA. Segundo os autores a presença do grupo de carbonato muda o comportamento da superfície da HAp, dando origem a uma maior hidrólise básica: a mudança composicional é compensada pela diferença na superfície. **Figura 4.20** mostra os valores de potencial zeta versus pH para as amostras de CHA, HAHA e HALA.

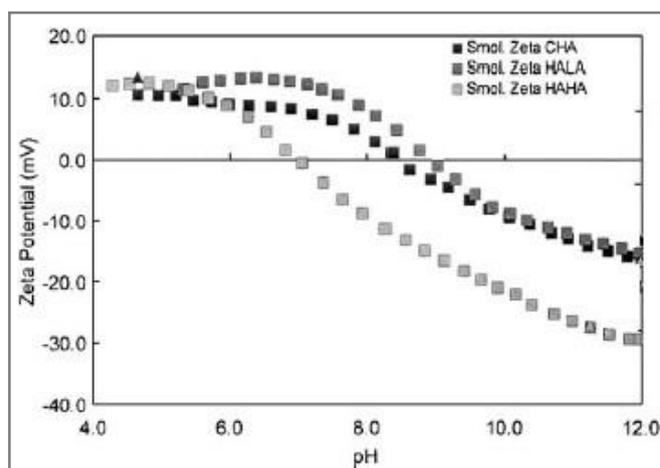


Figura 4.20: Potencial zeta da HAp e CHA vs pH. Figura adaptada do artigo de LANDI et al., (2003).

A **Figura 4.21** apresenta os valores de potencial zeta da amostra HAp:CO₃²⁻ em função do pH e da HAp sintetizada na temperatura de 37°C. Pode-se verificar que as curvas de P(ζ) são similares. Esta evidência sugere que a substituição do PO₄³⁻ pelo CO₃²⁻ não altera a reatividade dos sítios de superfície em relação a interação com íons H⁺ e OH⁻. O ponto isoelétrico da HAp:CO₃²⁻ é de 7,1 ± 0,5 próximo ao da HAp e da HAp:Zn²⁺. Este resultado indica que as vacâncias de Ca²⁺ criadas por compensação de cargas no processo de substituição do PO₄³⁻ pelo CO₃²⁻ não afetam as cargas da dupla camada da superfície da HAp37. A **Tabela 4.3** Mostra as medidas do ponto isoelétrico, razão Ca/P e tamanho médio dos cristais e aglomerados.

Tabela 4.3: Valores do ponto isoelétrico, razão Ca/P e tamanho médio dos cristais e aglomerados das amostras, HAp37 e HApCO₃²⁻.

Amostras	*IEP	Razão Ca/P	Tamanhos Cristais (002)	**Tamanho Médio Aglomerado
HAp37	7 ± 0,6	1,67	39 nm	3,4 μm
HAp:CO ₃ ²⁻	7,1 ± 0,5	2,55	12 nm	3,3 μm

* Valores de IEP obtido por um ajuste da curva experimental com uma função polinomial de 3 ordem.

**Valores do tamanho médio aglomerados no anexo I

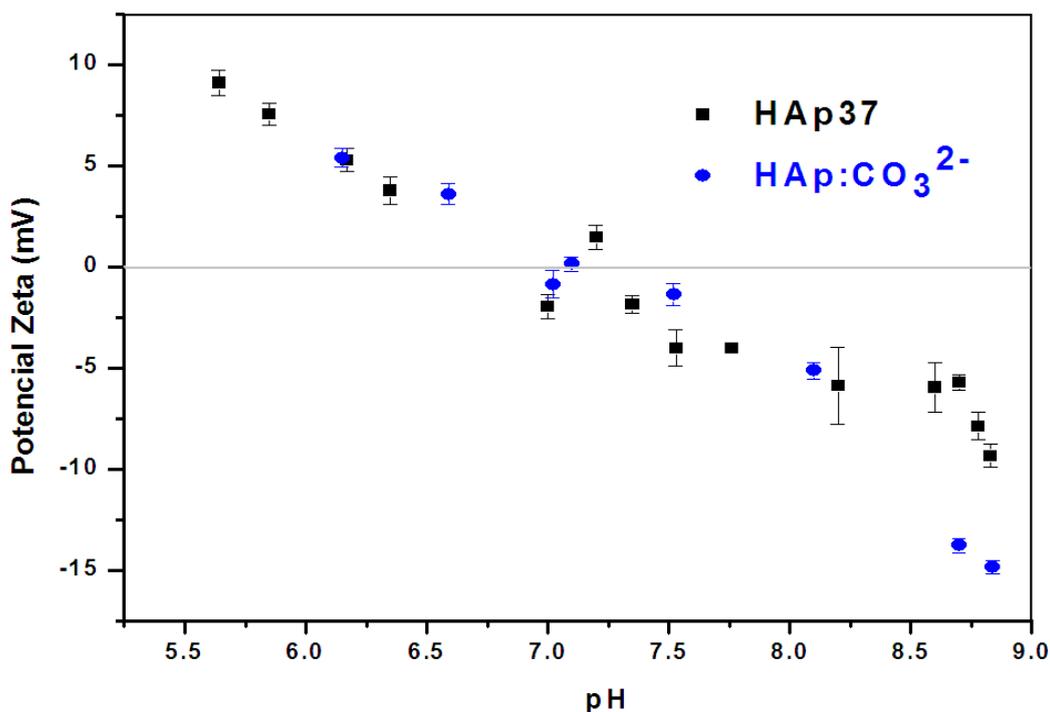


Figura 4.21: Potencial zeta das amostras de HAp:CO₃²⁻ e HAp37 em função do pH.

4.4 Potencial Zeta da HAp e da HAp Substituída por Zinco e Carbonato, Após a Adsorção da Albumina e Insulina

4.4.1 Adsorção das Proteínas

As medidas do potencial zeta na HAp, HAp:Zn²⁺ e HAp:CO₃²⁻, após a adsorção das proteínas BSA e insulina, foram realizadas com amostras sintetizadas em 37°C, conforme procedimento descrito no item 3.4.

A **Figura 4.22** mostra que HAp37 e a HAp:Zn²⁺ possuem taxas de adsorção similares em relação à albumina, enquanto a HAp:CO₃²⁻ adsorve uma menor quantidade desta proteína. Portanto, a substituição do Ca²⁺ pelo Zn²⁺ não altera a eficiência da superfície na adsorção da BSA, enquanto a substituição do PO₄³⁻ pelo CO₃²⁻ diminui a capacidade de adsorção da HAp37. Deve-se observar que a substituição do PO₄³⁻ pelo CO₃²⁻ cria vacâncias de Ca²⁺ o que diminuiria os sítios de adesão da proteína.

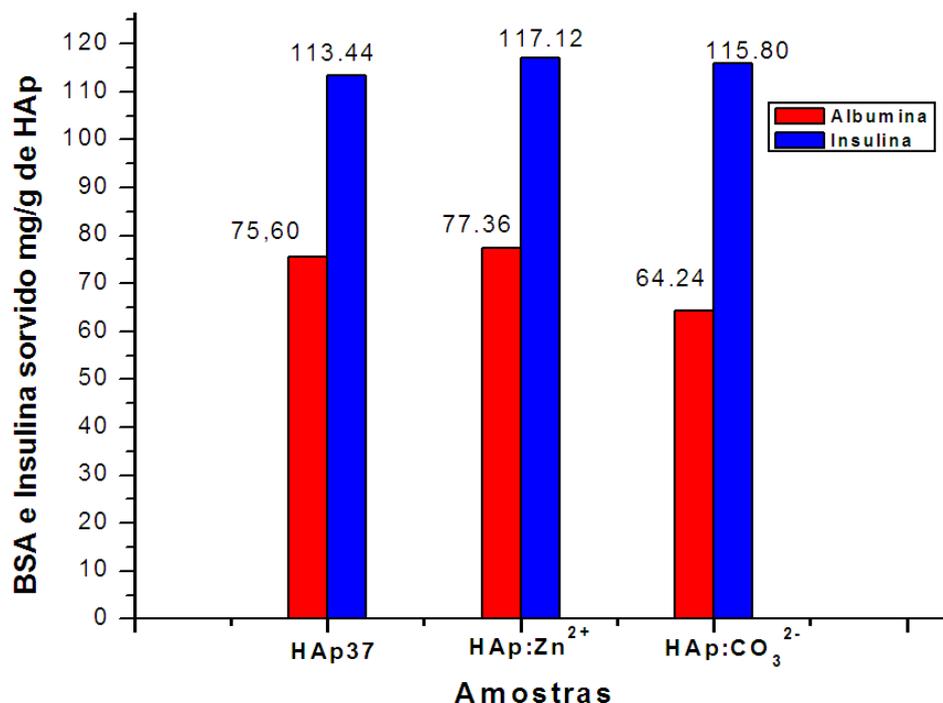


Figura 4.22: Adsorção da BSA e da insulina (24 horas) na HAp37, HAp:Zn²⁺ e HAp:CO₃²⁻ sintetizadas a 37°C em pH 7,4. Massa inicial de BSA e insulina na solução igual a 78,96 mg e 117,6 mg, respectivamente.

Nas três hidroxiapatitas estudadas, a insulina apresentou maior adsorção na HAp que a BSA., conforme mostra a **Figura 4.22**. A eficiência da adsorção não apresentou diferenças relevantes entre a HAp37, HAp:Zn²⁺ e HAp:CO₃²⁻ indicando que os sítios de adsorção da insulina não são afetados pela substituição do Ca²⁺ pelo Zn²⁺ e do PO₄³⁻ pelo CO₃²⁻.

As medidas de difração por raios X após a adsorção de albumina e insulina mostraram que a estrutura cristalina da HAp não é alterada pelo processo de adsorção das proteínas. O espectro de FTIR da HAp após a adsorção da albumina e da insulina são mostrados nas **Figura 4.23**. Na amostra HAp observa-se a banda devido água em 1645cm^{-1} . Pode-se verificar que nas amostras de HAp com albumina e insulina ocorre um deslocamento da banda para 1657cm^{-1} e 1651cm^{-1} respectivamente, além de um aumento de intensidade. Este efeito é devido à contribuição da banda do grupo Amida I da albumina e da insulina, respectivamente (MAVROPOULOS *et al.*, 2010 a e b). Este resultado indica que a proteína está ligada a superfície da HAp. A posição da banda da amida I é usada para monitorar as mudanças conformacionais em proteínas durante o

processo da adsorção (ROACH *et al.*, 2005), as quais poderiam afetar a atividade biológica da proteína. Uma interação forte com a superfície pode mudar a conformação da proteína levando ao um desnovelamento ou a desnaturação da proteína (LEE *et al.*, 1989). A proteína nativa albumina apresenta banda de amida I entre $1660-1650\text{cm}^{-1}$ (ZENG *et al.*, 1999). O deslocamento da banda da amida I para valores próximos a 1650cm^{-1} indica que a interação das proteínas com a superfície da hidroxiapatita produz uma mudança no estado conformacional da proteína (ROACH *et al.*, 2005). Brandes *et al.*, (2006) observaram por IR a influência da estrutura secundária de proteína BSA na adsorção na hidroxiapatita e estabeleceram que a região entre $1642-1660\text{cm}^{-1}$ corresponde a hélice α . O espectro de infravermelho da HAp:Zn²⁺ após a adsorção com BSA e insulina **Figura 4.24** mostram bandas em torno de: 1541cm^{-1} (Albumina) e 1526cm^{-1} (Insulina) indicando a presença da Amida II e a presença de bandas intensas em 1658cm^{-1} e 1651cm^{-1} respectivamente, indicando a presença da Amida I. (MAVROPOULOS *et al.*, 2010). A **Figura 4.25** mostra o aumento da intensidade da banda em 1653cm^{-1} associada a Amida I - na amostra HAp:CO₃²⁻, após a adsorção da albumina (BSA) e da insulina(INS) na superfície da HAp:CO₃²⁻.

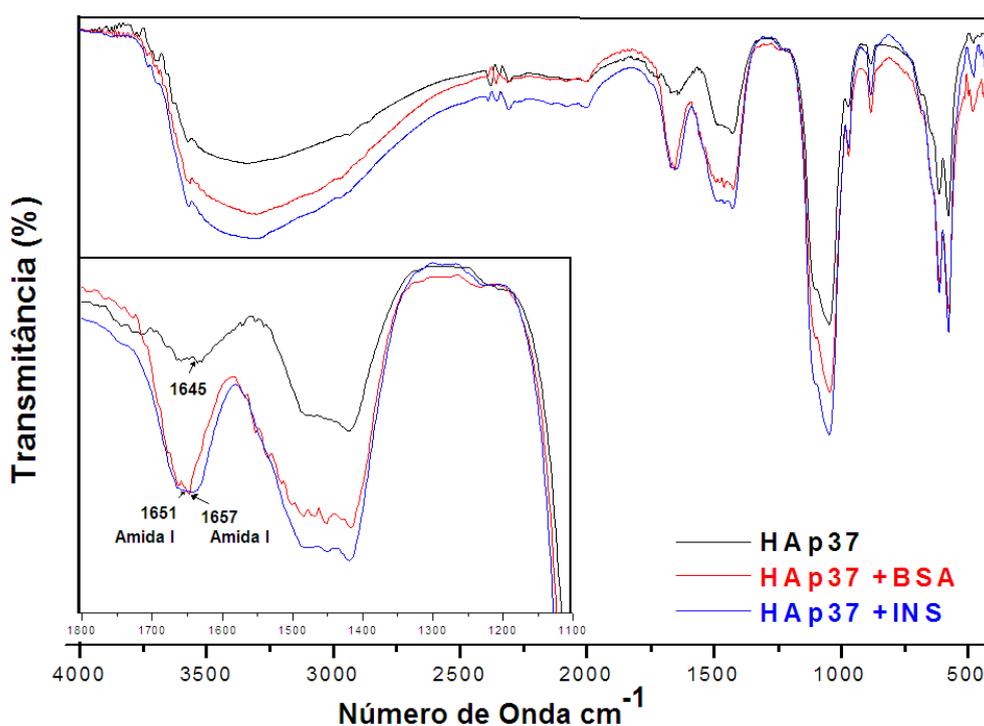


Figura 4.23: Espectro de infravermelho da HAp37, HAp37+BSA e HAp+INS.

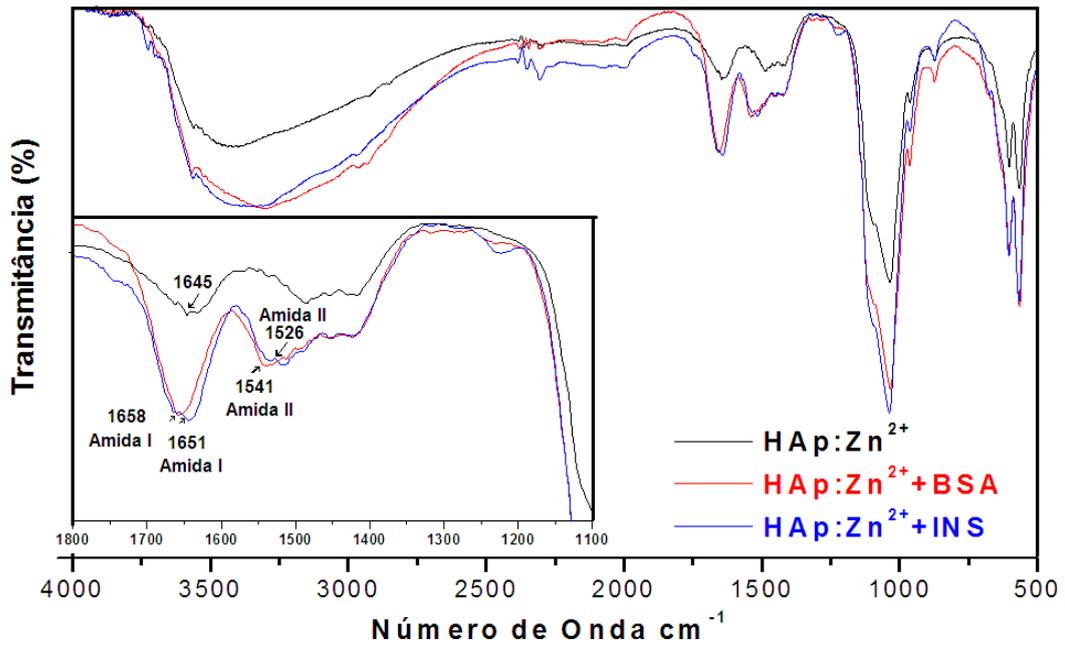


Figura 4.24: Espectro de Infravermelho da HAp:Zn²⁺, HAp:Zn²⁺+BSA e HAp:Zn²⁺+INS.

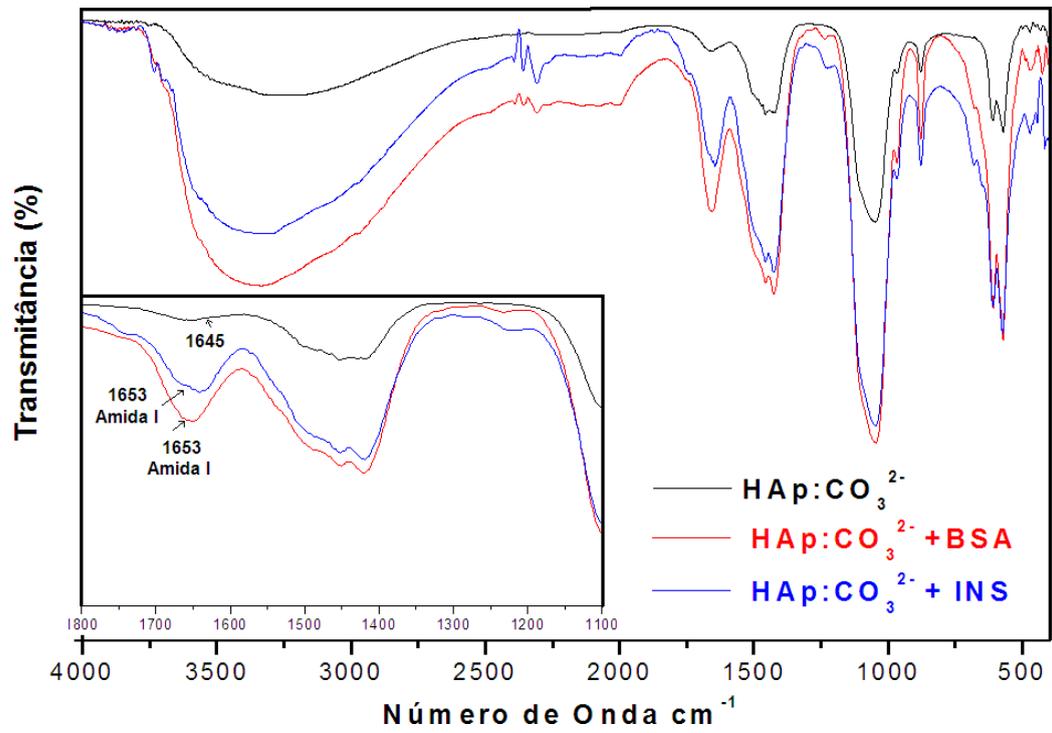


Figura 4.25: Espectro de Infravermelho da HAp:CO₃²⁻, HAp:CO₃²⁻+BSA, HAp:CO₃²⁻+INS.

4.4.2 Potencial Zeta da HAp37 Após a Adsorção da Albumina (BSA) e Insulina (INS)

A albumina (BSA) e a Insulina (INS) são proteínas ácidas adsorvidas pela HAp principalmente por meio da atração eletrostática entre os seus grupos COOH^- e os íons Ca^+ da superfície da HAp. A adsorção destas proteínas na superfície da HAp foram investigadas variando-se aspectos físicos e químicos do material tais como razão Ca/P, cristalinidade, substituições catiônicas divalentes, e conteúdo íons de carbonato na rede (ZHU *et al.*, 2006), (KANDORI *et al.*, 1995, 2000). Poucos artigos são encontrados na literatura sobre a adsorção da insulina.

Kandori *et al.*, (1995, 2007) realizaram estudos sobre adsorção da BSA em HAp. Mais recentemente (KANDORI *et al.*, 2010) os autores estudaram 5 amostras de hidroxiapatita sintetizadas por via ácida pela rota usual (BATCH) e usando um microreator. Determinaram o tamanho médio da partícula e sua forma são fatores determinantes na quantidade de proteína adsorvida pela HAp. A amostra sintetizada pela rota usual apresentou cristais pequenos com dimensões 12nm x 75nm, alta cristalinidade e razão Ca/P = 1,57, sugerindo forte deficiência em cálcio. As partículas sintetizadas no microreator apresentaram um tamanho de 2 a 4nm x 15 a 37nm, similar às dimensões da molécula BSA (4nm x 14nm). As razões Ca/P das hidroxiapatitas preparadas no microreator variaram de 1,57 a 1,69. A concentração de saturação da BSA na hidroxiapatita BATCH foi de 0,62mg/m² e diminuiu com o decréscimo do tamanho das partículas. Os autores atribuíram este comportamento a uma menor presença dos planos ac e bc nas faces das partículas menores. Estes planos possuem uma maior concentração de sítios dos íons Ca^{2+} na HAp que são os responsáveis pela ligação com os grupos COOH^- da albumina e como conseqüência a adsorção da proteína. Os valores do $P(\zeta)$ obtidos por Kandori *et al.*, (2010) para a albumina adsorvida na HAp foram negativos (os autores não divulgaram o pH da medida) como mostra a **Figura 4.26**.

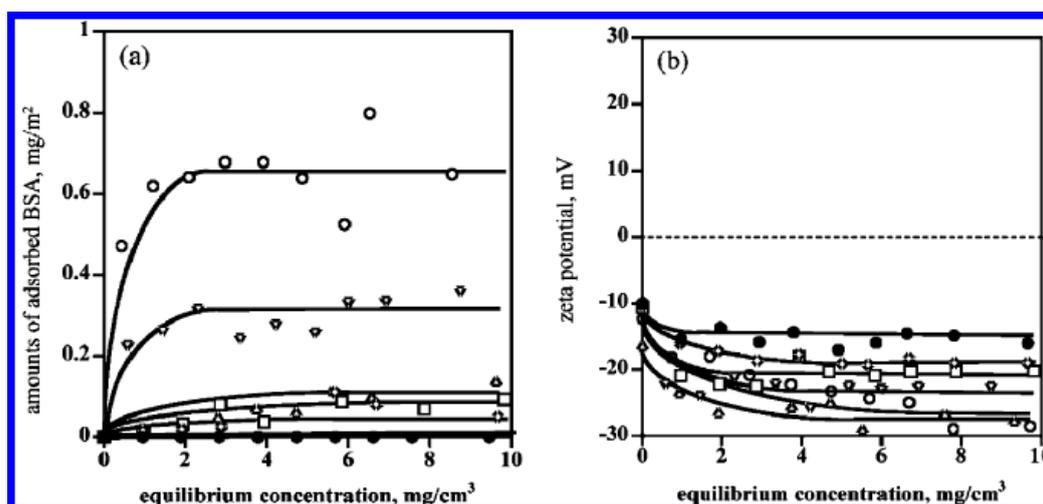


Figura 4.26: (a) Isotermas de adsorção da BSA e (b) Potencial zeta da HAp sintetizada pelo método de BATCH $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e microreator (O)Batch. Figura adaptada de KANDORI *et al.*, (2010).

A Figura 4.27 e Figura 4.28 apresenta os valores de potencial zeta da HAp em função do pH, após a adsorção da BSA e insulina. A adsorção da BSA na superfície da HAp não altera o $P(\zeta)$ para toda a faixa de pH investigada. Com isto, o ponto isoelétrico da superfície não sofre variação com a adsorção da BSA. Este comportamento do $P(\zeta)$ não é esperado, pois a BSA possui IEP igual a 4.9 e a concentração de proteína adsorvida na superfície da HAp37 seria suficiente para recobrir inteiramente a superfície das partículas de HAp. Nestas condições o $P(\zeta)$ da superfície deveria ser menos positivo que o da HAp em baixos pH e mais negativo que o da HAp em altos pH. Este comportamento do $P(\zeta)$ foi observado por Rezwan *et al.*, 2005 estudando a influência da BSA no $P(\zeta)$ da superfície de óxidos tais como alumina, sílica, titânia e zircônia. Uma explicação para esta aparente contradição com os resultados desta dissertação é assumir que a BSA não preencha todo o espaço da superfície, mas forme aglomerados globulares em regiões limitadas da superfície. Este arranjo da proteína tornaria o $P(\zeta)$ próximo do da HAp.

O comportamento do $P(\zeta)$ com o pH para a HAp com a insulina segue um padrão similar ao da HAp com albumina, mas com discreta diminuição nos valores de $P(\zeta)$ para toda faixa de pH. Este resultado indica que a insulina contribui para diminuir o $P(\zeta)$ da superfície da HAp, mesmo possuindo um IEP menor que o da albumina ($IEP_{\text{insulina}}=5.5$ e

IEP_{albumina} =4.9). A **Tabela 4.4** mostra os valores dos pontos isoelétricos da HAp37 antes e após da adsorção das proteínas albumina (BSA) e insulina (INS). Pode-se verificar que a HAp37 com a insulina possui um IEP similar que a da HAp37 com a albumina. Com isto, pode-se levantar a hipótese que esta proteína possui similar propriedade de aglomeração, na superfície da HAp com a BSA.

Tabela 4.4: Ponto isoelétrico, IEP e Tamanho médio dos aglomerados da amostra HAp37 antes e após da adsorção de albumina (BSA) e insulina (INS).

Amostras	*IEP	**Tamanho Médio Aglomerados
HAp37	7 ± 0,6	3,4 μm
HAp37+BSA	6,4 ± 0,5	2,6 μm
HAp37+INS	6,4 ± 0,4	3,2 μm

* Valores de IEP obtido por um ajuste da curva experimental com uma função polinomial de 3 ordem.

**Valores do tamanho médio aglomerados no anexo I.

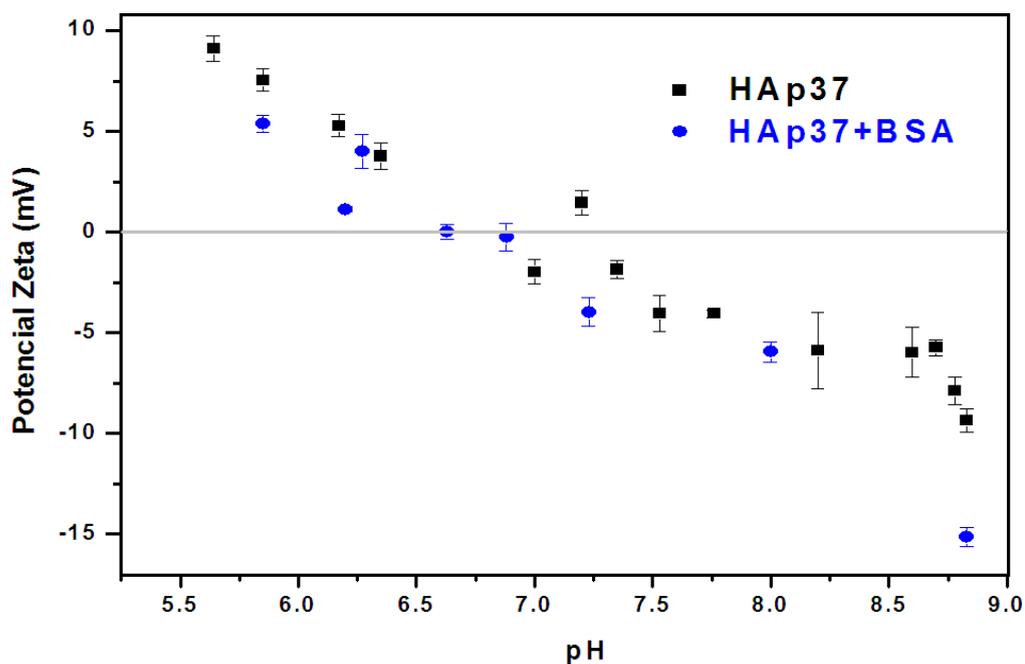


Figura 4.27: Potencial zeta da amostra de HAp37 com adsorção da albumina (BSA) em função do pH.

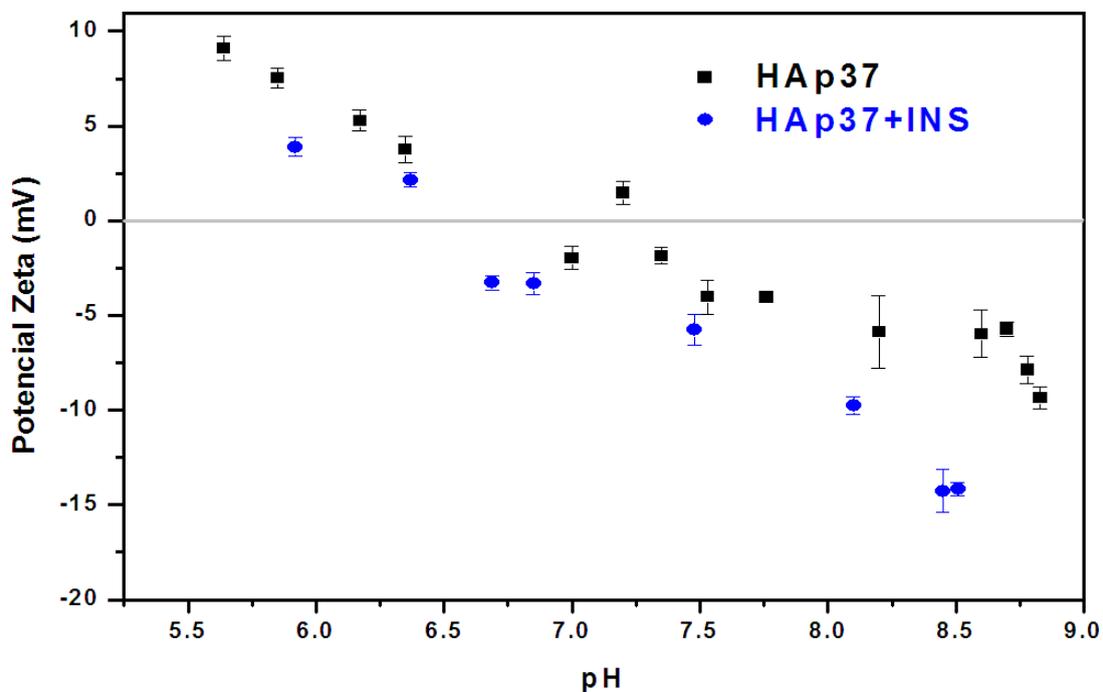


Figura 4.28: Potencial zeta da amostra de HAp37 com adsorção com Insulina (INS) em função do pH.

4.4.3 Potencial Zeta da HAp:CO₃²⁻ Após a Adsorção da Albumina (BSA) e Insulina (INS)

Durante a elaboração desta dissertação foi realizada uma pesquisa na literatura sobre trabalhos relacionados ao potencial zeta de hidroxiapatita carbonatada, após a adsorção de albumina e insulina. Não foram encontrados artigos sobre este tema o que mostra as lacunas ainda existentes na literatura sobre a caracterização da superfície da HAp carbonatada, após a adsorção de proteínas. A **Figura 4.29** e **Figura 4.30** mostra os valores do $P(\zeta)$ da amostra HAp:CO₃²⁻, após a adsorção de BSA e insulina em diferentes pH. A adsorção das duas proteínas induz uma pequena redução do $P(\zeta)$, principalmente para $pH < IEP$. Este efeito é mais pronunciado na albumina. Conforme mostra a **Tabela 4.5** o IEP da HAp:CO₃²⁻ diminuiu de $7,1 \pm 0,5$ para $6,7 \pm 0,5$, com a adsorção de insulina e para $6,4 \pm 0,4$ com a adsorção da albumina.

Este resultado é coerente com a contribuição do $P(\zeta)$ destas proteínas que é negativo em todo intervalo de pH investigado. Este resultado sugere que as proteínas também formam agregados na superfície da HAp:CO₃²⁻ tal como foi sugerido

anteriormente na interpretação do comportamento do $P(\zeta)$ na amostra HAp37 contendo BSA ou insulina. A albumina é a proteína que mais afeta o $P(\zeta)$ da hidroxiapatita carbonatada.

Tabela 4.5: Ponto isoelétrico (IEP) e Tamanho médio dos aglomerados da amostra HAp:CO₃²⁻ antes e após da adsorção de albumina (BSA) e insulina (INS).

Amostras	IEP	Tamanho Médio Aglomerados
HAp:CO ₃ ²⁻	7,1 ± 0,5	3,3 μm
HAp:CO ₃ ²⁻ +BSA	6,4 ± 0,4	2,4 μm
HAp:CO ₃ ²⁻ +INS	6,7 ± 0,5	3,2 μm

* Valores de IEP obtido por um ajuste da curva experimental com uma função polinomial de 3 ordem.

**Valores do tamanho médio aglomerados no anexo I.

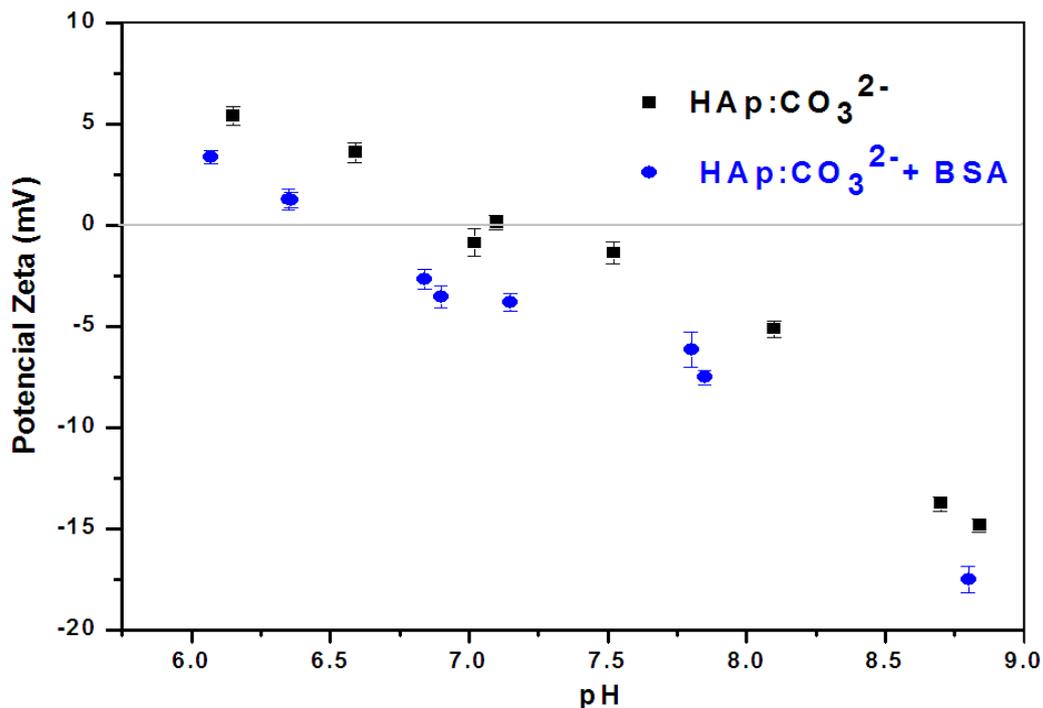


Figura 4.29: Potencial zeta da amostra de HAp:CO₃²⁻ com adsorção da albumina (BSA) em função do pH.

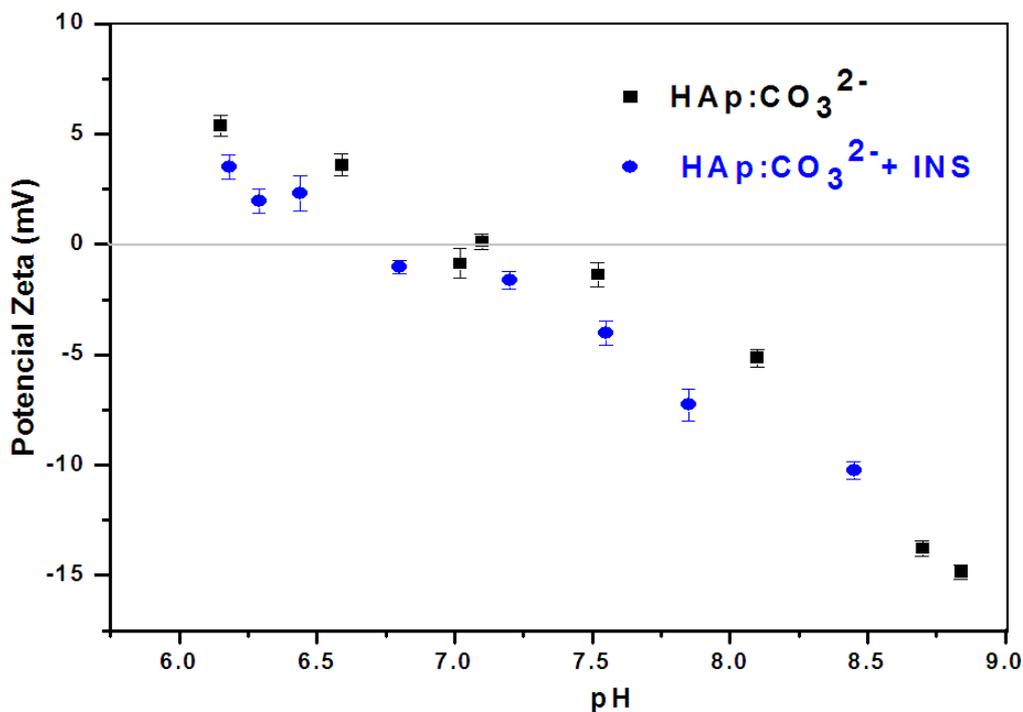


Figura 4.30: Potencial zeta da amostra de HAp:CO₃²⁻ com adsorção da Insulina (INS) em função do pH.

4.4.4 Potencial Zeta da (HAp:Zn²⁺) Após a Adsorção da Albumina (BSA) e Insulina (INS).

Também não foram encontrados artigos na literatura sobre o potencial zeta de hidroxiapatitas substituídas com zinco, após a adsorção com albumina e insulina.

Neste trabalho verificou-se que o potencial zeta da HAp:Zn²⁺, após a adsorção da albumina e da insulina apresentou uma grande mudança em relação ao P(ζ) do material antes da adsorção desta proteínas, conforme mostra a **Figura 4.31**. O P(ζ) assume valores negativos, mesmo para pH muito baixos. Isto demonstra a grande influência das proteínas nos os valores do P(ζ) da superfície da HAp:Zn²⁺. Como mostra a **Tabela 4.6** o IEP das amostras, após a adsorção fica abaixo de 5.5. Levando-se em conta que i) a concentração de proteína adsorvida pela HAp:Zn²⁺ foi similar à adsorvida pela HAp37 e ii) o que o P(ζ) da HAp37, após a adsorção da BSA e da insulina não sofreu alterações relevantes pode-se concluir que o zinco modificou fortemente a distribuição espacial das proteínas na superfície da hidroxiapatita. Esta mudança foi no sentido das proteínas ocuparem toda a superfície, envolvendo completamente as partículas de HAp:Zn²⁺.

Uma das hipóteses para esta mudança de distribuição das proteínas na superfície da HAp:Zn²⁺ poderia estar ligada à forte interação do Zn²⁺ situado na superfície da HAp com a proteína levando a uma distorção da sua estrutura secundária. Isto ocorreria devido ao rompimento de ligações laterais entre as cadeias das proteínas alterando sua carga total ou aumento de anions adsorvidos na superfície do material devido a essa nova conformação. Resultados obtidos por análises de dicroísmo circular (não apresentados nesta dissertação) nas mesmas amostras, após a adsorção, confirmam que a presença do zinco induz uma forte mudança no estado conformacional da BSA e da insulina e provavelmente a sua desnaturação. O passagem da proteína de uma configuração globular para desnaturada poderia explicar o aumento de área ocupada pela proteína, na superfície da HAp.

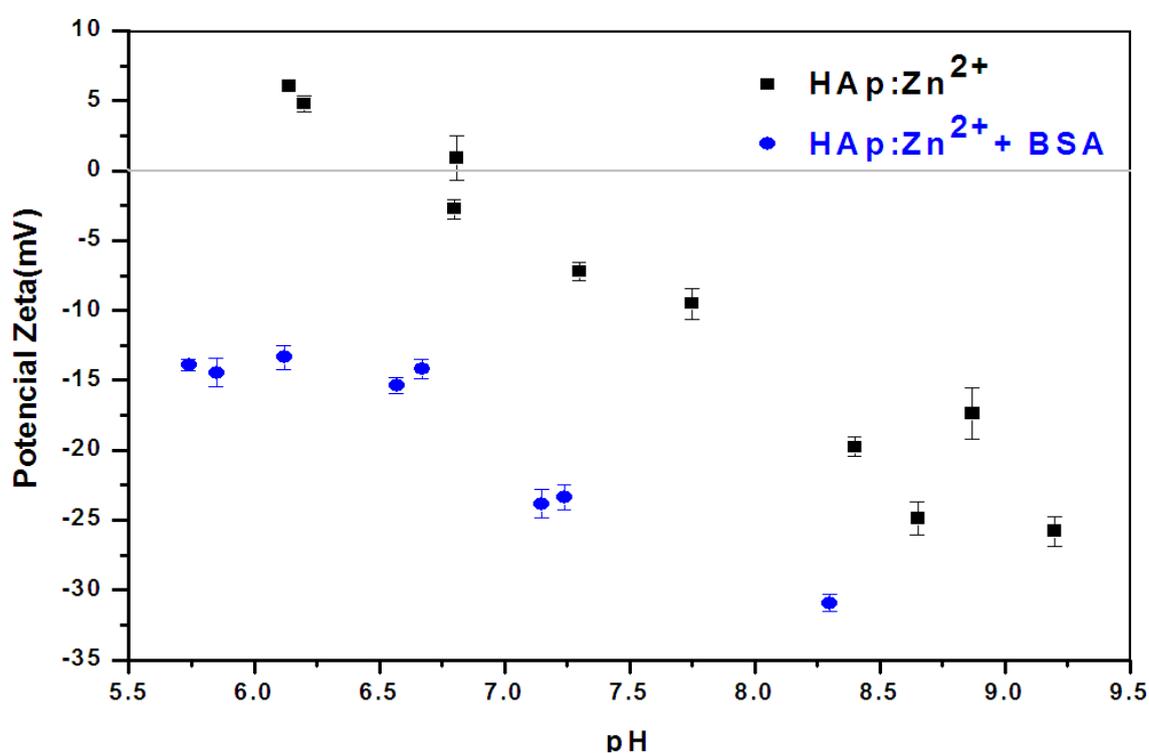


Figura 4.31: Potencial zeta da HAp:Zn²⁺ com adsorção da albumina (BSA) em função do pH.

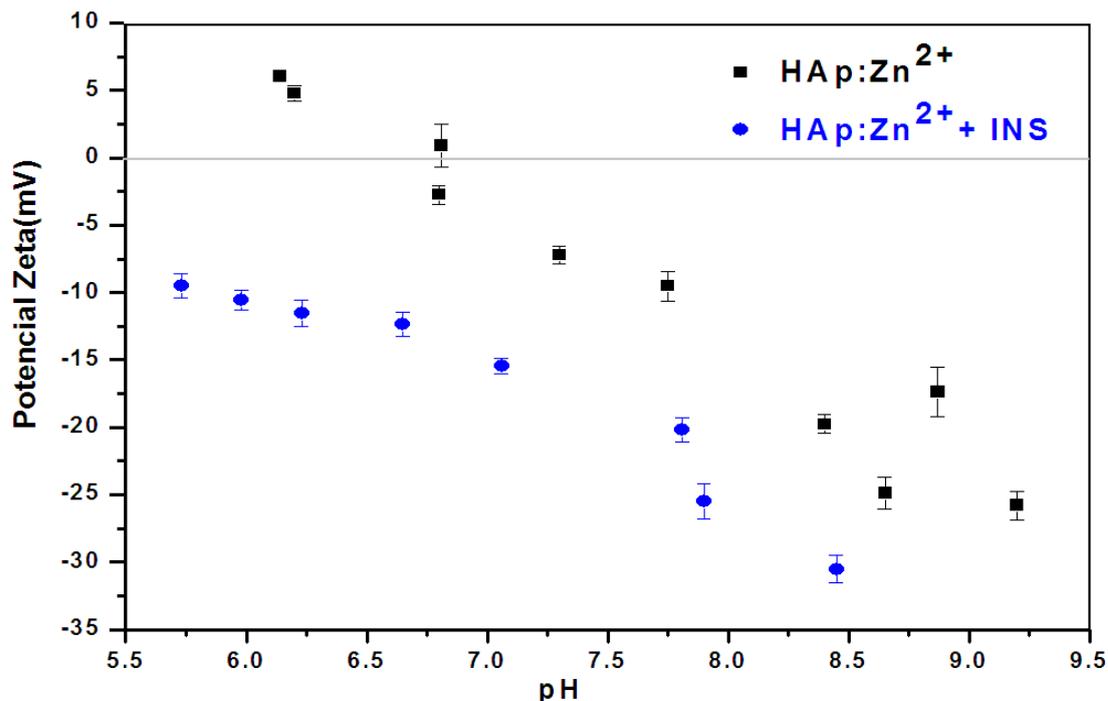


Figura 4.32: Potencial zeta da amostra da HAp:Zn²⁺ com adsorção da Insulina (INS) em função do pH.

Tabela 4.6: Ponto isoelétrico (IEP) e Tamanho médio dos aglomerados da amostra HAp:Zn²⁺ antes e após da adsorção de albumina(BSA) e insulina(INS).

Amostras	*IEP	**Tamanho Médio Aglomerados
HAp:Zn ⁺²	6.6 ± 0,6	1,9 μm
HAp:Zn ⁺² +BSA	----	1,3 μm
HAp:Zn ⁺² +INS	----	1,8 μm

* Valores de IEP obtido por um ajuste da curva experimental com uma função polinomial de 3 ordem.

**Valores do tamanho médio aglomerados no anexo I.

Capítulo 5

Conclusões

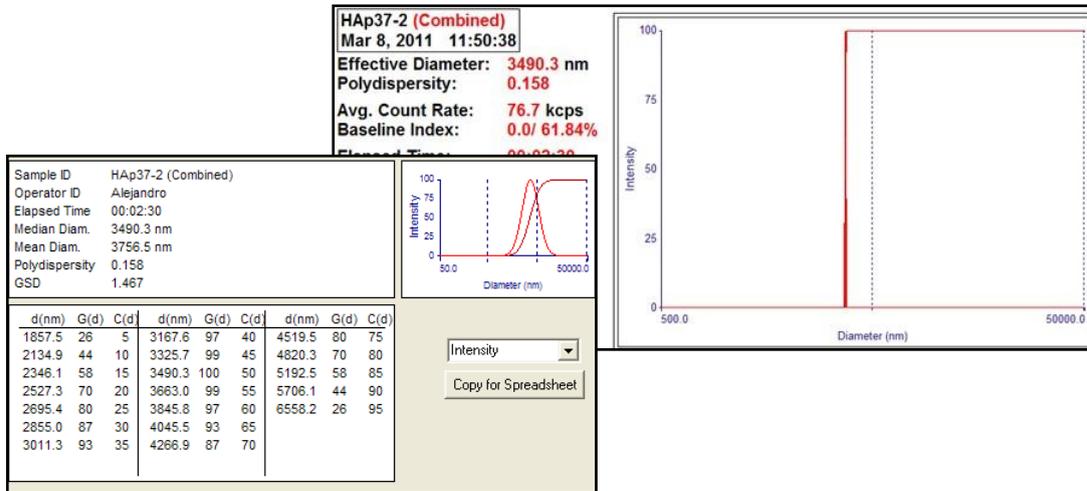
1. Amostras de hidroxiapatita com estequiometrias próximas a razão Ca/P de 1,67, mas com cristalinidade diferentes apresentaram um comportamento similar do potencial zeta em pH menores que o ponto isoelétrico. Para $P(\zeta) > IEP$ a amostra menos cristalina apresentou uma dupla camada na superfície mais negativa. Comparando-se os resultados deste trabalho com os da literatura observou-se grande variabilidade do comportamento do $P(\zeta)$ com o pH em diferentes amostras de HAp. Isto pode ser explicado pelas variações na estrutura e superfície das HAp quando sintetizadas em diferentes condições.
2. A substituição aniônica do PO_4^{3-} pelo CO_3^{2-} não afetou os valores do $P(\zeta)$ no intervalo de pH analisado. O mesmo comportamento foi observado na amostra com substituição catiônica do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} em $pH < IEP$. Para valores $pH > IEP$ o $P(\zeta)$ da HAp substituída com Zn^{2+} apresenta valores menores de $P(\zeta)$ que a da amostra não substituída, devido as características covalentes do zinco. Este resultado indica que em $pH > IEP$ a carga da dupla camada da superfície da HAp é fortemente dependente do sitio catiônico.

3. Os sítios do Ca^{2+} são os grandes responsáveis pela variação da carga da dupla camada da superfície (altos pHs) quando ocorrem mudanças na cristalinidade da HAp e nas substituições do Ca^{2+} pelo Zn^{2+} . Estas mudanças na estrutura da HAp pouco afetaram os valores do $P(\zeta)$ em baixos pHs porque as interações ocorrem predominantemente nos sítios do PO_4^{3-} e do OH^- . Os resultados sugerem que os sítios do Ca^{2+} são mais sensíveis às variações de estrutura da HAp que os sítios do PO_4^{3-} e do OH^- .

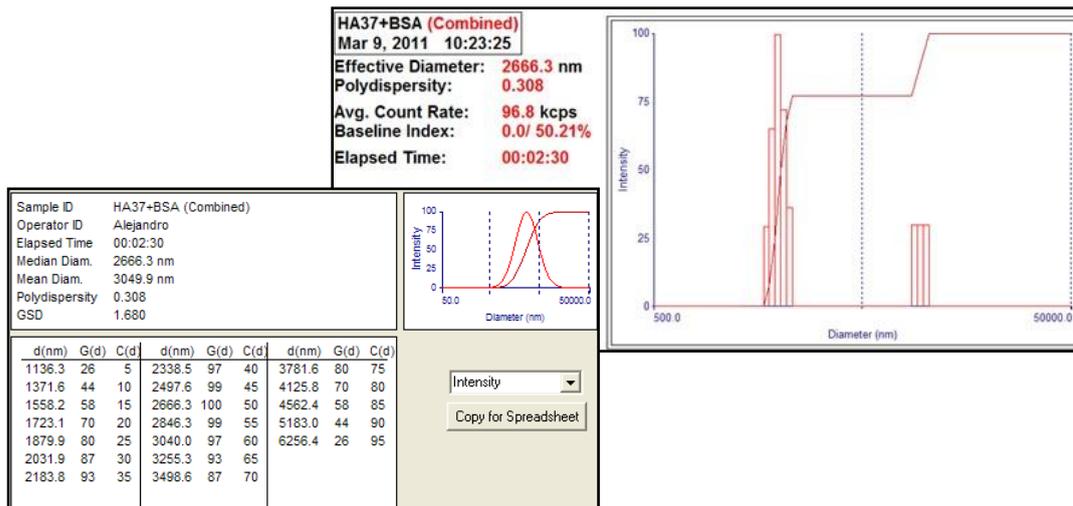
4. A adsorção da albumina e da insulina produziu pequenos decréscimos no $P(\zeta)$ da HAp e da HAp:HAp: CO_3^{2-} . Este comportamento pode ser atribuído à agregação das proteínas na superfície da HAp. Entretanto, a substituição do Zn^{2+} na estrutura da HAp produz fortes diminuições dos valores do $P(\zeta)$ em todo o intervalo de pH estudado. A contribuição da carga negativa da proteína é evidenciada quando o cálcio é substituído pelo zinco. Este efeito pode ser devido a uma mudança de conformação da proteína causada pela forte interação com o zinco na superfície da HAp. A hipótese sugerida neste trabalho é que esta mudança de conformação induz o desnovelamento da proteína e uma maior ocupação de área no biomaterial, causando uma diminuição do $P(\zeta)$.

ANEXO I

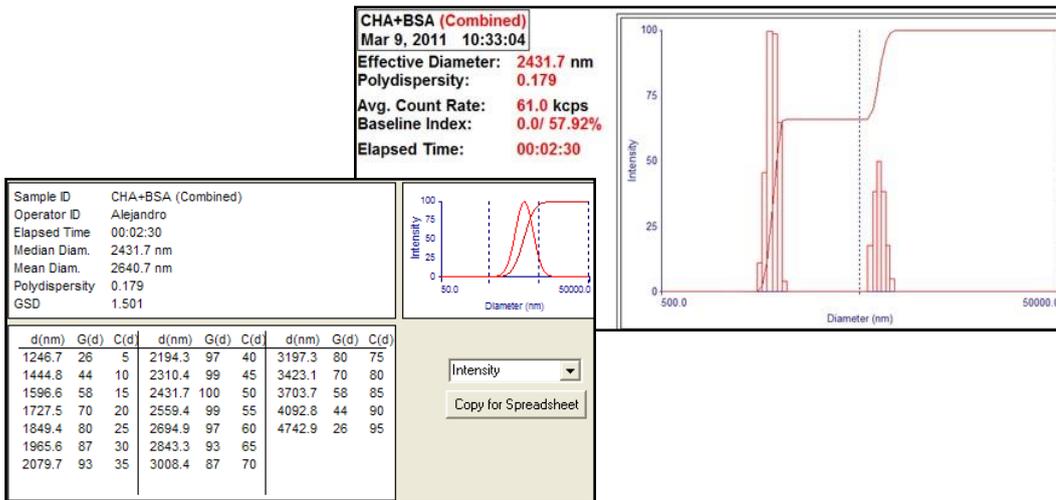
1. Tamanho médio de partícula da HAp37 e HAp37 + BSA e HAp37 + INS



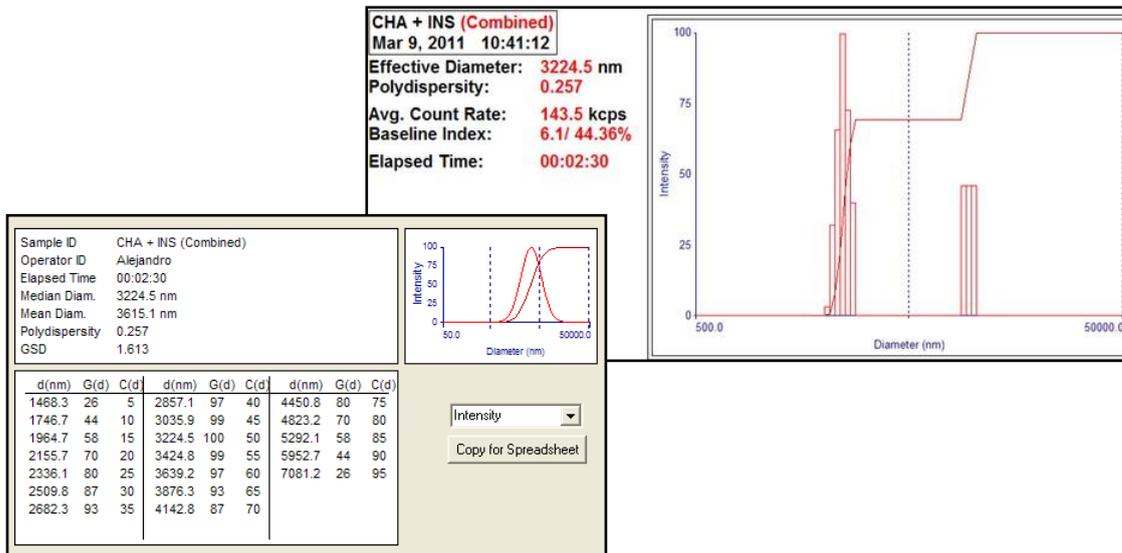
Medida do tamanho dos aglomerados da HAp37



Medida do tamanho dos aglomerados da HAp37 + BSA

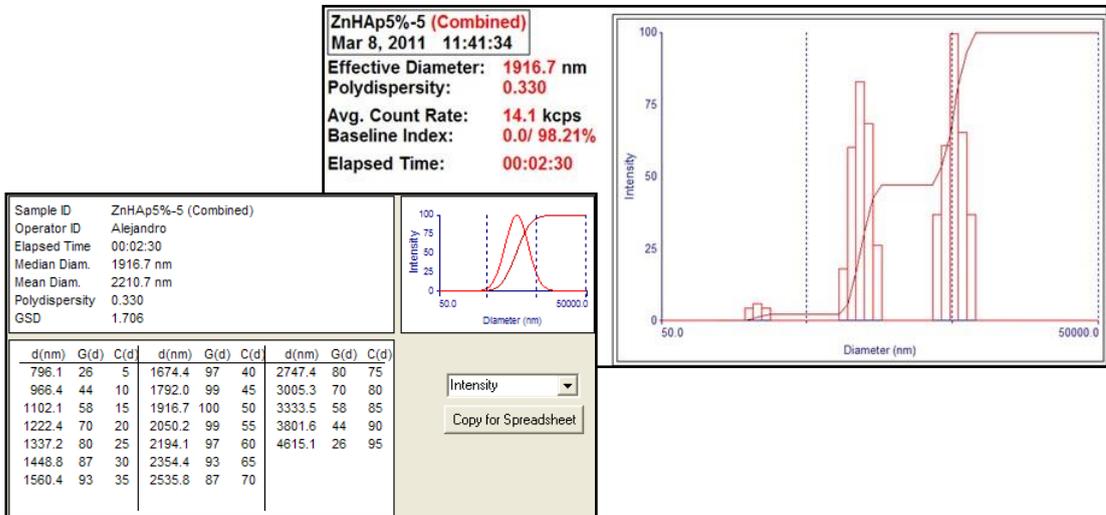


Medida do tamanho dos aglomerados da HAp:CO₃²⁻+BSA

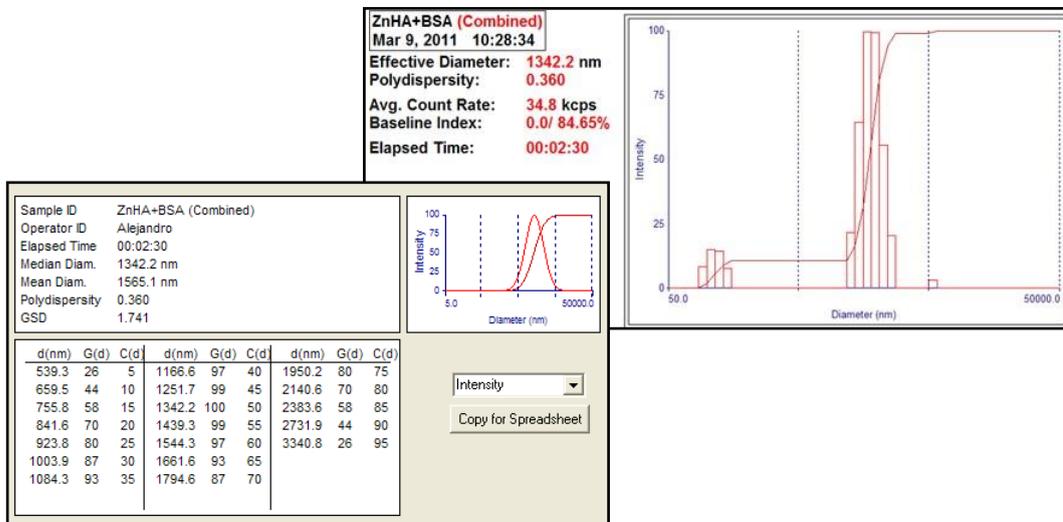


Medida do tamanho dos aglomerados da HAp:CO₃²⁻+ INS

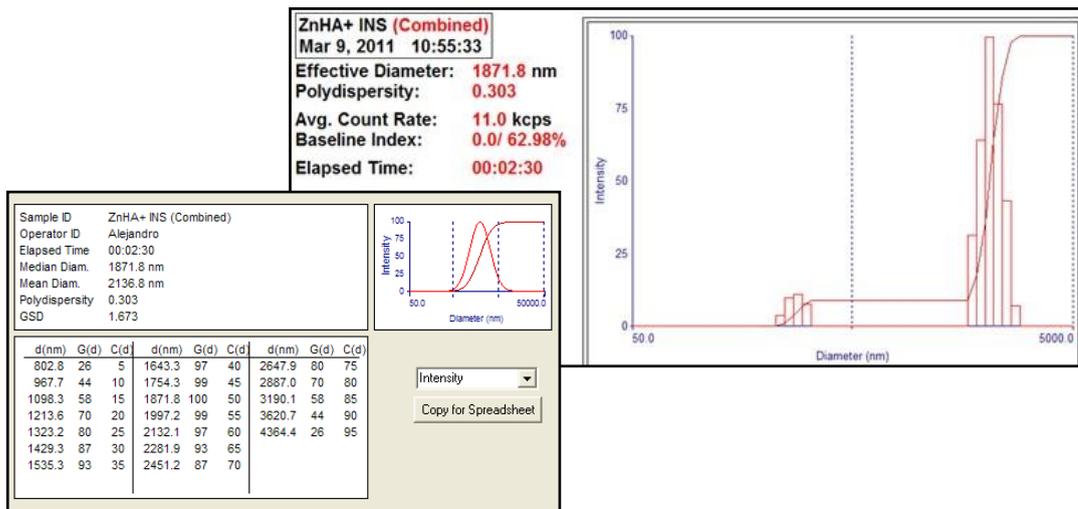
1. Tamanho médio de partícula da HAp:Zn²⁺, HAp:Zn²⁺ + BSA e HAp:Zn²⁺ + INS



Medida do tamanho dos aglomerados da HAp:Zn²⁺



Medida do tamanho dos aglomerados da HAp:Zn²⁺ + BSA



Medida do tamanho dos aglomerados da HAp:Zn²⁺ + INS

Capítulo 6

Referencias Bibliográficas

- ARENDS J., SCHUTHOF J., CHRISTOFFERSEN J., “Inhibition of enamel demineralization by albumin in vitro”., *Caries Res* 1986; 20: 337-340.
- AVEBURYBOOKS, <http://aveburybooks.com/faraday/catalog.html>.
- BARRALET, J., ALDRED S., WRIGHT A., COOMBES A., “In vitro behavior of albumin-loaded carbonate hydroxyapatite gel”, *J Biomed Mater Res* 60, 360–367, (2002).
- BECERRA H., RIZZO L., YU M., FREITAS D., “Utilização da albumina na citologia esfoliativa em pacientes com conjuntivite alérgica”, *Arq Bras Oftalmol* 2003;66:854-8.
- BECKER R., JOSEPH A., SPADARO and EDWARD W., “The Trace Elements of Human Bone”, *J Bone Joint Surg Am.* 1968; 50:326-334.
- BELÉM S. GONÇALVES “Extração, Purificação e Estudos sobre a Formação de Filmes Monomoleculares da Hialuronidase Bovina”, *Tese Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE* 2007.
- BHOWMIK D., CHIRANJIB K. SAMPATH K., “A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic Disease”, *Int J Pharm Biomed Sci* 2010.

- BIGI A., FORESTI E., GANDOLFI M., “Inhibiting effect of Zinc on hydroxyapatite crystallization”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 58, pp. 49-58, 1995.
- BRANDES N., WELZEL P., WERNER C., and KROH L., “Adsorption induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis”, *J Colloid Interface Sci*, 299 (2006), pp. 56–69.
- BROWN W., MATHEW M., Tung M., “The crystal Chemistry of octocalcium phosphate”, *Prog.Cryst. Growth Charact.* 1981; 4:59-73. Rang M. *The story of orthopaedics. Philadelphia: Saunders; 2000.*
- BUDDY D. Ratner “An Introduction to Materials in Medicine 2nd Edition”, pag162.
- BURCU C., YAVUZ G., NURAY Y., ZEKI A., AYLÄ C., “Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles”, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 322 (2008) 29–33.
- CAMPBELL A., “Bioceramics for implant coatings”, *Mater. Today Volume 6, Issue 11, November 2003, Pages 26-30.*
- CARTER D.C. and HO, J., “Structure of Serum-Albumin”, *Advances in Protein Chemistry, Vol 45, 1994.45: p.153-203.*
- CASTRO A., PANDOLFELLI V., “Revisão: Conceitos de dispersão e empacotamento de partículas para a produção de concretos especiais aplicados na construção civil”, *Cerâmica [online]. 2009, vol.55, n.333, pp. 18-32.*
- COSTA, A.M., “Preparo e caracterização de fosfatos de cálcio dopados com zinco para aplicações médico-odontológicas”. *Dissertação de M.Sc., PEMM / COPPE / UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.*
- DOI Y., KODA N. WAKAMATSU T., GOTO H., KAMEMIZU Y., MORIWAKI M., ADACHI and SUWA Y., “Influence of Carbonate on Sintering of Apatites”, *J. Dent. Res.* 72 (1993) 1279.
- EIJI F., MIZUKI O., KANJI T., SATOSHI H., AKIYOSHI O., KOJI K., CHRISTIAN B., FLORENCE B., “Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite”, *Acta Biomaterialia* 2 (2006) 69–74.
- ELLIOT JC., “Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates” vol. 18. *Elsevier; 1994.*

- EL FEKI H., SAVARIAULT J., BEN A., JEMAL M., "Sodium and carbonate distribution in substituted calcium hydroxyapatite", *Solid State Sci* 2000;2:577–86.
- FARINA C., "Cromatografia IMAC: estudos de adsorção de glucagon e insulina em sílica-IDA-Me²⁺", Dissertação de mestrado Universidade Estadual de Campinas Engenharia Química 2001.
- FLEET M., LIU X., "Local structure of channel ions in carbonate apatite", *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 7548-7554, 2005.
- GORBUNOFF M., TIMASHEFF S., "The Interaction of Proteins with Hydroxyapatite III Mechanism"; *Analytical Biochemistry*, v. 136, pp. 440-445. 1984.
- HAYAKAWA S., ANDO K., TSURU K. and OSAKA A., "Structural Characterization and Protein Adsorption Property of Hydroxyapatite Particles Modified With Zinc Ions", *J. Am. Ceram. Soc.*, 90 [2] 565–569 (2007).
- HERRERA A., MARCUS, LIA V., MÁRCIO L. "Estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e CO₃²⁻ na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP)" *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 4, 892-896, 2007.
- HIROYUKI Ohshima "Theory of Colloid and Interfacial Electric Phenomena"; 2006.
- HOTZA D., "ARTIGO REVISÃO: Colagem de Folhas Cerâmicas", *Cerâmica vol.43 no.283-284 São Paulo Sept./Oct./Nov./Dec. 1997.*
- HOU C., SHENG-MOU H., YU-SHENG H., JINN L., HSI-CHIN W., FENG-HUEI., "The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy" *Biomaterials* 30 (2009) 3956–3960.
- HUGHES T., RACHEL C. and GRAHAM E., "Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite", *Biomaterials* 16 (1995) 697-702.
- IVANOVA T., FRANK-KAMENETSKAYA O., KOL'TSOV A., and UGOLKOV V., "Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition", *Journal of Solid State Chemistry* 160, 340-349 (2001).
- JEVTIC M., MITRIC M., SKAPIN S., JANCAR B., IGNJATOVIC N. and USKOKOVIC D., "Crystal Structure of Hydroxyapatite Nanorods Synthesized by Sonochemical Homogeneous Precipitation", *growth & design* 2008 vol. 8, no. 7 2217–2222.

- JIM W. Goodwin., “Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers An Introduction” 2da Edition (2009).
- KANDORI K., TAKASHI S., AKEMI Y., TATSUO S., “Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite: influence of particle texture”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5 (1995) 81- 87.
- KANDORI K., MIWA S., TARO T., AKEMI Y., and TATSUO I. “Adsorption of Bovine Serum Albumin on Synthetic Carbonate Calcium Hydroxyapatite”, *Journal of Colloid and Interface Science* 174, 124-129 (1995).
- KANDORI K., MEGUMI M., AKEMI Y., and TATSUO I. “Competitive and Cooperative Adsorptions of Bovine Serum Albumin and Lysozyme to Synthetic Calcium Hydroxyapatites” *Langmuir*, 2000, 16 (5), pp 2301–2305.
- KANDORI K., SHINTARO T., HIDEKAZU T., TATSUO I. “Protein adsorption characteristics of calcium hydroxyapatites modified with pyrophosphoric acids”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58 (2007) 98–104.
- KANDORI K., TOMOHIKO K., SHIGENORI T., and ERIKA K., “Preparation of Calcium Hydroxyapatite Nanoparticles Using Microreactor and Their Characteristics of Protein Adsorption”, *J. Phys. Chem. B* 2011, 115, 653–659.
- KASEMO, B., “Biological surface science”, *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 3, 451-459.
- KAWACHI E., BERTRAN C., REIS R., Alves O., “Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar”. *Quimica Nova*, v.23, p. 518-522, 2000.
- KOVALEVA E., SHABANOV M., PUTLAYEV V., FILIPPOV Y., TRETYAKOV Y., IVANOV V., “Carbonated Hydroxyapatite Nanopowders for Preparation of Bioresorbable Materials”, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 2008, 39, No. 11.
- KOUTSOPOULOS S., “Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods”, *Journal of Biomedical Materials Research* Volume 62, Issue 4, pages 600–612, 15 December 2002.
- KRISANAPIBOON A., Buranapanitkit B., Oungbho K., “Biocompatibility of hydroxyapatite composite as a local drug delivery system”, *Journal of Orthopaedic Surgery* 2006;14(3):315-8.

- KYRIAKI S., NIKOS S., “Surface Characterization of Hydroxyapatite: Potentiometric Titrations Coupled With Solubility Measurements”, *Journal of Colloid and Interface Science* 308 (2007) 405-412.
- LANDI E., CELOTTI G., LOGROSCINO G., TAMPIERI A., “Carbonated hydroxyapatite as bone substitute”, *Journal of the European Ceramic Society* 23 (2003) 2931–2937.
- LEE C., BELTFORT G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 8392-8396.
- LI C., GUOCHANG L., SHUGUANG L., JIAHAI B., AIJUAN Z., “Spherical hydroxyapatite with colloidal stability prepared in aqueous solutions containing polymer/surfactant pair”, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 366 (2010) 27–33.
- LIU D., KEITH S., and MATTHEW Z., “Microstructural Engineering of Hydroxyapatite, Membranes to Enhance Proton Conductivity”, *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 3941–3947.
- LIU Z., SHENG-LI T., ZHONG-LI A., “Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells”, *World J Gastroenterol* 2003; 9(9):1968-1971 *World Journal of Gastroenterology*.
- MALZAC A., “Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso em ortopedia”, Dissertação de doutorado da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2008.
- MAVROPOULOS E., NILCE C., COSTA M., ROCHA M., MELLO A. and ROSSI A. “Insulin Adsorption by Hydroxyapatite”, *Key Engineering Materials Vols. 396-398 (2010) pp 65-68*.
- MAVROPOULOS E., KEDE M., ROCHA N., COSTA A., TOSI A., PRADO DA SILVA M., and ROSSI A., “BSA Attachment on Apatite Surface Modified with Zn²⁺ and Sr²⁺”, *Bioceramics Development and Applications Vol. 1 (2010)*.
- MIYAJI F., KONO Y., SUYAMA Y., “Formation and structure of zinc substituted calcium hydroxyapatite”, *Materials Research Bulletin*, vol. 40, no. 2, pp. 209-220, 2005.
- MURAKAMI S., HOSONO T., JEYADEVAN B., KAMITAKAHARA and IOKU K., “Hydrothermal Synthesis of magnetite/hydroxyapatite composite material for hyperthermia therapy for bone cancer”, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 116 [9] 950-954 2008.

- PASHLEY, R., KARAMAN, M., "Applied Colloid and Surface Chemistry 2004".
- REYNOLDS E., RILEY P., STOREY E., "Phosphoprotein inhibition of hydroxyapatite dissolution". *Calcif Tissue Res* 1982; 34: 552-556.
- REZWAN K., STUDART A., VOROS J., and GAUCKLER L., "Change of ζ Potential of Biocompatible Colloidal Oxide Particles upon Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme", *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 14469-14474.
- ROACH P., FARRAR D., PERRY C., *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 8168-8173.
- RODRIGUEZ, L., VALLETI-REGI M., "Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites", *Matter. Chem.*, vol. 12, pp 2460-2465, 2000.
- ROVERI N., FORESTI E., LELLI M., LESCI I. and MARCHETTI M., "Microscopic investigations of Synthetic Biomimetic Hydroxyapatite", <http://www.formatex.info/microscopy4/1868-1879.pdf>.
- SANTOS T. de Araujo Batista, "Desenvolvimento de nanomateriais absorvedores no ultravioleta para aplicação em filtros solares", *Teses de Doutorado 2010 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE*.
- SERRO A., FERNANDES A., SARAMAGO B., LIMA J., BARBOSA M., "Apatite deposition on titanium surfaces: The role of albumin adsorption". *Biomaterials* 1997;18:963-968.
- SHAW, D., "Introduction to colloid and surface chemistry". 4. ed. 1992.
- SHAFEI E., PHILIP C., MOUSSA N., "Fractal analysis of hydroxyapatite from nitrogen isotherms", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 27, 2004.
- SOGO Y., ITO A., FUKASAWA K., "Zinc-containing calcium phosphate ceramics with a (Ca+Zn)/P molar ratio a 1.67", *Key Engineering Materials*, Vols. 284-286.
- SOPYAN I., SINGH R., HAMDY M., "Synthesis of nano hydroxyapatite powder using sol-gel technique and its conversion to dense and porous bodies", *Indian Journal of Chemistry*, Vol. 74A, 2008, pp.1626-1631.
- TANG Y, HELEN F., MARTIN T., RICHARD J., YOUNG J., "Zinc incorporation into hydroxylapatite", *Biomaterials* 30 (2009) 2864-2872.
- TAKASHIMA S., KUSUDO Y., TAKEMOTO S., TSURU K., HAYAWAKA S., OSAKA A., "Synthesis of carbonate-hydroxy apatite and selective adsorption activity against specific pathogenic substance". *Bioceramic* 2002; 14:175-8.

- THAMARAISELVI T., PRABAKARAN K. and RAJESWARI S., "Synthesis of Hydroxyapatite that Mimic Bone Minerology", *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol 19(2), pp 81-83 (2006).
- THARWAT F., *Applied Surfactants Principles and Applications* 2005.
- TIAN T., DONGLIANG J., JINGXIAN Z., QINGLING L., "Aqueous tape casting process for hydroxyapatite", *Journal of the European Ceramic Society* 27 (2007).
- TUTORVISTA, www.tutorvista.com/content/sciencie/sciencie-i/matter-around-pure/types-solutions.php#top.
- TSUCHIDA T., JUN K., TETSUYA Y., SHUJI S., TATSUYA T., WATARU U., "Reaction of ethanol over hydroxyapatite affected by Ca/P ratio of catalyst", *Journal of Catalysis* 259 (2008) 183–189.
- VASCONCELOS C., "Obtenção de dispersões de complexos polielétricos à base de quitosana e poli(ácidos metacrílico) e análise de adsorção de albumina bovina sérica", *Teses de Doutorado-Universidade Federal Rio Grande do Norte Engenharia Química-2007*
- VÁZQUEZ F., MENDOZA-BARRERA C., ALTUZAR V., MELÉNDEZ-LIRA M., SANTANA-ARANDA M., OLVERA M., "Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles and their application in protein adsorption", *Materials Science and Engineering B* 174 (2010) 290–295.
- VUČINIĆ D., RADULOVIĆ D., DEUŠIĆ S., "Electrokinetic properties of hydroxyapatite under flotation conditions", *Journal of Colloid and Interface Science* 343 (2010) 239–245
- YIN G., ZHENG L., JIN Z., FUXIN D., NAIJU Y., "Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite", *Chemical Engineering Journal* 87 (2002) 181-186.
- ZENG H., CHITTUR K., LACEFIELD W., *Biomaterials* 20 (1999) 377-384.
- ZHANG J., MASAHIKO M., NORIKO K., MOTOHIRO H., HAJIME O., DONGLIANG J., MIKIO I., "Aqueous processing of hydroxyapatite" *Materials Chemistry and Physics* 99 (2006) 398–404.
- ZHOU W., WANG M., CHEUNG W., GUO B., JIA D., "Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanospheres through nanoemulsion", *J Mater Sci: Mater Med* (2008) 19:103–110.

- ZHU X., HONGSONG F., DONGXIAO L., YUMEI X., XINGDONG Z., “Protein Adsorption and Zeta Potentials of a Biphasic Calcium Phosphate Ceramic Under Various Conditions”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* Volume 82B, Issue 1(2006).