



**DANIELLA DIAS PALOMBINO DE CAMPOS**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO EM CRISTAIS  
LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS**

**CAMPINAS**

**2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DANIELLA DIAS PALOMBINO DE CAMPOS**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO EM  
CRISTAIS LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. CELSO APARECIDO BERTRAN**

**TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP PARA A OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR DANIELLA  
DIAS PALOMBINO DE CAMPOS E ORIENTADA PELO PROF. DR. CELSO APARECIDO  
BERTRAN.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS**

**2012**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144  
- BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

C157s Campos, Daniella Dias Palombino de (1979-).  
Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em  
cristais líquidos liotrópicos / Daniella Dias Palombino  
de Campos. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Celso Aparecido Bertran.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

1. Cristais líquidos. 2. Síntese de nanopartículas.  
3. Hidroxiapatita. I. Bertran, Celso Aparecido.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Synthesis of calcium phosphates nanoparticles in liotropic liquid crystals

**Palavras-chave em inglês:**

Liquid crystals  
Nanoparticle synthesis  
Hydroxyapatite

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Celso Aparecido Bertran [Orientador]  
Miguel Jafelicci Junior  
João Barros Valim  
Watson Loh  
Edvaldo Sabadini

**Data de defesa:** 21/05/2012

**Programa de pós-graduação:** Química



*“Para ser grande, sê inteiro:  
Nada teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda brilha,  
Porque alta vive”.*

*Fernando Pessoa*



Dedico este trabalho às pessoas que eu amo:

Aos meus pais Maria e José Carlos, ao meu esposo Eliseu e ao meu filho Matheus.



# AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer a importância das outras pessoas na nossa vida. É por isso que agradeço:

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades que Ele me concede diariamente.

Ao meu esposo Eliseu por nossa convivência, pelo seu carinho, amor e companheirismo.

À todos da minha família por todo o carinho, incentivo e apoio.

Ao professor Dr. Celso Aparecido Bertran, a quem tive o prazer de conhecer e ter como orientador desta Tese de Doutorado.

À Elizabete Yoshie Kawachi pelas valiosas conversas científicas ao longo destes anos.

Ao Marcus Vinícius Cardoso, doutorando orientado pelo Prof. Dr. Edvaldo Sabadini, por toda a ajuda com as medidas de RMN e pelo seu auxílio na compreensão dos resultados.

Aos amigos do laboratório I-130, com os quais compartilhei os bons momentos, em especial à Mara, pela amizade, e ao Thiago Carvalho, Lucila Andrade e Juliana Silveira, pelo bom andamento dos trabalhos.

A todo o apoio técnico e à excelente infra-estrutura oferecida pelo Instituto de Química da Unicamp.

À ABTLuS pela utilização do SAXS e do microscópio SEM-FEG.

A Oxiteno pela doação dos surfactantes.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.



# SÚMULA CURRICULAR

## Daniella Dias Palombino de Campos

---

### Formação Acadêmica

---

- 2006-2012**    **Doutorado em Físico-Química**  
Universidade Estadual de Campinas-Unicamp/ Instituto de Química  
Título da Tese: Síntese de Nanopartículas de Fosfatos de Cálcio em Cristais Líquidos Liotrópicos.  
Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran.  
Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- 2003-2006**    **Mestrado em Química Analítica**  
Universidade Estadual de Campinas-Unicamp/ Instituto de Química  
Título da Dissertação: Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas de Jambolão e Avaliação dos seus Efeitos Biológicos.  
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi.  
Co-orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama.  
Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- 2003-2005**    **Graduação em Química – Modalidade Licenciatura**  
Universidade Estadual de Campinas
- 1998-2002**    **Graduação em Química – Modalidade Bacharelado**  
Universidade Estadual de Campinas

---

### Atividades Profissionais Complementares

---

- 2012- atual**    **Professora de Educação Básica – Ensino Médio**  
Escola Estadual Dom Barreto  
Disciplinas: Química e Física  
Aprovada em concurso público - publicado no DOSP de 05/01/2012.
- 2011-2012**    **Professora de Educação Básica – Ensino Médio**  
Centro Estadual de Educação de Jovens e Adultos Paulo Decourt  
Disciplina: Química
- 2007-2007**    **Programa de Estágio Docente de Estudantes de Pós-Graduação**  
Universidade Estadual de Campinas-Unicamp  
Disciplina: Físico-Química Experimental II  
Supervisor: Prof. Dr. Ricardo Aparício

- 2005-2006 Professora de Educação Básica – Ensino Médio**  
Escola Estadual Culto à Ciência  
Disciplinas: Química e Física
- 2001-2003 Iniciação Científica**  
Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia  
Título do Projeto: Identificação e Caracterização Cinética de Fosfatase Ácida de Membrana de Linfócitos Humanos e Efeito de Flavonóides sobre a Atividade Fosfatásica.  
Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama.  
Bolsista: FAPESP
- 2000-2001 Iniciação Científica**  
Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Química  
Título do Projeto: Controle de Qualidade de Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos: Amoxicilina e Ampicilina.  
Orientador: Profa. Dra. Susanne Rath.  
Bolsista: FAPESP

---

## Produção Bibliográfica

---

### Artigos em Periódicos

1. Campos, D. D. P.; Cassu, S. N. ; GARCIA, R. B. R. ; Queiroz, H. A. A. S. ; Gonçalves, R.F.B. ; KAWACHI, E. Y. Avaliação por SAXS e DSC das Interações entre H<sub>2</sub>O e Renex-100. *Química Nova*. **2012**, 35(2): 355-359.
2. Bertazzo, S.; Zambuzzi, W. F.; Campos, D.D.P.; Ferreira, C. V.; Bertran, C. A. A simple method of enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. *Clin Oral Implan Res*. **2010**, 21(12): 1411-1413.
3. Bertazzo, S.; Zambuzzi, W. F.; Campos, D.D.P.; Ogeda, T.; Ferreira, C. V.; Bertran, C. A. Hydroxyapatite Surface Solubility and Effect on Cell Adhesion. *Colloid Surface B*. **2010**, 78(2): 177-184.
4. Campos, D.D.P.; Bertran, C.A. Synthesis of Carbonated Hydroxyapatite Nanorods in Liquid Crystals. *Mater Res*. **2009**, 12: 265-268.

### Trabalhos em Eventos – Resumos

1. Campos, D.D.P.; Bertran, C.A. *The Effect of the Anisotropic Liquid Crystals on the Hydroxyapatite Nanoparticles Synthesis*. Complex: International Workshop on Complex Physical Phenomena in Materials, Recife-PE, **2010**.
2. Campos, D.D.P.; Bertran, C.A. *Hydroxyapatite Nanorods Synthesized in a Hexagonal Liquid Crystal*. AutoOrg 2010: 2º Encontro sobre Estruturas Auto-Organizadas em Soluções e Interfaces, São Pedro-SP, **2010**.

3. Campos, D.D.P.; Andrade, L.; Bertran, C.A. *Efeito do comprimento da cadeia etoxilada de surfactantes Renex® na formação de cristais líquidos*. 33<sup>a</sup> RASBQ: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, **2010**.
4. Campos, D.D.P.; Andrade, L.; Nascimento, A. P.; Bertran, C.A. *Diagramas de Fases Ternários de Renex-100®. O efeito da solução salina na formação dos cristais líquidos*. 33<sup>a</sup> RASBQ: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, **2010**.
5. Campos, D.D.P.; Bertran, C.A. *Efeito de Renex-100® na Síntese de Fosfatos de Cálcio*. 32<sup>a</sup> RASBQ: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE, **2009**.
6. Silveira, J.R. Campos, D.D.P; Bertran, C.A. *Efeito do SDS na Desaglomeração de Partículas de Magnetita Sintetizadas em Ácido Oléico*. 32<sup>a</sup> RASBQ: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE, **2009**.
7. Campos, D.D.P.; Bertran, C.A. *Caracterização de Fases Líquido-Cristalinas por SAXS*. 19<sup>a</sup> Reunião Anual de Usuários de Luz Síncrotron. Campinas-SP, **2009**.
8. Campos, D.D.P.; Bertran, C.A. *Influence of the Brine and Temperature on the Liquid Crystals Stability. A <sup>2</sup>H-NMR Study*. AutoOrg 2008: 1<sup>o</sup> Encontro sobre Estruturas Auto-Organizadas em Soluções e Interfaces, São Pedro-SP, **2008**.
9. Campos, D.D.P.; Bertran, C.A. *Síntese de Hidroxiapatita em Cristais Líquidos formados por Renex®, Ciclohexano e Brine*. Colaob: 5<sup>o</sup> Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Ouro Preto-MG, **2008**.
10. Campos, D.D.P.; Kawachi, E.Y.; Bertran, C.A. *Synthesis of calcium Phosphates in Confined Environments by Cyclohexane/Renex-100®/Brine*. 8<sup>th</sup> WBC: World Biomaterials Congress, Amsterdam-Holanda, **2008**.

\* Outros trabalhos apresentados em congressos, em período anterior aos acima citados, podem ser consultados na Plataforma Lattes, <http://lattes.cnpq.br/>.

## Activity Reports

1. Campos, D.D.P.; Lopes, J.H.; Silveira, J.R.; Carvalho, T.R.; Bertran, C.A. *SAXS characterization of liquid crystals formed by nonylphenol ethoxylated surfactant with different sizes of ethoxylated chains*. Activity Report – LNLS, **2009**.
2. Pascoli, A.S.; Garcia, R.B.R.; Campos, D.D.P.; Bertran, C.A.; Kawashi, E. Y.; *SAXS evaluation of Renex-based self-assembly for nanostructure mullite preparation*. Activity Report – LNLS, **2008**.
3. Garcia, R.B.R.; Pascoli, A.S.; Campos, D.D.P.; Bertran, C.A.; Kawashi, E. Y.; *The influence of ethanol and temperature on the binary system Renex-100/water*. Activity Report – LNLS, **2008**.



# RESUMO

## **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATOS DE CÁLCIO EM CRISTAIS LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS**

Sistemas auto-organizados, preparados com surfactantes nonilfenil etoxilados com diferentes tamanhos de cadeia etoxilada, foram utilizados para sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita (HAP -  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), que é o fosfato de cálcio majoritariamente presente nos tecidos mineralizados dos vertebrados. O efeito do tamanho do grupo etoxilado do surfactante foi avaliado tanto na formação dos sistemas auto-organizados quanto nas propriedades das partículas de HAP precipitadas *in situ* nestes sistemas. Cristais líquidos hexagonal reverso, lamelar, hexagonal e cúbicos foram formados, nesta ordem, a medida que surfactantes com maiores grupos etoxilados foram empregados. Os fosfatos de cálcio sintetizados em todos os sistemas auto-organizados apresentaram-se na forma de nanohastes, de modo que as nanohastes formadas nas fases anisotrópicas (cristais líquidos hexagonais e lamelares) apresentaram diâmetros mais uniformes quando comparadas àquelas sintetizadas nos sistemas auto-organizados isotrópicos. O diâmetro das hastes de HAP comparado com as dimensões dos sistemas auto-organizados sugere que estas se formaram pela aglomeração orientada de partículas ainda menores de HAP, o que foi evidenciado por microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG). Estes resultados, em conjunto com medidas de tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) do hidrogênio das moléculas de água presentes nos sistemas auto-organizados, permitem propor que a limitação do tamanho das nanopartículas de HAP seja conseqüência da limitação da difusão iônica *in situ* e que a morfologia de hastes é resultante da auto-organização das fases.



# ABSTRACT

## **SYNTHESIS OF CALCIUM PHOSPHATES NANOPARTICLES IN LIOTROPIC LIQUID CRYSTALS**

Self-assembled systems from nonylphenol ethoxylate surfactants were prepared using surfactants with different hydrophilic chain lengths. These systems were used to synthesize hydroxyapatite (HAP -  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) nanoparticles, the main constituent of vertebrates mineralized tissues. The surfactant hydrophilic length influence was evaluated both on the self-assembled systems formation and on the properties of HAP nanoparticles which were obtained by in situ precipitation in these systems. As the surfactant hydrophilic length increased different liquid crystals were formed in this sequence: reverse hexagonal, lamellar, normal hexagonal and cubic mesophases. HAP nanoparticles synthesized in all self-assembled systems had morphology of rods. Particles precipitated in the anisotropic systems (hexagonal and lamellar liquid crystals) had more uniform diameters compared to particles precipitated in the isotropic systems (cubic liquid crystals). The HAP nanorods diameters were bigger than the repetition distances of the self-assembled systems. This occurrence, evidenced by SEM-FEG micrographs of the HAP nanoparticles, suggests that the nanorods were formed by even smaller HAP particles which were previously confined in the hydrophilic domains of the phases, and after the surfactant removal they were neatly clustered as induced by the self-assembled systems. These results along with the transversal relaxation times measurements ( $T_2$ ) for hydrogen in water molecules belonging self-assembled systems, allow us to propose the following: there is a reduced ionic diffusion within the liquid crystals hydrophilic domains and it is the cause for the size particles limitation and the particles morphology is influenced by the self-assembling of the systems.



# Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xxv</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>xxvii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Surfactantes e Parâmetro Crítico de Empacotamento.....	3
1.2 Cristais Líquidos: Definição e Caracterização.....	6
1.3 Cristais Líquidos como Meios de Síntese.....	13
1.4 Hidroxiapatita: Síntese e Propriedades Físico-Químicas .....	18
1.5 Nanopartículas de HAP: A Biomineralização Óssea e as Sínteses Bioinspiradas ...	20
1.6 Os Conceitos Norteadores desta Tese.....	25
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Parte Experimental .....</b>	<b>31</b>
3.1 Reagentes .....	31
3.2 Procedimentos.....	32
3.2.1 Avaliação do Método de Síntese de HAP e Remoção dos Componentes Orgânicos.....	32
3.2.2 Síntese de HAP nos Sistemas de Comparação .....	36
3.2.3 Síntese de HAP nos Sistemas Auto-Organizados .....	36
3.2.3.1 Preparo dos Sistemas Auto-Organizados .....	36
3.2.3.2 Caracterização dos Sistemas Auto-Organizados .....	38
3.2.3.3 Caracterização dos Materiais Sintetizados .....	39
3.2.4 Estudo da Formação das Nanopartículas de HAP nos Sistemas Auto-Organizados.....	40
3.3 Fluxograma da Parte Experimental .....	41
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>43</b>
4.1 Caracterização da Hidroxiapatita .....	44
4.2 Avaliação dos Métodos de Síntese e Remoção dos Componentes Orgânicos .....	47
4.3 Síntese de HAP nos Sistemas de Comparação .....	56
4.4 Síntese de HAP nos Sistemas Auto-Organizados.....	65
4.4.1 Caracterização dos Sistemas Auto-Organizados Utilizados para a Síntese de HAP.....	65
4.4.2 O Efeito do Tamanho do Grupo Etoxilado do Surfactante na Formação dos Cristais Líquidos .....	77
4.4.3 Caracterização dos Materiais Sintetizados nos Sistemas Auto-Organizados.....	79

4.4.4 Influência dos Sistemas Auto-Organizados na Morfologia das Nanopartículas de HAP .....	84
4.5 Estudo da Formação das Nanopartículas de HAP nos Sistemas Auto-Organizados.....	96
4.6 Considerações .....	112
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>117</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>119</b>
<b>Apêndice 1: Determinação do Raio de Giro das Nanopartículas de HAp por SAXS .....</b>	<b>125</b>
<b>Apêndice 2: O tempo de Relaxação Transversal (<math>T_2</math>) .....</b>	<b>127</b>

## Abreviaturas

**Amel** – Amelogenina

**CL** – Cristal Líquido

**CPP** – Parâmetro Crítico de Empacotamento

**CPPD** – pirofosfato de cálcio dihidratado

**CTAB** – brometo de cetil trimetil amônio

**DRX** – Difractometria de raios-X

**DCPA** - monohidrogeno fosfato de cálcio

**FTIR** – Espectroscopia na região do Infra-vermelho

**HAP** – hidroxiapatita

**JCPDS** – Joint Committe on Powder Diffraction Standards

**NMR** – Ressonância Magnética Nuclear

**POM** – Microscopia Ótica com Luz Polarizada

**q** – vetor de espalhamento

**SAXS** – Espalhamento de raios X a Baixos Ângulos

**SEM** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**SEM-FEG** – Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo

**PEG** - polietilenoglicol



# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Leis de reflexão para as mesofases lamelar, hexagonal e cúbicas...	13
<b>Tabela 2.</b> Surfactantes nonilfenil etoxilados utilizados neste trabalho.....	32
<b>Tabela 3.</b> Condições de aquecimento das amostras para eliminação dos componentes orgânicos.....	35
<b>Tabela 4.</b> Nomenclatura das fases que foram utilizadas na síntese dos fosfatos de cálcio .....	38
<b>Tabela 5.</b> Relação das bandas observadas nos espectros da Figura 14 e suas atribuições .....	46
<b>Tabela 6.</b> Relação das bandas observadas nos espectros da Figura 16 e suas atribuições .....	48
<b>Tabela 7.</b> Valores médios dos diâmetros das hastes de HAP obtidas pelos diferentes métodos de síntese e de remoção dos componentes orgânicos .....	54
<b>Tabela 8.</b> Caracterização dos sistemas auto-organizados preparados com diferentes surfactantes por SAXS.....	76
<b>Tabela 9.</b> Valores médios dos diâmetros das nanohastes de fosfatos de cálcio sintetizados nos diferentes sistemas auto-organizados .....	93
<b>Tabela 10.</b> Caracterização dos sistemas auto-organizados sem partículas, com partículas de HAP <i>in situ</i> e preparados com nitrato de amônio como solução salina .....	100
<b>Tabela 11.</b> Distâncias de repetição das fases prévia e posteriormente à formação das partículas .....	100
<b>Tabela 12.</b> Cálculo do raio de giro ( $R_g$ ) das partículas sintetizadas nos cristais líquidos formados com os diferentes surfactantes .....	104
<b>Tabela 13.</b> Tempos de relaxação spin-spin ( $T_2$ ) calculados para a água nos diferentes sistemas auto-organizados e na fase PEG-23 .....	110



# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Parâmetro de Empacotamento Crítico (CPP) de surfactantes e respectivos agregados moleculares .....	5
<b>Figura 2.</b> Representação das estruturas de cristais líquidos lamelar, hexagonais (normal e reversa) e mesofases cúbicas (bicontínuas e micelar) ..	7
<b>Figura 3.</b> Orientações dos agregados (de mesofases lamelares e hexagonais) em relação ao campo magnético externo $B_0$ e possíveis orientações do eixo diretor do agregado (D) e do eixo diretor molecular do surfactante ( $M_s$ ). Neste caso, o surfactante é deuterado e $M_s$ é relativo a ligação C- <sup>2</sup> H .....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema de medição de raios X espalhados em baixos ângulos ....	11
<b>Figura 5.</b> Imagens de TEM mostrando as diferentes nanoestruturas de ZnSe obtidas nos cristais líquidos: (a) nanodiscos obtidos na mesofase lamelar, nanotubos (mesofase hexagonal) e nanoesferas (mesofase cúbica).....	14
<b>Figura 6.</b> Representação da síntese de materiais inorgânicos porosos mediada por cristais líquidos. (a) cristal líquido; (b) solidificação do domínio aquoso do cristal líquido e (c) obtenção do material poroso após a remoção do surfactante .....	15
<b>Figura 7.</b> (a) Modelo proposto por Li e colaboradores para a síntese de HAP nanoporosa e (b) microscopia de transmissão das partículas obtidas.....	17
<b>Figura 8.</b> Distribuição dos íons referentes ao equilíbrio do ácido fosfórico em função do pH.....	19
<b>Figura 9.</b> Modelo de osteogênese primária: os osteoblastos segregam vesículas de matriz, as quais atuam como sítios de nucleação onde se formam os primeiros cristais de HAp, com o crescimento, os cristais rompem a membrana vesicular dando continuidade à mineralização do tecido ósseo ...	22
<b>Figura 10.</b> Modelo proposto para a biomineralização intrafibrilar: (a) as esferas representam o precursor polimérico que leva os íons ao interior das fibras. Ao interagir com as fibras, os íons são liberados e a mineralização	

ocorre após a perda do excesso de água, levando os cristais a ficarem orientados na direção das fibras (b).....	24
<b>Figura 11.</b> Fórmula estrutural dos surfactantes nonilfenil etoxilados.....	31
<b>Figura 12.</b> Diagrama ilustrando o sistema usado para permeação das fases com gás amônia e consequente precipitação <i>in situ</i> dos fosfatos de cálcio .....	34
<b>Figura 13.</b> Diagrama de fases para o sistema ternário: Triton X-100, água e benzeno .....	37
<b>Figura 14.</b> Fluxograma da parte experimental .....	42
<b>Figura 15.</b> Espectro de FTIR para a HAP comercial. As linhas tracejadas indicam os grupos fosfato e as pontilhadas, os grupos hidroxilas .....	45
<b>Figura 16.</b> Difratoograma de raios X obtido para a HAP comercial .....	46
<b>Figura 17.</b> Espectros de FTIR dos materiais sintetizados pelos diferentes métodos de síntese e de remoção dos componentes orgânicos .....	49
<b>Figura 18.</b> Difratoograma de Raios-X dos fosfatos de cálcio sintéticos obtidos em cristal líquido, com diferentes condições de síntese e de remoção dos componentes orgânicos .....	51
<b>Figura 19.</b> Micrografias dos fosfatos de cálcio obtidos na fase LC-10 pelos diferentes métodos de síntese e remoção dos componentes orgânicos, explícitos acima das imagens .....	53
<b>Figura 20.</b> Sobreposição dos histogramas mostrando a distribuição dos tamanhos das hastes de HAP obtidas pelos diferentes métodos de síntese e de remoção dos componentes orgânicos .....	55
<b>Figura 21.</b> FTIR dos materiais formados na ausência de surfactante, na presença de $8.10^{-7}$ mol.L <sup>-1</sup> de S-10 e da hidroxiapatita comercial.....	59
<b>Figura 22.</b> XRD dos materiais formados na ausência de surfactante, na presença de concentrações reduzidas de surfactante com 10EO e da hidroxiapatita comercial.....	60
<b>Figura 23.</b> Micrografias (SEM) dos fosfatos de cálcio (CPPD) obtidos na ausência de surfactante .....	63
<b>Figura 24.</b> Micrografias dos fosfatos de cálcio obtidos na presença de $8.10^{-7}$ mol.L <sup>-1</sup> de Renex-100®. Micrografias obtidas por: SEM (a) e SEM-FEG (b-d).	64

<b>Figura 25.</b> Fotografias dos sistemas auto-organizados utilizados para a síntese da HAP. Os números 04, 06, 10, 15, 20, 23 e 30 correspondem às unidades etoxiladas dos surfactantes utilizados no preparo dos sistemas Os sistemas LC04 a LC06 assemelham-se a líquidos viscosos, enquanto os sistemas LC20 a LC30 assemelham-se a pastas.....	66
<b>Figura 26.</b> Micrografias obtidas por POM dos sistemas auto-organizados utilizados na síntese da HAp <i>in situ</i> .....	67
<b>Figura 27.</b> Espectros de <sup>2</sup> H-NMR dos sistemas auto-organizados utilizados para a síntese de HAP <i>in situ</i> . Os sistemas LC-04 a LC-15 são anisotrópicos e os sistemas LC-20 a LC-30 são isotrópicos. ....	69
<b>Figura 28.</b> Curvas de SAXS para os sistemas auto-organizados preparados com surfactantes com diferentes grupos etoxilados. Os números ao lado dos picos referem-se à razão $q_n/q_1$ .....	72
<b>Figura 29.</b> Curvas de SAXS dos sistemas auto-organizados preparados com surfactantes contendo 15 ou mais grupos etoxilados. As linhas tracejadas indicam as posições esperadas para difrações comuns às fases cúbicas. Elas indicam as posições relativas às razões $q_n/q_1$ iguais a $\sqrt{2}, \sqrt{3}, \sqrt{4}, \sqrt{5}, \sqrt{6}, \sqrt{8}, \dots$ .....	74
<b>Figura 30.</b> Representação esquemática do aumento da região polar do surfactante e o empacotamento preferencial do surfactante de acordo com sua geometria .....	78
<b>Figura 31.</b> Espectros de FTIR dos fosfatos de cálcio sintéticos e da hidroxiapatita comercial. A seta indica a banda de absorção atribuída à presença de calcita.....	80
<b>Figura 32.</b> Difratomogramas de raios X para os materiais sintetizados nos diferentes sistemas auto-organizados e para a HAP comercial.....	81
<b>Figura 33.</b> Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada sintetizadas na fase LC-04 (caracterizada como um cristal líquido hexagonal reverso) e histograma mostrando a distribuição de diâmetros das nanohastes .....	85
<b>Figura 34.</b> Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizadas na fase LC-06 (caracterizada como um cristal líquido lamelar) e histograma mostrando distribuição de diâmetros das nanohastes .....	86
<b>Figura 35.</b> Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizada na fase LC-10 (caracterizada como cristal líquido hexagonal) e histograma mostrando distribuição de diâmetros das hastes .....	87

<b>Figura 36.</b> Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizadas no sistema LC-15, caracterizado como uma mistura de um cristal líquido hexagonal e um cúbico irregular .....	88
<b>Figura 37.</b> Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizadas no sistema LC-20, caracterizado como uma mistura de fases cúbicas (Pn3m e irregular).....	89
<b>Figura 38.</b> Micrografias de nanopartículas de HAP carbonatada sintetizada na fase LC-23, caracterizada como cristal líquido cúbico irregular .....	90
<b>Figura 39.</b> Micrografias de nanopartículas de HAP carbonatada sintetizadas na fase LC-30, caracterizada como cristal líquido cúbico irregular .....	91
<b>Figura 40.</b> Micrografias do material sintetizado na presença de PEG-1000 (fase PEG-23). O material foi caracterizado como uma mistura de HAP e calcita .....	92
<b>Figura 41.</b> Curvas de SAXS dos sistemas auto-organizados preparados com surfactantes com diferentes grupos etoxilados contendo ou não partículas de HAP (curvas em preto e vermelho, respectivamente) e fases preparadas com nitrato de amônio como solução aquosa (curva em azul) .....	98
<b>Figura 42.</b> Micrografias das nanohastes de HAP sintetizadas na fase LC-04...	102
<b>Figura 43.</b> Curvas de SAXS referentes ao sistema LC-04 contendo partículas de HAP. As curvas pontilhadas (mais escuras) mostram os dados experimentais e as curvas mais claras referem-se aos ajustes. Os ajustes consideram apenas o formato esférico (a) e cilíndrico (c) para as partículas e os mesmos ajustes com sobreposição da estrutura lamelar (b e d).....	106
<b>Figura 44.</b> Modelo proposto para a formação das nanohastes na fase LC-04..	108
<b>Figura 45.</b> Modelo que sugere como ocorre o controle dimensional e morfológico das nanopartículas de HAP precipitadas em uma mesofase cúbica micelar .....	111
<b>Figura 46.</b> Microscopia da matriz óssea inorgânica de crânio de rato whistar com diferentes aumentos: (a) 50 000 e (b) 100 000 vezes .....	114

# 1. Introdução

As moléculas de surfactante, sob determinadas condições dos sistemas do qual participam, possuem a capacidade de se auto-associarem formando fases auto-organizadas e termodinamicamente estáveis, denominadas de Cristais Líquidos (CL). Estas fases apresentam diversas aplicações tecnológicas e, nas últimas duas décadas, vêm sendo empregadas na síntese de nanopartículas inorgânicas com propriedades controladas, tais como: tamanho, morfologia, porosidade e orientação. A capacidade de controlar as propriedades das nanopartículas sintetizadas *in situ*, associada à mobilidade molecular dos constituintes da fase auto-organizada, confere aos cristais líquidos a designação de moldes flexíveis [1-3].

A vantagem de se obter nanopartículas sintéticas de hidroxiapatita (HAP), com alto controle morfológico e dimensional, reside na semelhança que estas nanopartículas podem ter com a HAP biológica, que é a principal constituinte inorgânica dos tecidos rígidos mineralizados dos vertebrados, tais como ossos e dentes. Estes tecidos mineralizados são formados por diversos arranjos das nanopartículas de apatitas em diferentes níveis hierárquicos resultando em biomateriais auto-organizados com propriedades físico-químicas e mecânicas particulares [4].

O processo de formação do tecido mineralizado, conhecido como biomineralização, é bastante complexo e não compreendido completamente. Entretanto, não há dúvidas de que este processo seja controlado pela matriz orgânica presente nos ossos, a qual influencia a nucleação, o crescimento, a cristalinidade e a orientação dos cristais de HAP no tecido. No caso do tecido ósseo, a matriz orgânica é composta essencialmente por colágeno, que possui a propriedade de formar fibras, as quais se alinham em uma direção preferencial de modo praticamente paralelo, deixando espaços interfibrilares livres onde ocorre a mineralização. Os cristais de HAP, por sua vez, são epitaxialmente orientados sobre esta matriz colagênica, como consequência da biomineralização ter ocorrido em um meio orientado [4-6].

Assim como o colágeno, as fases líquido-cristalinas são auto-organizadas e geralmente orientadas em uma direção preferencial, como é o caso das fases anisotrópicas. Deste modo, a síntese de HAP nestas fases simula este aspecto da matriz colagênica, tratando-se de uma síntese bioinspirada.

As sínteses bioinspiradas de HAP apresentam dois objetivos principais. O primeiro refere-se à obtenção de materiais semelhantes aos biológicos, os quais poderão ser futuramente empregados no preenchimento de defeitos ósseos e dentários, além de inspirar o desenvolvimento planejado de novos biomateriais. O segundo contempla a própria compreensão do mecanismo de mineralização óssea que ocorre *in vivo* [7].

Os cristais líquidos utilizados para sintetizar HAP neste trabalho correspondem a um sistema ternário composto por surfactante, solução aquosa contendo íons de interesse e ciclohexano. Como surfactantes, foram utilizados nonilfenil polietoxilados com diferentes tamanhos de cadeia etoxilada. A versatilidade permitida pela escolha de moléculas de surfactante com diferentes tamanhos de cadeia polar levou a obtenção de diferentes estruturas de cristais líquidos, incluindo as mesofases hexagonais (normal e reversa), lamelar e cúbicas. Assim, foi possível avaliar a influência do comprimento das cadeias

etoxiladas dos surfactantes tanto na formação dos cristais líquidos quanto nas propriedades das partículas de hidroxiapatita sintetizadas *in situ*.

Os tópicos seguintes consistem em uma revisão bibliográfica que aborda pontos centrais desta Tese. Devido ao fato dos cristais líquidos serem formados pelo auto-arranjo molecular de surfactantes em meio aquoso, oleoso ou em ambos [8], o próximo tópico descreve sucintamente as propriedades que resultam na auto-organização dos surfactantes.

## 1.1 Surfactantes e Parâmetro de Empacotamento Crítico

Surfactantes, ou tensoativos, são moléculas anfifílicas, pois possuem domínios discretos hidrofílicos e hidrofóbicos na sua estrutura molecular [9,10].

Em solução aquosa e acima da concentração micelar crítica (CMC), os surfactantes se auto-organizam formando agregados moleculares com dimensões coloidais denominados micelas. Neste caso, as micelas se formam pela interiorização da parte hidrofóbica do surfactante que minimiza o seu contato com a água. As micelas também se formam em sistemas ternários compostos por surfactante, água e óleo, e neste caso, as moléculas de surfactante se adsorvem na interface água-óleo separando estes dois domínios. Quando o óleo é confinado no interior das micelas, elas são denominadas normais e quando a água é confinada, as micelas são reversas [11,12].

O processo de micelanização é espontâneo ( $\Delta G < 0$ ). Dados experimentais mostram que este processo é governado pelo aumento entrópico, pois a formação de micelas envolve uma pequena variação entálpica e um grande aumento entrópico. Uma possível explicação para o aumento entrópico é que quando uma molécula de surfactante encontra-se em meio aquoso, as moléculas de água próximas à parte apolar do surfactante se ordenam formando clusters. Quando esta molécula de surfactante se transfere para a micela, as moléculas de água

que estavam anteriormente estruturadas ao redor do grupo apolar são liberadas para o meio, de forma que o maior grau de liberdade destas moléculas é a causa do aumento entrópico [11].

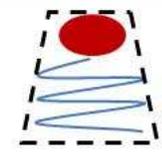
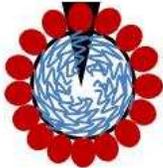
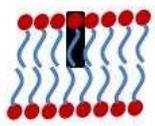
Os agregados moleculares de surfactantes podem apresentar diferentes geometrias, sendo o parâmetro de empacotamento crítico (CPP) um indicativo do formato destes agregados. O CPP é um parâmetro geométrico que correlaciona dados estruturais do surfactante, tais como o volume molecular ( $v$ ) e o comprimento molecular ( $l$ ) da parte hidrofóbica, e a área efetiva da secção transversal ( $a$ ) do grupo cabeça, ou hidrofílico (equação 1) [13].

$$CPP = \frac{v}{al} \quad \text{Equação 1}$$

O valor de CPP está relacionado com a estrutura do agregado molecular da seguinte maneira: surfactantes contendo grupo cabeça volumoso e cauda apolar não tão volumosa, assemelham-se geometricamente a um cone, com valor de CPP inferior a 1/3. Neste caso, as micelas formadas são esféricas, visto que esta geometria é a que garante o maior empacotamento de cones. Pelo contrário, valores de CPP maiores ou iguais a 1 são característicos para surfactantes iônicos com dupla cadeia apolar ou não-iônicos com grupo cabeça pequeno (estrutura semelhante a um cilindro), neste caso, os agregados formados são lamelares, pois são os que melhor empacotam cilindros. O mesmo raciocínio pode ser empregado para prever a geometria dos agregados quando as micelas confinam água (sistemas reversos) [14]. A Figura 1 permite relacionar as geometrias do surfactante com seus respectivos valores de CPP e os agregados moleculares formados.

O parâmetro de empacotamento crítico indica como as moléculas de surfactante se posicionam na interface água-óleo, cuja curvatura determina a forma do agregado. É possível perceber, ao observar a Figura 1, que conforme o CPP aumenta, a curvatura da interface dos agregados fica cada vez menor, de modo que as micelas esféricas passam a ser alongadas. Aumentando-se ainda

mais o CPP, as moléculas de surfactante se empacotam em bicamadas planas, ou seja, nesta situação, a curvatura é nula. Com um aumento ainda maior do CPP, as curvaturas de interface se invertem (por definição, as curvaturas são negativas ou convexas) e, neste caso, as micelas reversas são formadas [12,15-16].

CPP	$< 1/3$	$1/3 - 1/2$	$\sim 1$	$> 1$
Forma da Seção Transversal	 Cone	 Cone truncado	 cilindro	 Cone truncado
Estrutura esperada para os agregados	 micela esférica	 micela alongada	 bicamada plana	 micela reversa

**Figura 1.** Parâmetro de Empacotamento Crítico (CPP) de surfactantes e respectivos agregados moleculares. Figura adaptada de Segota e Tezak, 2006 [14].

A formação dos cristais líquidos geralmente ocorre quando a concentração de surfactante no meio é elevada, de modo que as micelas existentes se empacotam formando arranjos específicos. Em geral, as micelas esféricas empacotam-se em arranjos cúbicos, enquanto as micelas alongadas (ou cilíndricas) em arranjos hexagonais e as bicamadas empacotam-se em lamelas.

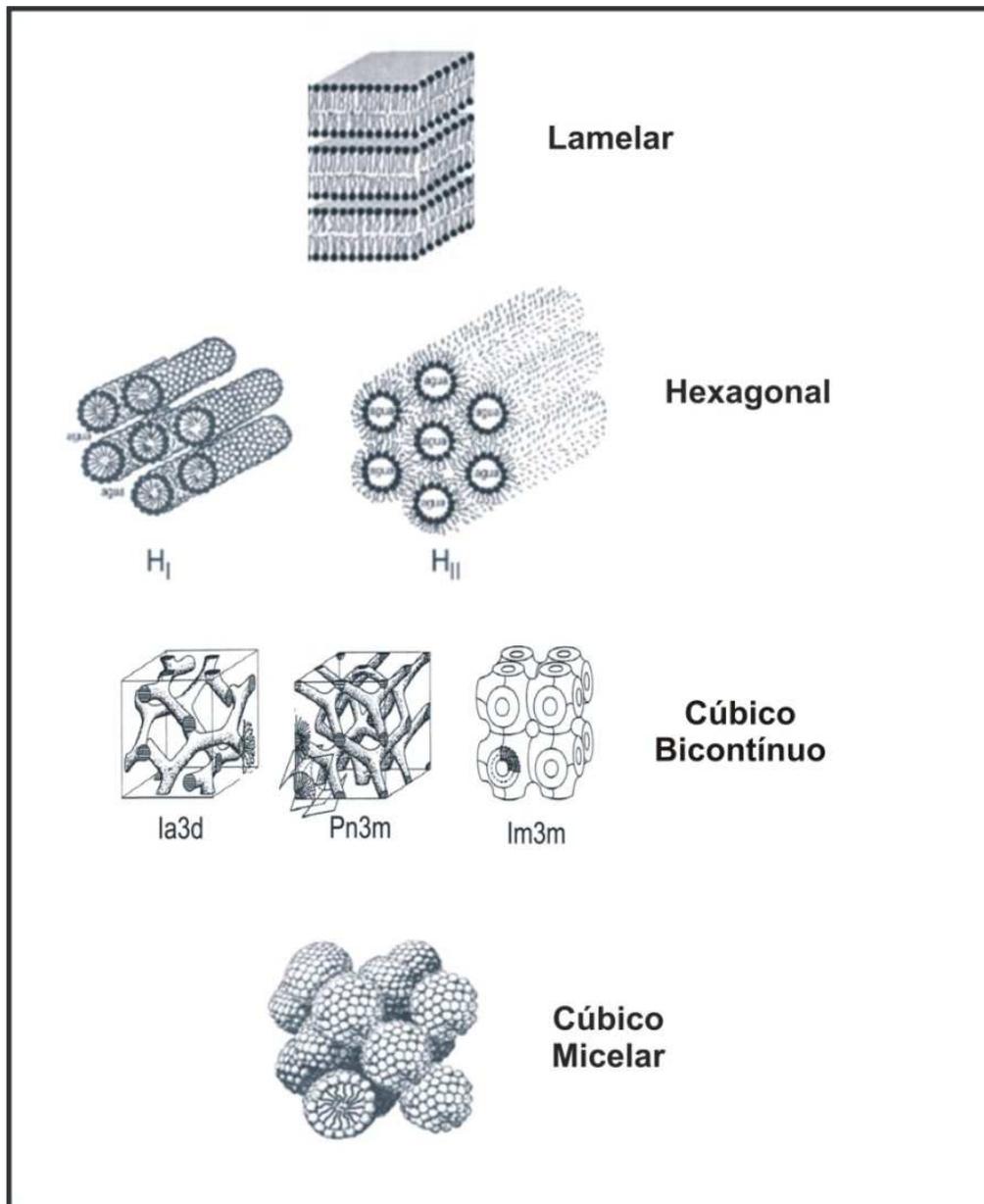
Embora o valor de CPP permita fazer uma previsão sobre o empacotamento molecular, outros fatores também afetam o empacotamento das moléculas, tais como quantidade de água presente, presença de sais, óleos dissolvidos, concentração do surfactante, temperatura, etc. Por esta razão, o mesmo surfactante pode formar diferentes fases em função da composição e da temperatura do meio, como evidenciam os diagramas de fase [12-13,17].

## 1.2 Cristais Líquidos: Definição e Caracterização

O termo cristal líquido significa um estado de agregação que é intermediário entre o sólido cristalino e o líquido, por isso, os cristais líquidos são também conhecidos como mesofases, onde o termo “meso” significa intermediário. Como regra, um sistema neste estado tem ordem à longa distância comparável aos sólidos cristalinos, e ao mesmo tempo, exibe um grau de fluidez que, em muitos casos, se assemelha a dos líquidos [18].

Os cristais líquidos são divididos em duas classes: os termotrópicos, cujas propriedades anisotrópicas e estruturais são geradas por aquecimento de um composto puro e os liotrópicos, que são formados por uma mistura de dois ou mais componentes, sendo geralmente, um surfactante e água [19]. A Figura 2 mostra exemplos de arranjos moleculares para diferentes cristais líquidos.

Como pode ser visto na Figura 2, os cristais líquidos lamelar e hexagonais (fase normal -  $H_I$  e fase reversa -  $H_{II}$ ) possuem orientação em uma direção preferencial, o que não se observa para as mesofases cúbicas. Por esta razão, as fases lamelar e hexagonal são anisotrópicas, enquanto que as fases cúbicas são isotrópicas.



**Figura 2.** Representação das estruturas de cristais líquidos lamelar, hexagonais (normal e reversa) e mesofases cúbicas (bicontínuas e micelar). Figura adaptada [3, 20].

Os cristais líquidos cúbicos apresentam em comum o fato de serem muito viscosos. Eles dividem-se em duas famílias: as fases bicontínuas e as micelares. As fases bicontínuas são formadas por superfícies mínimas periódicas e possuem 4 tipos de arranjos classificados de acordo com o grupo espacial, sendo eles:  $Im3m$ ,  $Ia3d$ ,  $Pn3m$  e  $R3c$ . As fases micelares são formadas por micelas discretas e apresentam 3 arranjos:  $Pm3n$ ,  $Im3m$  e  $Fm3m$  [20-22].

Nos diagramas de fase de surfactantes, as fases líquido-cristalinas são representadas pelas letras  $L\alpha$  para a fase lamelar,  $H$  para a fase hexagonal,  $V$  para as fases cúbicas bicontínuas e  $I$  para as fases cúbicas micelares. Os números em subscrito indicam a natureza das fases:  $I$  indica fase normal e  $II$  fase reversa.

A anisotropia das fases é uma característica que pode ser facilmente identificada pela técnica de microscopia óptica com polarizadores cruzados, POM [23]. O comportamento anisotrópico óptico é identificado pela birrefringência, o qual é um fenômeno óptico típico de cristais em que um raio incidente sofre refração sendo decomposto nas suas componentes coloridas, semelhantemente ao que se observa quando um raio de luz branca atravessa um prisma. Assim, quando observadas por POM, as fases isotrópicas geram um padrão escuro, enquanto os cristais líquidos anisotrópicos apresentam brilho ou padrões coloridos [11,24].

Outra técnica que permite diferenciar fases isotrópicas e anisotrópicas é a Ressonância Magnética Nuclear (NMR) para núcleo de deutério. Para caracterizar a anisotropia em cristais líquidos o sistema é enriquecido com este núcleo em torno de 5% em massa. O deutério é um núcleo quadrupolar, com  $I = 1$ . Os núcleos com  $I \geq 1$  interagem com a componente elétrica do campo eletromagnético, apresentando transições no espectro de NMR desdobradas em  $2I$  transições. No caso do núcleo de  $^2H$  ( $I=1$ ), em meios isotrópicos, as transições são coincidentes e dão origem a um sinal singleto, mas em meios anisotrópicos, onde as moléculas estão orientadas, o sinal de NMR aparecerá desdobrado [25-26].

O desdobramento quadrupolar ( $\Delta\nu$ ) de um domínio simples de uma fase líquido-cristalina uniaxial, como a hexagonal ou lamelar, é dado por:

$$\Delta\nu = 2\bar{\delta} \cdot \frac{1}{2} (3\cos^2 \theta_{DL} - 1) \quad \text{Equação II}$$

onde  $\theta_{DL}$  é o ângulo entre um domínio individual do cristal líquido (como uma lamela para a fase lamelar e um cilindro para a fase hexagonal) e o campo magnético aplicado e  $\bar{\delta}$  é dado por:

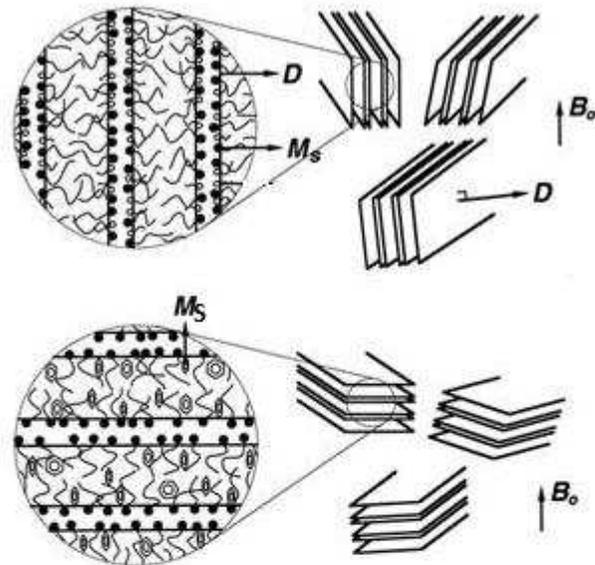
$$\bar{\delta} = \delta \cdot \frac{1}{2} \langle 3\cos^2 \theta_{PM} - 1 \rangle_M \cdot \frac{1}{2} \langle 3\cos^2 \theta_{MD} - 1 \rangle_D \quad \text{Equação III}$$

onde  $\bar{\delta}$  e  $\delta$  são os parâmetros de anisotropia dinâmico e estático, respectivamente e  $\theta_{PM}$  é o ângulo de orientação formado pelo  $D_2O$  em relação ao tensor EFG (gradiente de campo eletromagnético) e  $\theta_{MD}$  é o ângulo entre o eixo molecular do surfactante e o eixo diretor do agregado.

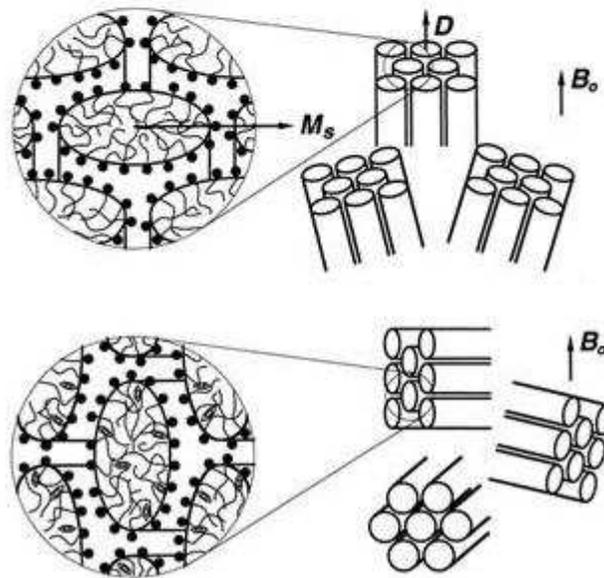
A Figura 3 mostra as orientações dos agregados em relação ao campo magnético  $B_0$ , onde é possível observar que na mesofase lamelar, os eixos moleculares do surfactante ( $M_s$ ) estão paralelos ao eixo diretor do agregado ( $D$ ) e deste modo,  $\theta_{MD}$ , em média, é  $0^\circ$ . Em contrapartida, os eixos  $M_s$  nos cilindros da fase hexagonal apresentam-se perpendiculares a  $D$ , de modo que  $\theta_{MD}$ , em média, é  $90^\circ$ . Assim, os desdobramentos  $\Delta\nu$  para as mesofases lamelar ( $L\alpha$ ) e hexagonal ( $H\alpha$ ), são dados da seguinte maneira:

$$\Delta\nu^{L\alpha} = \delta \cdot S_{CD} \cdot (1) \quad \text{Equação IV}$$

### Mesofase Lamelar



### Mesofase Hexagonal



**Figura 3.** Orientações dos agregados (de mesofases lamelares e hexagonais) em relação ao campo magnético externo  $B_0$  e possíveis orientações do eixo diretor do agregado ( $D$ ) e do eixo diretor molecular do surfactante ( $M_s$ ). Neste caso, o surfactante é deuteroado e  $M_s$  é relativo a ligação  $C-^2H$ . Figura adaptada de Firouzi et. al., 1997 [25].

$$\Delta v^{H\alpha} = \delta \cdot S_{CD} \cdot \left(\frac{1}{2}\right)$$

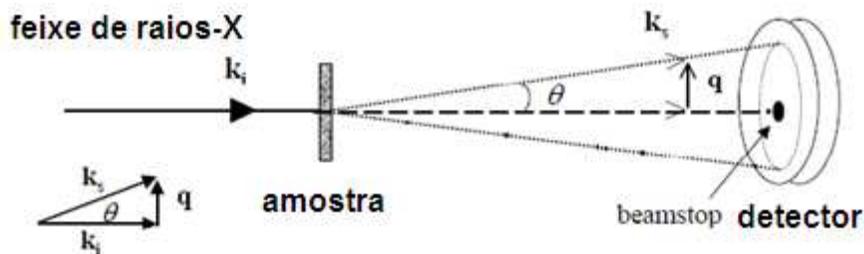
**Equação V**

onde o termo  $S_{CD}$  corresponde a  $\frac{1}{2} \langle 3\cos^2 \theta_{PM} - 1 \rangle_M$

que é o primeiro termo da equação III.

Desta forma, por questões de geometria, o desdobramento quadrupolar observado para a fase lamelar geralmente é duas vezes maior que o desdobramento observado para as fases hexagonais [25].

Além das técnicas de NMR e POM, os cristais líquidos podem ser caracterizados por espalhamento dos raios X em baixos ângulos (SAXS). Esta técnica fornece informações estruturais para materiais que não possuem homogeneidade eletrônica em distâncias que variam de dezenas a centenas de Angströms. A Figura 4 mostra um esquema representando um experimento de SAXS, onde um feixe de raios X incide sobre uma amostra fazendo com que os elétrons desta amostra emitam ondas secundárias de raios X, cujas interferências construtivas são detectadas [27].



**Figura 4.** Esquema de medição de raios X espalhados em baixos ângulos.

A magnitude do vetor espalhamento ( $q$ ), representado na Figura 4, é descrita por:

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad \text{Equação VI}$$

em que  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente e  $\theta$  é o ângulo de espalhamento [28].

O vetor de espalhamento ( $q$ ) relaciona-se com as distâncias interplanares ( $d$ ) entre 2 planos de refração, de acordo com a equação VII [28].

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad \text{Equação VII}$$

Qualquer processo de espalhamento é caracterizado pela lei da reciprocidade, a qual resulta em uma relação inversa entre tamanho e o ângulo de espalhamento [27]. Para estruturas com ordem a longas distâncias, como as fases líquido cristalinas, a interferência construtiva é dada pela Lei de Bragg, conforme a equação VIII:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Equação VIII}$$

em que  $n$  é um número inteiro,  $d$  é a distância entre os planos e  $2\theta$  é o ângulo de difração.

Assim, as fases líquido-cristalinas são caracterizadas por SAXS pelas posições relativas dos picos de difração na curva de intensidade  $I$  versus o vetor de espalhamento  $q$ . As distâncias relativas dos picos, características para cada mesofase, são dadas pelas leis de reflexão, as quais correspondem à razão entre o parâmetro unitário de cela ( $a$ ) e as distâncias interplanares ( $d$ ) para cada mesofase. As leis de difração das fases lamelar, hexagonal e para 5 fases cúbicas encontram-se na Tabela 1 [22,28].

**Tabela 1.** Leis de difração para as mesofases lamelar, hexagonal e cúbicas.

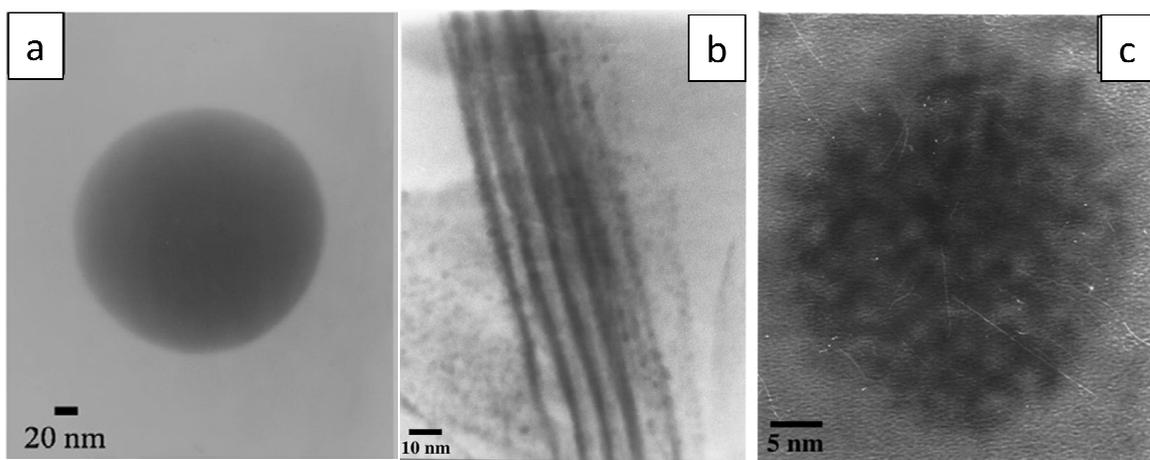
Mesofase	Lei de Reflexão
lamelar	$\left(\frac{a}{d}\right) = 1,2,3,4,5,6\dots$
hexagonal	$\left(\frac{\sqrt{3}\cdot a}{2\cdot d_{hk}}\right)^2 = 1,3,4,7\dots$
Pn3m	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2,3,4,6,8,9,10,11\dots$
Pm3n	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2,4,5,6,8\dots$
Fd3m	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 3,8,11,12,16,19,24\dots$
Im3m	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 2,4,6,8\dots$
Ia3d	$\left(\frac{a}{d_{hkl}}\right)^2 = 6,8,14,16,20,22,24\dots$

### 1.3 Cristais Líquidos como Meios de Síntese

Os cristais líquidos (LCs) vêm despertando grande interesse científico e tecnológico devido às suas possibilidades de aplicação, que compreendem sua utilização como displays, sensores, veículos de distribuição controlada de drogas e mais recentemente, como meios para a síntese de nanopartículas com propriedades controladas [3].

Há diversos trabalhos na literatura que classificam os LCs como moldes maleáveis, visto que nanopartículas metálicas ou inorgânicas sintetizadas nestas fases apresentam dimensões e morfologias “feitas sob medida”, ou seja, que

copiam fielmente as propriedades das mesofases que as originaram [3]. Como exemplo, Karanikolos e colaboradores obtiveram nanoestruturas de ZnSe com morfologias esféricas, de nanotubos e nanodiscos usando cristais líquidos cúbico, hexagonal e lamelar, respectivamente, conforme mostra a Figura 5. Em outro trabalho, os autores obtiveram esferas e nanotubos ocios de ZnSe, através de fases cúbica e hexagonal normais, respectivamente. É surpreendente como as propriedades dos materiais sintetizados em cada fase, reproduz de maneira fidedigna as características morfológicas e dimensionais das fases líquido-cristalinas utilizadas na síntese [1-3].

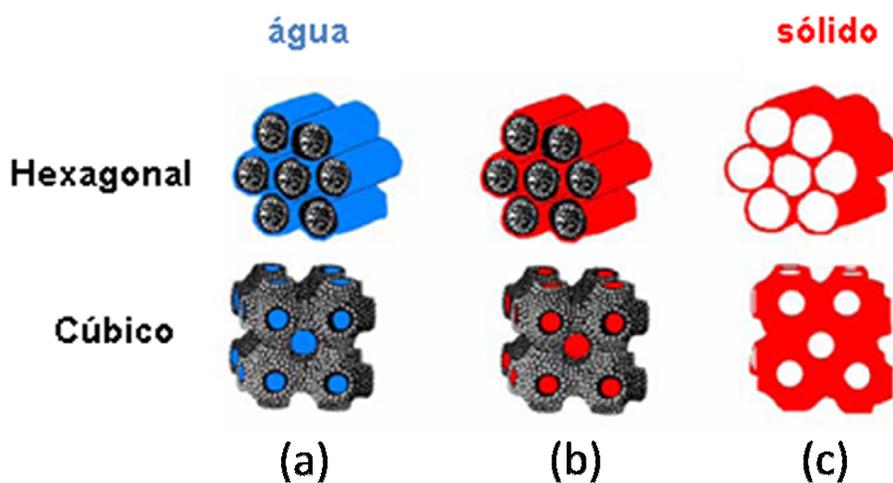


**Figura 5.** Imagens de TEM mostrando as diferentes nanoestruturas de ZnSe obtidas nos cristais líquidos: (a) nanodiscos obtidos na mesofase lamelar, (b) nanotubos (mesofase hexagonal) e (c) nanoesferas (mesofase cúbica micelar) [3].

Os cristais líquidos não apenas atuam como moldes na formação de nanopartículas como também influenciam na auto-organização destas nanopartículas. A redução de nitrato de prata na presença de um cristal líquido hexagonal reverso levou à formação de nanopartículas de prata com dimensões na faixa de 4-6 nm, e, após a remoção do molde, as partículas se alinharam em

fibras com extensões que variaram de 30 nm até atingir dimensões milimétricas [29-31].

As sínteses de materiais inorgânicos mediadas por cristais líquidos também podem levar a obtenção de materiais porosos com a vantagem de controlar as propriedades dos poros tais como tamanho, morfologia e distribuição tridimensional. Estas sínteses se baseiam em uma reação de polimerização que ocorre *in situ* com os componentes que formam o domínio aquoso do cristal líquido e, portanto, referida como solidificação do domínio aquoso do cristal líquido. Após a reação, há a remoção do surfactante resultando em um material poroso, como pode ser observado no mecanismo representado na Figura 6. Este método de síntese foi utilizado com sucesso na obtenção de peneiras moleculares (em cristal líquido hexagonal) cujos poros apresentaram diâmetros de na faixa entre 2 e 50 nm [3].

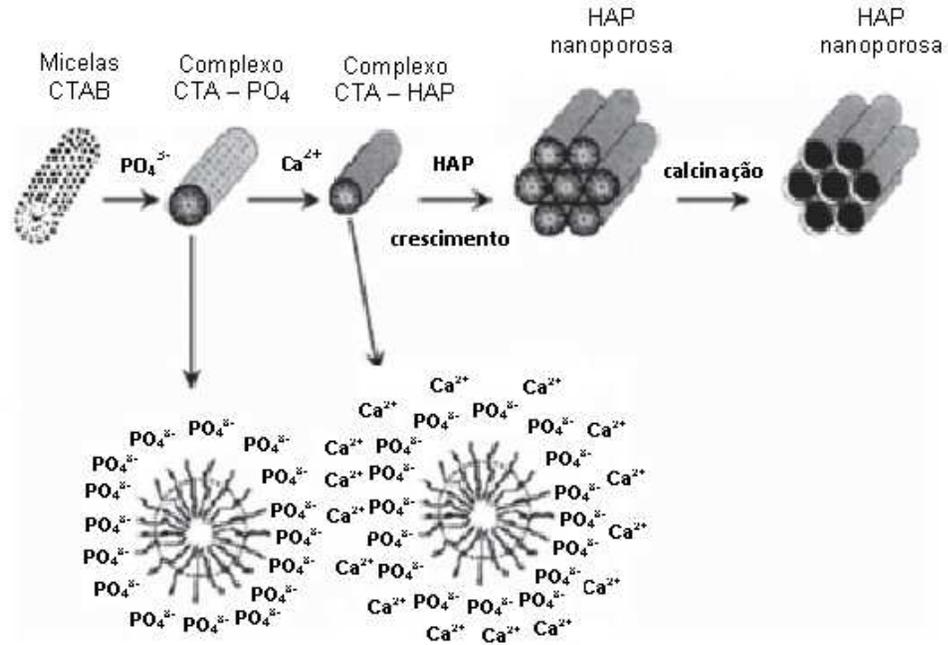


**Figura 6.** Representação da síntese de materiais inorgânicos porosos mediada por cristais líquidos hexagonal e cúbico. (a) cristal líquido; (b) “solidificação” do domínio aquoso do cristal líquido e (c) obtenção do material poroso após a remoção do surfactante. Adaptado de Holmberg, K. 2004 [29,31].

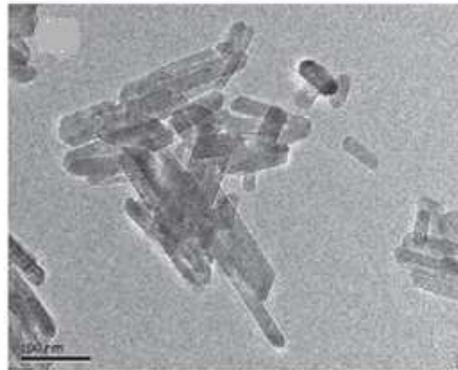
Baseado no modelo de síntese de materiais inorgânicos porosos, Li e colaboradores, em 2007, propuseram um modelo para obter partículas de HAP nanoporosas. Assim, os autores sintetizaram HAP na presença do surfactante catiônico CTAB, o qual foi posteriormente eliminado por aquecimento, com temperatura mínima de 550°C. No modelo proposto (Figura 7), os autores mostraram que a síntese provavelmente ocorreu na presença de um cristal líquido hexagonal, entretanto, em nenhum momento houve a caracterização da fase utilizada na síntese, e os autores nem sequer mencionaram que a fase era um cristal líquido, cuja estrutura somente aparece no modelo proposto para explicar os resultados [32].

Não há outros trabalhos publicados na literatura que se refiram à síntese de nanopartículas de HAP na presença de cristais líquidos, exceto os publicados pelo nosso grupo de pesquisa [33-34]. Entretanto, há um número significativo de trabalhos que relatam o emprego de surfactantes nas sínteses de HAP, pois os surfactantes também alteram a morfologia e o tamanho das partículas inorgânicas sintetizadas em sua presença, geralmente, pela sua adsorção seletiva em faces preferenciais do cristal em crescimento. Como a síntese de HAP é um processo bioinspirado, há vários trabalhos que relatam o emprego de proteínas específicas do processo de biomineralização na síntese de HAP [35-36]. Devido às proteínas possuírem domínios hidrofóbicos e hidrofílicos e apresentar estrutura tridimensional bem definida, elas podem se comportar de maneira semelhante a um surfactante e, provavelmente, este seja um fator importante para se compreender melhor o processo de biomineralização. Este processo, bem como algumas sínteses bioinspiradas serão tratados com maiores detalhes no tópico 1.5.

(a)



(b)



**Figura 7.** (a) Modelo proposto por Li e colaboradores para a síntese de HAP nanoporosa e (b) microscopia de transmissão das partículas obtidas [32].

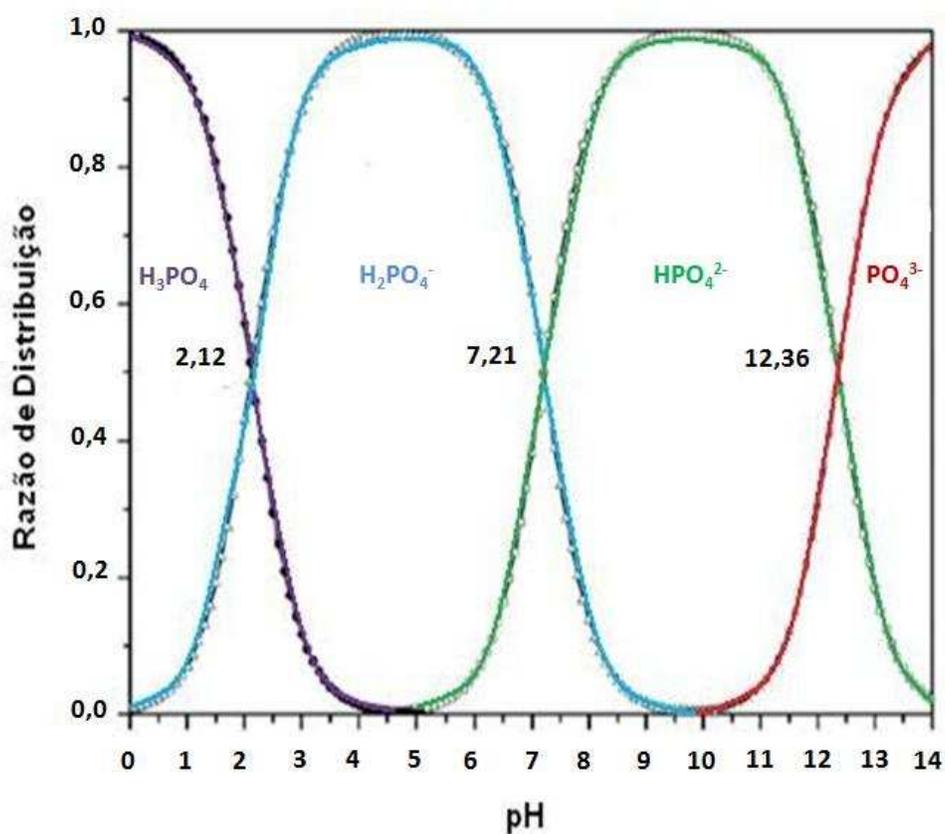
## 1.4. Hidroxiapatita: Síntese e Propriedades Fisico-Químicas

Apatitas são fosfatos de cálcio que possuem fórmula mínima  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}$ , sendo X os ânions  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{OH}^-$ , e estas apatitas denominadas fluorapatita, clorapatita e hidroxiapatita (HAP), respectivamente, sendo que esta última é o componente inorgânico majoritário dos tecidos mineralizados dos vertebrados. Na verdade, a química estrutural da HAP biológica é bastante complexa, porque não se trata de um mineral puro em termos de composição, mas sim, de um mineral deficiente em cálcio e rico em carbonato [4]. A carbonatação deve-se à substituição dos íons fosfato e hidroxila da HAP pelos íons carbonato, o que ocorre comumente no sistema biológico. A HAP, carbonatada ou não, possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, tratando-se de um excelente material para a substituição óssea e dentária e, portanto, sua síntese em laboratório tem sido alvo de grande interesse [4, 53].

Diversos métodos de síntese têm sido utilizados para a obtenção de HAP, tais como reações no estado sólido, precipitações a partir de soluções, processos hidrotérmicos, precipitação na presença de surfactantes, sínteses em sol-gel, entre outros [54]. Devido à solubilidade reduzida dos fosfatos de cálcio em meio aquoso (o que pode ser conferido nas tabelas contendo os produtos de solubilidade -  $K_{\text{PS}}$  - destes compostos) [54], a técnica de precipitação em via úmida tem se destacado, onde os fosfatos de cálcio são obtidos por precipitação a partir de soluções aquosas contendo íons cálcio e fosfato [4].

Uma das formas de obtenção da HAP por precipitação em via úmida é a sua formação a partir do aumento de pH de uma solução aquosa de ácido fosfórico contendo íons cálcio [33,55]. A medida que o pH da solução de ácido fosfórico é elevado, o equilíbrio se desloca no sentido de formar íons fosfato que são necessários para a precipitação da HAP, como pode ser visto através das equações de equilíbrio mostradas a seguir [37] e também pela Figura 8 que

apresenta uma razão de distribuição das espécies químicas presentes em solução em função do pH [60].



**Figura 8.** Distribuição dos íons referentes ao equilíbrio do ácido fosfórico em função do pH. Figura adaptada de Liu *et. al.*, 2012 [60].

A precipitação da HAP é dada na equação de equilíbrio mostrada a seguir:



Além dos equilíbrios referentes aos íons fosfato e da própria HAP, para a obtenção da HAP sintética deve-se atentar também para a razão entre os íons cálcio e fósforo presentes no meio reacional que deve ser igual a 1,67, que é a razão estequiométrica da HAP [54]. Outras razões Ca/P podem levar a formação de outros fosfatos de cálcio, o que não é desejável.

### **1.5. Nanopartículas de HAP: A biomineralização óssea e as sínteses bioinspiradas.**

As nanopartículas que compõem o tecido ósseo apresentam composição semelhante à HAP. Nos seres vivos, o estágio mais básico de organização óssea corresponde a cristais de HAP embebidos ou incrustados na matriz colagênica. O tamanho das partículas de apatitas nos tecidos rígidos está compreendido em uma faixa que varia de unidades até centenas de nanômetros [4-5].

A obtenção de partículas sintéticas de HAP com dimensões nanométricas, morfologia controlada e alinhamento em uma direção preferencial mimetiza a HAP biológica e pode trazer contribuições importantes para a elucidação do mecanismo de biomineralização, bem como pode contribuir para o desenvolvimento planejado de biomateriais, que serão utilizados no preenchimento ósseo ou dentário, com propriedades similares a dos tecidos que irão substituir [4].

O processo de biomineralização pode ocorrer de diferentes formas, as quais dependem, entre outros fatores, da etapa de desenvolvimento do animal,

visto que o tecido ósseo é constantemente remodelado ao longo da vida dos vertebrados [5-6, 37].

A osteogênese, formação do tecido ósseo em um ser vivo, ocorre em dois estágios principais, os quais são denominados de osteogêneses primária e secundária. Embora o mecanismo de formação óssea em cada estágio ocorra de maneira muito diferente, em ambos os casos há uma forte influência da matriz orgânica sobre a formação, crescimento e controle dos cristais de HAP. Enquanto que na osteogênese primária, o processo de biomineralização é mediado por vesículas de matriz, na osteogênese secundária, é o próprio colágeno quem controla a mineralização [5].

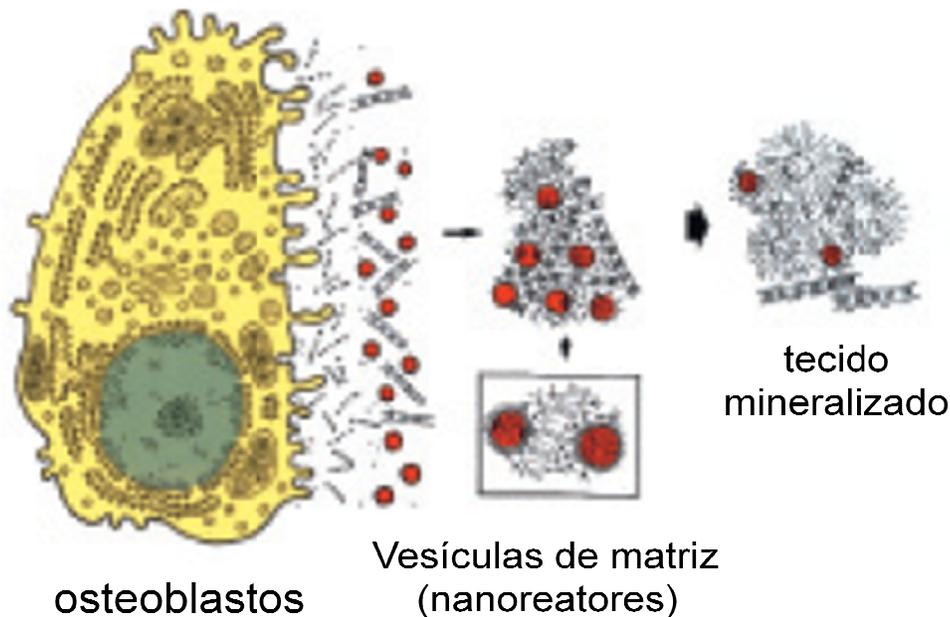
Na osteogênese primária, o processo de biomineralização ocorre na cartilagem epifisária onde há alta ocorrência de vesículas de matriz. As vesículas de matriz são vesículas esféricas, com dimensões da ordem de 20 a 200 nm, formadas a partir da membrana plasmática proveniente das células responsáveis pela formação do tecido mineralizado, como os condrócitos (células do tecido cartilaginoso), osteoblastos e odontoblastos, porém, a composição da membrana vesicular difere da membrana progenitora devido à presença de proteínas específicas [38].

Neste modelo de biomineralização, clusters de HAP se formam dentro da vesícula, a qual também é denominada de nódulo de calcificação, conforme mostra a Figura 9. Acredita-se que as vesículas de matriz se responsabilizam tanto pelo transporte dos cristais quanto pelo transporte de uma elevada concentração de íons, que são necessários para a biomineralização. Por esta razão, as vesículas de matriz podem ser consideradas como nanoreatores [5, 38-39].

Com o crescimento dos cristais de HAP, há o rompimento da membrana e a exposição da fase mineral ao meio externo. As proteínas não colagênicas se aderem às superfícies dos cristais dando continuidade ao seu processo de crescimento, e deste modo, o tecido ósseo vai sendo formado. Este modelo sugere que as fibrilas de colágeno encontradas na cartilagem, por serem muito

estreitas, impedem a deposição do mineral entre elas, e como consequência, só há a mineralização extrafibrilar [5, 38-39].

Neste mecanismo de biomineralização, o colágeno não tem um papel apreciável em controlar o processo, atuando apenas como uma espécie de suporte onde os cristais formados ficam embebidos [5, 38-39].



**Figura 9.** Modelo de osteogênese primária: os osteoblastos segregam vesículas de matriz, as quais atuam como sítios de nucleação onde se formam os primeiros cristais de HAp, com o crescimento, os cristais rompem a membrana vesicular dando continuidade à mineralização do tecido ósseo [39].

Na osteogênese secundária, a biomineralização é mediada pela matriz orgânica, que atua como um molde orgânico, cuja função é controlar a nucleação, o crescimento, a morfologia e a cristalinidade da fase mineral em formação [40]. Neste processo, os nanocristais de HAP são uniaxialmente orientados ao longo das fibrilas de colágeno, as quais se alinham de modo aproximadamente paralelo [5].

Olszta e colaboradores (2007) propuseram um modelo para explicar a osteogênese secundária atribuindo o controle do processo de mineralização às proteínas não colagênicas presentes na matriz orgânica, as quais regulam o crescimento dos cristais de HAP sobre as fibrilas de colágeno [5]

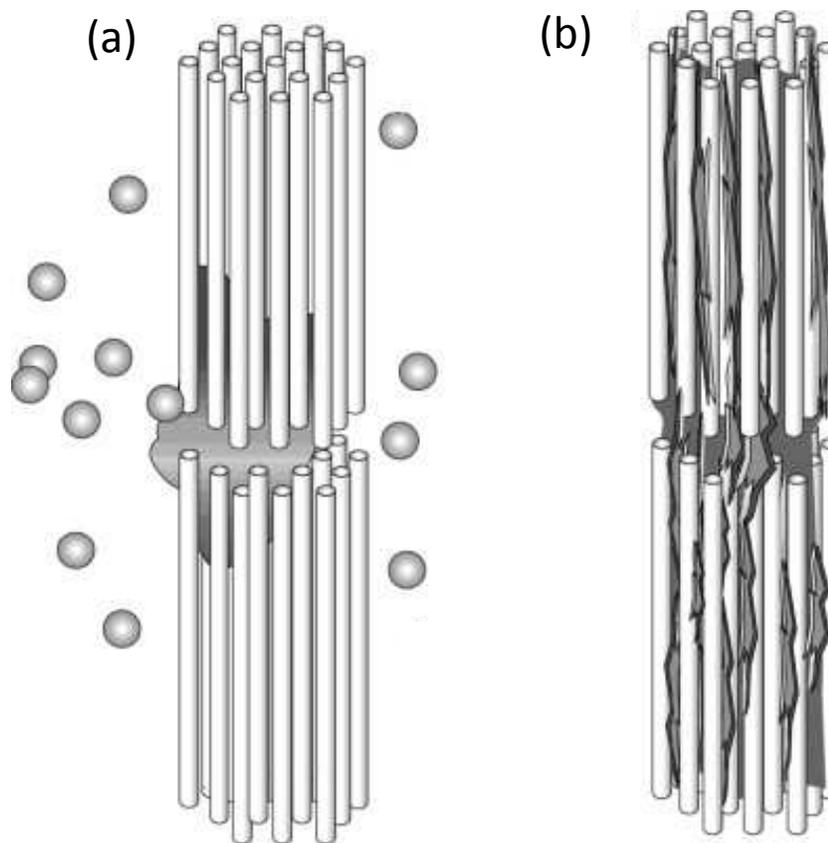
Uma observação experimental interessante que sustenta esta hipótese é que a precipitação de HAP ocorrida na presença de colágeno *in vitro* leva a formação de clusters de HAP heterogeneamente distribuídos sobre a matriz colagênica e não nanocristais uniaxialmente orientados como se observa nos tecidos mineralizados dos seres vivos [5,36]. Este resultado levou a conclusão de que há outras substâncias na matriz óssea orgânica que auxiliavam a organização e orientação dos cristais na matriz colagênica: as proteínas não colagênicas [5].

As proteínas não colagênicas são ricas em aminoácidos negativamente carregados, como o ácido aspártico que possui grupos carboxilatos livres capazes de quelar os íons cálcio e transportá-los no meio biológico. Assim, estas proteínas se comportam como uma espécie de reservatório de íons cálcio e fosfato e ao interagirem com as fibras de colágeno, favorecem a ocorrência da mineralização em um espaço restrito espacialmente e orientado [5].

Para comprovar este modelo, os autores realizaram a síntese da HAP sobre as fibrilas de colágeno utilizando um precursor líquido polimérico (ácido poliaspártico), denominado de PILP. Em contato com solução contendo íons cálcio e fosfato, o PILP forma uma micela polimérica, capaz de transportar os íons e se infiltrar entre as fibrilas de colágeno. A parte hidrofóbica do PILP interage com as fibras de colágeno, expondo os íons cálcio e fosfato, que ao serem desidratados solidificam e cristalizam formando a HAP, conforme mostra a Figura 10. Estudos de raios X mostraram que as nanopartículas de HAP, produzidas desta forma, se orientaram na mesma direção das fibrilas de colágeno [5].

É interessante notar que na biomineralização mediada por matriz orgânica, diferentemente da mediada por vesículas de matriz, os cristais de HAP se formam em um meio anisotrópico constituído pelo alinhamento das fibras de colágeno ao longo de uma direção preferencial, as quais se empacotam de maneira

praticamente paralela. Neste modelo, não há necessariamente uma limitação espacial como se observa no modelo vesicular, porém, os movimentos moleculares e a difusão iônica são restritos, como conseqüências inerentes ao meio colagênico. De maneira semelhante, a síntese de nanopartículas de HAP em cristais líquidos também ocorre na presença de um meio auto-organizado que pode ter orientação em uma direção preferencial (fases anisotrópicas).



**Figura 10.** Modelo proposto para a biomíneralização intrafibrilar: (a) as esferas representam o precursor polimérico (PILP) que leva os íons ao interior das fibras. Ao interagir com as fibras, os íons são liberados e a mineralização ocorre após a perda do excesso de água, levando os cristais de HAP a ficarem orientados na direção das fibras (b). Esquema adaptado de Olszta e colaboradores, 2007 [5].

As sínteses bioinspiradas são assim denominadas, pois imitam alguns aspectos do processo de biomineralização a serem investigados. Se todas as condições fisiológicas fossem rigorosamente respeitadas, a síntese da HAP seria denominada de biomimética, porém, sua compreensão seria tão complexa quanto entender a própria biomineralização.

Sínteses bioinspiradas de HAP têm sido conduzidas na presença de proteínas não colagênicas, tais como Amelogenina (Amel) e Serina e, de maneira interessante, a morfologia das partículas de HAP formadas nestas situações é de nanohastes [4,35]. Os autores discutem que a adsorção seletiva das proteínas em faces preferenciais de HAP, conduz ao crescimento dos cristais de HAP em uma direção preferencial, o que justifica a morfologia alongada na forma de nanohastes. Entretanto, um fator não mencionado, é que estas proteínas, de maneira análoga aos surfactantes, possuem domínios hidrofílicos e hidrofóbicos e, portanto, a capacidade de se auto-organizar [4]. O mecanismo proposto para a síntese de HAP na presença de Amel, por exemplo, considera que a proteína se auto-organiza em nanoesferas, as quais interagem com os íons cálcio via interações eletrostáticas com os grupos carboxilatos. As nanoestruturas esféricas são alinhadas em nanohastes de HAP, as quais são designadas como blocos construtores secundários do esmalte dentário [35].

## **1.6. Os Conceitos Norteadores desta Tese**

Nesta Tese, partículas de HAP foram sintetizadas por precipitação em solução aquosa tanto na presença quanto na ausência de surfactante, bem como em meios auto-organizados anisotrópicos e isotrópicos formados no sistema ternário de surfactante, solução aquosa e ciclohexano. Os sistemas auto-organizados correspondem a um meio onde o crescimento das partículas é orientado, havendo também a possibilidade destes meios controlarem a concentração de íons local através da limitação da difusão iônica [40]. Trata-se, portanto, de uma síntese bioinspirada que mimetiza algumas condições importantes do meio biológico onde ocorre a biomineralização.

Os surfactantes que foram utilizados nesta Tese são polietoxilados e, portanto, não iônicos que apresentam diferentes unidades de grupos etoxilados (EO). Esta versatilidade de cadeia hidrofílica permite formar diferentes estruturas de cristais líquidos incluindo fases isotrópicas e anisotrópicas, bem como sistemas normais e reversos, o que permite explorar diferentes ambientes para a síntese de HAP [21]. Os surfactantes polietoxilados apresentam como vantagens adicionais o fato de serem atóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e interagirem bem com íons cálcio [41, 42]. As cadeias etoxiladas presentes nestes surfactantes e que formam os compostos do tipo polietileno glicol (PEG), disponível comercialmente em vários tamanhos, se responsabilizam pela interação com os íons cálcio. Rossainy e Hubbell (1994) verificaram que hidrogéis de PEG sofreram calcificação quando implantados em ratos e os autores acreditam que um possível mecanismo para esta interação seja a quelação dos íons cálcio pelos oxigênios pertencentes ao grupo éter da cadeia etoxilada do PEG [41]. De maneira análoga, Varaksa e colaboradores (1996) atribuíram esta capacidade de coordenação de íons cálcio, denominada de efeito “calcitrópico”, ao surfactante etoxilado C<sub>6</sub>EO<sub>10</sub> [42]. Assim, nesta Tese, surfactantes etoxilados com diferentes tamanhos de cadeia etoxilada foram considerados como potenciais candidatos para o estudo de precipitação *in situ* de HAP.

Assim, na execução desta Tese, foram considerados como conceitos norteadores:

1) Os tecidos rígidos dos vertebrados são constituídos por nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) organizadas em diferentes níveis hierárquicos. Os mecanismos de biomineralização aceitos propõem que estas nanopartículas foram originadas em um ambiente protéico, muitas vezes, orientado e espacialmente restrito.

2) A precipitação de nanopartículas de HAP *in situ* em cristais líquidos é um processo bioinspirado em que alguns aspectos do ambiente biológico são mimetizados tais como: a existência de domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, a possibilidade de orientação e a restrição espacial.

**3)** O uso de surfactantes nonilfenil etoxilados, com cadeias etoxiladas com diferentes comprimentos permite explorar a versatilidade do comprimento da cadeia hidrofílica do surfactante tanto sobre a formação das partículas de HAP, bem como, na formação dos próprios sistemas auto-organizados, propiciando diferentes ambientes onde a precipitação ocorre. A formação de HAP nos diferentes ambientes (sem organização ou auto-organizados, havendo ou não orientação), pode contribuir para a compreensão dos ambientes biológicos onde a mineralização ocorre.



## 2. Objetivos

Os objetivos gerais desta Tese de Doutorado contemplam:

- (i) Utilizar surfactantes nonilfenil etoxilados com diferentes tamanhos de domínios hidrofílicos para preparar sistemas auto-organizados ternários, constituídos por surfactante, solução aquosa e ciclohexano;
  
- (ii) Avaliar a influência dos sistemas auto-organizados nas propriedades das partículas sintetizadas *in situ*, principalmente no que se refere ao controle morfológico e dimensional destas partículas;
  
- (iii) Propor mecanismos que justifiquem o controle das propriedades das nanopartículas precipitadas nos diferentes sistemas auto-organizados.

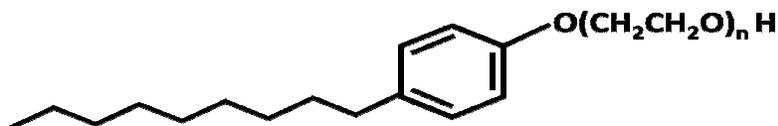


## 3. Parte Experimental

### 3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nesta Tese foram: acetona Synth; ácido fosfórico Synth; álcool etílico Synth; álcool isopropílico Synth; ciclohexano Synth; hidroxiapatita Fluka, hidróxido de amônio Synth, nitrato de cálcio Synth; óxido de deutério Cambridge Isotope Laboratories Inc.; polióxido etileno glicol com massa molecular de  $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  – PEG 1000 (Riedel-de-Haen) e surfactantes nonilfenil etoxilados da Oxiteno.

Os surfactantes utilizados são disponíveis comercialmente com diversos tamanhos de cadeia etoxilada e são denominados de Renex® ou Ultranex®. A Figura 11 mostra a estrutura destes surfactantes e a Tabela 2 contém os nomes comerciais e lotes dos surfactantes, bem como e as nomenclaturas que foram adotadas nesta Tese.



**Figura 11.** Fórmula estrutural dos surfactantes nonilfenil etoxilados.

**Tabela 2.** Surfactantes nonilfenil etoxilados utilizados nesta Tese.

<b>Unidades etoxiladas (n)</b>	<b>Nomes comerciais</b>	<b>lote do surfactante utilizado</b>	<b>Nome adotado</b>
04	Renex-40/ Ultranex NP 40	060605C34654	S-04
06	Renex-60 / Ultranex NP 60	060605C34650	S-06
10	Renex-100 / Ultranex NP 100	061226C42139	S-10
15	Renex-150 / Ultranex NP 150	040323C9270	S-15
20	Renex-200 / Ultranex NP 200	080709C61433	S-20
23	Renex-230 / Ultranex NP 230	081005C64701	S-23
30	Renex-300 / Ultranex NP 300	070422C46336	S-30

## **3.2. Procedimentos**

### **3.2.1 Avaliação do método de síntese de HAP e remoção dos componentes orgânicos**

As sínteses das partículas foram realizadas *in situ* através da precipitação causada pelo aumento de pH dos sistemas auto-organizados. Estes sistemas foram formados por surfactante, ciclohexano e solução aquosa de íons cálcio e fosfato (nitrato de cálcio e ácido fosfórico), com razão Ca/P igual a 1,67 e em pH

2,0. Assim, o aumento de pH dos sistemas levava a formação de HAP via precipitação.

O preparo dos sistemas auto-organizados, também denominados de fases, está descrito em detalhes no tópico 3.2.3.1. Como as sínteses ocorriam pela precipitação causada pela elevação do pH das fases, foram testados inicialmente dois procedimentos para a elevação do pH. Para este estudo exploratório, uma fase preparada com o surfactante contendo 10 unidades etoxiladas, a fase LC-10, foi escolhida para avaliar duas possíveis formas de elevação do pH:

- (i) Através da mistura de duas fases preparadas separadamente;
- (ii) Através da permeação de amônia na fase.

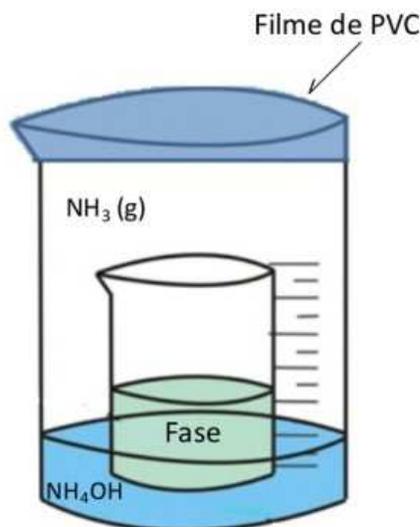
No primeiro método de síntese, duas fases são preparadas separadamente. A primeira fase contém nitrato de cálcio e ácido fosfórico (em pH 2) como solução aquosa e a segunda, hidróxido de amônio. As composições em porcentagens de massa foram:

- Fase I: 45,5% de S-10, 45,5% de solução aquosa contendo íons cálcio e fosfato e 9,0% de ciclohexano.

- Fase II: 45,5% de S-10: 45,5% de solução aquosa de hidróxido de amônio  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  e 9,0% de ciclohexano.

A elevação do pH ocorreu pela adição lenta de pequenas quantidades da fase II à fase I. O sistema era constantemente homogeneizado com uma espátula e, ao término da adição, era mantido em repouso por 10 dias.

O segundo método de síntese consistiu em deixar a fase (preparada com solução aquosa de nitrato de cálcio e ácido fosfórico, em ambiente fechado contendo solução de amônia durante 10 dias. A solução de amônia libera gás amônia que permeia a fase elevando o seu pH. A Figura 12 mostra um diagrama ilustrando a montagem utilizada no procedimento de síntese.



**Figura 12.** Diagrama ilustrando o sistema usado para permeação das fases com gás amônia e consequente precipitação *in situ* dos fosfatos de cálcio.

Basicamente, a diferença entre estes dois procedimentos está na cinética do processo, pois no método de mistura de fases, acredita-se que os fosfatos de cálcio se formem imediatamente após o contato entre as micelas, enquanto que no método de precipitação por permeação de amônia, as partículas são formadas após a permeação do vapor de amônia por um sistema viscoso, o que resultaria na elevação gradativa do pH ao longo do tempo de permeação.

Após a sua formação, os fosfatos de cálcio foram separados das fases utilizadas nas sínteses, e novamente, 2 procedimentos de remoção dos componentes orgânicos foram avaliados:

- (i) Queima das fases a 500 °C;
- (ii) Lavagem das fases com etanol e extração com acetona em soxlet.

No primeiro método de remoção dos componentes orgânicos, os sistemas foram aquecidos em forno Edgcon 3P. O processo de aquecimento foi lento e gradual, para evitar alterações morfológicas e dimensionais nas partículas de fosfato de cálcio com a eliminação dos componentes orgânicos. A Tabela 3 mostra

as condições sob as quais as amostras foram aquecidas para eliminar as fases e obter os fosfatos de cálcio. As amostras permaneceram por 10 horas a 500 °C.

**Tabela 3.** Condições de aquecimento das amostras para eliminação dos componentes orgânicos.

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de repouso (h)
02	50	1
02	100	1
02	200	1
05	500	10

A coluna “tempo de repouso” da Tabela 3, refere-se ao tempo que os sistemas permaneceram no forno, com a temperatura constante, antes de serem aquecidos novamente.

O segundo método de remoção dos componentes orgânicos consistiu na lavagem das fases com etanol e extração com acetona em soxlet.

Assim, após a formação dos fosfatos de cálcio, as fases foram lavadas com etanol e centrifugadas em centrífuga Tomy IC-15SN, descartando-se os sobrenadantes. Este procedimento foi repetido por quatro vezes. Após isto, as amostras foram filtradas a vácuo e depois envoltas em papel de filtro e extraídas com acetona em soxlet.

As demais sínteses descritas nesta Tese (próximos tópicos) foram feitas utilizando-se o método de precipitação via permeação de amônia e a remoção dos componentes orgânicos foi feita por aquecimento a 500 °C.

### **3.2.2. Síntese de HAP nos sistemas de comparação.**

Visando avaliar o efeito dos sistemas auto-organizados na formação da HAP, as sínteses foram também realizadas em outras situações para fins de comparação. As situações foram:

- (i) na ausência de surfactante;
- (ii) na presença de concentração reduzida de surfactante ( $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  de S-10), a qual é inferior à CMC;
- (iii) na presença de polietilenoglicol 1000, PEG-1000.

O PEG-1000 é um composto que contém aproximadamente 23 grupos etoxilados e, portanto, é semelhante à parte polar do surfactante S-23. Assim, a fase formada com PEG-1000 foi denominada PEG-23, em que o número 23 refere-se à quantidade média de unidades etoxiladas por molécula de PEG.

### **3.2.3. Síntese de HAP nos sistemas auto-organizados.**

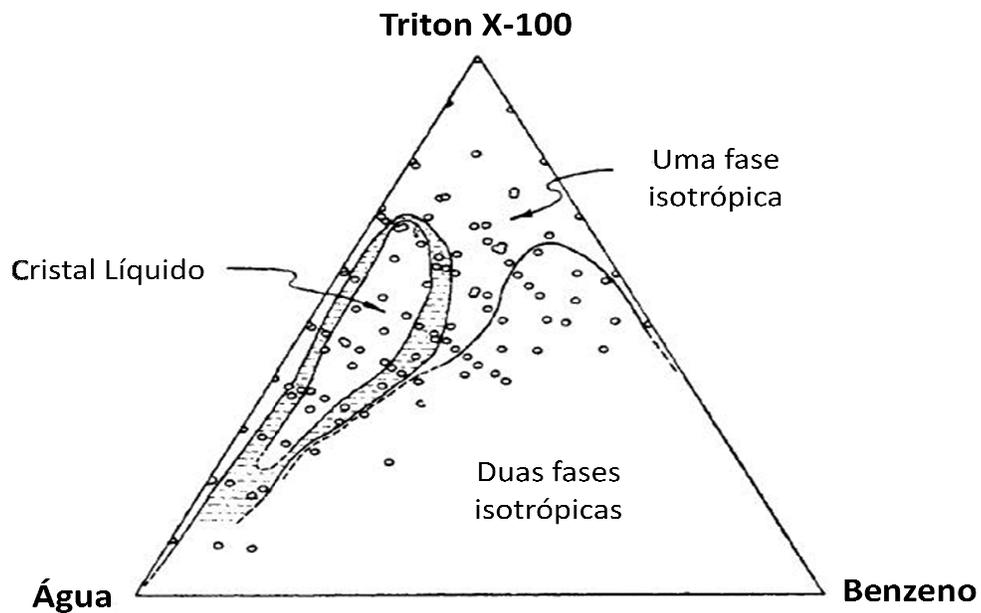
#### **3.2.3.1 Preparação dos Sistemas Auto-Organizados**

Os sistemas auto-organizados, utilizados na síntese da HAP, foram preparados pela mistura de surfactante, solução aquosa e ciclohexano mantendo-se a proporção de 45,5%: 45,5%: 9,0%, respectivamente, em porcentagem de massa. A solução aquosa utilizada foi preparada misturando-se volumes iguais das soluções de nitrato de cálcio  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  e ácido fosfórico  $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ , com pH final igual a 2, resultando em uma solução com concentração final de  $\text{Ca}^{2+}$  e ácido fosfórico de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente.

A composição dos sistemas foi baseada em trabalhos anteriores partindo-se do diagrama de fases do Triton X-100®, o qual é estruturalmente análogo ao

Renex-100® (S-10). A Figura 13 mostra o diagrama de fases ternário para um sistema de surfactante Triton X-100, água e benzeno, permitindo verificar que os cristais líquidos se formam em regiões com maiores proporções de água e surfactante e menor proporção de benzeno [33,43].

As fases foram denominadas de acordo com a quantidade de unidades etoxiladas do surfactante utilizado como pode ser visto na Tabela 4.



**Figura 13.** Diagrama de fases para o sistema ternário: Triton X-100, água e benzeno [43].

**Tabela 4.** Nomenclatura das fases que foram utilizadas na síntese dos fosfatos de cálcio.

Surfactante usado	Fase
S-04	LC-04
S-06	LC-06
S-10	LC-10
S-15	LC-15
S-20	LC-20
S-23	LC-23
S-30	LC-30

Apenas o sistema formado com S-04 separou fase: formou-se uma fase pouco viscosa e incolor (em pequena quantidade) e uma fase mais viscosa e opaca. O sistema foi centrifugado a 5000 rpm durante 20 minutos em centrífuga Eppendorf 5810R e então a fase inferior (pouco viscosa e incolor) foi descartada, enquanto a fase superior foi denominada LC-04.

### 3.2.3.2 Caracterização dos Sistemas Auto-Organizados

As fases listadas na Tabela 4 foram caracterizadas por microscopia óptica com luz polarizada (POM), Ressonância Nuclear Magnética (NMR) e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).

Para a análise por POM utilizou-se microscópio Nikon Eclipse 80i com dois polarizadores que podiam ser cruzados para se observar a birrefringência. O microscópio foi acoplado a uma câmera Nikon digital Sight DS-Fi1. As amostras foram colocadas entre uma lâmina e uma lamínula e observadas no microscópio para verificar se eram anisotrópicas.

As medidas de NMR foram realizadas usando-se equipamento Inova 500. As fases a serem medidas foram preparadas pela substituição da solução aquosa

contendo os íons cálcio e fosfato por uma outra solução com mesma composição, mas contendo também 10% de D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories, Inc, 99,9%). As fases foram colocadas em tubos de vidro para RMN com 10 mm de diâmetro utilizando-se uma seringa e um tubo flexível de PVC.

As medidas de SAXS foram realizadas na linha D11A-SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), com o detector posicionado a 1039,983 cm do porta-amostra. As fases formadas com os surfactantes contendo até 20 grupos etoxilados, por serem menos viscosas, foram injetadas com uma seringa no porta-amostra e as demais foram colocadas no porta-amostra com uma espátula. Previamente à análise as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos para eliminação das bolhas de ar presas no material devido a sua viscosidade.

### **3.2.3.3 Caracterização dos Materiais Sintetizados**

Todos os materiais sintetizados foram caracterizados empregando-se as técnicas de espectroscopia na região do infra-vermelho (FTIR), difratometria de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (SEM-FEG).

Para a análise de FTIR foi utilizado um espectrômetro Bomem B 100 com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. O material foi analisado na forma de pastilhas, após ser prensado com KBr.

As análises de DRX foram realizadas em um equipamento Shimadzu XRD7000 operado a 40 kV e 30 mA na faixa 05° < 2θ < 65° e com velocidade de aquisição de 2°/min. Previamente à análise, as amostras foram trituradas em almofariz de ágata e analisadas em um porta-amostra de vidro.

As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura JSM6360-LV. As amostras foram fixadas em porta-amostra de cobre-zinco

utilizando-se fita de carbono. Para a obtenção das imagens, as amostras foram recobertas com carbono e ouro em metalizador Bal-Tec MCS 010.

As micrografias por SEM-FEG foram feitas no LNLS usando-se microscópio Zeiss Supra 55VP. Os fosfatos de cálcio foram colocados em isopropanol e ultrassonicados utilizando-se uma sonda de ultrassom (Sonics – cell vibration) durante 30 minutos. Após este procedimento, uma gota da dispersão foi colocada sobre um monocristal de silício e deixada secar a temperatura ambiente. A amostra foi recoberta com carbono em metalizador Bal-Tec MCS 010 e então observada no microscópio.

### **3.2.4 Estudo da Formação das Nanopartículas de HAP nos Sistemas Auto-Organizados**

Para compreender como os cristais líquidos controlam as propriedades das partículas de fosfatos de cálcio, foram obtidas curvas de SAXS de três sistemas independentemente:

- I) apenas dos sistemas auto-organizados;
- II) dos sistemas auto-organizados após a permeação de amônia, onde houve a precipitação da hidroxiapatita, visando compreender como as partículas de HAP se dispõem *in situ* após a sua precipitação nos sistemas;
- III) dos sistemas auto-organizados formados com nitrato de amônio  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  como solução aquosa (ao invés da solução contendo íons cálcio e fosfato). Estes sistemas foram analisados porque simulam a força iônica e a composição do meio após a formação das nanopartículas de HAP.

As medidas de SAXS foram feitas nas mesmas condições descritas na Seção 3.2.3.2.

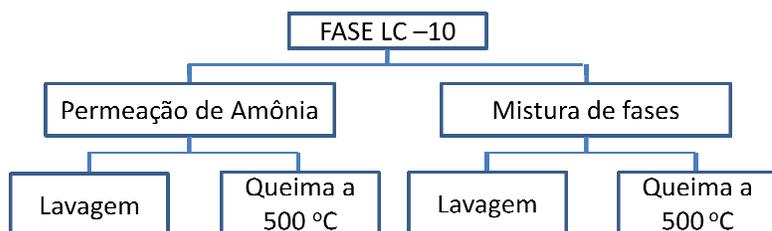
Também foram realizadas medidas de tempo de relaxação spin-spin ( $T_2$ ) por NMR para avaliar o grau de liberdade das moléculas de água nos sistemas auto-organizados e com isto, avaliar o papel da difusão iônica na formação das nanopartículas.

As medidas de  $T_2$  foram realizadas no espectrômetro de ressonância nuclear magnética Varian (INOVA 500) operando a 500 MHz. Para a obtenção das medidas, as amostras foram colocadas em tubos de vidro de 5 mm de diâmetro utilizando-se uma seringa e um tubo flexível de PVC. Para a determinação dos valores de  $T_2$  foram utilizadas as áreas dos picos da água ( $\delta\omega \cong 4,77$ ), cujas intensidades são proporcionais à intensidade do FID logo imediatamente após o começo da aquisição do sinal. A sequência utilizada foi a CPMG  $90^\circ[180^\circ \tau-180^\circ]_n$ . Foram escolhidos tempos de espera finais de maneira tal que a magnetização (intensidade do pico) decaísse a um valor inferior a 5% da intensidade em  $t=0$ . Cada pico foi obtido a partir da média de 4 scans com tempo de reciclagem ou de espera de 8 – 10 s de maneira que este tempo fosse superior a  $5T_1$ .

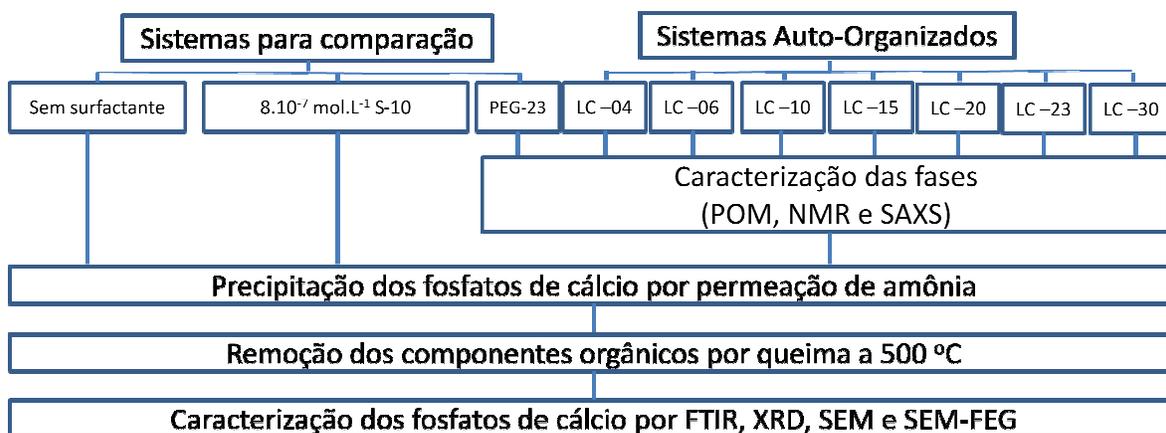
### **3.3. Fluxograma da Parte Experimental**

A Figura 14 mostra um fluxograma que ilustra a sequência de todos os procedimentos da parte experimental facilitando a visualização das etapas envolvidas na síntese e a compreensão da formação da HAP nos diversos sistemas.

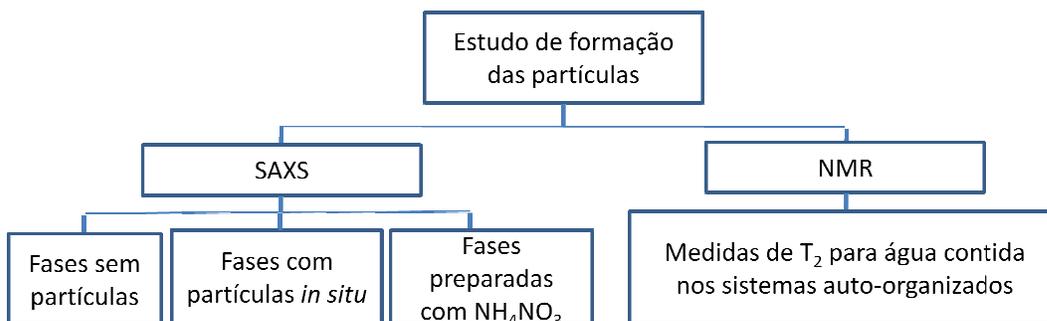
### 1ª Etapa: Avaliação dos Métodos de Síntese e de Remoção dos Componentes Orgânicos



### 2ª Etapa: Síntese de HAP nos sistemas auto-organizados e nos sistemas de comparação



### 3ª Etapa: Estudo da formação das nanopartículas de HAP nos sistemas auto-organizados



**Figura 14.** Fluxograma da parte experimental.

## 4. Resultados e Discussão

Neste trabalho, nanopartículas de hidroxiapatita foram obtidas via precipitação *in situ* em cristais líquidos liotrópicos formados por surfactante, solução aquosa (contendo íons cálcio e fosfato) e ciclohexano. A precipitação das nanopartículas ocorreu via elevação do pH da solução aquosa, a qual é uma mistura de ácido fosfórico e nitrato de cálcio e corresponde ao domínio aquoso do cristal líquido.

A precipitação das partículas de HAP ocorre porque à medida que o pH dos sistemas auto-organizados é elevado pela permeação e dissolução da amônia gasosa ou pela coalescência das micelas dos sistemas auto-organizados contendo as soluções de hidróxido de amônio e nitrato de cálcio, os equilíbrios da solução de ácido fosfórico são deslocados formando os íons  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , como pode ser visto na Figura 8 da Seção 1.4. Quando o pH do meio atinge valores próximos de 12 o íon predominante é o fosfato, o que resulta na formação da hidroxiapatita. A precipitação da hidroxiapatita nos sistemas é favorecida por questões de solubilidade, pois os sais  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$  e  $\text{CaHPO}_4$ , que precipitariam em pHs menores, apresentam solubilidades consideravelmente elevadas em relação à HAP [59].

Os surfactantes utilizados foram nonilfenil etoxilados com diferentes tamanhos de cadeia etoxilada. A variação do comprimento da cadeia etoxilada permitiu obter diferentes cristais líquidos abrangendo fases isotrópicas e

anisotrópicas. Devido aos cristais líquidos serem reconhecidos na literatura como moldes flexíveis, foi possível avaliar a influência destas fases nas propriedades das nanopartículas de HAP, sobretudo, com relação às dimensões e morfologias destas partículas.

Na Tese, a apresentação dos resultados foi dividida em 4 partes para tornar didático o encadeamento dos objetivos. Estas partes compreendem principalmente: (i) avaliação do método de síntese e remoção dos componentes orgânicos; (ii) síntese de HAP em sistemas comparativos, ou seja, sistemas sem auto-organização; (iii) síntese de HAP nos sistemas auto-organizados (cristais líquidos) e (iv) propostas de mecanismos para o controle das propriedades físico-químicas das nanopartículas de HAP precipitadas nos sistemas auto-organizados.

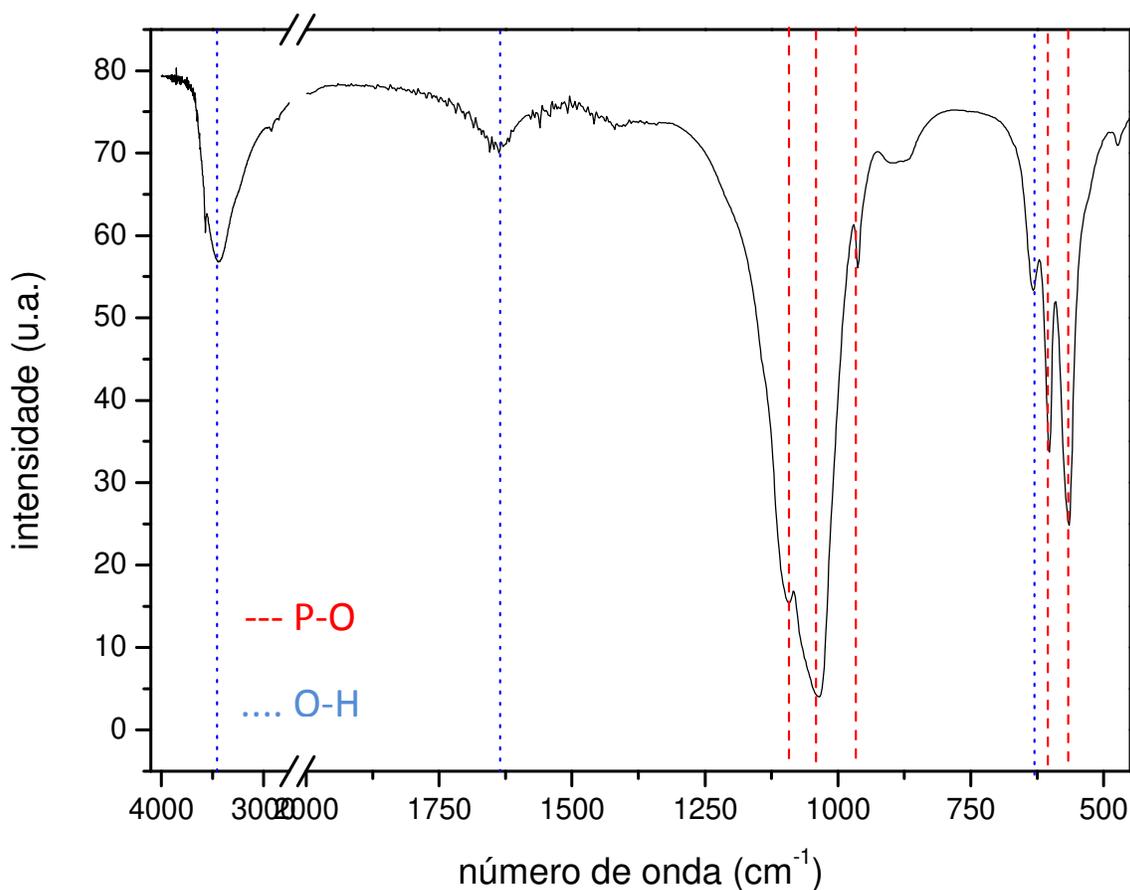
Além dos resultados diretamente pertinentes ao trabalho, o composto HAP disponível comercialmente foi caracterizado por FTIR e DRX para facilitar a comparação com os resultados obtidos para os materiais sintéticos.

#### **4.1. Caracterização da Hidroxiapatita**

Todos os materiais sintetizados nesta Tese, independentemente do sistema utilizado na síntese, foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e difratometria de raios X (DRX). Por esta razão, a HAP comercial também foi analisada por estas técnicas, visando facilitar a posterior comparação com os resultados obtidos para os materiais sintéticos.

A Figura 15 mostra o espectro de FTIR obtido para a HAP comercial -  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . As bandas observadas foram atribuídas às deformações, estiramentos e vibrações das ligações químicas correspondentes, como pode ser visto na Tabela 5. Para facilitar a visualização, as bandas atribuídas aos grupos

fosfatos foram indicadas na Figura 15 com as linhas verticais tracejadas enquanto que as bandas atribuídas às hidroxilas estão indicadas pelas linhas pontilhadas.

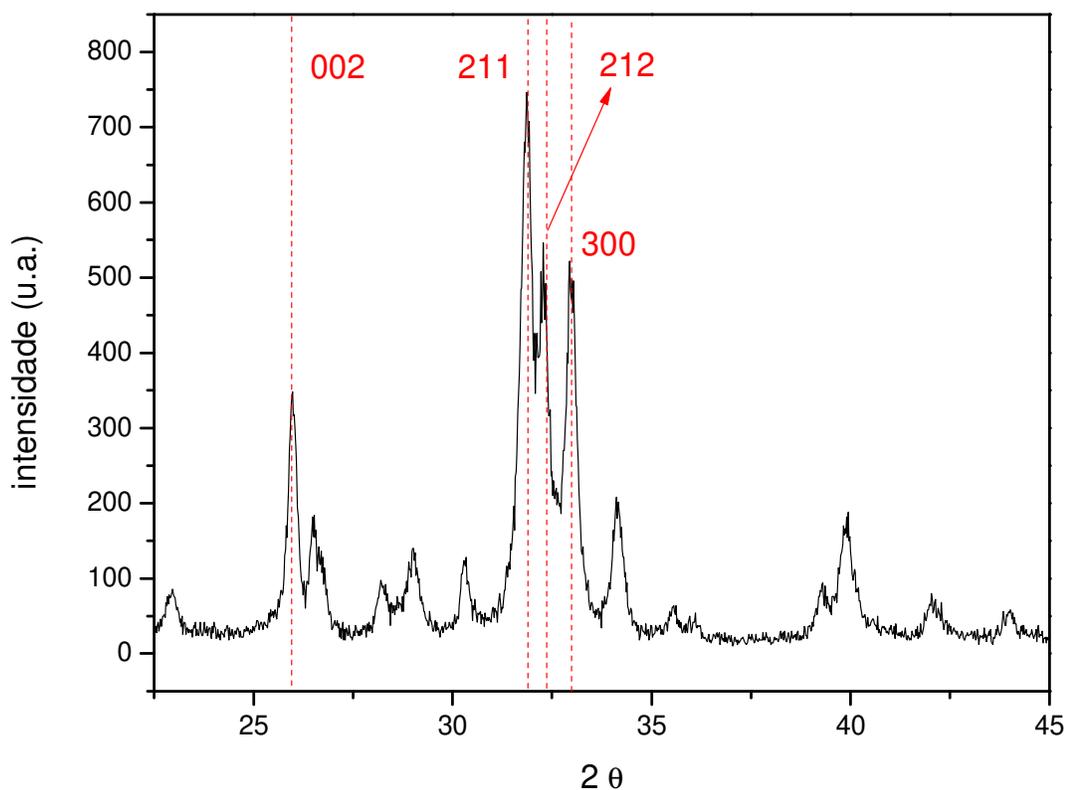


**Figura 15.** Espectro de FTIR para a HAP comercial. As linhas tracejadas indicam os grupos fosfato e as pontilhadas, os grupos hidroxilas.

A Figura 16 mostra o difratograma obtido por DRX para a HAP comercial. No difratograma, as linhas tracejadas indicam os picos mais intensos da HAP, cujos planos cristalinos estão indicados ao lado de cada pico. Este difratograma é concordante quando comparado com o disponível no banco de dados “Powder Diffraction File, International Centre for Diffraction Data, 1997”, para a HAP (JCPDS card 9-04321).

**Tabela 5.** Relação das bandas observadas nos espectros da Figura 15 e suas atribuições [33, 44-45].

Banda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
568, 603	Deformações assimétricas O-P-O
635	Vibração O-H de hidroxila
961	Estiramento assimétrico P-O
1035, 1096	Estiramentos assimétricos de $\text{PO}_3^-$
1636	Deformação de H-O-H de $\text{H}_2\text{O}$
3444	Estiramento O-H



**Figura 16.** Difratoograma de raios X obtido para a HAP comercial.

## 4.2. Avaliação dos Métodos de Síntese e Remoção dos Componentes Orgânicos.

As partículas de HAP foram precipitadas pela elevação de pH de uma solução aquosa contendo íons cálcio e fosfato, com razão Ca/P igual a 1,67 e, após a formação das partículas, os componentes orgânicos foram eliminados para permitir a análise de composição e morfologia das mesmas.

Inicialmente foi necessário avaliar se os diferentes procedimentos usados para a precipitação e eliminação de componentes orgânicos poderiam interferir na composição das partículas precipitadas.

Primeiramente, avaliou-se a influência que a velocidade de elevação do pH exerceria sobre a síntese da HAP *in situ* em um sistema auto-organizado testando-se dois métodos: o **método de mistura de fases** e o **método de permeação de amônia**, que estão descritos detalhadamente na seção 3.2.1. A diferença entre estes dois métodos se baseia na velocidade de formação das partículas de HAP. Enquanto no método de mistura de fases, as partículas se formam imediatamente após o contato entre as fases, no método de permeação de amônia, é necessário que o vapor de amônia permeie o cristal líquido, elevando o pH do sistema mais lentamente, e a medida que isto ocorre há a precipitação dos fosfatos de cálcio.

Após a formação das partículas de HAP, os componentes orgânicos foram removidos e dois métodos de remoção também foram testados, conforme descrito detalhadamente na seção 3.2.1: o **método de queima**, em que os componentes orgânicos das amostras foram removidos por degradação térmica e o **método de lavagem**, em que os componentes orgânicos foram removidos por lavagem exaustiva com solventes da fase orgânica.

A Figura 17 mostra os espectros dos materiais obtidos nas diferentes condições de síntese e de remoção dos componentes orgânicos. Nesta Figura, as linhas tracejadas em vermelho indicam as bandas atribuídas ao grupo fosfato (568, 603, 961, 1035 e 1096  $\text{cm}^{-1}$ ), as linhas tracejadas em azul indicam as

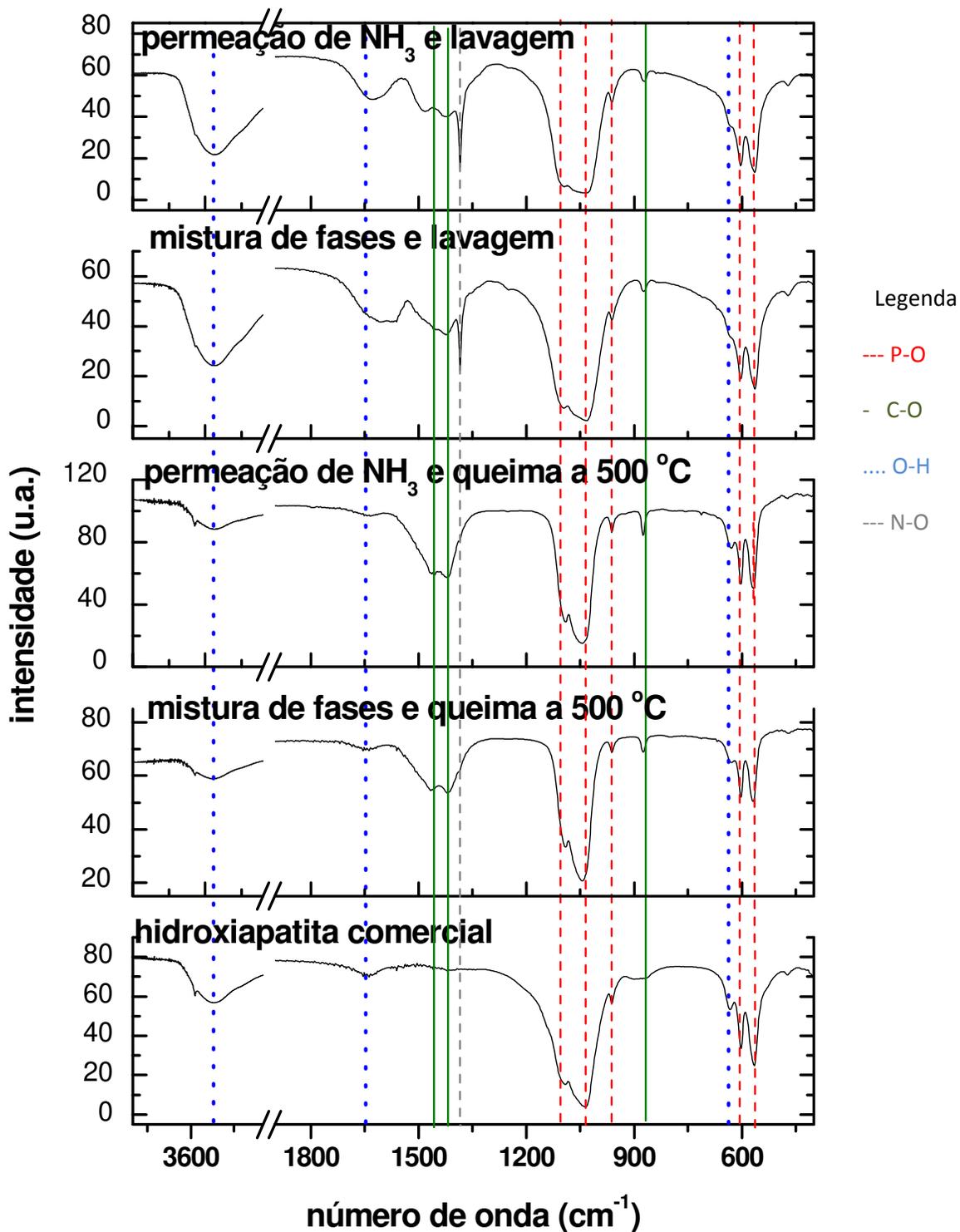
bandas atribuídas ao grupo hidroxila (635, 1636 e 3444  $\text{cm}^{-1}$ ), as linhas em verde indicam a presença de grupos carbonato (875, 1419 e 1465  $\text{cm}^{-1}$ ) e a linha tracejada em cinza indica a presença de nitrato (1384  $\text{cm}^{-1}$ ). As bandas características da HAP foram atribuídas conforme mostrado na Tabela 5 e as bandas atribuídas aos grupos carbonato e nitrato que estavam presentes no material sintetizado estão atribuídas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Relação das bandas observadas nos espectros da Figura 17 e suas atribuições [33,44-45].

Banda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
875	Deformação C-O
1384	Estiramento $\text{NO}_3^-$
1419, 1465	Estiramentos assimétricos de $\text{CO}_3^{2-}$

A análise dos espectros de FTIR indica que todas as amostras correspondem à HAP carbonatada. A incorporação de íons carbonato na estrutura da HAP é muito comum, pois estes íons são os maiores substituintes dos grupos hidroxila e fosfato da HAP biológica [7,54]. A carbonatação da HAP é um fator positivo, pois melhora a bioatividade do material, devido ao aumento de solubilidade [54].

Os íons carbonato incorporados na HAP poderiam ser provenientes do gás carbônico previamente dissolvido nas soluções utilizadas como reagentes ou decorrente da queima dos surfactantes, porém, como as amostras que foram lavadas também apresentaram incorporação de íons carbonato, a primeira hipótese é a mais provável.

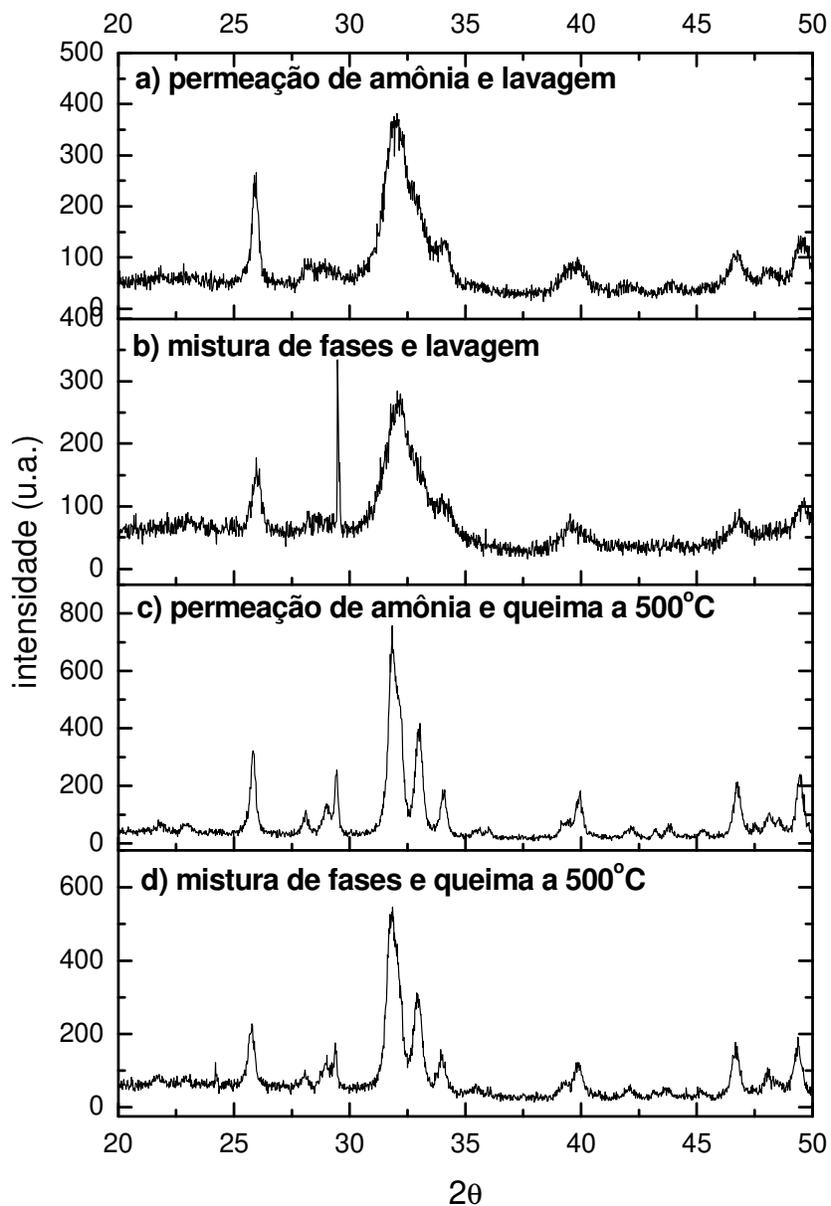


**Figura 17.** Espectros de FTIR dos materiais sintetizados pelos diferentes métodos de síntese e de remoção dos componentes orgânicos.

Apenas as amostras que foram lavadas apresentaram bandas atribuídas ao estiramento de N-O, em  $1384\text{ cm}^{-1}$ , que foram indicadas com a linha tracejada cinza. Este resultado indica a presença de íons nitrato proveniente do reagente nitrato de cálcio, o qual não foi completamente removido no procedimento de lavagem. As bandas de hidroxila das amostras que foram lavadas também foram mais intensas quando comparadas às amostras queimadas, indicando a possibilidade de haver água adsorvida nestes materiais.

Os materiais obtidos pelas diferentes condições de síntese e de remoção dos componentes orgânicos também foram analisados por DRX e os difratogramas são mostrados na Figura 18. Estes difratogramas foram comparados com o obtido para a HAP comercial (Figura 16) e também com o difratograma disponível no banco de dados para a HAP (JCPDS, card 9-04321).

Observando-se a Figura 18, nota-se que os difratogramas de raios X de todas as amostras apresentaram picos nas posições esperadas, ou seja, referentes aos planos cristalinos 002, 211 e 212 (sobrepostos) e 300 da HAP, que estão indicados na Figura 16. A sobreposição dos picos referentes aos planos 211 e 212 é uma evidência da carbonatação [47]. A única exceção refere-se à amostra preparada via mistura de fases e que foi lavada (Figura 18 b), cujo difratograma apresentou um pico adicional bastante fino e intenso em  $2\theta = 29,4^\circ$ , o que poderia indicar a presença de calcita. A existência de calcita na amostra, no entanto, seria evidenciada pela presença de um pico em torno de  $714\text{ cm}^{-1}$  no espectro de FTIR, o que não foi observado na Figura 17 [46]. A ausência de picos adicionais nos espectros de FTIR dificulta atribuir o pico de DRX à calcita e, aliado a este fato, a comparação deste difratograma com os disponíveis no banco de dados também não possibilitou a atribuição do pico.

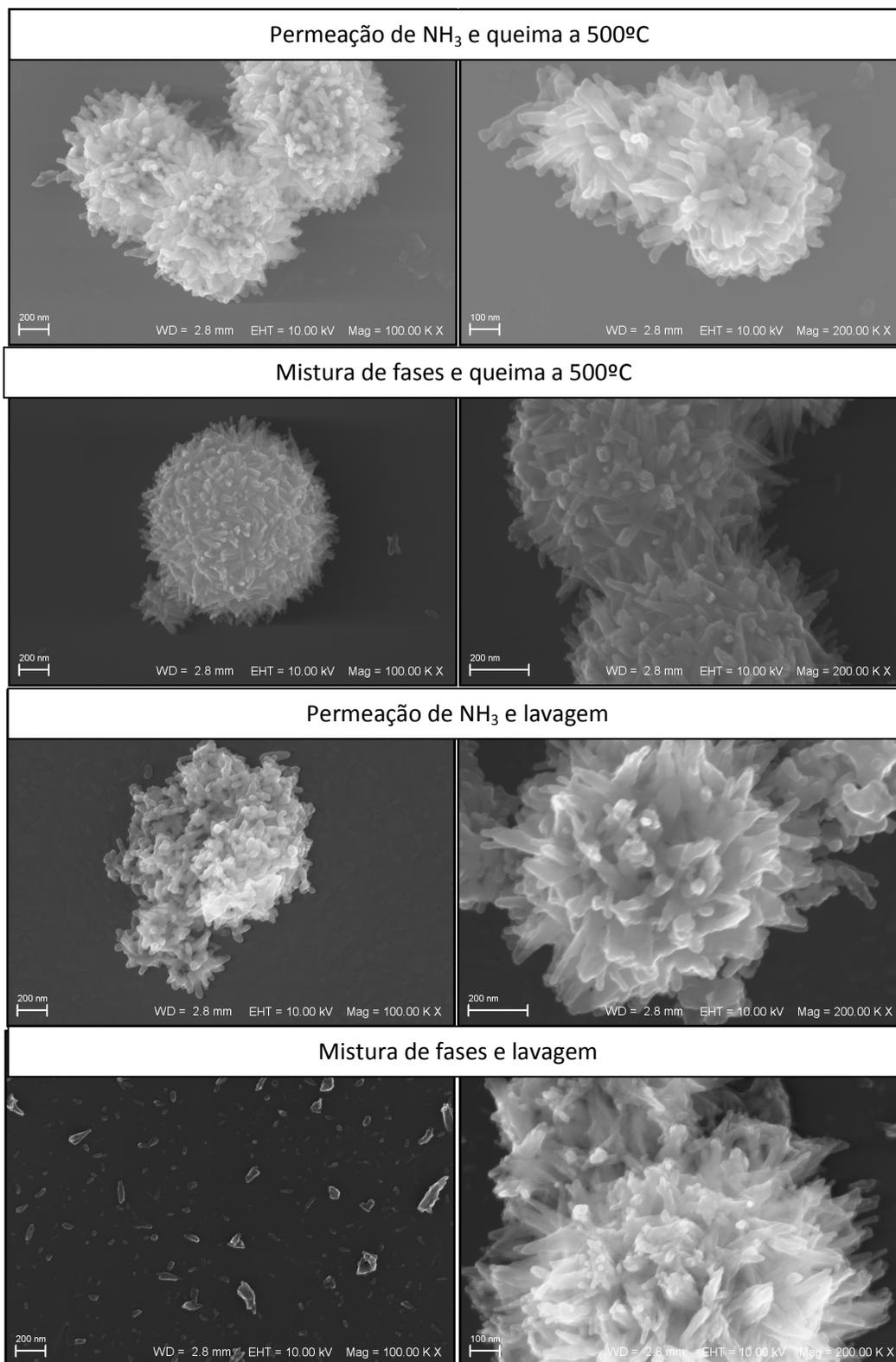


**Figura 18.** Difratoograma de Raios X dos fosfatos de cálcio sintéticos obtidos em cristal líquido, com diferentes condições de síntese e de remoção dos componentes orgânicos.

Comparando-se ainda os difratogramas da Figura 18 não foi possível notar nenhuma evidência que mostre diferenças entre os materiais sintetizados pelos dois métodos de síntese, no entanto, com relação aos métodos de remoção dos componentes orgânicos, nota-se claramente que as amostras que foram lavadas apresentaram picos de difração bem mais largos quando comparados aos picos das amostras que foram queimadas a 500°C. Entre os fatores que causam alargamento nos picos de difração de raios X estão a presença de impurezas no retículo cristalino e o tamanho reduzido dos cristais na amostra [37, 47].

Como os espectros de FTIR indicaram a presença de íons carbonato em todas as amostras e apenas as que foram lavadas apresentaram picos de difração alargados, é provável que este alargamento não seja causado pela incorporação dos íons carbonato, e sim, uma consequência destas amostras serem formadas por cristalitos de HAP menores quando comparadas às amostras que foram queimadas. O tratamento térmico das amostras poderia ter provocado a coalescência dos cristalitos formando cristais maiores, o que explicaria os picos de difração mais definidos para as amostras que foram queimadas a 500°C. Para avaliar esta hipótese, foram obtidas micrografias dos materiais por SEM-FEG como mostra a Figura 19.

Observa-se pela Figura 19 que, independentemente do método de síntese e de remoção dos componentes orgânicos, a morfologia dos materiais apresentou-se na forma de hastes com diâmetros regulares e que as hastes se aglomeraram formando estruturas que lembram ouriços do mar.



**Figura 19.** Micrografias dos fosfatos de cálcio obtidos na fase LC-10 pelos diferentes métodos de síntese e remoção dos componentes orgânicos, explícitos acima das imagens.

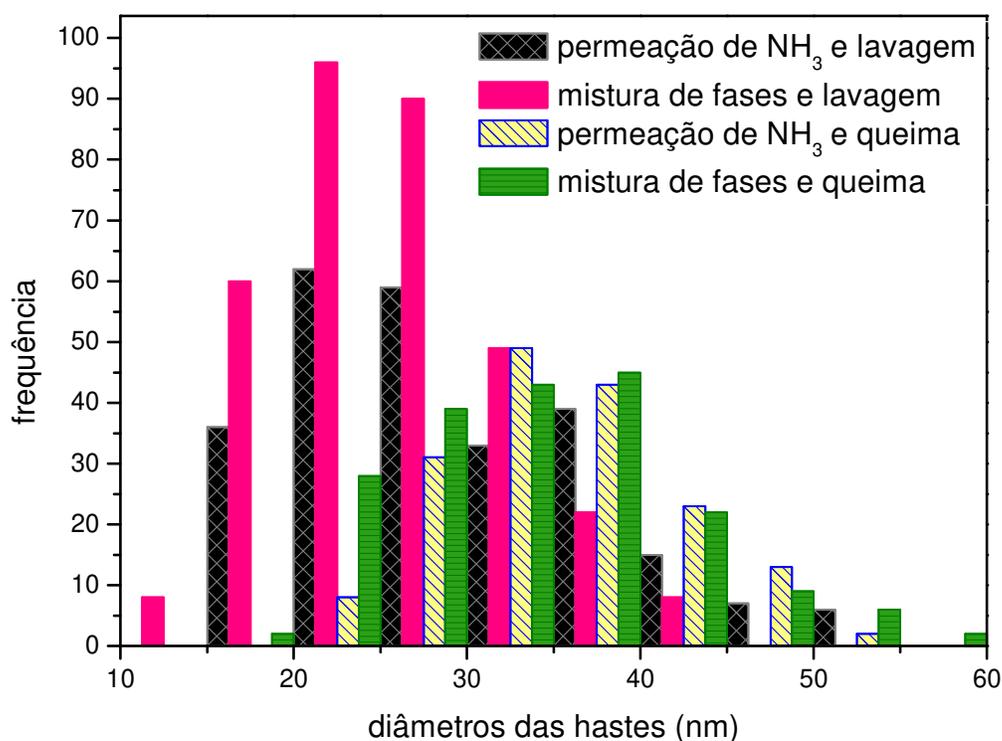
Uma observação interessante é que apenas a amostra que foi preparada pelo método de mistura de fases e que foi lavada apresentou facilidade de se desaglomerar, ou seja, foi possível observar imagens de hastes isoladas (micrografia da esquerda) embora também fossem observadas imagens de hastes aglomeradas como “ouriços” (micrografia da direita). Antes da análise microscópica, as amostras foram submetidas ao ultrassom por 30 minutos em isopropanol visando desaglomerá-las, no entanto, a desaglomeração foi observada apenas para a amostra citada. Em estudos paralelos, observou-se que as amostras que foram lavadas apresentaram hastes isoladas. Este fato será novamente verificado e discutido em um tópico posterior desta Tese (Seção 4.5) para uma amostra também submetida ao processo de lavagem exaustiva com solvente para remoção dos meios de síntese, sugerindo que o aquecimento das amostras leva à compactação das hastes, mas a lavagem não.

Para avaliar se os métodos de precipitação ou de remoção dos componentes orgânicos do meio de síntese influenciaram na dimensão das partículas de HAP sintéticas, foram feitas medidas dos diâmetros das hastes a partir de todas as imagens obtidas, usando-se o software ImageTool versão 3.00, um software gratuito que pode ser baixado pela internet. Optou-se por medir os diâmetros das partículas, pois, a aglomeração das hastes na forma de ouriços dificulta a medida dos seus comprimentos. A Tabela 7 apresenta as médias e desvios-padrão para os valores de diâmetros medidos.

**Tabela 7.** Valores médios dos diâmetros das hastes de HAP obtidas pelos diferentes métodos de síntese e de remoção dos componentes orgânicos.

Método de síntese	Remoção dos componentes orgânicos	Número de Medidas	Diâmetro médio das hastes (nm)
permeação de NH <sub>3</sub> (g)	queima a 500°C	228	35 ± 7
mistura de fases	queima a 500°C	197	34 ± 8
permeação de NH <sub>3</sub> (g)	lavagem	257	29 ± 9
mistura de fases	lavagem	333	26 ± 7

Os valores mostrados na Tabela 7 indicam que a remoção dos componentes orgânicos por lavagem levou à obtenção de hastes com diâmetros ligeiramente menores, o que se torna ainda mais evidente ao se observar a Figura 20 que mostra os histogramas de todas as amostras plotados em conjunto. No entanto, considerando os desvios-padrão das medidas ou mesmo aplicando-se um teste estatístico como o teste “t de Student” nota-se que os diâmetros das hastes não diferem estatisticamente entre si a um nível de 95% de confiança.



**Figura 20.** Sobreposição dos histogramas mostrando a distribuição dos tamanhos das hastes de HAP obtidas pelos diferentes métodos de síntese e de remoção dos componentes orgânicos.

Os resultados obtidos até aqui permitem concluir que o método de precipitação parece não influenciar na composição e na morfologia dos materiais obtidos, entretanto, a remoção dos componentes orgânicos por lavagem levou a

obtenção de materiais com incorporação de íons nitrato e cujos difratogramas de raios X apresentaram picos alargados, o que pode ser consequência da impureza da amostra como a presença de íons nitrato, carbonato e água adsorvida no material. Como experimentalmente o método de remoção dos componentes orgânicos por queima é mais simples de ser realizado e permite um maior rendimento da síntese, visto que há menor perda de material neste procedimento, e que este procedimento não altera a composição do material, possibilitando a obtenção de nanopartículas de HAP carbonatada com morfologia definida e distribuição homogênea de tamanhos, este método foi escolhido para a remoção dos compostos orgânicos.

Assim, todos os demais materiais obtidos nesta Tese foram sintetizados pelo método de precipitação via permeação de amônia e os componentes orgânicos foram removidos por queima a 500°C.

### **4.3. Síntese de HAP nos Sistemas de Comparação**

O objetivo principal desta Tese de Doutorado é obter nanopartículas de HAP em sistemas auto-organizados, tendo como foco aumentar a compreensão dos mecanismos de controle exercido por estes sistemas, sobretudo no tamanho e morfologia das nanopartículas precipitadas *in situ*, o que pode ajudar a esclarecer como ocorre o controle das propriedades das nanopartículas de HAP no processo de mineralização *in vivo*.

Sistemas auto-organizados são formados por surfactantes que possuem a capacidade de se auto-organizar formando micelas, as quais, por sua vez, podem se empacotar em arranjos tridimensionais bem definidos, dando origem aos cristais líquidos. No entanto, a literatura tem reportado que sólidos inorgânicos, quando sintetizados na presença de surfactantes, ainda que em concentrações inferiores às necessárias para a formação dos cristais líquidos, podem ter suas

propriedades modificadas. Os trabalhos têm mostrado que materiais cristalinos, obtidos nestas condições de concentração reduzida de surfactantes, apresentaram morfologias alongadas, devido a indução do crescimento do material em uma direção preferencial via adsorção de surfactante em faces preferenciais do cristal durante o seu crescimento [5].

Assim, nesta etapa do trabalho, partículas de HAP foram sintetizadas em sistemas que não apresentam auto-organização, com a finalidade de comparar os resultados com aqueles referentes às sínteses ocorridas nos sistemas auto-organizados. Os sistemas empregados para este fim, descritos na Parte Experimental (Seção 3.2.2) foram usados para sintetizar as partículas de HAP nas condições listadas a seguir:

- na ausência de surfactante, onde não haveria nenhum tipo de influência sobre a formação e crescimento das partículas;

- na presença de concentrações reduzidas de surfactante S-10 ( $8 \cdot 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>), onde seria possível verificar se o surfactante, mesmo em concentrações inferiores às necessárias para formação dos cristais líquidos, influenciaria nas propriedades das partículas.

- na presença de PEG-1000 (fase PEG-23), que embora não seja um surfactante, o PEG permite explorar a influência da cadeia polietoxilada, contendo 23 unidades EO (análoga à região hidrofílica dos surfactantes e com número de unidades etoxiladas próximas a do surfactante S-23) na síntese da HAP, em uma situação onde não há auto-organização.

Inicialmente, foram analisadas as duas primeiras possibilidades de síntese: na ausência de surfactante e na presença de concentrações reduzidas de S-10. Esta concentração de surfactante foi escolhida por ser uma concentração próxima da sua CMC em meio aquoso, que é da ordem de  $4 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> [56] e também porque há evidências de que a presença de surfactantes durante precipitação de fosfatos de cálcio causa mudanças na morfologia das partículas.

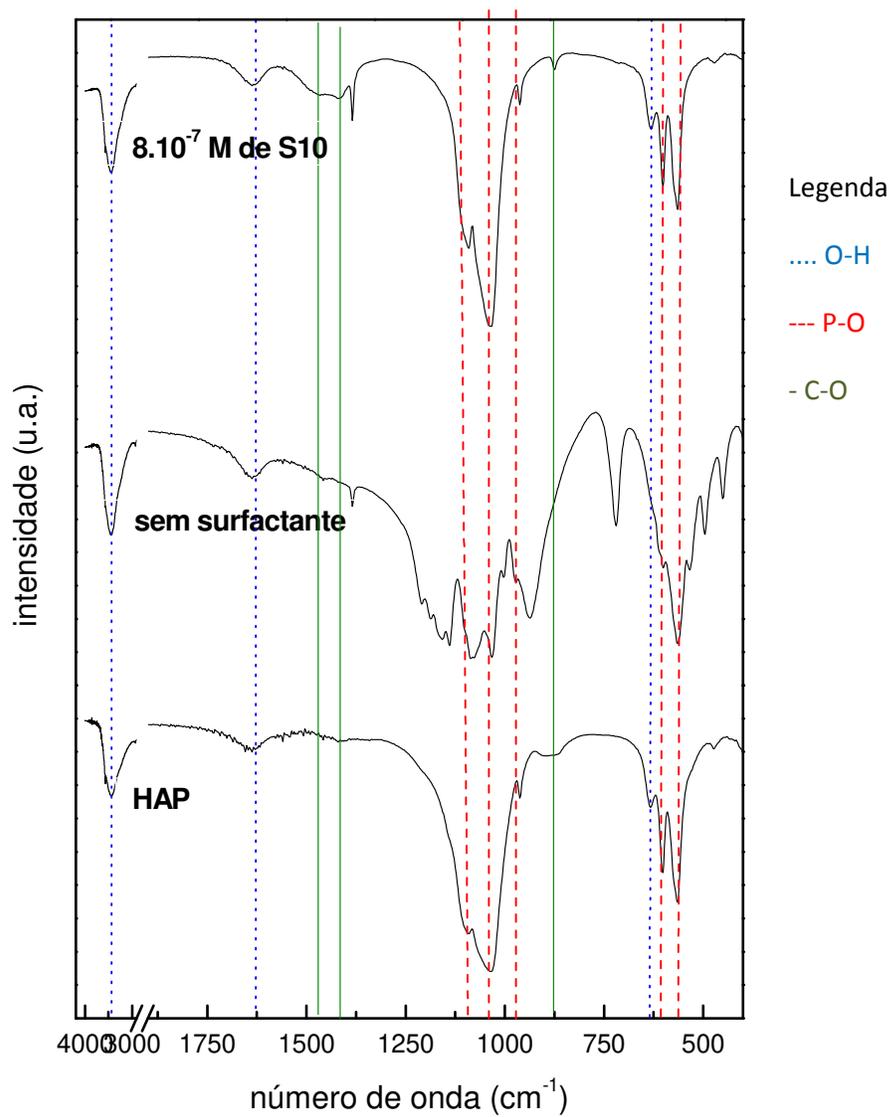
Os resultados referentes à síntese de HAP na fase PEG-23 serão discutidos em conjunto com os resultados das sínteses nos sistemas auto-organizados, posteriormente.

As Figuras 21 e 22 mostram os espectros de FTIR e os difratogramas de raios X, respectivamente, para os materiais sintetizados na ausência de surfactante e na presença de concentrações reduzidas de S-10. O espectro e o difratograma da HAP comercial foram adicionados nestas figuras para facilitar a comparação.

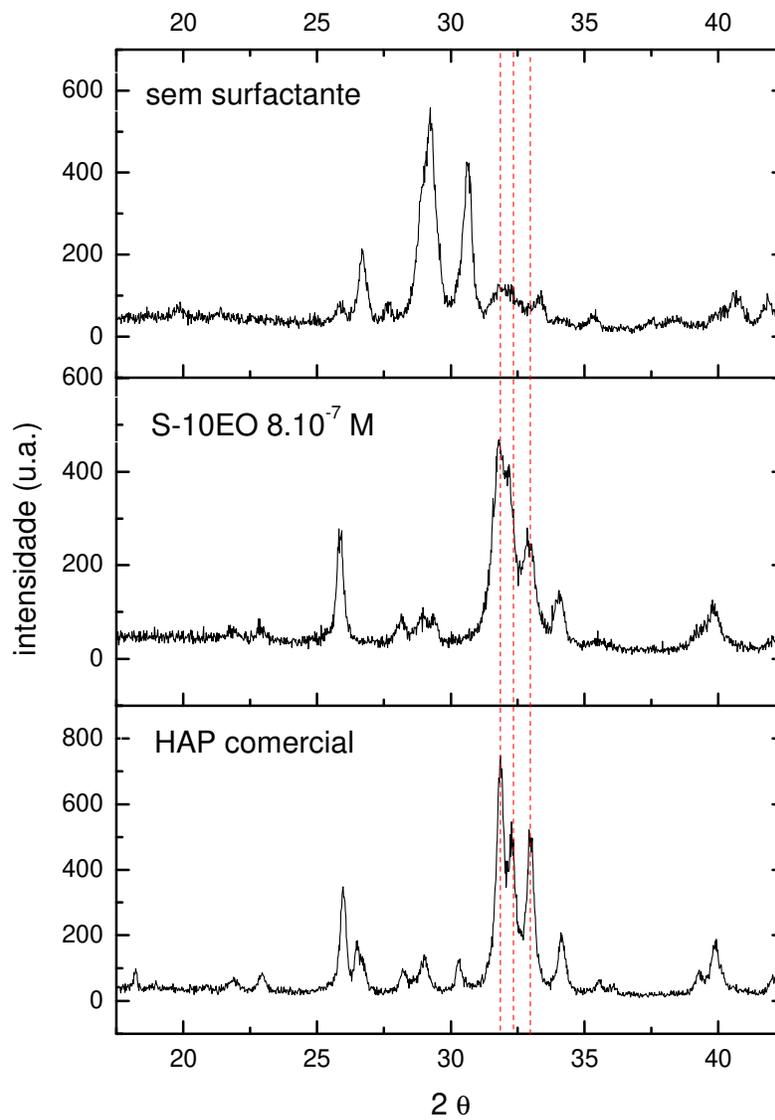
A Figura 21 mostra que ambos os materiais sintéticos apresentaram bandas atribuídas à presença de grupos fosfato e hidroxila, as quais estão indicadas pelas linhas tracejadas e pontilhadas, respectivamente, de acordo com a Tabela 5. Apenas a amostra obtida na presença de concentrações reduzidas de surfactante apresentou bandas características de ligações C-O de carbonato, como indicado pelas linhas sólidas.

O espectro de FTIR do material obtido na ausência de surfactante, no entanto, difere significativamente de todos os demais analisados até o momento, pois foram observadas bandas adicionais intensas nas regiões de 445, 496, 535, 720, 933, 1140, 1170, 1191 e 1214  $\text{cm}^{-1}$ , as quais foram atribuídas à presença de pirofosfato de cálcio dihidratado – **CPPD** – cuja fórmula molecular é  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [48].

O difratograma do material sintetizado na presença de surfactante, Figura 22, se assemelha muito ao da hidroxiapatita, o qual é concordante com o difratograma da HAP disponível no banco de dados JCPDS (card 9-04321), indicado pelas linhas tracejadas. O material sintetizado na ausência de surfactante, no entanto, apresentou picos característicos de CPPD (JCPDS card 17-0499) e picos pouco intensos relativos aos planos cristalinos da HAP.



**Figura 21.** FTIR dos materiais formados na ausência de surfactante, na presença de  $8.10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> de S-10 e da hidroxiapatita comercial.



**Figura 22.** XRD dos materiais formados na ausência de surfactante, na presença de concentrações reduzidas de surfactante com 10EO e da hidroxiapatita comercial.

Os resultados permitem notar que todas as precipitações ocorridas na presença de surfactante, mesmo que em concentrações reduzidas, leva à formação de HAP carbonatada, enquanto que na ausência de surfactante, não se forma hidroxiapatita carbonatada, mas sim pirofosfato de cálcio dihidratado. Assim, pode-se admitir que a presença de surfactante no meio de síntese, independentemente da concentração, é um fator que influencia no controle da composição dos materiais.

É possível que o pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD) tenha sido formado a partir da desidratação do monohidrogeno fosfato de cálcio – DCPA ( $\text{CaHPO}_4$ ) - durante a queima, conforme mostra a equação a seguir [57,58]:



A possibilidade do CPPD ter sido formado a partir da desidratação de DCPA permite assumir que, na síntese ocorrida na ausência de surfactante, houve a formação do DCPA e não da HAP, como era esperado. Para se compreender como isto ocorre, deve-se analisar o procedimento utilizado para síntese do material. No processo de síntese por permeação de amônia, o pH do meio vai sendo elevado lentamente e, com isto, os equilíbrios do ácido fosfórico vão se deslocando no sentido de formar as seguintes espécies em função do pH (Figura 8 da Seção 1.4):  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (predominante em pH próximo de 2),  $\text{HPO}_4^{2-}$  (predominante em pH próximo de 7) e  $\text{PO}_4^{3-}$  (predominante em pH próximo de 12).

Os surfactantes têm a propriedade de se adsorverem em superfícies e interfaces. Assim, quando a síntese de HAP é conduzida na presença de surfactante, embora possa haver a formação de DCPA, as moléculas de surfactante se adsorvem nas superfícies destes cristais modificando a energia de interface cristal/solução.

Como o processo de precipitação somente se inicia a partir de um determinado grau de supersaturação, a modificação da energia de interface cristal/

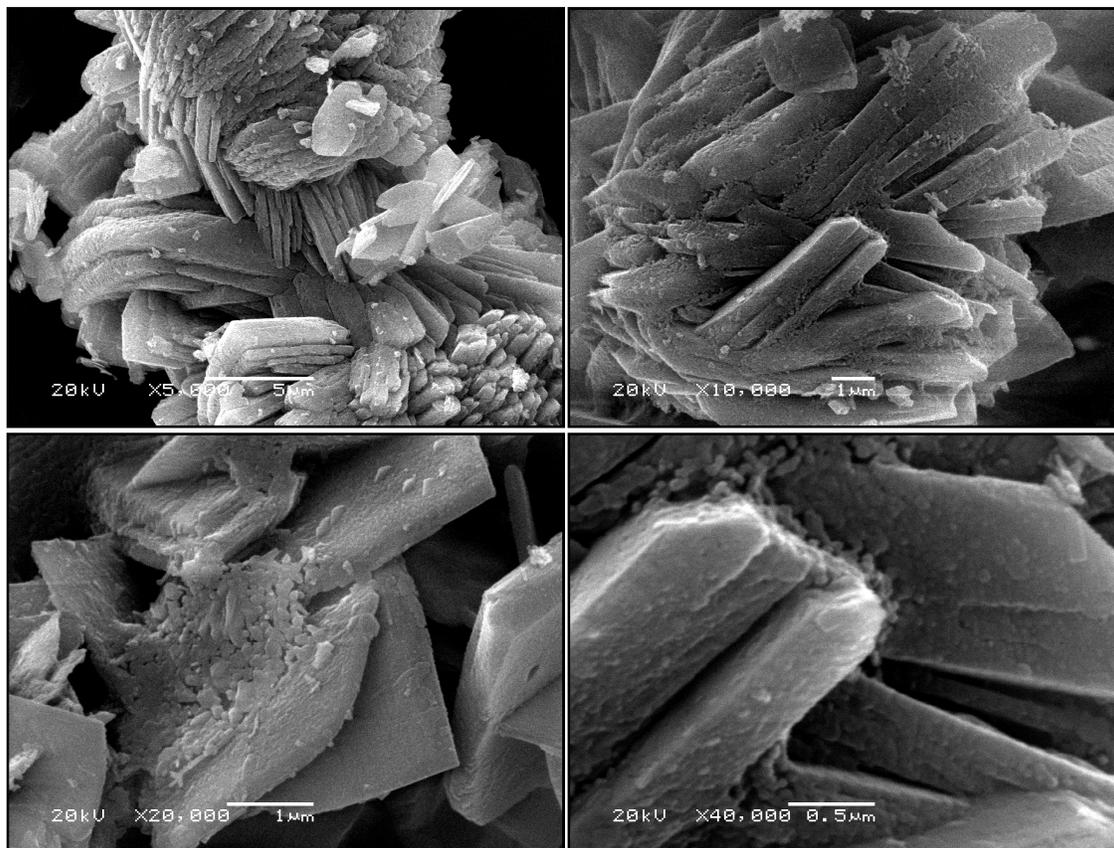
solução, faz com que o grau de supersaturação necessário para iniciar a precipitação na presença de surfactante seja maior e, portanto, em pH mais elevado, no qual o íon predominante não é mais o  $\text{HPO}_4^{2-}$  e sim o  $\text{PO}_4^{3-}$ . Assim, na precipitação sem surfactante, quando a supersaturação necessária para que ocorra a precipitação é alcançada há a presença de  $\text{HPO}_4^{2-}$  que coprecipita com o fosfato de cálcio. Na presença de surfactante como o pH deve ser maior devido a necessidade de uma supersaturação maior (equilíbrio deslocado para formar mais  $\text{PO}_4^{3-}$ ) quando ela ocorre não há mais íons  $\text{HPO}_4^{2-}$  para coprecipitar. É importante notar que a presença de íons fosfato no meio reacional leva à precipitação da HAP, visto que seu produto de solubilidade ( $k_{\text{PS}}$ ) é da ordem de  $10^{-112}$  e, portanto, consideravelmente menor do que o produto de solubilidade do DCPA que é da ordem de  $10^{-9}$  [59].

A morfologia dos materiais foi determinada por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 23 mostra micrografias do material obtido na ausência de surfactante, previamente caracterizado como uma mistura de CPPD e HAP. Nota-se que o material não apresenta morfologia definida, ora assemelhando-se a placas, ora sendo estruturas alongadas, em ambos os casos, assumindo dimensões micrométricas.

A Figura 24 mostra as micrografias do material formado na presença de concentrações reduzidas de surfactante ( $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  de S-10), caracterizado como HAP carbonatada. As imagens desta Figura mostram que o material apresenta-se na forma de placas com dimensões nanométricas, as quais se agregam formando grandes aglomerados que se assemelham aos arranjos descritos na literatura como “flower-like” [49].

É possível observar que as micrografias com maiores aumentos da Figura 24 apresentaram regiões muito claras que são consequência do efeito de carregamento. Os fosfatos de cálcio apresentam baixa condutividade elétrica e, por isso, antes de serem analisados por microscopia eletrônica de varredura devem ser recobertos com um filme de carbono ou ouro (ou ambos), o que melhora a condutividade do material e, como resultado, as imagens são melhores.

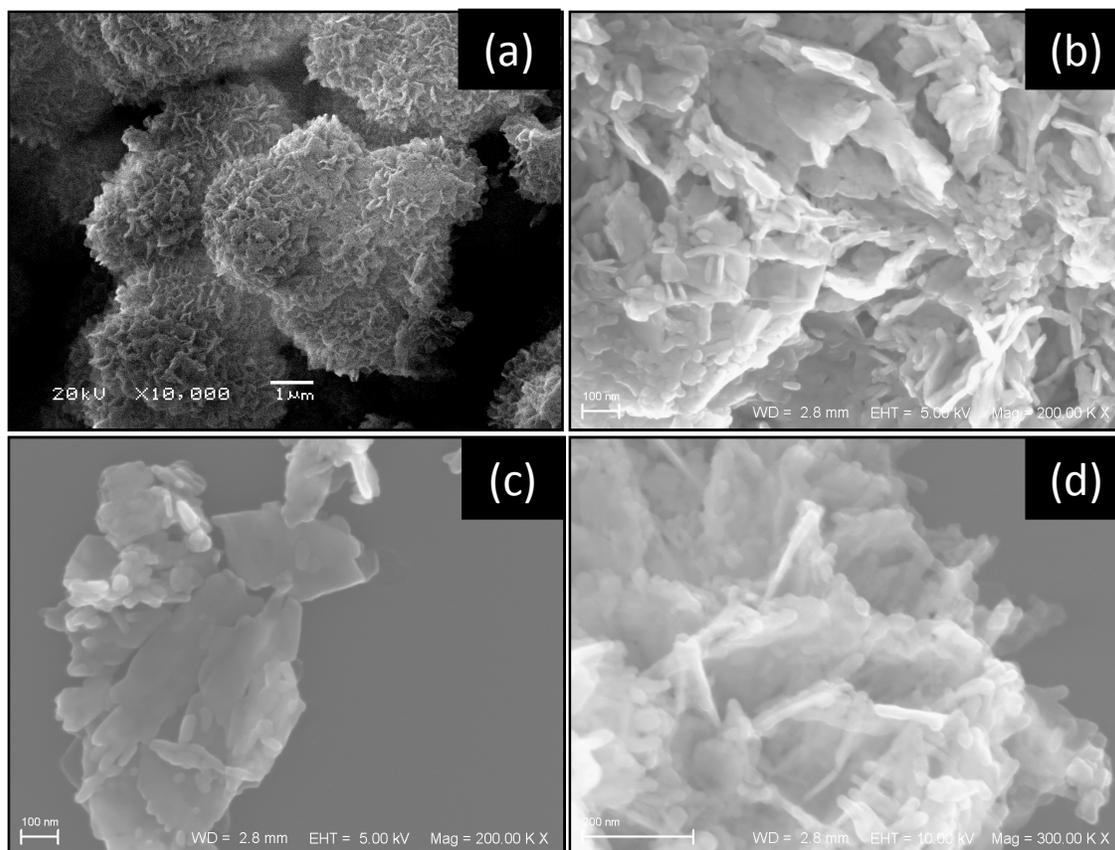
Porém, como a superfície do material em questão é bastante irregular, o recobrimento desta com o carbono não foi uniforme e, com isto, o efeito de carregamento não pôde ser completamente evitado.



**Figura 23.** Micrografias (SEM) dos fosfatos de cálcio (CPPD e HAP) obtidos na ausência de surfactante.

Os fosfatos de cálcio sintetizados na presença de surfactante em concentrações reduzidas apresentaram morfologia bem distinta dos materiais sintetizados na ausência de surfactante, este fato é atribuído à propriedade intrínseca aos surfactantes de se adsorverem em superfícies, o que conduziu a

esta mudança morfológica. É bem possível que imediatamente após serem formados os núcleos de HAP, houve a adsorção do surfactante em suas superfícies impedindo o crescimento das placas, o que limitou o tamanho das mesmas. A aglomeração das placas em estruturas flower-like pode ter sido uma consequência dos cristais de HAP terem crescido livremente em torno de um ponto de nucleação ou, mais provavelmente, essas estruturas foram formadas devido à coalescência das placas após a remoção do surfactante.



**Figura 24.** Micrografias dos fosfatos de cálcio obtidos na presença de  $8 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de Renex-100®. Micrografias obtidas por: SEM (a) e SEM-FEG (b-d).

## **4.4. Síntese de HAP nos Sistemas Auto-Organizados**

As nanopartículas de HAP foram obtidas em diferentes sistemas auto-organizados, ora denominados de cristais líquidos. Os cristais líquidos foram formados no sistema ternário: surfactante, solução aquosa (contendo íons cálcio e fosfato) e ciclohexano. Como os surfactantes utilizados continham diferentes tamanhos de grupos etoxilados, as mesofases foram denominadas LC-X, onde X corresponde ao número de unidades etoxiladas do surfactante, conforme mostra a Tabela 4, na seção 3.2.3.1 da Parte Experimental.

Antes de se analisar a influência dos sistemas auto-organizados nas propriedades da HAP é conveniente mostrar como estes sistemas foram caracterizados e qual foi o efeito do tamanho da cadeia etoxilada dos surfactantes na sua formação.

### **4.4.1. Caracterização dos Sistemas Auto-Organizados Utilizados para a Síntese de HAP**

A Figura 25 mostra uma fotografia dos sistemas auto-organizados preparados com os diferentes surfactantes e que foram utilizados posteriormente para as sínteses de HAP via permeação de amônia. A fotografia permite notar que os sistemas formados com os surfactantes contendo 20, 23 e 30 grupos etoxilados são semelhantes à “pastas” enquanto que os demais assemelham-se à líquidos viscosos.

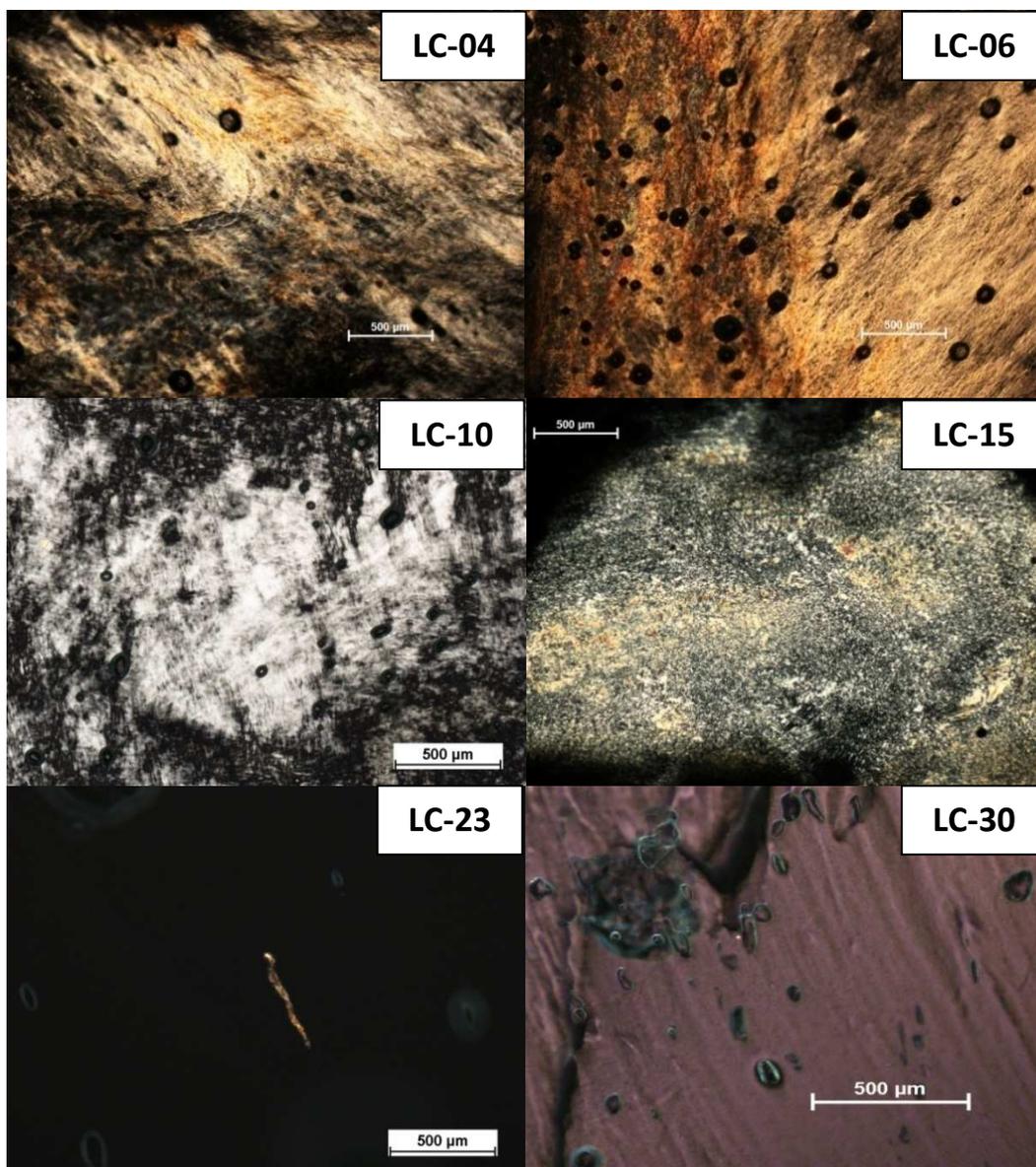


**Figura 25.** Fotografias dos sistemas auto-organizados utilizados para a síntese da HAP. Os números 04, 06, 10, 15, 20, 23 e 30 correspondem às unidades etoxiladas dos surfactantes utilizados no preparo dos sistemas. Os sistemas LC04 a LC06 assemelham-se a líquidos viscosos, enquanto os sistemas LC20 a LC30 assemelham-se a pastas.

Os sistemas da Figura 25 foram caracterizados por Microscopia Óptica com Luz Polarizada (POM), Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e Espalhamento de Raios X em Baixos Ângulos (SAXS).

A técnica de POM permite distinguir fases isotrópicas e anisotrópicas, pois estas últimas são birrefringentes, como é o caso dos cristais líquidos lamelares e hexagonais. A Figura 26 mostra as micrografias obtidas por POM para os sistemas auto-organizados.

As micrografias da Figura 26 mostram que apenas os sistemas formados com surfactantes contendo de 04 a 15 grupos etoxilados apresentaram birrefringência. Os sistemas formados com surfactantes contendo 20 ou mais grupos etoxilados não apresentaram birrefringência, sendo, portanto, isotrópicos (a micrografia do sistema LC-20 foi omitida, pois é idêntica à do sistema LC-23). A técnica de POM não permite distinguir as fases micelares (que não possuem qualquer organização, como as microemulsões, por exemplo) dos cristais líquidos cúbicos, que apesar de serem sistemas auto-organizados, os agregados não possuem orientação em uma direção preferencial e, portanto, também são isotrópicos.

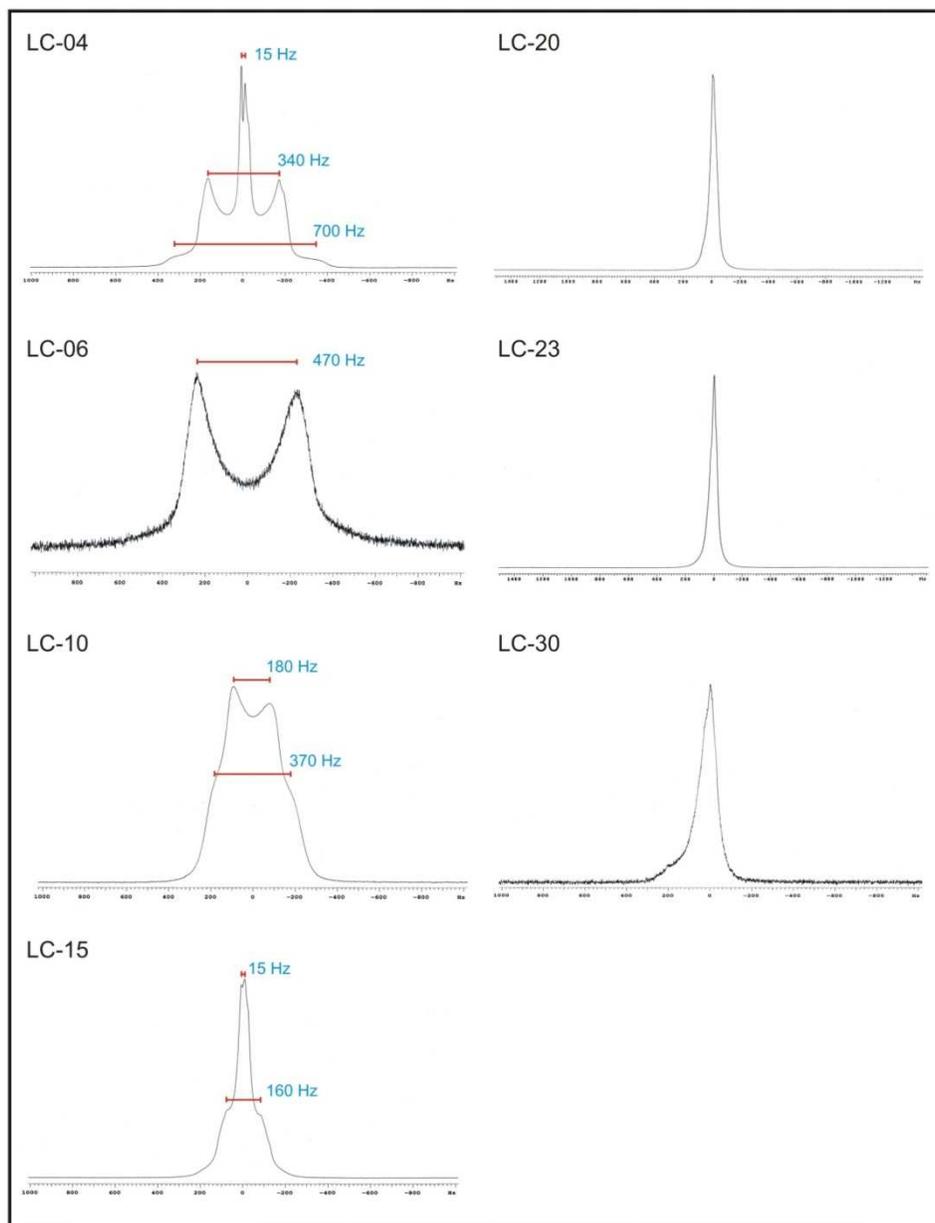


**Figura 26.** Micrografias obtidas por POM dos sistemas auto-organizados utilizados para a síntese da HAp *in situ*.

Todos os sistemas auto-organizados, previamente caracterizados por POM, foram também caracterizados por NMR para núcleo de deutério ( $^2\text{H-NMR}$ ). Para serem analisados por esta técnica, os sistemas foram preparados com uma solução aquosa enriquecida com 10% de  $\text{D}_2\text{O}$ , o que corresponde a uma concentração final de óxido de deutério em torno de 5%. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 27.

Os espectros da Figura 27 mostram que os sistemas formados com surfactantes contendo até 15 grupos etoxilados apresentaram sinais desdobrados que são característicos de meios anisotrópicos, enquanto que os sistemas formados com surfactantes com 20 ou mais grupos etoxilados, são isotrópicos. Apenas o sistema LC-30 apresentou sinal bastante largo, o que provavelmente é uma consequência da sua alta viscosidade, que aumenta o tempo de relaxação do núcleo de deutério, e conseqüentemente, causa o alargamento do sinal [50].

De acordo com a Figura 27, o sistema denominado LC-04 bem como o LC-15 apresentaram um sinal central desdobrado com largura de desdobramento ( $\Delta\nu$ ) bem pequena, da ordem de 15 Hz. Estes desdobramentos, cujas larguras são muito pequenas, não indicam a existência de um meio anisotrópico, mas provavelmente, são consequência da não homogeneidade do campo magnético sentido pelo núcleo de deutério. Devido às amostras serem muito viscosas, elas aprisionam bolhas de ar durante sua manipulação e estas bolhas são muito difíceis de serem removidas, podendo ser a causa dos desdobramentos observados. A própria manipulação das amostras no momento de colocá-las dentro dos tubos para as medidas, requer extrema paciência e pode levar a formação de mais bolhas.



**Figura 27.** Espectros de  $^2\text{H}$ -NMR dos sistemas auto-organizados utilizados para a síntese de HAP *in situ*. Os sistemas LC-04 a LC-15 são anisotrópicos e os sistemas LC-20 a LC-30 são isotrópicos.

O sistema LC-04 merece atenção especial, pois, além do pico central atribuído a não homogeneidade do campo, já discutido no parágrafo anterior, este sistema apresenta dois outros desdobramentos, um deles cujo  $\Delta\nu$  é da ordem de 340 Hz e um “ombro” com  $\Delta\nu$  em torno de 700 Hz. Em um primeiro momento, pode-se admitir que este sistema contenha duas fases anisotrópicas, uma hexagonal ( $\Delta\nu \approx 340\text{Hz}$ ) e outra lamelar ( $\Delta\nu \approx 700\text{Hz}$ ), visto que o desdobramento quadrupolar de uma fase lamelar é da ordem de duas vezes o desdobramento da fase hexagonal. No entanto, na parte experimental (seção 3.2) foi relatado que após o preparo, esta amostra separou fases e, após a centrifugação, a fase mais viscosa e opaca foi denominada de LC-04. Devido à técnica de NMR ser muito sensível, pode ser que pequenas quantidades residuais das outras fases, que não foram eficientemente removidas no processo de centrifugação, tenham gerado o desdobramento atribuído a fase lamelar.

O sistema LC-06 apresentou apenas um sinal desdobrado, cuja largura é da ordem de 470 Hz, enquanto que o LC-10 apresentou um sinal desdobrado com  $\Delta\nu$  de 180 Hz e um ombro com  $\Delta\nu$  igual a 380 Hz. Novamente, estes desdobramentos sugerem a coexistência de duas fases anisotrópicas diferentes. Da mesma maneira o sistema LC-15 apresentou um sinal central desdobrado com largura de 15 Hz, atribuído a uma fase isotrópica, e um sinal desdobrado com largura da ordem de 160 Hz.

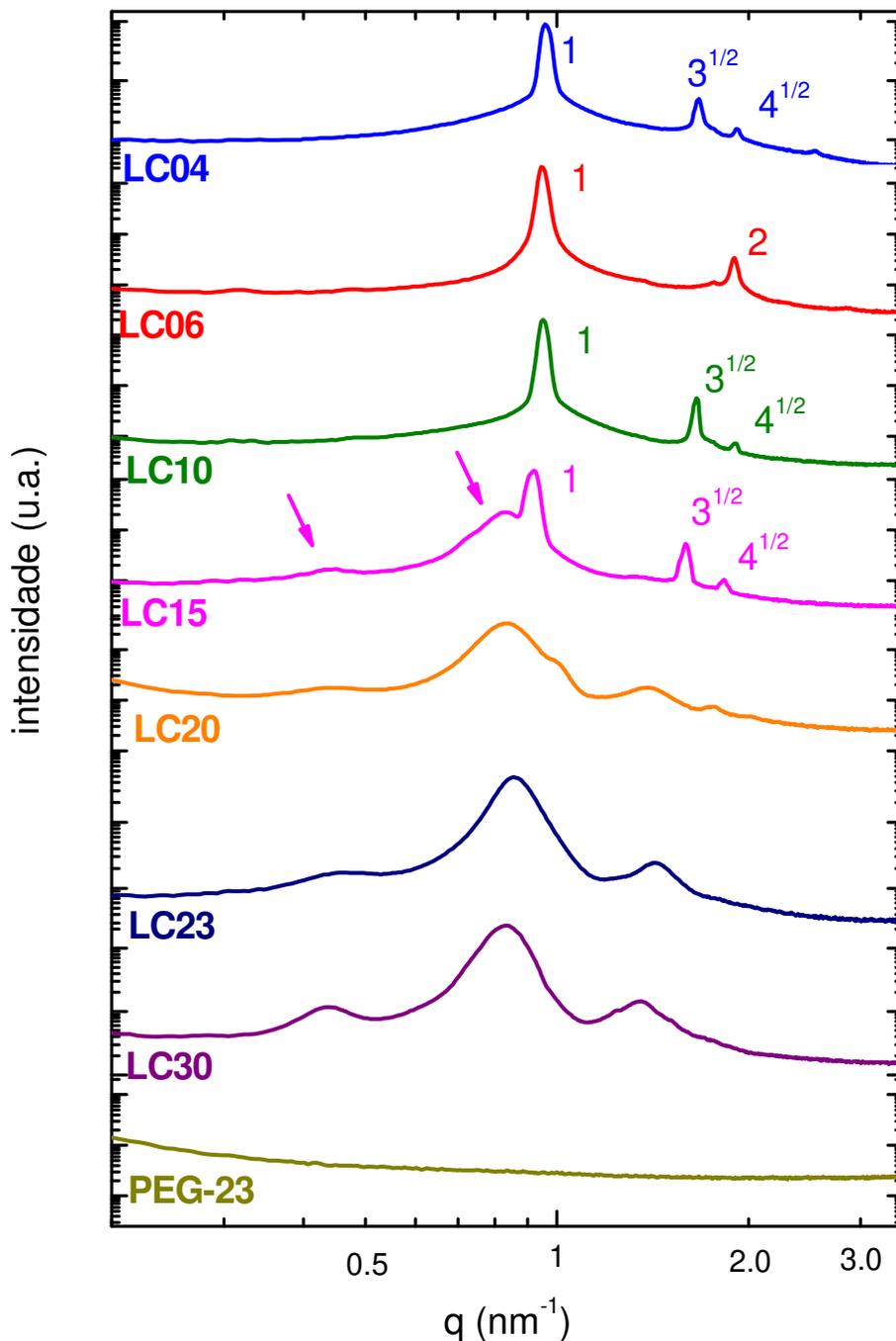
Em um trabalho recente, Klaus e colaboradores (2010) [26], verificaram que duas amostras de cristais líquidos ao serem analisadas por  $^2\text{H-NMR}$  apresentaram dois desdobramentos que seriam atribuídos a coexistência de duas fases anisotrópicas, porém, ao verificarem por SAXS que se tratava de apenas uma fase anisotrópica, os autores se propuseram a investigar melhor este fato em trabalhos futuros. Estes resultados podem indicar que a técnica de ressonância seja realmente sensível na caracterização de sistemas auto-organizados, permitindo caracterizar sistemas que estejam muito pouco concentrados. De qualquer modo, seria interessante investigar o observado para as fases LC06 e LC15 em trabalhos futuros.

Os demais sistemas, formados com surfactantes contendo 20 ou mais grupos etoxilados apresentaram um único pico central que foi atribuído a existência de fases isotrópicas.

Os sistemas auto-organizados, previamente caracterizados por POM e por RMN, foram também analisados pela técnica de espalhamento de raios X em baixos ângulos (SAXS), que além de permitir verificar a anisotropia, possibilita ainda identificar as fases presentes através da posição relativa dos picos de difração, incluindo as fases cúbicas, que por serem isotrópicas, não podem ser caracterizadas pelas técnicas anteriores. A técnica de SAXS permite também obter parâmetros importantes como, por exemplo, as distâncias de repetição das fases, como será visto posteriormente. A Figura 28 mostra os difratogramas de SAXS obtidos para os sistemas auto-organizados.

Os sistemas formados com os surfactantes que possuem menos de 15 grupos etoxilados apresentaram picos estreitos, bem definidos. Os valores indicados ao lado dos picos de difração das fases mostrados na Figura 28 indicam as razões  $q_n/q_1$ , que são características para cada cristal líquido (vide Tabela 1 na Seção 1.2). Assim, os sistemas LC-04 e LC-10 são cristais líquidos hexagonais enquanto que o LC-06 refere-se a um cristal líquido lamelar.

Como mencionado anteriormente, o sistema formado com o surfactante contendo 04 unidades etoxiladas separou fase, por isso, o sistema foi centrifugado e a fase líquida cristalina foi denominada LC-04. Após separada, adicionou-se pequenas quantidades de solução aquosa ou de ciclohexano à LC-04, separadamente, e a fase que recebeu a solução aquosa separou-se novamente. Este resultado permite afirmar que o cristal líquido é hexagonal reverso, ou seja, as micelas desta fase confinam a solução aquosa no seu interior. Este ensaio foi feito porque, os sistemas normais e reversos apresentam o mesmo padrão de difração de raios X ao serem analisados por SAXS.



**Figura 28.** Curvas de SAXS para os sistemas auto-organizados preparados com surfactantes com diferentes grupos etoxilados e posteriormente utilizados para a síntese da HAP. Os números ao lado dos picos referem-se à razão  $q_n/q_1$ . As setas na curva observada para o sistema LC-15 indicam a existência de uma ou mais fases que podem ser observadas nas curvas subseqüentes (LC-20, LC-23 e LC-30).

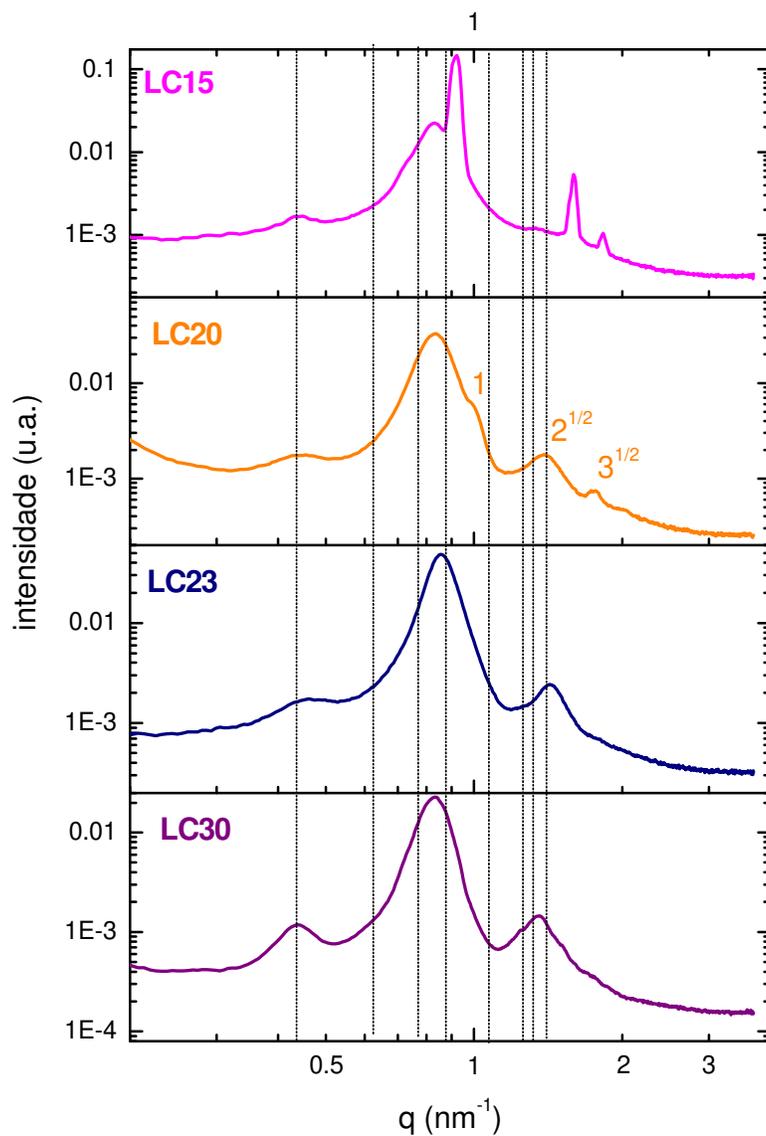
Diferentemente dos resultados de NMR, a análise da fase LC-04 por SAXS apresentou apenas uma distribuição de picos característica para um cristal líquido hexagonal, o que reforça o fato de que a técnica de NMR é mais sensível para caracterizar os sistemas auto-organizados.

A fase LC-15 apresentou 2 conjuntos de picos, um deles em que os picos são mais estreitos e suas razões são características de uma fase hexagonal e o outro conjunto evidenciado por picos mais largos, que por comparação com as demais amostras (como discutido a seguir), provavelmente, refere-se a um cristal líquido cúbico. Assim, esta amostra corresponde a um sistema bifásico, cujas fases não foram separadas por centrifugação e estes resultados estão em concordância com os obtidos por NMR.

Para facilitar a comparação referente aos picos alargados comuns às fases LC-15, LC-20, LC-23 e LC-30, as curvas de SAXS destes sistemas estão indicadas na Figura 29, juntamente com linhas verticais tracejadas que indicam as posições de  $q$ , cujas razões  $q_n/q_1$  são características para as mesofases cúbicas.

De acordo com as curvas de SAXS da Figura 29, todas as fases apresentaram um primeiro pico menos intenso e largo, com valor de  $q_1$  igual a  $0,44 \text{ nm}^{-1}$ . As linhas tracejadas em preto indicam as posições esperadas para as difrações comuns às fases cúbicas, com razões  $q_n/q_1$  iguais a  $\sqrt{2}, \sqrt{3}, \sqrt{4}, \sqrt{5}, \dots$ , as quais podem ocorrer nas fases cúbicas  $Pm3n$ ,  $Pn3m$  e  $Im3m$ , como pode ser visto na Tabela 1 da seção 1.2.

Através da Figura 29 é possível perceber uma seqüência de picos para a fase LC-20, cujas razões  $q_n/q_1$  são características para a fase cúbica bicontínua  $Pn3m$  (as razões  $q_n/q_1$  foram assinaladas acima do pico correspondente).



**Figura 29.** Curvas de SAXS dos sistemas auto-organizados preparados com surfactantes contendo 15 ou mais grupos etoxilados. As linhas verticais indicam as posições esperadas para difrações comuns às fases cúbicas. Elas indicam as posições relativas às razões  $q_n/q_1$  iguais a  $\sqrt{2}, \sqrt{3}, \sqrt{4}, \sqrt{5}, \sqrt{6}, \sqrt{8}, \dots$

Uma análise mais cuidadosa das curvas de SAXS de todas as amostras permite notar que há uma seqüência de transição de fases que abrange a formação de um cristal líquido hexagonal reverso (LC-04), um lamelar (LC-06), um hexagonal normal (LC-10), uma mistura de cristais líquidos hexagonal e cúbico, com predominância da fase hexagonal (LC-15), uma mistura de dois cristais líquidos cúbicos onde uma das fases pertence ao grupo espacial Pn3m (LC-20) e fases cúbicas, provavelmente, micelares (LC-23 e LC-30).

A presença de picos largos observados nas fases formadas com surfactantes contendo 15 ou mais unidades etoxiladas, pode ter duas causas. A primeira consiste no fato de que estas fases podem não ser puras, e sim, formadas por misturas de cristais líquidos cúbicos cujos picos de difração se sobrepõem dando origem ao alargamento. A segunda leva em consideração que o alargamento observado pode ser conseqüência das fases apresentarem domínios (ou centros espalhadores de raios X) com distâncias de repetição não homogêneas. Em outras palavras, imaginando as mesofases cúbicas bicontínuas que são formadas por canais de surfactantes, as posições destes canais apresentariam certas distorções quando comparadas àquelas esperadas para um arranjo cúbico perfeito, independentemente do grupo espacial a que este cristal pertença. Da mesma forma, este raciocínio é válido considerando os cristais cúbicos micelares, onde as micelas não ocupariam rigorosamente as posições que satisfizessem a geometria de um sistema cúbico perfeito.

É conveniente ressaltar que os difratogramas da Figura 29 foram cuidadosamente analisados, inclusive, levando-se em consideração a possibilidade de que o primeiro pico de difração tivesse intensidade tão pequena comparada aos demais que não fosse possível observá-lo nas curvas obtidas. A intensidade reduzida do primeiro pico é uma observação comum nas curvas de SAXS de cristais líquidos cúbicos [16, 28, 61]. Sendo assim, o pico que foi atribuído como  $q_1$  nas curvas experimentais, cuja posição é aproximadamente  $0,44 \text{ nm}^{-1}$ , seria, na verdade, o segundo pico de difração. Mesmo assumindo esta possibilidade, a posição relativa dos demais picos observados nas curvas de

SAXS da Figura 29 não é coincidente com um arranjo cúbico específico e, novamente, a largura acentuada destes picos fortalece a hipótese destas fases não estarem puras ou representarem arranjos cúbicos distorcidos.

A Tabela 8 mostra as caracterizações das fases por SAXS. O símbolo (\*) indica que a fase foi caracterizada como cúbica distorcida ou como uma mistura de mesofases cúbicas.

**Tabela 8.** Caracterização dos sistemas auto-organizados preparados com diferentes surfactantes por SAXS.

<b>Sistema Auto-organizado</b>	<b>identificação</b>
LC-04	hexagonal reversa
LC-06	lamelar
LC-10	hexagonal
LC-15	cúbica* + hexagonal
LC-20	cúbica* + cúbica Pn3m
LC-23	cúbica micelar*
LC-30	cúbica micelar*

\*referente às fases que apresentam picos largos que se sobrepõem dificultando a visualização dos picos nas posições esperadas para as fases cúbicas.

Os resultados mostrados na Figura 28 também trazem uma curva de SAXS referente à fase PEG-23 a qual não apresenta picos de difração. Este resultado era esperado, pois se trata de uma fase isotrópica não micelar. Embora a molécula de polietileno glicol (PEG) não seja um surfactante, esta fase foi utilizada na síntese de fosfatos de cálcio para comparar se os grupos etoxilados apresentariam alguma influência no controle morfológico e dimensional das partículas de fosfatos de cálcio obtidas nesta condição.

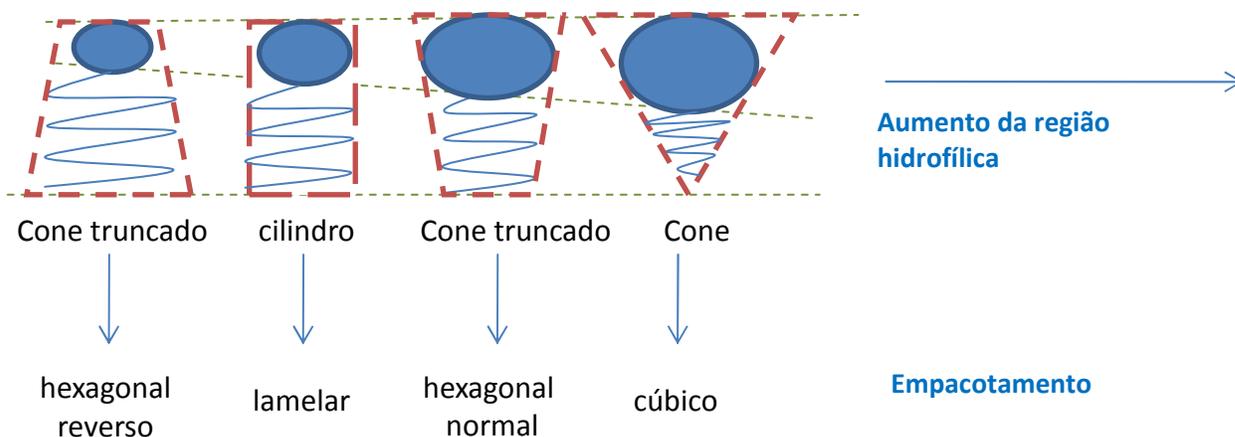
As técnicas utilizadas para a caracterização das fases foram concordantes e complementares entre si. Enquanto as técnicas de POM e NMR permitiram discriminar as fases anisotrópicas e isotrópicas, a técnica de SAXS mostrou-se adequada para identificar as fases presentes, e principalmente para caracterizar os cristais líquidos cúbicos.

#### **4.4.2. O Efeito do Tamanho do Grupo Etoxilado do Surfactante na Formação dos Cristais Líquidos.**

Os sistemas auto-organizados, caracterizados no item 4.4.1, foram preparados com as mesmas composições em porcentagem de massa dos seus três componentes: solução aquosa (45,5%), ciclohexano (9,0%) e surfactante (45,5%), de modo que a única variação destas fases consistiu na quantidade de unidades etoxiladas por molécula de surfactante.

Em consequência do aumento de unidades etoxiladas dos surfactantes, diferentes sistemas auto-organizados foram obtidos, seguindo-se a ordem de formação: hexagonal reverso, lamelar, hexagonal e fases cúbicas.

Esta observação pode ser explicada baseando-se no Parâmetro de Empacotamento Crítico (CPP). Como o CPP é um parâmetro geométrico que relaciona as áreas ocupadas pelos grupos hidrofílico (cabeça) e hidrofóbico (cauda) do surfactante, é relativamente fácil observar que o aumento da área ocupada pela parte polar do surfactante, resulta em uma diminuição do CPP (vide Figura 1 da Seção 1.1), que conduz a diferentes possibilidades de empacotamentos moleculares, como mostra o esquema da Figura 30 [2].



**Figura 30.** Representação esquemática do aumento da região polar do surfactante e o empacotamento preferencial do surfactante de acordo com sua geometria.

Dong e Hao, em 2010, publicaram uma revisão sobre o comportamento de fase de surfactantes não iônicos do tipo monoalquil éteres, com variações de tamanho tanto das cadeias hidrofóbicas quanto das hidrofílicas. Em meio aquoso, mantendo-se a cadeia hidrofóbica do surfactante e aumentando-se a cadeia hidrofílica, os autores verificaram a formação de novos cristais líquidos, seguindo-se uma seqüência de transição de fases em função da hidrofilicidade do surfactante. Analisando-se o comportamento de fase, apenas em termos de formação de cristais líquidos, para o surfactante  $C_{16}EO_x$ , por exemplo, observa-se que quando  $x$  era menor ou igual a 4, formavam-se as mesofases lamelar e cúbica bicontínua reversa, para valores de  $x$  entre 6 e 12, além da fase lamelar, formavam-se também as fases hexagonal e cúbica bicontínua (normal) e para valores de  $x$  maiores ou iguais a 12, formam-se todas as fases lamelar, hexagonal, cúbica bicontínua e cúbica micelar [21].

Embora os surfactantes e as condições sejam diferentes, é possível comparar os dados de Dong e Hao (2010) [21] com os obtidos neste trabalho, pois a seqüência de fases descrita em função do aumento da cadeia etoxilada dos surfactantes  $C_{16}EO_x$ , em meio aquoso, é completamente concordante com a seqüência das fases observadas neste trabalho para os surfactantes nonilfenil etoxilados em sistema ternário (surfactante, “água” e “óleo”). É bem possível que,

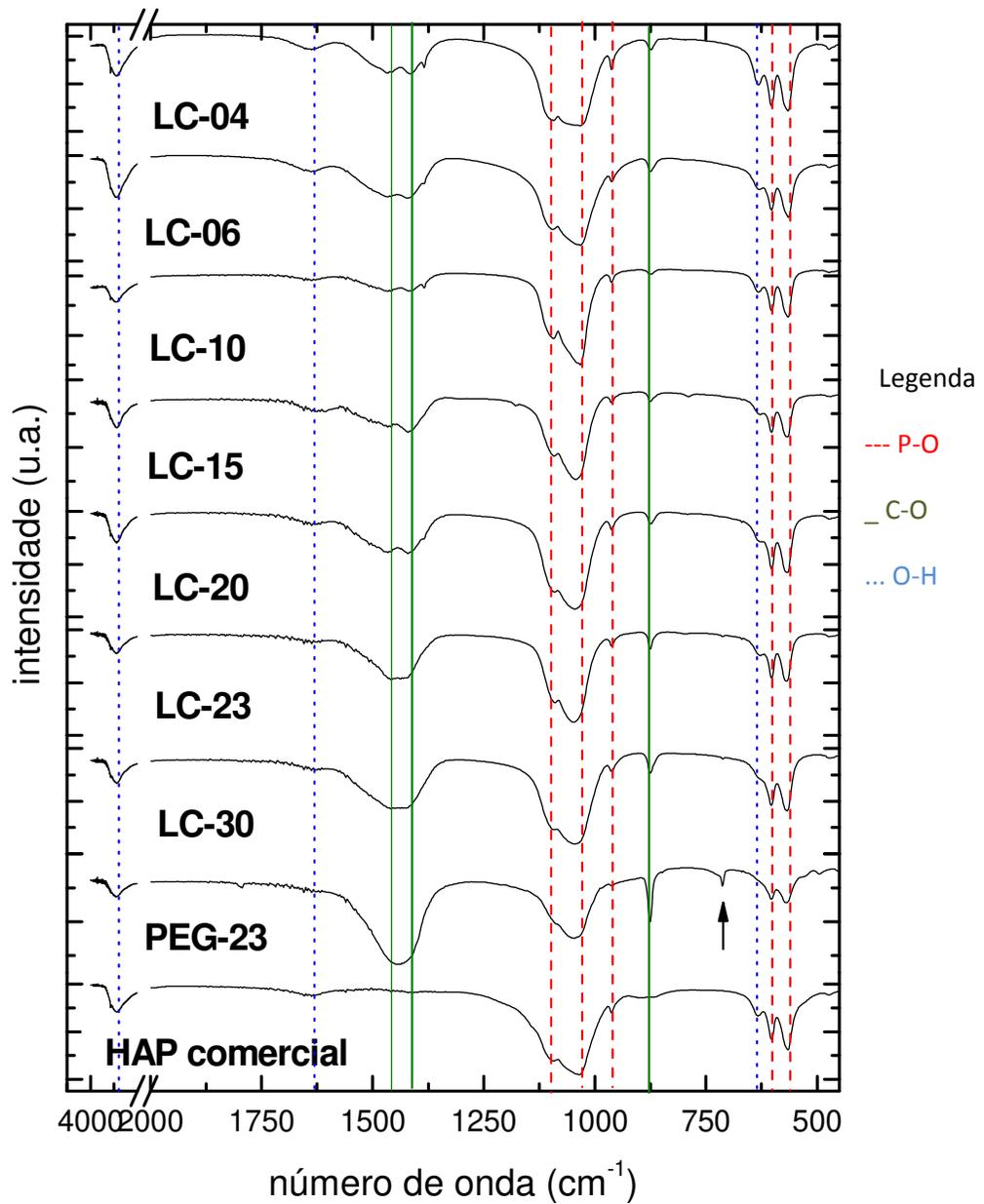
uma das fases dos sistemas LC-15 e LC-20 seja um cristal líquido cúbico bicontínuo, enquanto que as fases LC-23 e LC-30 sejam cristais líquidos cúbicos micelares.

#### **4.4.3. Caracterização dos Materiais Sintetizados nos Sistemas Auto-Organizados**

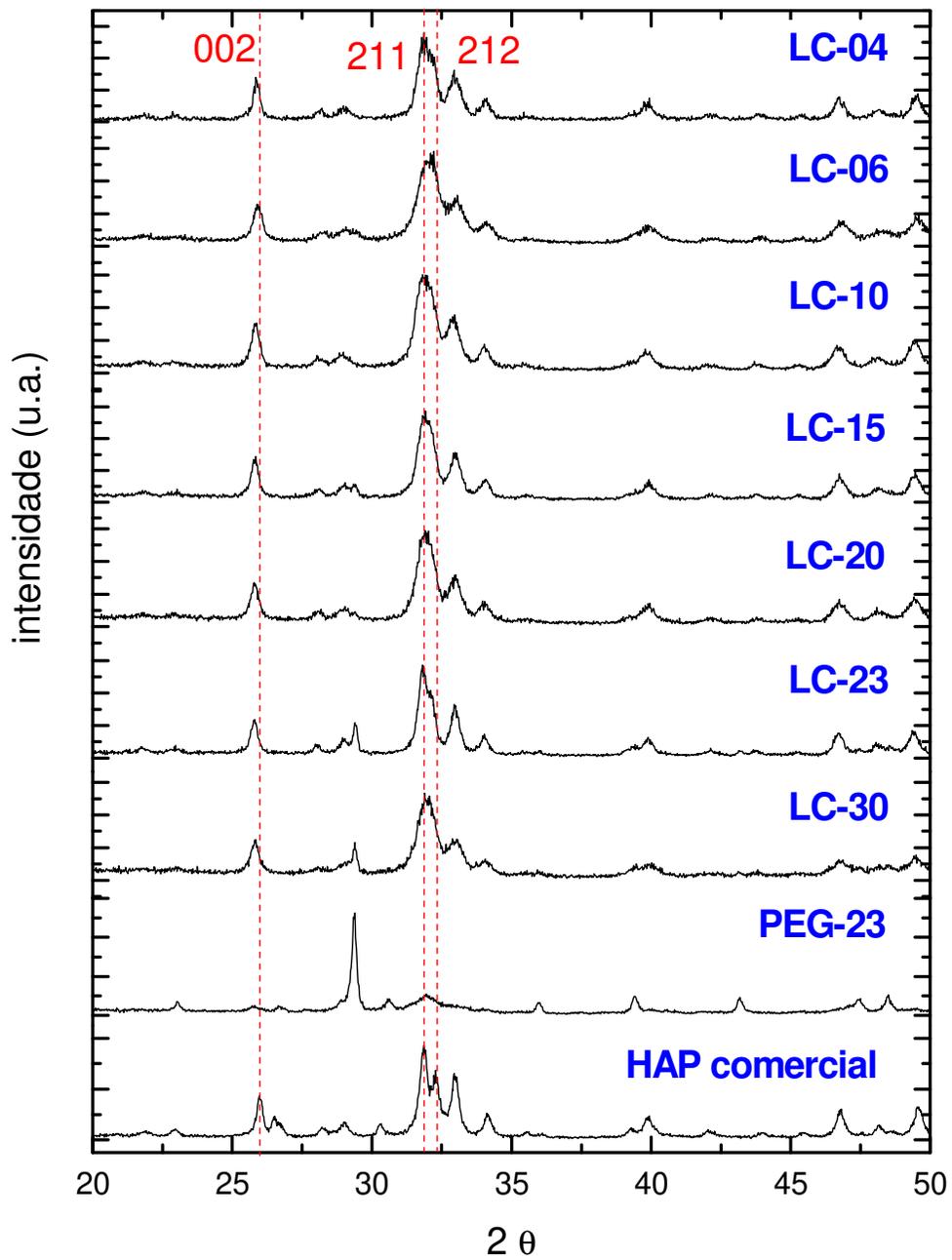
Os fosfatos de cálcio foram sintetizados por precipitação *in situ* nos sistemas caracterizados na seção 4.4.1. A precipitação ocorreu via elevação do pH dos sistemas por permeação de amônia e os componentes orgânicos foram removidos por queima a 500°C. Os materiais obtidos em cada sistema auto-organizado assim como os sintetizados por precipitação em polietileno glicol (fase PEG-23) foram caracterizados por FTIR e DRX, como mostram as Figuras 31 e 32, respectivamente.

As bandas observadas nos espectros de FTIR da Figura 31 foram atribuídas às deformações, estiramentos e vibrações das ligações químicas correspondentes à HAP, conforme pode ser visto na Tabela 5. Todas as amostras apresentaram bandas adicionais referentes à presença de íons carbonato, atribuídas na Tabela 6. Para facilitar a visualização dos espectros, as bandas atribuídas aos grupos fosfatos, hidroxilas e carbonatos foram indicadas na Figura 31 com as linhas tracejadas, pontilhadas e inteiras, respectivamente.

Observa-se ainda na Figura 31, que os espectros de FTIR dos materiais obtidos nos diferentes sistemas auto-organizados apresentaram-se muito similares. Todas as amostras apresentaram bandas características à HAP e bandas adicionais em 875, 1419 e 1465  $\text{cm}^{-1}$ , que indicam que os materiais são carbonatados.



**Figura 31.** Espectros de FTIR dos fosfatos de cálcio sintéticos e da hidroxiapatita comercial. A seta indica a banda de absorção atribuída à presença de calcita.



**Figura 32.** Difratogramas de raios X para os materiais sintetizados nos diferentes sistemas auto-organizados e para a HAP comercial.

A Figura 31 permite observar ainda que o material sintetizado na fase PEG-23 apresentou um perfil diferenciado dos demais. O espectro do material possui uma banda adicional em  $714\text{ cm}^{-1}$ , indicada com uma seta na Figura 31, a qual é característica de vibração C-O de carbonatos de cálcio, tais como aragonita e calcita [46]. Observa-se também que as intensidades relativas das bandas atribuídas às ligações C-O (em  $1419$  e  $1465\text{ cm}^{-1}$ ) são maiores do que aquelas referentes às ligações P-O. Estes dados indicam que o material obtido na fase PEG-23 não é a HAP carbonatada, mas sim uma mistura de HAP e carbonato de cálcio.

Observando-se os difratogramas de raios X, Figura 32, nota-se que todos os materiais apresentaram picos característicos de hidroxiapatita (JCPDS card 9-04321), como indicado pelas linhas tracejadas. O alargamento e sobreposição dos picos referente aos planos 211 e 212, bem como o deslocamento do pico referente ao plano 002 para valores de  $2\theta$  menores, são evidências de que as amostras são carbonatadas [47].

Em concordância com a análise de FTIR, o difratograma de raio X do material sintetizado na fase PEG-23 apresentou-se diferente dos demais, pois os picos característicos de hidroxiapatita mostraram-se pouco intensos, enquanto que há um pico bastante intenso em  $2\theta = 29,4^\circ$  característico de carbonato de cálcio, mais precisamente, calcita [46].

Os resultados de FTIR e XRD são concordantes e complementares, eles permitiram identificar todos os materiais obtidos nos sistemas auto-organizados como hidroxiapatitas carbonatadas, sendo que, apenas o material sintetizado na fase PEG-23 refere-se a uma mistura de hidroxiapatita e calcita.

É interessante notar que todas as fases líquido-cristalinas levaram à formação de HAP carbonatada, enquanto que o material precipitado na presença de PEG correspondeu a uma mistura de carbonato e fosfato de cálcio. Assim, de algum modo, a natureza da fase influenciou na composição dos materiais formados. Além da auto-organização, há outras particularidades relevantes que

são características de uma maneira geral para todas as fases líquido-cristalinas em comparação com a fase PEG-23, como por exemplo, a viscosidade destas fases que é bem superior à viscosidade da fase PEG-23.

A elevada viscosidade das fases líquido-cristalinas pode ter dificultado a difusão dos íons *in situ* necessários para formar os sólidos, como também pode ter reduzido a velocidade de permeação do gás amônia, influenciando na cinética de formação dos materiais. Porém, no estudo realizado na seção 4.2, a HAP foi formada por precipitação “instantânea” no método de mistura das fases, mostrando que a cinética pode não ser um fator determinante no caso das sínteses realizadas em ambientes auto-organizados. De alguma forma, as partículas formadas nos meios auto-organizados são controladas em termos de composição, o que não se verifica nos sistemas usados como comparação (exceto na síntese realizada na presença de surfactante em concentração reduzida, que também levou à formação de HAP carbonatada).

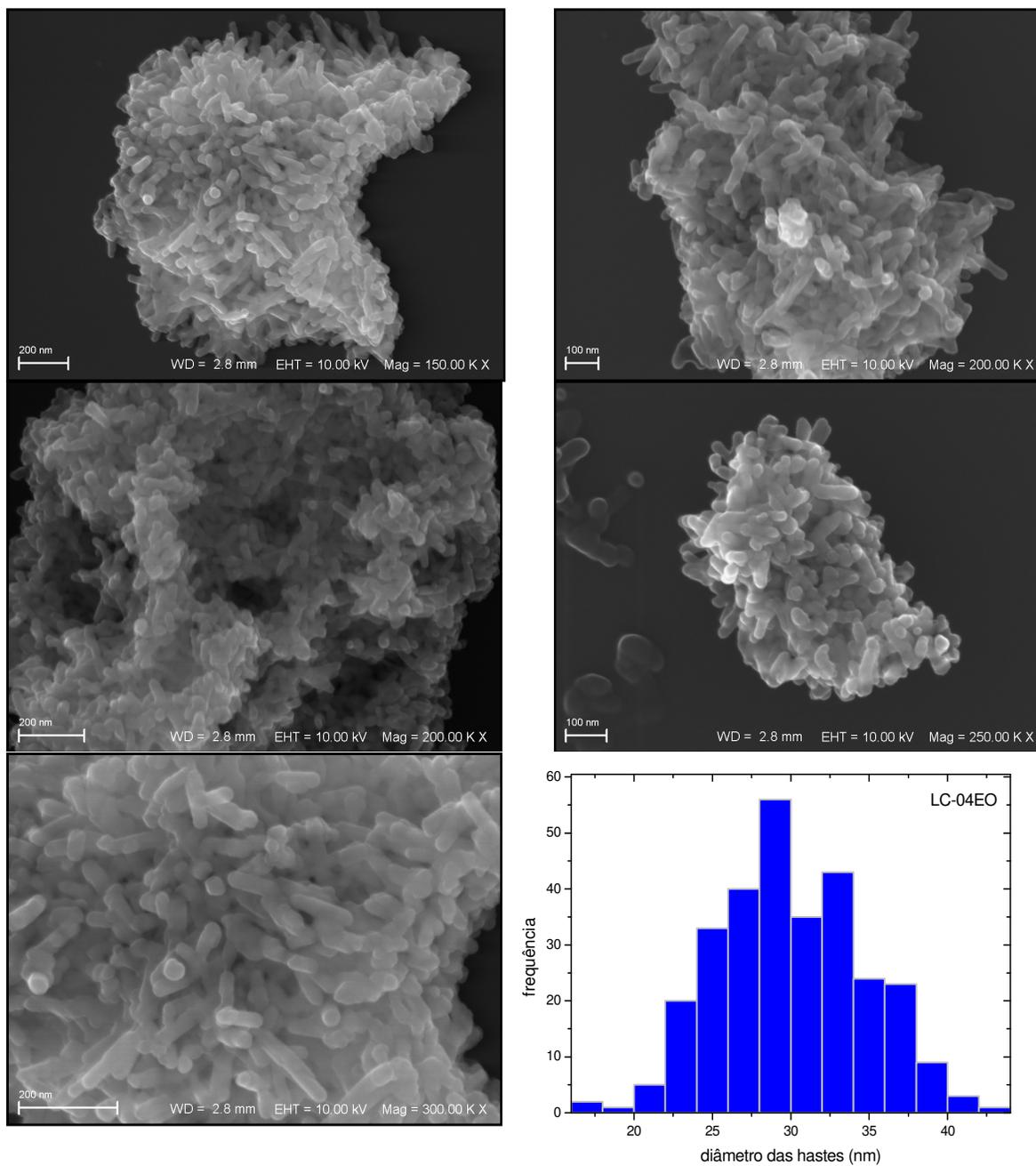
Os resultados obtidos aqui confirmam o fato de que a presença de surfactante no meio reacional leva à precipitação preferencial da HAP, pois a síntese ocorrida na fase PEG-23 (que é um sistema comparativo sem surfactante) levou a formação majoritária de carbonato de cálcio (calcita). Como já mencionado na seção 4.3, a precipitação **na presença de surfactante** deve ocorrer em pHs maiores, nos quais os equilíbrios referentes ao ácido fosfórico se deslocam no sentido de favorecer a formação de íons fosfato e, conseqüentemente, ocorre a precipitação da HAP cuja solubilidade é bem reduzida ( $K_{PS} \sim 10^{-112}$ ).

É conveniente perceber que no meio reacional há a existência concomitante de vários íons, como as espécies de fosfatos ( $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  e  $PO_4^{3-}$ ) e íon carbonato ( $CO_3^{2-}$ ) proveniente da incorporação do gás carbônico atmosférico nas soluções utilizadas para síntese. Assim, o sólido que irá precipitar preferencialmente irá depender das condições do meio no momento em que a precipitação ocorre: tais como pH, saturação da espécie iônica em questão, fatores cinéticos, entre outros [60]. Em termos de solubilidade, por exemplo, a calcita também é pouco solúvel em meio aquoso (com  $K_{PS}$  da ordem de  $10^{-5}$ ), no

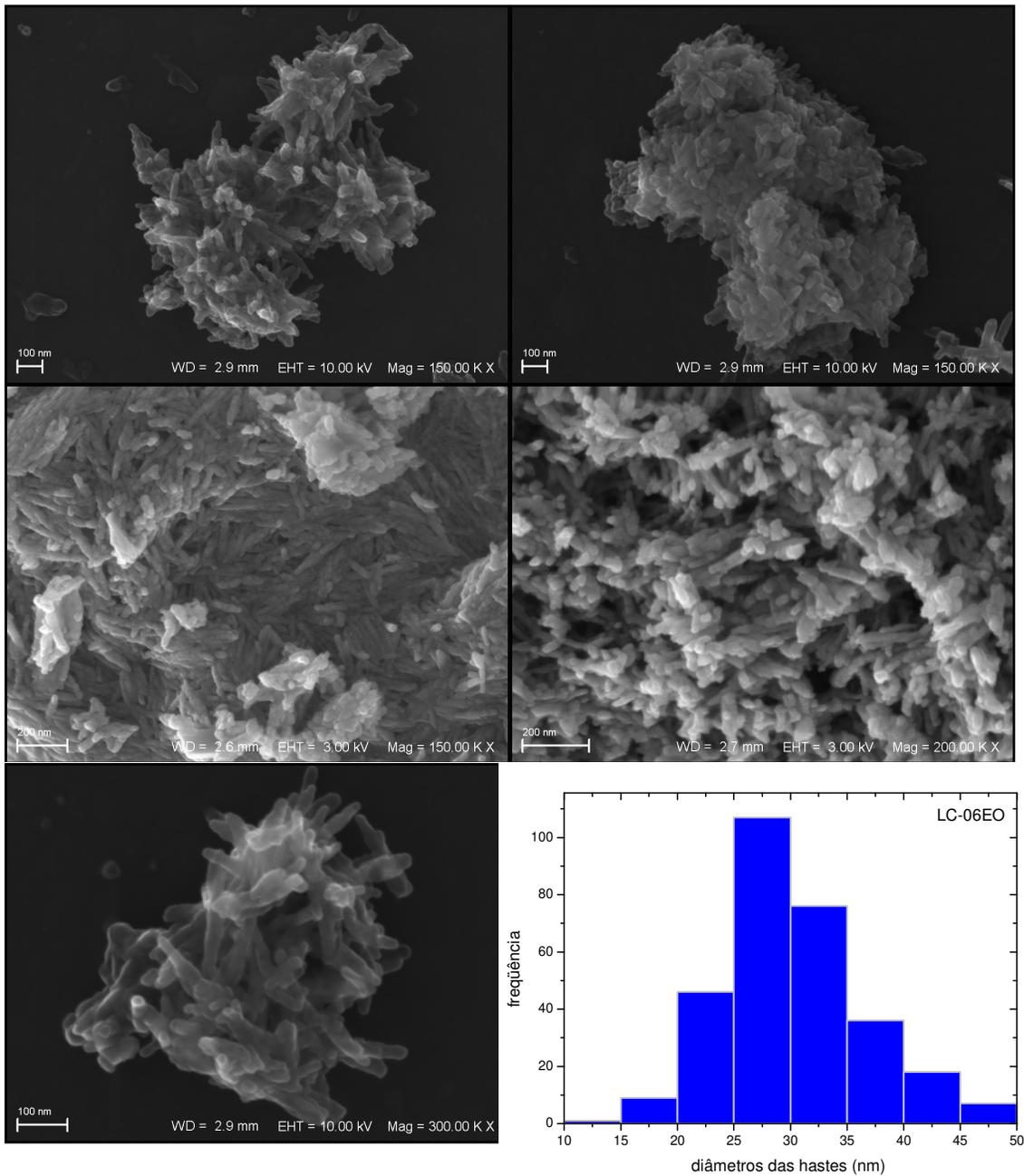
entanto, sua solubilidade é consideravelmente maior quando comparada a da HAP. Assim, a precipitação preferencial da calcita em relação a qualquer fosfato de cálcio deve ser explicada por fatores cinéticos, ou pelo pH no momento da precipitação, ou pela saturação dos íons carbonato, enfim, há várias possibilidades para explicar esta observação. Como o foco desta Tese consiste em compreender como os sistemas auto-organizados controlam as propriedades das nanopartículas de HAP sintetizadas *in situ* seria conveniente explorar um pouco mais dos mecanismos de formação dos materiais formados na ausência de surfactantes em oportunidades futuras. No entanto, a constatação de que a composição dos materiais formados nos sistemas comparativos difere da composição esperada, e que é obtida nos sistemas auto-organizados, é uma informação importante que não deve ser ignorada.

#### **4.4.4. Influência dos Sistemas Auto-Organizados na Morfologia das Nanopartículas de HAP.**

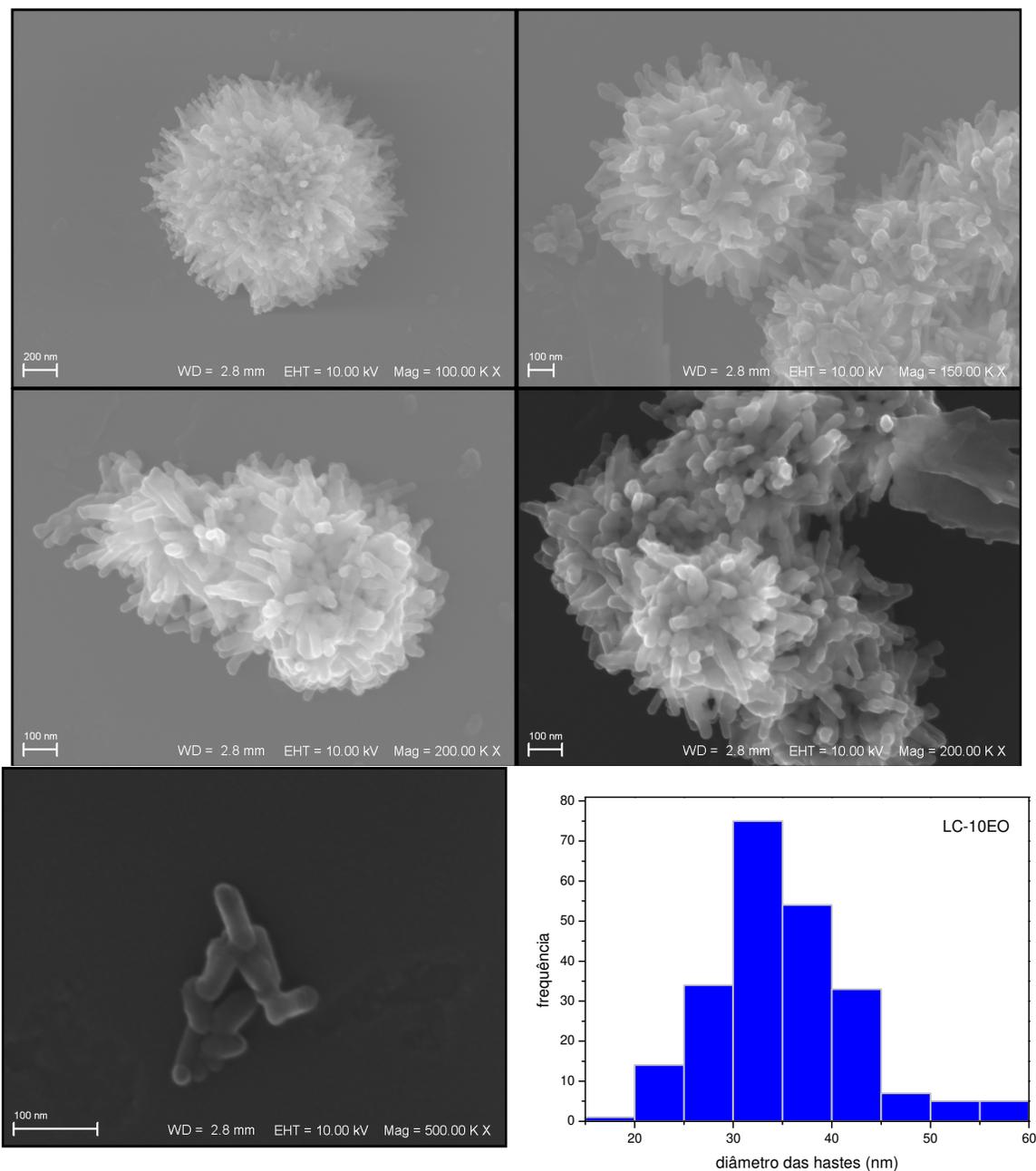
Para avaliar o efeito dos sistemas auto-organizados no controle morfológico e dimensional da HAP, foram obtidas micrografias dos materiais sintéticos nos diferentes sistemas auto-organizados e na presença de PEG utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura convencional (SEM) e também por emissão de campo (SEM-FEG). As micrografias encontram-se nas Figuras 33 até 40.



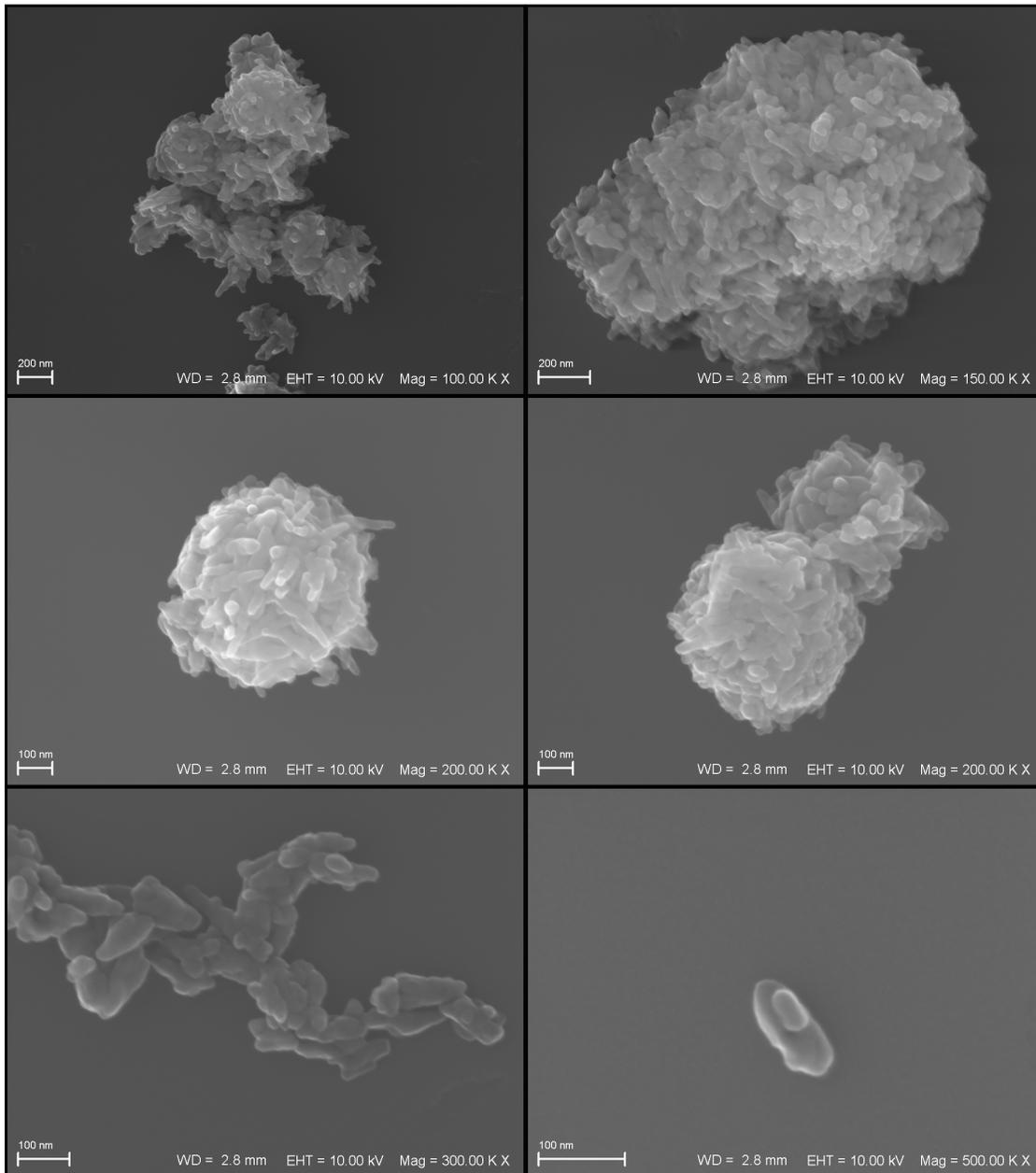
**Figura 33.** Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada sintetizadas na fase LC-04 (caracterizada como um cristal líquido hexagonal reverso) e histograma mostrando a distribuição de diâmetros das nanohastes.



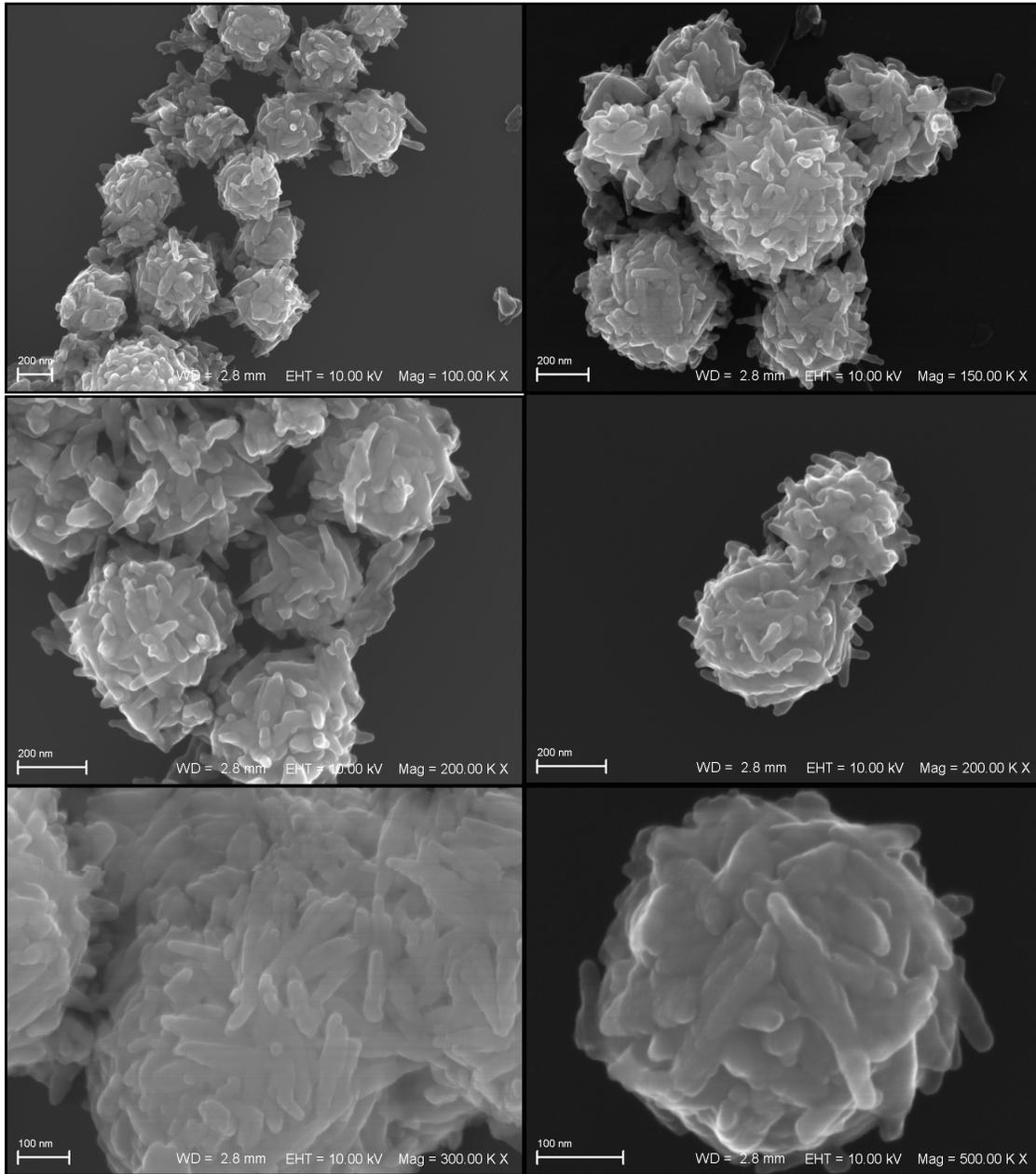
**Figura 34.** Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizadas na fase LC-06 (caracterizada como um cristal líquido lamelar) e histograma mostrando distribuição de diâmetros das nanohastes.



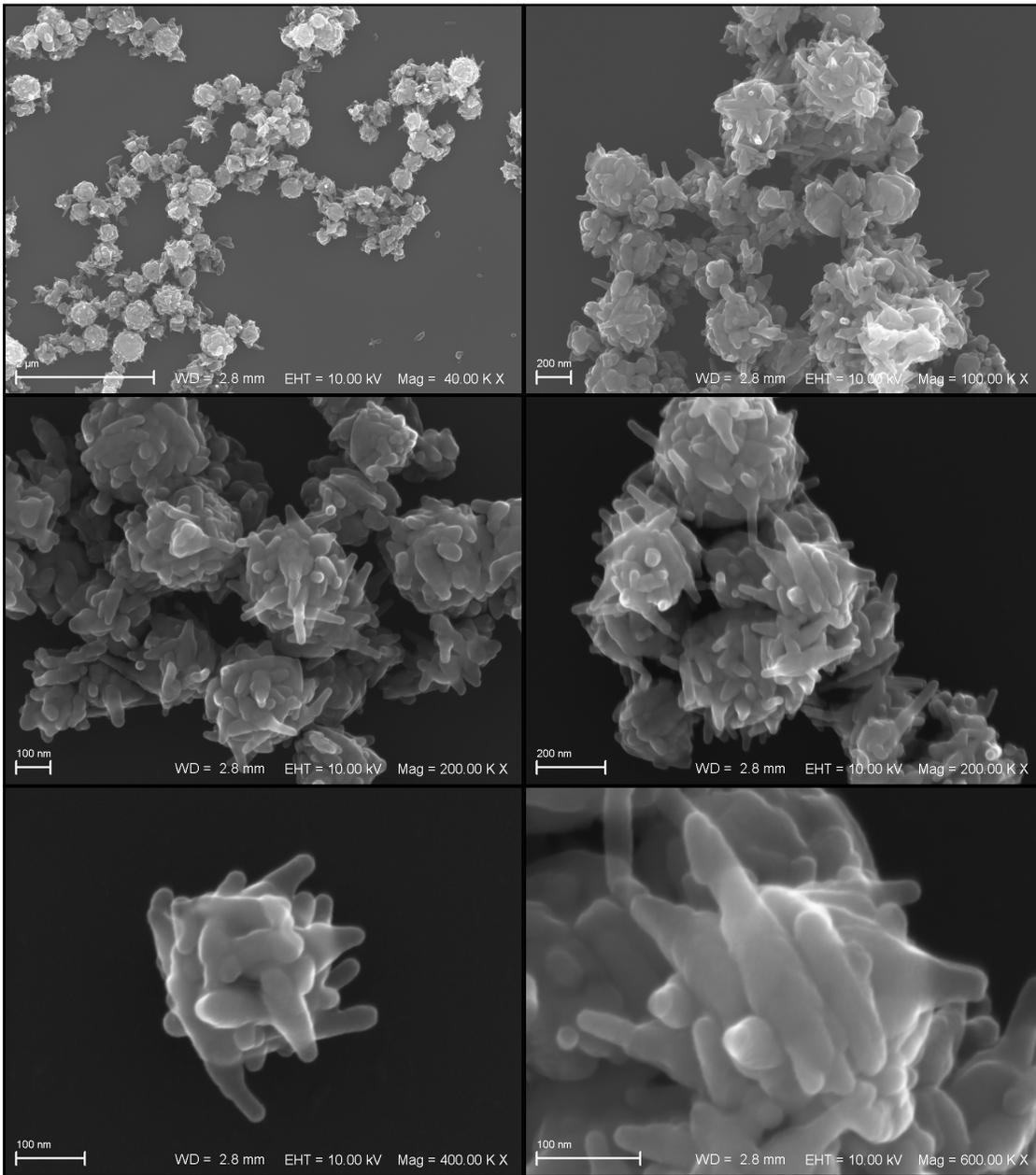
**Figura 35.** Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizada na fase LC-10 (caracterizada como cristal líquido hexagonal) e histograma mostrando distribuição de diâmetros das hastes.



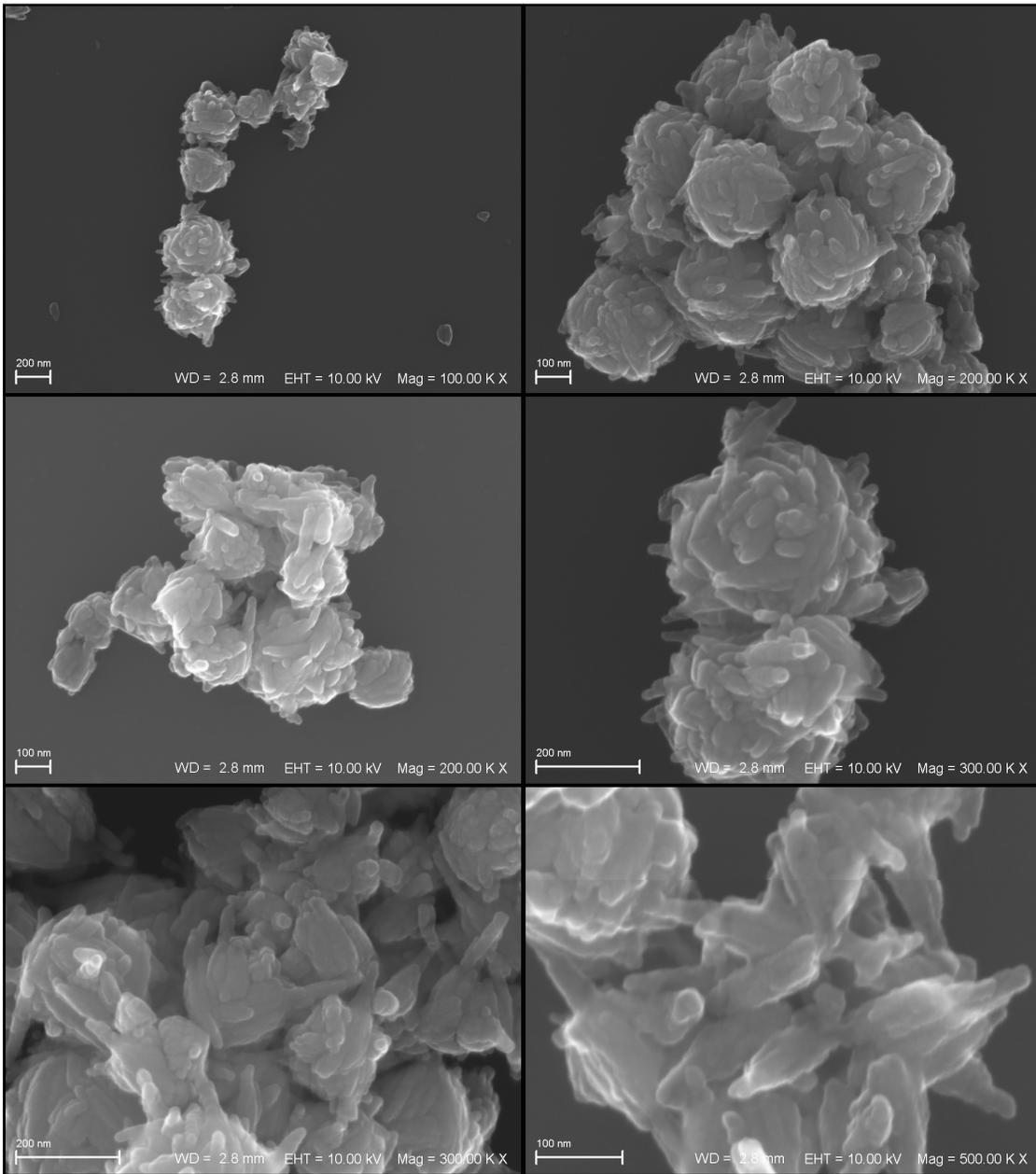
**Figura 36.** Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizadas no sistema LC-15, caracterizado como uma mistura de um cristal líquido hexagonal e um cúbico irregular.



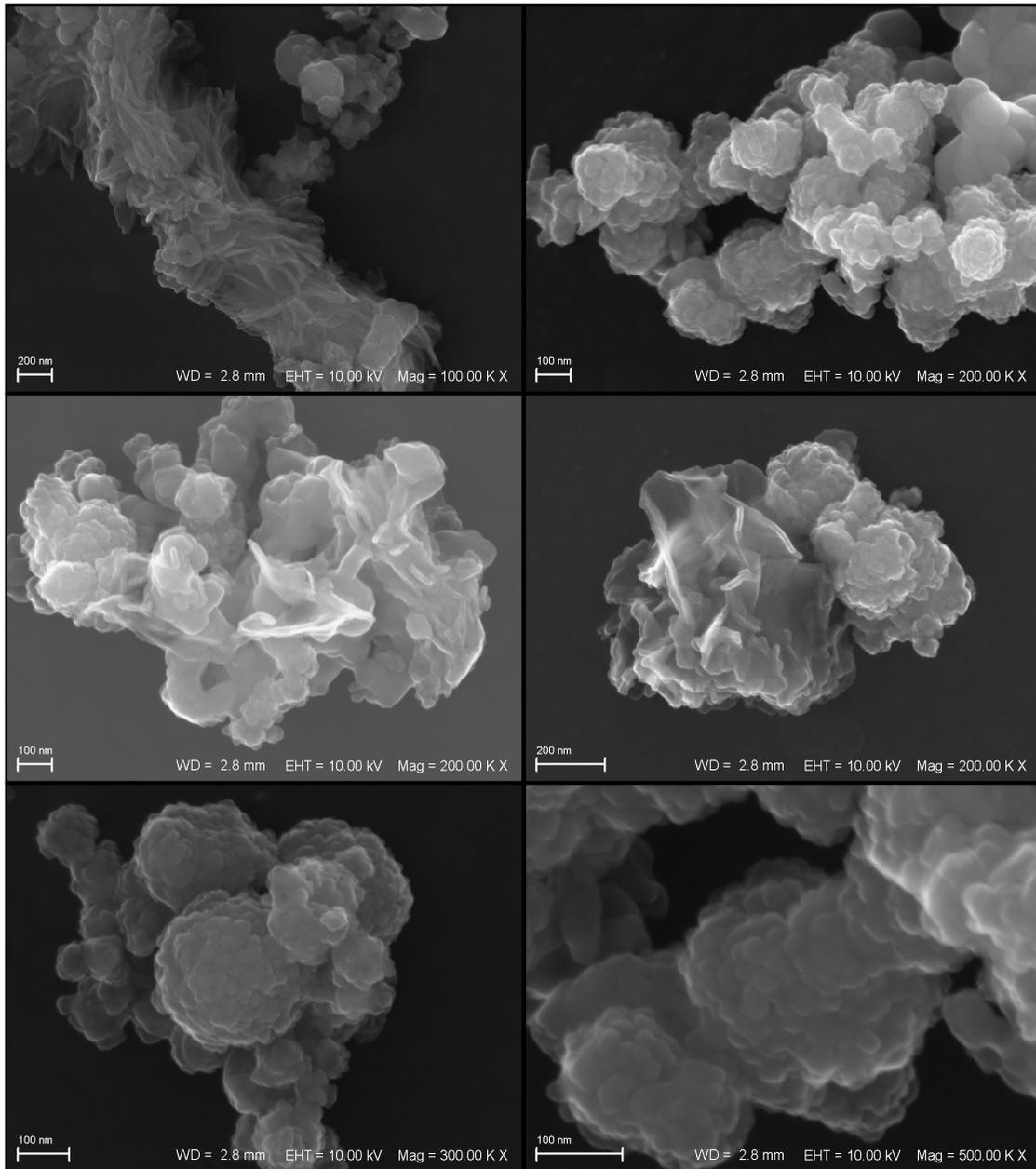
**Figura 37.** Micrografias das nanopartículas de HAP carbonatada, sintetizadas no sistema LC-20, caracterizado como uma mistura de fases cúbicas (Pn3m e irregular).



**Figura 38.** Micrografias de nanopartículas de HAP carbonatada sintetizada na fase LC-23, caracterizada como cristal líquido cúbico irregular.



**Figura 39.** Micrografias de nanopartículas de HAP carbonatada sintetizadas na fase LC-30, caracterizada como cristal líquido cúbico irregular.



**Figura 40.** Micrografias do material sintetizado na presença de PEG (fase PEG-23). O material foi caracterizado como uma mistura de HAP e calcita.

Observando-se cuidadosamente as Figuras 33 até 39, nota-se algumas semelhanças comuns a todos os materiais que foram obtidos nos diferentes sistemas auto-organizados, independentemente do sistema de síntese. As partículas de HAP obtidas apresentaram dimensões nanométricas e morfologia alongada que lembram hastes e, por esta razão, serão denominadas de nanohastes de HAP.

Em alguns casos, as nanohastes de HAP possuem diâmetros uniformes ao longo da sua extensão e, em outros, os diâmetros são irregulares. Para as sínteses nas quais houve uniformidade dos diâmetros das partículas, estes diâmetros foram medidos e tratados estatisticamente. As Figuras 33, 34 e 35 mostram as micrografias das nanohastes de HAP que apresentaram diâmetros uniformes. A partir das micrografias e usando-se o software Image Tool 3.0, os diâmetros foram medidos e estatisticamente transformados em histogramas, que estão mostrados no canto esquerdo inferior de cada uma das Figuras (33 a 35).

A Tabela 9 mostra os valores médios dos diâmetros das nanohastes para cada síntese.

**Tabela 9.** Valores médios dos diâmetros das nanohastes de fosfatos de cálcio sintetizados nos diferentes sistemas auto-organizados.

<b>Fase</b>	<b>Tipo de Sistema auto-organizado</b>	<b>Número de medidas</b>	<b>Diâmetro médio das hastes (nm)</b>
LC-04	Hexagonal reverso	295	$30 \pm 5$
LC-06	Lamelar	300	$30 \pm 6$
LC-10	Hexagonal	228	$35 \pm 7$

De maneira geral, a Tabela 9 mostra que os diâmetros médios das nanohastes de HAP sintetizadas nos sistemas auto-organizados caracterizados como hexagonal reverso, lamelar e hexagonal, foram relativamente próximos. Apenas as nanopartículas formadas na fase LC-10 apresentaram diâmetros ligeiramente maiores quando comparadas com as demais, entretanto, aplicando-se o teste “t de Student” estes diâmetros não são estatisticamente diferentes a um nível de 95% de confiança.

Observando-se cuidadosamente, as Figuras 36 até 39, nota-se que os materiais obtidos nas fases preparadas com surfactantes contendo 15 ou mais grupos etoxilados apresentaram morfologia alongada, porém, o diâmetro destas nanohastes não são uniformes ao longo de toda a sua extensão. De maneira geral, observa-se que as extremidades das hastes são mais estreitas quando comparadas às regiões centrais e, por este motivo, daqui em diante, a morfologia destes materiais será designada como sendo nanohastes irregulares. Devido a esta irregularidade, os diâmetros destas nanohastes não foram determinados.

É interessante notar que, embora os cristais líquidos que geraram as nanohastes regulares sejam diferentes, eles têm em comum o fato de serem anisotrópicos, enquanto que as fases que originaram as nanohastes irregulares são isotrópicas. Este fato indica que a anisotropia exerce influencia sobre a regularidade observada para o diâmetro das hastes.

Outro fato interessante a ser observado nas Figuras 36 até 39 é como as nanohastes irregulares se entrelaçam, formando estruturas globulares. O modo como as nanohastes se agregam para formar estas estruturas pode ser conseqüência do arranjo cúbico destas fases, pois este tipo de arranjo em que as hastes parecem estar empilhadas foram observados para todos os sistemas auto-organizados isotrópicos. Tomando-se os materiais sintetizados na fase LC-10 que é um cristal líquido hexagonal (Figura 35) como comparação, verifica-se que as nanohastes se aglomeram numa estrutura tipo-ouriço, de maneira nitidamente diferente quando comparadas com as estruturas resultantes das fases cúbicas. Estas observações foram levadas em consideração na Seção 4.5, onde alguns

modelos foram propostos para explicar como os sistemas auto-organizados controlam a precipitação das nanopartículas de HAP *in si*. Porém, a compreensão destas observações ainda consiste em um desafio.

As observações realizadas até o momento permitem sugerir que há um forte comprometimento entre a anisotropia das fases e o controle de forma e de tamanho dos materiais, de modo que a anisotropia da fase parece ser um fator mais determinante do que a própria estruturação da fase em si (lamelar, hexagonal ou cúbica), visto que todos os materiais apresentaram morfologia alongada de hastes, mas somente aqueles obtidos nas fases anisotrópicas apresentaram diâmetros uniformes.

Os materiais sintetizados na fase PEG-23, apresentaram morfologias bem distintas quando comparados com aqueles obtidos nos sistemas auto-organizados, como pode ser visto na Figura 40. As micrografias mostradas nesta Figura mostram que o material obtido na fase PEG-23 não apresentou morfologia alongada de haste, como observado para os materiais sintetizados nos sistemas auto-organizados, mas sim, duas formas morfológicas distintas: enquanto uma parte do material se apresenta na forma de placas, outra parte forma aglomerados com formas arredondadas. Estes aglomerados são formados pela união de partículas menores que também se assemelham muito mais com glóbulos do que com hastes. Em consequência do material ter sido caracterizado como uma mistura de hidroxiapatita e calcita é bem provável que estas diferentes morfologias sejam consequência das diferentes composições. De qualquer modo, as partículas formadas na presença de PEG não apresentaram similaridade em termos morfológicos com àquelas sintetizadas nos sistemas auto-organizados.

Embora o PEG não seja um surfactante, a morfologia do material sintetizado em sua presença difere significativamente da morfologia do material sintetizado na ausência de surfactante (Figura 23), indicando que a presença de PEG modifica a morfologia do material.

Os resultados mostrados até aqui permitem concluir que, de fato, os sistemas auto-organizados levaram a formação de nanohastes de HAP com composições controladas (HAP carbonatada), morfologias alongadas (hastes) e dimensões uniformes (nanométricas), exercendo um controle sobre o processo de precipitação *in situ*. A obtenção de materiais com composições diferentes e sem controle morfológico ou dimensional, como observado para os materiais precipitados nos sistemas comparativos, realmente fortalece a evidência de que os cristais líquidos são capazes de controlar as propriedades das nanopartículas de HAP precipitadas *in situ*, atuando como espécies de moldes.

Assim, os resultados obtidos permitem que possam ser propostos modelos que expliquem o mecanismo de controle exercido pelos sistemas auto-organizados sobre as propriedades das nanohastes de HAP precipitadas *in situ* nestes sistemas.

#### **4.5. Estudo da formação das Nanopartículas de HAP nos Sistemas Auto-Organizados**

Para compreender como os cristais líquidos controlam as propriedades das partículas de fosfatos de cálcio precipitadas *in situ*, foram realizados experimentos de SAXS de sistemas auto-organizados independentemente, os quais foram separados em três grupos descritos a seguir:

grupo I) Sistemas auto-organizados sem partículas (idênticos aos mostrados previamente na Seção 4.4.1);

grupo II) Sistemas auto-organizados contendo partículas de HAP precipitadas *in situ*. Neste caso, foram obtidas curvas de SAXS dos sistemas do grupo I após a permeação de amônia;

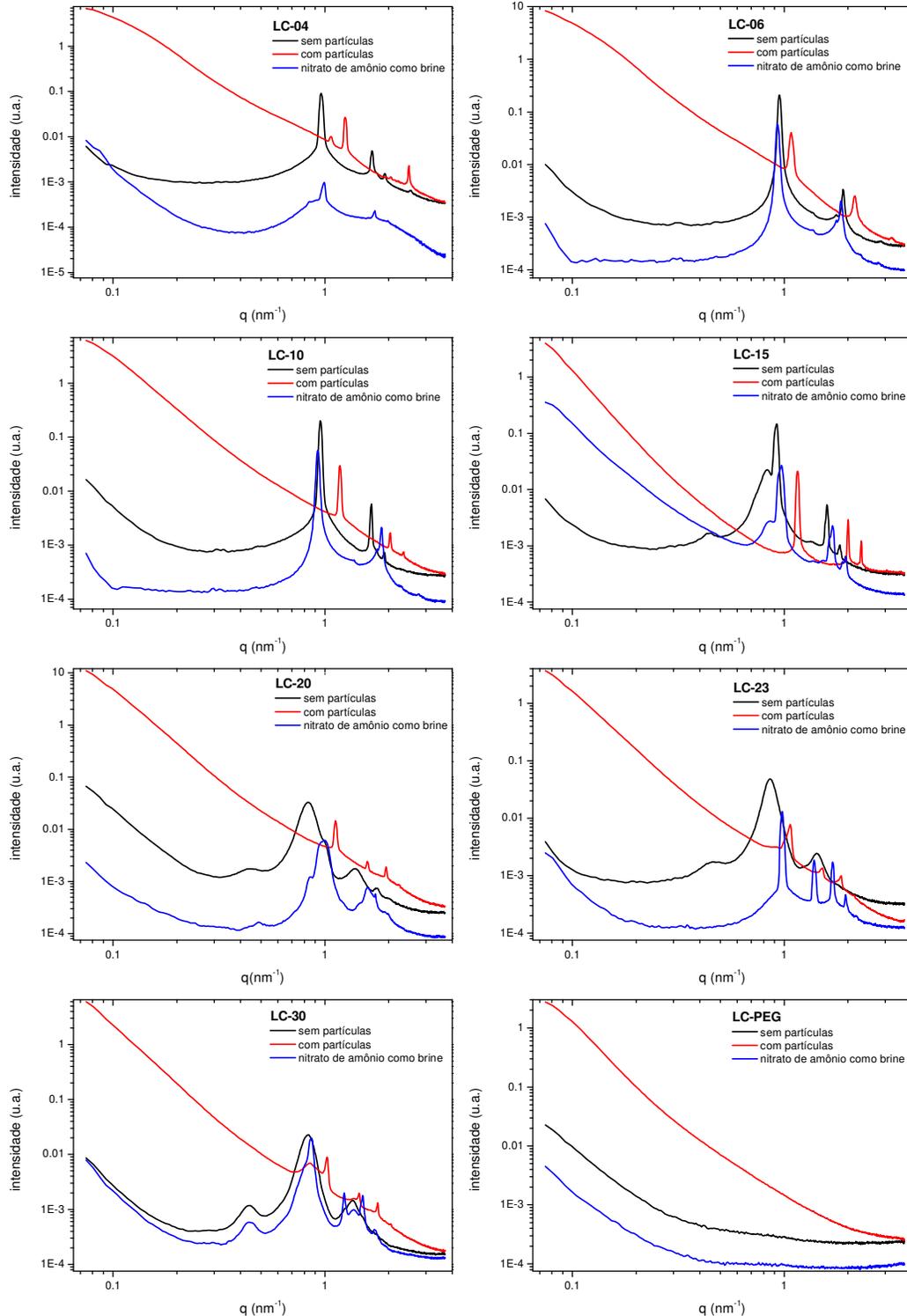
grupo III) Sistemas auto-organizados formados com solução de nitrato de amônio  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$  como solução aquosa com força iônica equivalente à solução resultante após a precipitação *in situ* das partículas de HAP.

Os sistemas representados pelos grupos I e II foram analisados para obter características das partículas de HAP precipitadas *in situ* através do espalhamento de raios X para valores pequenos de  $q$  ( $q \approx 0$ ), região de Guinier.

Os sistemas correspondentes ao grupo III simulam a composição e a força iônica dos sistemas auto-organizados após a precipitação das partículas de HAP, pois quando os íons cálcio e fosfato precipitam, a fase aquosa resultante é composta basicamente por íons nitrato e amônio e sua força iônica é reduzida em relação à fase original prévia à precipitação.

A Figura 41 mostra as curvas de SAXS obtidas para cada sistema (com ou sem partículas e contendo nitrato de amônio como solução aquosa) preparado com os diferentes surfactantes.

Neste experimento, esperava-se que as curvas de SAXS das fases preparadas com nitrato de amônio (grupo III) fossem semelhantes às curvas das fases contendo partículas precipitadas (grupo II), devido à similaridade na composição e na força iônica das fases pertencentes a estes dois grupos. Entretanto, as curvas obtidas para o grupo III se assemelharam muito mais às obtidas para o grupo I (fases sem partículas precipitadas), com exceção do sistema LC-23, cujo comportamento da curva da fase preparada com nitrato de amônio realmente foi mais semelhante à curva obtida para a fase contendo partículas. Outra observação interessante é que as curvas das fases preparadas com nitrato de amônio apresentam picos mais definidos para os sistemas LC-20, LC-23 e LC-30 quando comparadas com as curvas dos grupos I e II obtidas para estes mesmos sistemas. Estes dados podem indicar que os sistemas preparados com surfactantes contendo 20 ou mais grupos etoxilados são mais sensíveis à variação da força iônica do que os demais sistemas, preparados com os surfactantes que contém até 15 unidades EO.



**Figura 41.** Curvas de SAXS dos sistemas auto-organizados preparados com surfactantes com diferentes grupos etoxilados contendo ou não partículas de HAP (curvas em vermelho e preto, respectivamente) e fases preparadas com nitrato de amônio como solução aquosa (curva em azul).

Embora o foco deste experimento tenha sido analisar a influência do sistema auto-organizado na formação das partículas, é impossível não notar o efeito inverso, ou seja, o efeito causado pela formação das partículas nas fases, o qual será brevemente discutido.

Observando-se as curvas obtidas para as fases contendo partículas precipitadas *in situ* (grupo II), que estão representadas em vermelho na Figura 41, nota-se que todas elas apresentaram picos mais definidos, ou seja, mais estreitos, quando comparadas às curvas dos grupos I e III, principalmente para os sistemas formados com surfactantes contendo mais de 15 grupos etoxilados. Além disso, na maior parte dos casos, a formação das partículas *in situ* conduziu a uma transição de fases. Uma terceira observação interessante é o fato de que todas as fases contendo partículas apresentaram curvas de SAXS com os picos deslocados para valores maiores de  $q$ , o que indica menores distâncias de repetição.

A Tabela 10 mostra as caracterizações dos diferentes sistemas auto-organizados permitindo notar que apenas as fases LC-06 e LC-10, não sofreram transição com a formação das partículas. Nestas fases houve apenas um deslocamento dos picos de difração após a precipitação das partículas.

O deslocamento dos picos de difração para maiores valores de  $q$ , observado para as curvas contendo partículas, está relacionado com as distâncias interplanares ou distâncias de repetição das fases, segundo a equação:  $q = 2\pi/d$ . A Tabela 11 mostra as distâncias de repetição calculadas para os primeiros picos mais intensos das fases pertencentes aos três grupos analisados.

**Tabela 10.** Caracterização dos sistemas auto-organizados sem partículas, com partículas de HAP *in situ* e preparados com solução aquosa de nitrato de amônio.

Fase	Fase sem partículas (grupo I)	Fase com partículas (grupo II)	Fase preparada com Nitrato de amônio (grupo III)
LC-04	hexagonal reversa	2 fases lamelares	hexagonal
LC-06	lamelar	lamelar	lamelar
LC-10	hexagonal	hexagonal	lamelar
LC-15	Hexagonal+cúbica*	hexagonal	hexagonal+cúbica*
LC-20	cúbica*	cúbica Pn3m	hexagonal + cúbica*
LC-23	cúbica*	cúbica Pn3m	Cúbica Pn3m
LC-30	cúbica*	Cúbica*	Cúbica Pn3m + Cúbica*

\* fases que apresentam picos largos que se sobrepõem nas posições esperadas para as fases cúbicas, que podem indicar arranjos distorcidos ou mistura de fases.

**Tabela 11.** Distâncias de repetição das fases prévia e posteriormente à formação das partículas.

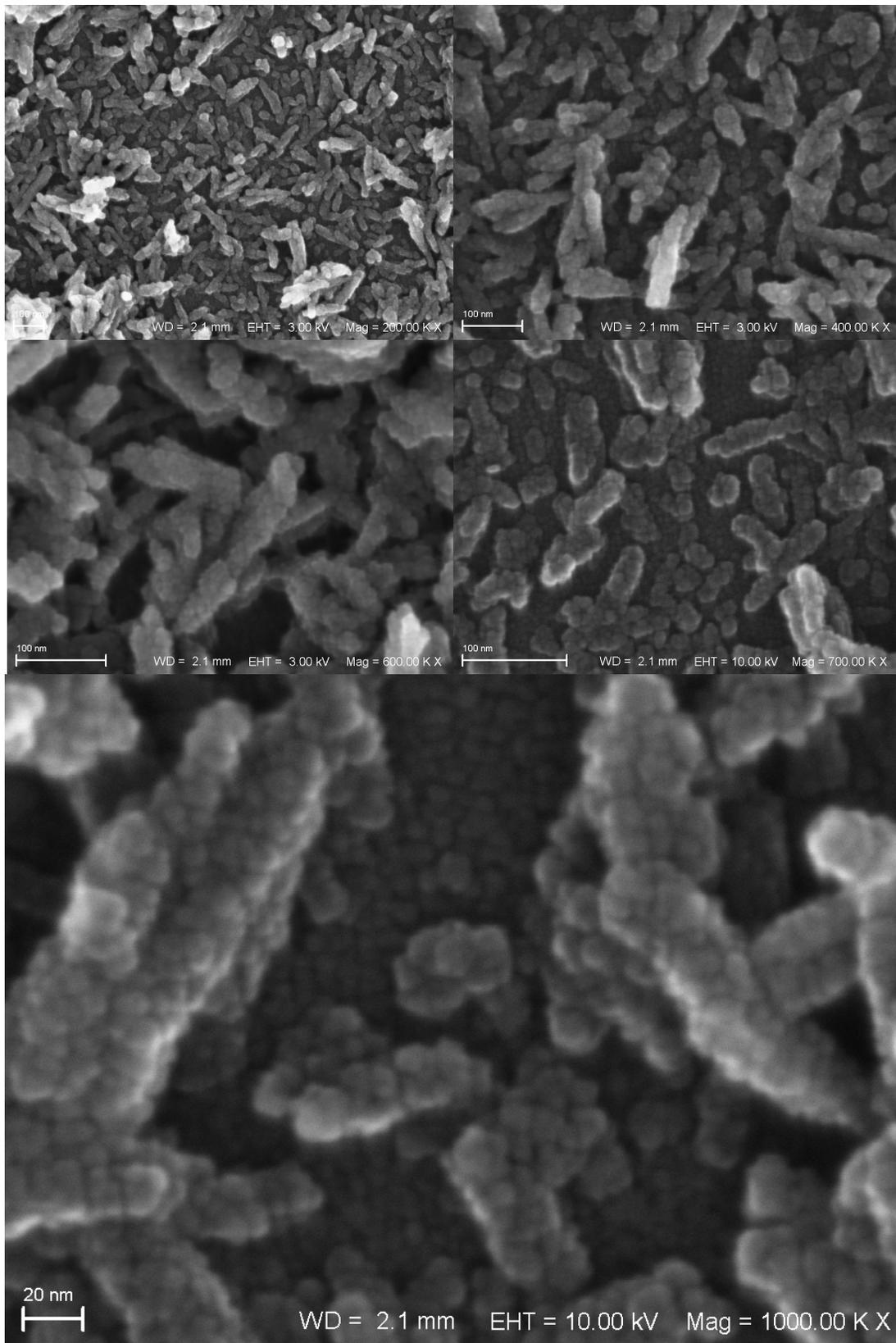
Fase	Distâncias de repetição (nm)		
	Fase sem partículas (grupo I)	Fase com partículas (grupo II)	Fase preparada com Nitrato de amônio (grupo III)
LC-04	6,5	5,9	6,4
LC-06	6,6	5,8	6,8
LC-10	6,6	5,4	6,8
LC-15	6,8	5,4	6,5
LC-20	7,5	5,6	6,5
LC-23	7,3	5,6	6,5
LC-30	7,5	6,2	7,2

De maneira geral, após a formação dos sólidos as distâncias de repetição das fases diminuem, certamente mostrando que há uma influência da formação das partículas sob a fase. As distâncias de repetição calculadas para as fases preparadas com nitrato de amônio são mais próximas dos valores calculados para as fases que não contem partículas *in situ*, o que sugere que a força iônica não seja o fator determinante para explicar a diminuição dos espaçamentos interplanares nestes casos.

O efeito da formação das partículas sobre as fases, seja no que se refere às transições ou as distâncias interplanares, geralmente são ignorados nos trabalhos. Estes resultados mostram que seria interessante avaliar, em trabalhos futuros, as causas que levam à mudança nas distâncias interplanares das fases com a formação das partículas *in situ*.

Embora os experimentos de SAXS permitissem fazer algumas observações sobre a influência das partículas nas fases, o objetivo deste experimento foi justamente o oposto, ou seja, de compreender como os sistemas auto-organizados controlam as propriedades das partículas precipitadas *in situ*, sobretudo no que se refere ao tamanho e a morfologia destas partículas.

Antes de continuar analisando as curvas de SAXS, é conveniente observar novamente algumas microscopias obtidas por SEM-FEG das nanopartículas de HAP precipitadas no sistema LC-04. Neste caso, em particular, os componentes orgânicos deste sistema foram removidos pelo método de lavagem com etanol e acetona, e não pelo método de queima a 500 °C, como foi utilizado para as demais amostras. Assim, em concordância com os resultados mostrados na Seção 4.2, é possível afirmar que a formação das hastes não é consequência do aquecimento a 500 °C. Por outro lado, ao se realizar as análises de microscopia (SEM-FEG) notou-se que as amostras que foram lavadas apresentaram maior facilidade de desaglomeração e, com isto, foi possível obter imagens das nanohastes precipitadas no sistema LC-04 com maior aumento e melhor resolução e isto possibilitou obter informações mais detalhadas com relação ao tamanho e a morfologia das nanopartículas de HAP, como mostra a Figura 42.



**Figura 42.** Micrografias das nanohastes de HAP sintetizadas na fase LC-04.

Através da Figura 42, é possível notar que as nanohastes de HAP são formadas pela aglomeração de nanopartículas de HAP ainda menores com morfologias globulares, as quais se alinham e formaram as hastes, com  $30 \pm 5$  nm de diâmetro, conforme indicado na Tabela 9. Apesar das micrografias permitirem observar que as nanohastes sejam formadas por partículas ainda menores de HAP, é difícil por meio destas imagens poder determinar precisamente as dimensões destas nanopartículas menores. Assim, as curvas de espalhamento por SAXS serão analisadas com esta finalidade.

As curvas de SAXS trazem duas informações independentes simultaneamente, as quais se referem a duas contribuições descritas como fator forma e fator estrutura. Enquanto o fator estrutura está relacionado à região de espalhamento relativa à auto-organização do meio (região onde ocorre a difração e que já foi analisada na ocasião da caracterização dos sistemas auto-organizados), o fator forma refere-se ao espalhamento das partículas em si e este espalhamento ocorre em valores de  $q$  muito pequenos, tendendo a zero. A região da curva onde se observa o espalhamento das partículas é denominada de Região de Guinier e a análise do espalhamento nesta região permite obter parâmetros da partícula, tal como o raio de giro ( $R_g$ ) ou raio de Guinier, que é uma grandeza proporcional ao tamanho da partícula.

A Tabela 12 mostra os valores dos raios de giro das nanopartículas de HAP, os quais foram obtidos diretamente das curvas de espalhamento usando-se o software SASfit 0.93.2. A Tabela 12 mostra também os raios das partículas de HAP contidas *in situ* nos sistemas auto-organizado que foram calculados a partir dos valores de  $R_g$ , considerando que estas partículas sejam esféricas, pois, acredita-se que as nanohastes de HAP tenham sido formadas a partir da aglomeração orientada de nanopartículas ainda menores e esféricas de HAP, conforme discutido a seguir.

**Tabela 12.** Raios de giro (Rg) e raios das partículas contidas *in situ* nos cristais líquidos formados com os diferentes surfactantes.

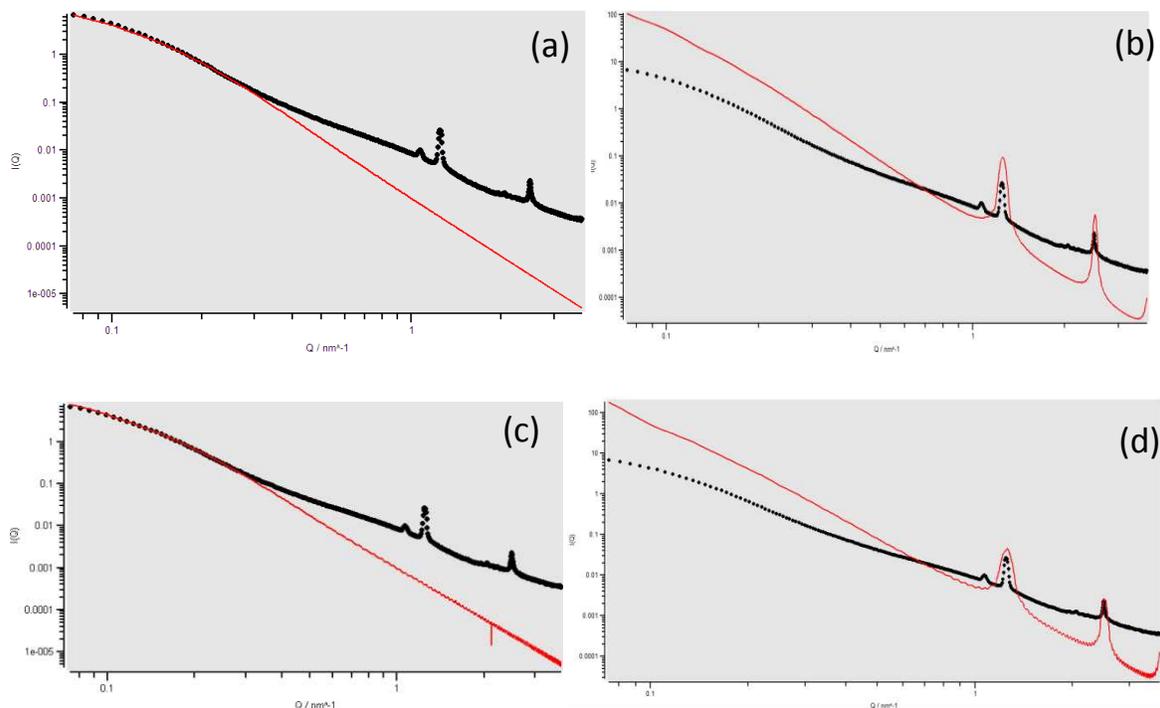
Fase	Rg (nm)	Número de pontos usados no ajuste	$\frac{Rg^2 q_{\max}^2}{4\pi^2}$	Raio da partícula (nm)
LC-04	16,9 ± 0,3	9	0,11	21,8± 0,4
LC-06	17,8 ± 0,5	9	0,12	23,0± 0,6
LC-10	20,6 ± 0,3	8	0,15	27,0± 0,5
LC-15	28,4 ± 0,7	4	0,18	36,6± 0,9
LC-20	24,4 ± 0,9	5	0,15	32± 1
LC-23	22,5 ± 0,5	7	0,16	29,0± 0,7
LC-30	26,1 ± 0,8	6	0,19	34± 1
PEG-23	22,2 ± 0,3	8	0,17	28,6± 0,4

A confiabilidade dos resultados de Rg foi avaliada usando-se a Equação A1-3 (ver Apêndice 1) e todos os valores obtidos encontram-se no intervalo delimitado por esta mesma equação. No entanto, a Região de Guinier, em um gráfico de I versus q, se caracteriza por um patamar de espalhamento observado para valores de q tendendo a zero, porém, este patamar não foi observado na maioria das curvas. Apenas para os sistemas LC-04, LC-06 e LC-10 é possível observar uma região inicial (para valores de q muito pequenos) onde a inclinação da curva é ligeiramente menor, sugerindo a existência de um patamar. Para as demais fases, formadas com surfactantes contendo 15 ou mais grupos etoxilados, pode haver um patamar em regiões cujos valores de q são ainda menores, para as quais não há medidas de espalhamento. Estes resultados indicam que os raios de giro das partículas formadas nestas fases podem ser ainda maiores do que os indicados na Tabela 12.

Os raios de giro calculados para as partículas no sistema LC-04 são da ordem de 17 nm e, portanto, bem maiores do que as distâncias de repetição do

sistema auto-organizado (5,9 nm) - Tabelas 11 e 12. Em conjunto com os resultados de microscopia, estes resultados sugerem que as nanohastes de HAP tenham sido formadas pela aglomeração orientada das nanopartículas de HAP ainda menores, as quais foram previamente precipitadas nos cristais líquidos. Neste caso, a anisotropia da fase teria um caráter importante na orientação das partículas, definindo a morfologia dos materiais.

O software SASfit 0.93.2 possibilita ajustar curvas teóricas aos dados de espalhamento de raios X obtidos experimentalmente, levando em consideração simultaneamente o espalhamento das partículas e dos sistemas auto-organizados. O programa apresenta vários parâmetros, relacionados às partículas e aos sistemas auto-organizados, que devem ser ajustados concomitantemente para que a curva teórica se sobreponha à experimental, fornecendo as informações desejadas sobre os sistemas. A vantagem de utilizar o SASfit para analisar os resultados de espalhamento obtidos nesta Tese consiste em poder determinar o tamanho e a morfologia das partículas de HAP precipitadas *in situ*, com o diferencial que, para isso, não haveria a necessidade de remover o sistema auto-organizado, como foi feito para obter as imagens de microscopia das nanopartículas. No entanto, várias tentativas de ajustes foram feitas sem sucesso para os sistemas estudados nesta Tese. A Figura 43 mostra as tentativas de ajuste feitas para o sistema LC-04. Este sistema foi escolhido, pois é o que possui uma maior quantidade de informações prévias, devido às microscopias de SEM-FEG que apresentaram maiores aumento e resolução.



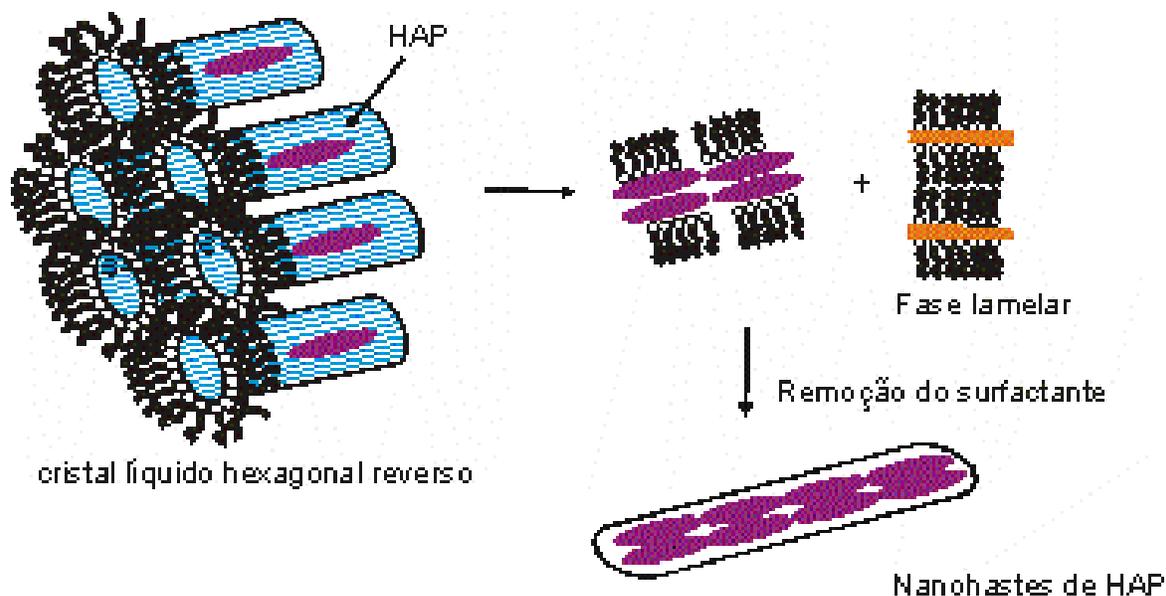
**Figura 43.** Curvas de SAXS referentes ao sistema LC-04 contendo partículas de HAP. As curvas pontilhadas pretas mostram os dados experimentais e as curvas vermelhas referem-se aos ajustes. Os ajustes consideram apenas o formato esférico (a) e cilíndrico (c) para as partículas e os mesmos ajustes com sobreposição da estrutura lamelar (b e d).

As tentativas de ajuste da Figura 43 levam em consideração apenas a forma das partículas (curvas a e c) e, em seguida, há a sobreposição da estrutura auto-organizada (curvas b e d). Assim, a curva ajustada na Figura 43 (a) considera que o formato das partículas seja esférico com raio de 7,5 nm, enquanto que o ajuste da curva da Figura 43 (c) assume que a morfologia das partículas seja cilíndrica (com raio de 7,5 nm e comprimento de 133 nm). Estas tentativas de ajuste no SASfit foram baseadas nas imagens das partículas de HAP mostradas na Figura 42, onde é possível notar que as partículas menores que formam as hastes apresentam morfologia globular, onde cada unidade teria um raio aproximado com valor menor ou igual a 10 nm. Então, as tentativas de ajuste das curvas foram feitas alterando-se os valores de raio e fitando curvas teóricas até

que a melhor sobreposição fosse verificada. É interessante notar que ambas as curvas (a) e (c) parecem ter ajustes semelhantes apesar das morfologias consideradas serem diferentes (esférica e cilíndrica, respectivamente). Estes resultados de ajuste não permitem afirmar se nos sistemas após a precipitação, as partículas se encontravam alinhadas.

Ambas as curvas apresentam um melhor ajuste nos pontos iniciais, mas para valores de  $q$  maiores, onde a contribuição do fator estrutura do cristal líquido passa a prevalecer, o ajuste torna-se pior. Ao se acrescentar o fator estrutura nas curvas (Figuras 43 (b) e (d)), os ajustes continuam insatisfatórios. Embora várias tentativas tenham sido feitas para se obter um melhor ajuste entre as curvas teóricas e experimentais, inclusive considerando outras morfologias para as partículas e tentando ajustar os fatores forma e estrutura concomitantemente (resultados não mostrados) não foi possível obter um ajuste adequado. Como estes ajustes são importantes para o entendimento do processo de formação e organização das partículas, eles poderão ser continuados em trabalhos futuros. Os ajustes feitos mostraram que a coexistência das duas contribuições (forma e estrutura) parecem não ser completamente independentes.

Dentre todas as fases estudadas, a LC-04 é a única que corresponde a um cristal líquido hexagonal reverso, onde necessariamente haveria um confinamento da solução aquosa e com isto, uma limitação dos íons necessários para a formação dos sólidos, os quais posteriormente se agregam formando as nanohastes. A Figura 44 mostra um modelo que foi proposto para explicar a formação das nanohastes na fase LC-04.



**Figura 44.** Modelo proposto para a formação das nanohastes na fase LC-04.

No modelo proposto, sugere-se que as nanopartículas de HAP se formem no interior dos agregados (região que é hidrofílica). Após a precipitação, ocorre a transição do cristal líquido de hexagonal reverso para lamelar, conforme indicam as curvas de SAXS (Figura 41). Em função da falta de ajuste das curvas do SASfit com as curvas de SAXS do sistema com partículas, pode-se propor duas possibilidades: ou as partículas estão agregadas na forma de hastes *in situ* nos cristais líquidos ou a agregação ocorre com a remoção dos componentes orgânicos, onde as nanopartículas menores se orientam e formam as hastes.

Modelos análogos poderiam ser construídos para explicar a morfologia e a limitação dimensional das nanopartículas que foram sintetizadas nos outros sistemas auto-organizados. Embora a fase LC-04 corresponda ao único sistema reverso, onde necessariamente uma porção de solução aquosa estaria confinada no interior das micelas, e deste modo, cada micela atuaria como um reservatório limitado de íons, que limitaria o tamanho das partículas, os outros sistemas auto-

organizados, principalmente os anisotrópicos, também são capazes de segregar domínios hidrofílicos e hidrofóbicos.

Outro fator que deve ser explorado a fim de justificar o controle dimensional das partículas é a limitação da difusão dos íons nos sistemas auto-organizados, pois a viscosidade inerente a estes sistemas é um fator que dificultaria a difusão iônica limitando o tamanho das partículas. Considerando que mesmo as hastes irregulares de HAP (que foram precipitadas em meios isotrópicos - Figuras 36-39) apresentaram tamanhos razoavelmente uniformes, é possível que o controle dimensional das partículas seja realmente uma consequência da limitação da difusão iônica.

Para verificar esta hipótese foi feito um experimento de NMR para avaliar o grau de liberdade das moléculas de água *in situ* nos sistemas auto-organizados através de medidas de  $T_2$  (tempo de relaxação spin-spin ou transversal). Esta medida é importante, pois o grau de liberdade da água está diretamente relacionado com a difusão iônica no domínio hidrofílico e, portanto, ao fator que pode ser a causa da limitação do tamanho das partículas.

A relaxação spin-spin ou relaxação transversal ( $T_2$ ) é resultante da perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos individuais de cada spin durante a sua precessão. A relação existente entre  $T_2$  e a mobilidade molecular deve-se ao fato do parâmetro  $T_2$  ser inversamente proporcional ao tempo de correlação,  $\tau_c$ , que é o tempo médio necessário para que uma molécula rotacione 1 radiano ( $\approx 60^\circ$ ) a partir da sua orientação inicial. De maneira geral, em tempos muito menores que  $\tau_c$ , a maioria das moléculas permanecem próximas às suas posições originais e em tempos muito maiores que  $\tau_c$ , as orientações moleculares são completamente aleatórias, de modo que toda a “memória” da orientação molecular original foi perdida. Assim, espera-se que moléculas muito pequenas, ou em solventes muito pouco viscosos tenham tempos de correlação muito pequenos (e conseqüentemente, maiores valores de  $T_2$ ) devido aos rápidos movimentos moleculares [50]. Mais detalhes sobre  $T_2$  podem ser vistos no Apêndice 2.

A Tabela 13 mostra os valores de  $T_2$  medidos para o hidrogênio da molécula de água que está contida nos diferentes sistemas auto-organizados. Embora os dados sejam apenas indicativos, pois devido à viscosidade dos sistemas, as medidas são bem difíceis de serem feitas, havendo poucas replicatas, os resultados da Tabela 13 indicam que os valores de  $T_2$  são em média 10 vezes menores quando comparados aos valores da água destilada. Em outras palavras, os resultados confirmam que o grau de liberdade das moléculas de água nos sistemas auto-organizados é realmente menor quando comparado à água destilada e isto permite considerar que, realmente, nos sistemas auto-organizados há uma limitação da difusão iônica.

**Tabela 13.** Tempos de relaxação spin-spin ( $T_2$ ) calculados para a água nos diferentes sistemas auto-organizados e na fase PEG-23.

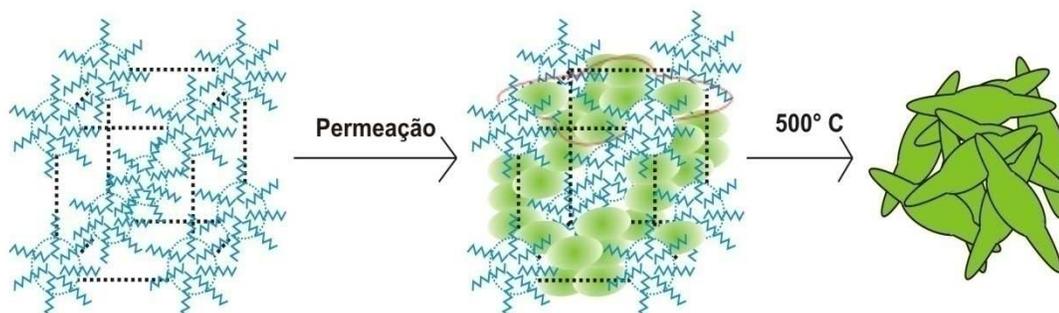
<b>Fase</b>	<b>Número de Medidas</b>	<b>Média <math>\pm</math> sd(s)</b>
Água destilada	2	2,69 $\pm$ 0,03
LC-04	2	0,34 $\pm$ 0,05
LC-06	3	0,126 $\pm$ 0,007
LC-10	2	0,3 $\pm$ 0,3
LC-15	3	0,27 $\pm$ 0,02
LC-20	2	0,370 $\pm$ 0,006
LC-23	2	0,24 $\pm$ 0,03
LC-30	2	0,175 $\pm$ 0,006
PEG-23	1	0,484

Observa-se para a fase PEG-23, que o valor medido para  $T_2$  é bem menor do que o medido para a água, mostrando que nesta fase também há restrição de movimentos moleculares. Entretanto, o valor de  $T_2$  para o PEG 23 é maior que o obtido para os demais sistemas auto-organizados, inclusive para a fase LC-23 que

tem o mesmo número de unidades etoxiladas por molécula de surfactante quando comparada a cadeia de PEG-23.

As mesofases cúbicas, assim como a fase PEG-23, são isotrópicas. Porém, ambos sistemas (cúbicos e fase PEG-23) são muito diferentes, pois, enquanto na fase PEG-23, as moléculas de PEG encontram-se aleatoriamente distribuídas, nos sistemas auto-organizados cúbicos, as micelas estão organizadas. De certa maneira, verifica-se pelos dados da Tabela 13 que a restrição dos movimentos moleculares da água, realmente, é mais pronunciada nos sistemas auto-organizados cúbicos (LC-15 ao LC-30) quando comparados à fase PEG-23. De fato, estes resultados são coerentes com as análises prévias de tamanho e morfologia das partículas de HAP precipitadas nos diferentes meios, pois as partículas sintetizadas na fase PEG não são alongadas e nem é possível prever o tamanho das mesmas, enquanto que nos sistemas auto-organizados cúbicos, as nanopartículas apresentam morfologia de hastes que, conforme o modelo proposto, foram formadas pela aglomeração de partículas de HAP ainda menores.

Estes resultados indicam que a limitação da difusão iônica possa ser a causa do controle dimensional das partículas, enquanto que a auto-organização do sistema leva a formação das partículas com morfologias de hastes. A Figura 45 mostra como uma mesofase cúbica micelar poderia controlar as propriedades das nanopartículas de HAP sintetizadas na sua presença.



**Figura 45.** Modelo que sugere como ocorre o controle dimensional e morfológico das nanopartículas de HAP precipitadas em uma mesofase cúbica micelar.

De acordo com o modelo proposto na Figura 45, a solução aquosa formada pelos íons cálcio e fosfato não está confinada no interior das micelas e sim, entre as micelas e que, portanto, o controle dimensional das partículas deve-se à limitação da difusão iônica no sistema auto-organizado. Após a permeação de amônia, ocorre a nucleação da HAP (representado pelos glóbulos), os núcleos de HAP recém-formados crescem e após a remoção da fase orgânica, se aglomeram formando as nanohastes irregulares. O modelo sugere que as nanohastes sejam irregulares devido à falta de um alinhamento das partículas de HAP em uma direção preferencial, visto que o sistema em questão é isotrópico.

#### **4.6. Considerações**

Os resultados e os modelos propostos permitem tecer um conjunto de considerações que os organizam e estabelecem uma forte correlação entre eles.

As sínteses realizadas nos sistemas auto-organizados levaram a obtenção de nanopartículas de HAP carbonatadas com morfologias alongadas, evidenciando que os sistemas auto-organizados, de fato, atuam como moldes que regulam o tamanho, a morfologia e, até mesmo, a composição dos materiais inorgânicos precipitados *in situ*. Estes resultados contrastam com aqueles das sínteses de comparação: sem surfactante, com concentrações reduzidas de surfactante ou na presença de polietilenoglicol (PEG-23) e também com outros resultados referentes à síntese de HAP em microemulsões, publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, onde as nanopartículas de HAP apresentaram morfologia esférica [33]. Nestes sistemas comparativos, não foram obtidas nanopartículas de HAP com morfologias de hastes e controle dimensional, mas sim, partículas com variações nas dimensões, morfologias e composições.

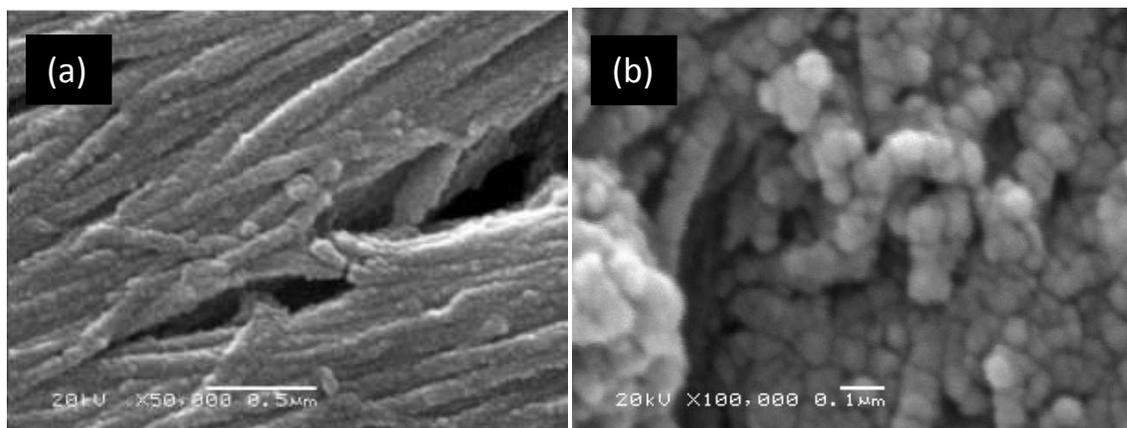
Os resultados referentes à síntese da HAP em sistemas auto-organizados também diferem consideravelmente dos exemplos publicados por outros autores, para outros materiais, como é o caso das sínteses de partículas de ZnSe que

apresentaram propriedades que copiam as dimensões e as morfologias dos domínios hidrofílicos dos cristais líquidos em que foram sintetizadas [1-2].

Baseando-se nos resultados de Karanikolos e colaboradores [1-2] era de se esperar que as nanopartículas de HAP também copiassem as morfologias e dimensões dos domínios hidrofílicos dos cristais líquidos, de modo que as partículas de HAP obtidas no cristal líquido lamelar deveriam apresentar formato de placas, nos cristais líquidos hexagonais como nanotubos e, nos cristais líquidos cúbicos, como esferas. Porém, as microscopias eletrônicas mostram claramente que independentemente do sistema auto-organizado utilizado na síntese, as nanopartículas de HAP são, na verdade, nanohastes e com dimensões muito maiores do que seriam esperadas levando em consideração as distâncias de repetição das fases. Estes resultados, a princípio, controversos, permitiram verificar posteriormente que as nanohastes eram formadas por nanopartículas ainda menores de HAP, as quais eram alinhadas em direções preferenciais devido à influência dos sistemas auto-organizados. Estes resultados permitiram considerar que a segregação dos domínios hidrofílicos nos sistemas auto-organizados aliada à limitação da mobilidade dos íons dentro destes domínios, foram as causas do controle dimensional e morfológico das partículas precipitadas no interior das fases. Os valores de  $T_2$  medidos para a água contida nos sistemas auto-organizados mostraram que a mobilidade molecular da água nestes sistemas é reduzida, o que reforça a hipótese de que a difusão iônica nos sistemas seja limitada e responsável pelo controle dimensional das partículas de HAP.

Estes resultados facilitam a compreensão do mecanismo de biomineralização que ocorre durante a osteogênese secundária, onde as nanopartículas de HAP nucleiam e crescem entre as fibrilas de colágeno, em um ambiente anisotrópico, restrito espacialmente e controlado pela ação de proteínas específicas. Microscopias eletrônicas do tecido ósseo desproteínado, obtidas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa [37], mostram que este tecido é formado por nanopartículas de HAP que tendem a se alinhar em uma direção

preferencial (Figura 46) de maneira muito similar ao que se observa experimentalmente nas precipitações de HAP nos cristais líquidos anisotrópicos.



**Figura 46.** Microscopia da matriz óssea inorgânica de crânio de rato whistar com diferentes aumentos: (a)50 000 e (b) 100 000 vezes.

Mesmo na ausência de proteínas específicas à biomineralização, as partículas de HAP sintetizadas nesta Tese de Doutorado apresentaram tamanhos e morfologias controlados pelos sistemas auto-organizados semelhantes às observadas nos tecidos ósseos, demonstrando que, o papel *in vivo* destas proteínas também pode estar relacionado ao transporte dos íons e a organização local que leva a orientação dos cristais de HAP nas fibras de colágeno.

É interessante notar que a síntese de HAP meramente na presença de colágeno leva a formação de clusters de HAP, onde as partículas não possuem qualquer controle morfológico ou dimensional. Por outro lado, as nanopartículas de HAP precipitadas na presença de um precursor polimérico contendo sítios negativamente carregados, precipitaram entre as fibras de colágeno uniaxialmente orientadas [5, 52]. De maneira análoga, as proteínas não colagênicas que participam da biomineralização também são polianiónicas [5], como é o caso da Amelogenina [35], uma proteína primordial no processo de biomineralização do esmalte dentário, o que levou a acreditar que a presença destes sítios

negativamente carregados fosse primordial no controle morfológico e orientacional das nanopartículas de HAP nos tecidos mineralizados. Entretanto, os resultados contidos nesta Tese mostraram que as nanopartículas de HAP precipitadas nos cristais líquidos anisotrópicos, também se alinharam em uma direção preferencial formando nanohastes com diâmetros uniformes, de modo que a orientação das nanopartículas dependeu da orientação local, mas que não houve a necessidade de sítios com cargas negativas para a nucleação dos íons cálcio, talvez porque os grupos etoxilados dos surfactantes tenham atuado como sítios de quelação de íons cálcio.

Portanto, os resultados desta Tese auxiliam na compreensão do mecanismo de biomineralização, levando a crer que a composição, as dimensões e as morfologias das nanopartículas de HAP que formam os tecidos mineralizados, muito provavelmente, foram controladas pela limitação da difusão iônica e orientação das fibras de colágeno durante a precipitação que ocorre *in vivo*. Assim, estes fatores podem ser mais decisivos do que a presença de sítios negativamente carregados nas proteínas que participam do processo de biomineralização, ou mesmo de um ambiente totalmente restrito atuando como um reservatório de íons, como seria o papel das vesículas de matriz.



## 5. Conclusões

Os resultados obtidos nesta Tese de Doutorado permitiram concluir que:

- Sistemas auto-organizados foram preparados com surfactantes nonilfenil etoxilados com diferentes tamanhos de cadeia hidrofílica (sendo no mínimo, 04 e no máximo, 30 unidades etoxiladas por molécula de surfactante). Os sistemas auto-organizados foram caracterizados como cristais líquidos hexagonal reverso, lamelar, hexagonal e mesofases cúbicas, nesta ordem, à medida que o comprimento da cadeia hidrofílica (unidades EO) do surfactante aumentava.
- Os diferentes sistemas auto-organizados foram utilizados como meios de síntese para obter nanopartículas de hidroxiapatita com propriedades controladas. Todas as sínteses levaram à formação de partículas com dimensões nanométricas e morfologia de hastes, sendo que o diâmetro das hastes apresentava-se mais uniforme quando os sistemas auto-organizados eram anisotrópicos, enquanto que as sínteses nos sistemas isotrópicos levaram a formação de nanohastes com diâmetros irregulares. Em contraste, outros meios de síntese sem auto-organização (sínteses realizadas na ausência de surfactante, na presença de surfactante S-10 em concentração reduzida e na presença de PEG-23) levaram a formação de partículas sem controle morfológico ou dimensional.

- As nanohastes de HAP foram formadas por partículas ainda menores de HAP que se aglomeraram de maneira organizada por influência da auto-organização do sistema utilizado como meio de síntese. Provavelmente, estas partículas ainda menores de HAP foram formadas por precipitação *in situ* nas regiões hidrofílicas dos sistemas auto-organizados e tiveram seus tamanhos controlados devido a limitação da difusão iônica nestes ambientes, conforme sugerem os resultados de medidas de tempo de relaxação spin-spin ( $T_2$ ) por RMN da água contida nestes sistemas.
- A restrição da difusão iônica *in vivo* associada à auto-organização das fibras de colágeno assemelham-se às propriedades dos sistemas auto-organizados utilizados nesta Tese e, podem ser peças-chaves para a compreensão de como a matriz óssea orgânica é capaz de controlar a nucleação e crescimento das nanopartículas de HAP durante o processo de biomineralização.

## 6. Referências Bibliográficas

- [1] Karanikolos, G.N., Alexandridis, P., Mallory, R., Petrou, A., Mountziaris, T.J., Templated Synthesis of ZnSe Nanostructures using Lyotropic Liquid Crystals. *Nanotechnology* **2005**, 16: 2372-2380.
- [2] Karanikolos, G.N., Law, N-L, Mallory, R., Petrou, A., Alexandridis, P., Mountziaris, T.J., Water-based Synthesis of ZnSe Nanostructures using Amphiphilic Block Copolymer Stabilized Lyotropic Liquid Crystals as Templates. *Nanotechnology* **2006**, 17: 3121-3128.
- [3] Hegmann, T., Qi, H., Marx, V.M. Nanoparticles in Liquid Crystals: Synthesis, Self-Assembly, Defect Formation and Potential Applications. *J. Inorg. Organomet. P.* **2007**, 17(3):483-508.
- [4] Cai, Y., Tang, R. Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. *J. Mater. Chem.* **2008**, 18: 3775–3787.
- [5] Olszta, M., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R., Kim, Y-Y., Kaufman, M.J., Douglas, E.P., Gower, L.B. Bone Structure and Formation: A New Perspective. *Mat. Sci Eng R* **2007**, 58: 77–116.
- [6] Bertazzo, S., Bertran, C.A., Camilli, J.A. Morphological Characterization of Femur and Parietal Bone Mineral of Rats at Different Ages”. *Key Eng. Mat.* **2006**, 309-311: 11-14.
- [7] Eichert, D., Drouet, C., Sfhia, H., Rey, C., Combes, C. Nanocrystalline Apatite-Based Biomaterials. Nova Science Publishers Inc., New York, **2009**.
- [8] Imura, T., Hikosaka, Y., Worakitkanchanakul, W., Sacai, H., Abe, M., Konoshi, M., Minamikawa, H., Kitamoto, D., Aqueous-phase behavior of natural glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid A: sponge, cubic and lamellar phases. *Langmuir*. **2007**, 23: 1659-1663.
- [9] Jönsson, B, Lindman, B., Holmberg, K., Kronberg, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley & Sons, LTD. West Sussex, **1998**.

- [10] Rosen, M.J. Surfactants and Interfacial Phenomena. 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley & Sons, New Jersey, **2004**.
- [11] Tadros, T.F. Applied Surfactants Principles and Applications. Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [12] Evans, D.F. The colloidal domain: Where Physics, chemistry, biology and technology meet, VCH, New York, **1994**.
- [13] Sagalowicz, L., Leser, M., Watzke, H.J., Michel, M. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. *Trends in Food Sci. Technol.* **2006**, 17: 204-214.
- [14] Segota, S., Tezak, D. Spontaneous Formation of Vesicles. *Adv. Colloid. Interfac.* **2006**, 121: 51-75.
- [15] Pouzot, M., Mezzenga, R., Leser, M., Sagalowicz, L., Guillot, S., Glatter, O. Structural and rheological investigation of Fd3m inverse micellar cubic phases. *Langmuir.* **2007**, 23: 9618-9628.
- [16] May, A., Aramaki, K., Gutierrez, J.M. Phase Behavior and Rheological Analysis of Reverse Liquid Crystals and W/I2 and W/H2 Gel Emulsions Using an Amphiphilic Block Copolymer. *Langmuir.* **2011**, 27: 2286–2298.
- [17] Edlund, H., Bydén, M., Lindström, B., Khan, A. Ternary phase equilibria of the 1-Dodecylpyridinium bromide-dodecanol-water system. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 156: 231-240.
- [18] Chandrasekhar, S. *Liquid Crystals*. Cambridge University Press, New York, **1977**.
- [19] Khetrapal, C.L., Kunwar, A.C., Tracey, A.S. e Diehl, P. *Lyotropic Liquid Crystals*. Springer-Verlag, New York, **1975**.
- [20] Pasquali, R. C., Bregni, C., Serrao, R. Características e Identificación de los Cristales Líquidos Liotrópicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **2006**, 002 (37): 38-53.
- [21] Dong, R., Hao, J. Complex Fluids of Poly(oxyethylene) Monoalkyl Ether Nonionic Surfactants. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (9): 4978-5022.
- [22] Hyde, S.T., Identification of Lyotropic Liquid Crystalline Mesophases. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*, John Wiley & Sons, LTD. **2002**, Cap. 16, 299-332.

- [23] Aouada, F.A., Moura, M.R., Fernandes, P.R.G., Rubira, A.F., Muniz, E.C. Optical and morphological characterization of polyacrylamide hydrogel and liquid crystal systems. *Eur. Polym. J.* **2005**, 41: 2134.
- [24] Lauglin, R. G., *The Aqueous Phase Behavior of Surfactants*, Academic Press Inc., San Diego, **1994**.
- [25] Firouzi, A., Schaefer, D.J., Tolbert, S.H., Stucky, G.D. Chmelka, B.F. Magnetic-Field-Induced Orientational Ordering of Alkaline Lyotropic Silicate – Surfactant Liquid Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119: 19466-9477.
- [26] Klaus, A., Tiddy, G.J.T., Touraud, D., Schramm, A., St€uhler, G., Kunz, W. Phase Behavior of an Extended Surfactant in Water and a Detailed Characterization of the Concentrated Phases. *Langmuir.* **2010**, 26(22): 16871-16883.
- [27] Glatter, O., Kratky, O. *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press, London, **1983**.
- [28] Yaghmur, A., Campo, L., Salentinig, S., Sagalowicz, L., Leser, M.E., glatter, O. Oil-loaded monolinolein-based particles with confined inverse discontinuous cubic structure (Fd3m). *Langmuir.* **2006**, 22: 517-521.
- [29] Holmberg, K. J. Surfactant-templated Nanomaterials Synthesis. *J Colloid Interf Sci.* **2004**, 274: 355-364.
- [30] Andersson, M., Alfredsson, M.V., Kjellin, P., Palmqvist, A.E.C. Macroscopic Alignment of Silver Nanoparticles in Reverse Hexagonal Liquid Crystalline Templates. *Nano Lett.* **2002**, 2 (12): 1403-1407.
- [31] Yeh, Y-Q., Lin, H-P., Tang C-Y., Mou, C-Y. Mesoporous silica SBA-15 sheet with perpendicular nanochannels. *J. Coll. Interf. Sci.* **2011**, 362: 354-366.
- [32] Li, Y., Tjandra, W., Tam, K.C. Synthesis and Characterization of Nanoporous Hydroxyapatite using Cationic Surfactants as Templates. *Mater. Res. Bull.* **2008**, 43: 2318-2326.
- [33] Kawachi, E.Y. Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em ambientes confinados no sistema Renex-100@ciclohexano/"brine". Tese de Doutorado. Campinas: Unicamp, 2002.
- [34] Campos, D.D.P., Bertran, C.A. Synthesis of Carbonated Hydroxyapatite Nanorods in Liquid Crystals. *J. Mat. Res.* **2008**, 12(3): 265-268.

- [35] Wang, L., Guan, X., Yin, H., Moradian-Oldak, J., Nancollas, G.H. Mimicking the Self-Organized Microstructure of Tooth Enamel. *J. Phys. Chem. C*. **2008**, 112: 5892-5899.
- [36] Bertran, C.A., Allegretti, L.J.M., Bertazzo, S. Synthesis of Calcium Phosphate Nanoparticles in Collagen Medium. *Macromol. Symp.* **2007**, 253:77-81.
- [37] Bertazzo, S. Matriz Óssea Inorgânica e Propriedades da Interface Fosfato de Cálcio/Soluções Aquosas. Tese de Doutorado. Campinas: Unicamp, 2007.
- [38] Golub, E.E. Role of Matrix Vesicles in Biomineralization. *Bioch. Bioph. Acta*. **2009**, 1790: 1592-1598.
- [39] Osawa, H., Hoshi, K., Amizuka, N. Current Concepts of Bone Biomineralization. *J. Oral Biosc.* **2008**, 50 (1): 1-14.
- [40] Gajjerman, S., Narayanan, K., Hao, J., Qin, C., George, A. Matrix Macromolecules in Hard Tissues Control the Nucleation and Hierarchical Assembly of Hydroxyapatite. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (2): 1193-1204.
- [41] Hossainy, S.F.A., Hubbel, J.A. Molecular Weight Dependence of Calcification of Polyethylene Glycol Hydrogels. *Biomater.* **1994**, 15(11): 921-925.
- [42] Varaksa, N., Kuperman, A., Ozin, G.A. Calcitropic Non-ionic Surfactant Lamellar Phases. *Chem. Mater.* **1996**, 8: 1084-1091.
- [43] Marsden, S.S., McBain, J.W. Aqueous Systems of Non-ionic Detergents as Studied by X-Ray Diffraction. *J. Phys. Chem.* **1948**, 52(1): 110-130.
- [44] Nassif, N., Martineau, F., Syzgantseva, O., Gobeaux, F., Willinger, M., Coradin, T., Cassaignon, S., Azaïs, T., Giraud-Guille, M.M. *In vivo* inspired Conditions to Synthesize Biomimetic Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* **2010**, 22: 3653-3663.
- [45] Trommer, R.M., Santos, L.A., Bergmann, C.P. Nanostructured hydroxyapatite powders produced by a flame-based method. *Mat. Sci. Eng. C - Mater.* **2009**, 29: 1770-1775.
- [46] Sarkar, A. and Mahapatra, S. Synthesis of all crystalline phases of anhydrous calcium carbonate. *Cryst. Growth Des.* **2010**, 10: 2129-2135.
- [47] LeGeros, R.Z. and Trautz, O.R. Apatite Crystallites: Effects of carbonate on morphology. *Science* **1967**, 3768: 1409-1411.

- [48] Loher, S., Stark, W.J., Maciejewski, M., Baiker, A., Pratsinis, S.E., Reichardt, D., Maspero, F., Krumeich, F., Günther, D. Fluoro-Apatite and Calcium Phosphate Nanoparticles by Flame Synthesis. *Chem. Mater.* **2005**, 17: 36-42.
- [49] Zang, Y., Liu, Y., Ji, X. Fabrication of flower-like hydroxyapatite agglomerates with the assistant of bamboo membrane. *Mater. Lett.* **2011**, 65: 1982-1985.
- [50] Hore, P.J. Nuclear Magnetic Resonance, Oxford University Press Inc., New York, **1995**.
- [51] Stribeck, N. X-Ray Scattering of Soft Matter. Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2007**.
- [52] Jee, S.S., Kasinath, R.K., DiMasi, E., Kim, Y-Y., Gower, L. Oriented Hydroxyapatite in Turkey Tendon Mineralized via the Polymer-Induced Liquid-Precursor (PILP) Process. *Cryst Eng Comm.* **2011**, 13: 2077-2083.
- [53] Costa, A.C.F.M., Lima, L.H.M.A., Cordeiro, V.V., Viana, K.M.S., Souza, V., Lira, H.L. Hidroxiapatita: Obtenção, Caracterização e Aplicações. *Rev. Eletr. Mat. Proc.* **2009**, 4.3: 29-38.
- [54] Uskokovic, V., Uskokovic, D.P. Nanosized Hydroxyapatite and Other Calcium Phosphates: Chemistry of Formation and Application as Drug and Gene Delivery Agents. *J. Biom. Mat. Res. B.* **2011**, 96B(1):152-191.
- [55] Bertazzo, S., Bertran, C.A., Kawachi, E.Y. Synthetic Calcium Phosphate Nanoparticles Mimetic of Bone Mineral: Similarities in Composition and Morphology. *Key Eng. Mat.* **2006**, 309-311: 507-509.
- [56] de Campos, D.D.P., Cassu, S.N., Garcia, R.B.R., Queiroz, H.A.A.S., Gonçalves, R.F.B., Kawachi, E.Y. Avaliação por SAXS e DSC das Interações entre H<sub>2</sub>O e Renex-100. *Quim. Nova* **2012**, 35 (2): 355-359.
- [57] Kawachi, E.Y. Fosfatos de Cálcio: Porosidade, Cristalinidade, Potencial de Interface e Comportamento *in vivo*. Dissertação de Mestrado. Campinas: Unicamp, 1997.
- [58] Oliveira, S.V., Medeiros, K.M., Araújo, E.P., Braga, C.R.C., Araújo, E.M., Fook, M.V.L. Caracterização Química e Morfológica do Pirofosfato de Cálcio Obtido por Via Úmida. *Rev. Eletr. Mat. Proc.* **2009**, 4.3:11-20.
- [59] Bertazzo, S., Zambuzzi, W.F., Campos, D.D.P., Ogeda, T.L., Ferreira, C.V., Bertran, C.A. Hydroxyapatite Surface Solubility and Effect on Cell Adhesion. *Colloid Surface B.* **2010**, 78: 177-184.

[60] Liu, Y., Sheng, X., Dong, Y., Ma, Y. Removal of high-concentration phosphate by calcite: Effect of sulfate and pH. *Desalination*. **2012**, 289: 66–71.

[61] Sato, T., Hossain, M.K., Acharya, D.P., Glatter, O., Chiba, A., Kunieda, H. Phase Behavior and Self-Organized Structures in Water/Poly(oxyethylene) Cholesterys Ether Systems. *J. Phys. Chem. B*. **2004**, 108: 12927-12939.

## **APÊNDICE 1**

### **Determinação do Raio de Giro das Nanopartículas de HAP por SAXS**

O espalhamento observado na região de Guinier é proporcional ao raio de giro (Rg) ou raio de Guinier, conforme a equação:

$$\ln I(q) = \ln I_0(q) + \frac{Rg^2 q^2}{3} \quad \text{Equação A1-1}$$

A equação A1-1 mostra que o raio de giro é proporcional ao coeficiente angular da reta obtida a partir do gráfico de  $\ln I$  versus  $q^2$ . A importância de se calcular o raio de giro é que ele é proporcional ao tamanho da partícula espalhadora. Considerando-se que a partícula espalhadora seja esférica, a relação entre o raio de giro e o raio da partícula ( $r$ ) é:

$$Rg^2 = \frac{3}{5} r^2 \quad \text{Equação A1-2}$$

A confiabilidade dos valores calculados de Rg é válida se estiver no intervalo dado pela Equação A1-3 [51]:

$$0,1 \leq \frac{Rg^2 q_{\max}^2}{4\pi^2} \leq 0,4 \quad \text{Equação A1-3}$$



## APÊNDICE 2

### O Tempo de Relaxação Transversal ( $T_2$ )

As medidas de NMR baseiam-se na interação da radiação eletromagnética na região de rádio-frequências com spins nucleares. Na presença de um campo magnético externo,  $B_0$ , orientado, por definição, ao longo do eixo z, os spins nucleares alinham-se paralelamente e anti-paralelamente rompendo a degenerescência dos estados quânticos de spin nuclear. Assim, quando uma amostra é submetida a um campo magnético externo, pode haver transição entre os níveis de menor e maior energia pela interação com radiação eletromagnética cuja frequência da radiação coincide com a diferença da energia entre os níveis fundamental e excitado dos spins nucleares. Esta radiação situa-se na região de radio-frequência usualmente próximo a algumas centenas de MHz. A volta dos spins ao estado fundamental ocorre por processos de relaxação dissipativos não radioativos que são descritos pelos tempos de relaxação longitudinal ou spin-rede ( $T_1$ ) e tempo de relaxação transversal ou spin-spin ( $T_2$ ).

Para se compreender um pouco melhor o processo de relaxação transversal ( $T_2$ ) e a sua relação com a dinâmica molecular é necessário descrever, ainda que muito resumidamente, alguns princípios básicos de NMR.

A princípio, duas grandezas importantes dos spins devem ser definidas: o momento angular e momento de dipolo magnético.

Os spins nucleares possuem um momento angular ( $I$ ), cuja magnitude é dada por:

$$|\mathbf{I}| = [I(I + 1)]^{1/2} \hbar \quad \text{Equação A2-1}$$

em que  $\hbar = h/2\pi$ , sendo que  $h$  é a constante de Planck e o número quântico  $I$  pode assumir valores inteiros e semi-inteiros.

Associado ao momento angular de spin existe um momento de dipolo magnético  $\boldsymbol{\mu}$ , dado pela equação:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{I} \quad \text{Equação A2-2}$$

em que  $\gamma$  é a razão giromagnética, uma constante característica de cada núcleo.

Todo núcleo que possui momento magnético, quando submetido na presença de um campo magnético externo homogêneo e estático ( $B_0$ ) - interage com este, eliminando a degenerescência dos estados quânticos, de modo que a energia do sistema se divide em níveis dados por  $(2I + 1)$ . Este rompimento da degenerescência dos estados quânticos de spin nuclear é chamada de **Efeito Zeeman nuclear**, e as transições de spins entre os níveis consistem nos fenômenos estudados em RMN.

A interação do campo externo ( $B_0$ ) com os momentos de dipolo ( $\boldsymbol{\mu}$ ) gera um torque ( $\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0$ ) que faz com que os spins precessionem, ou seja, rotacionem ao redor do eixo  $z$  formando um movimento cônico similar ao de um peão, com frequência de rotação ( $\omega_0$ ), conhecida como frequência de Larmor e descrita por:

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad \text{Equação A2-3}$$

Aplicando-se um campo magnético oscilante de intensidade  $B_1$ , com frequência  $\omega_1$ , e orientado perpendicularmente ao eixo  $z$ , o campo magnético “sentido” pelos spins é um campo resultante entre  $B_1$  e o campo estático  $B_0$ . Quando a frequência do campo pulsante,  $\omega_1$ , coincide com a frequência de Larmor, o campo resultante “sentido” pelos spins torna-se essencialmente  $B_1$  e a magnetização dos spins é deslocada para o plano  $x$ - $y$ . Este processo é chamado

de ressonância nuclear magnética e nesta condição os spins precessionam ao redor do campo  $B_1$ . Devido a processos relacionados a interação entre os spins e, conseqüentemente, à existência de campos oscilantes locais ao longo de z, ocorre a perda de coerência de precessão destes spins com o tempo, de modo que eles passam a precessionar com velocidades angulares ligeiramente diferentes uns dos outros. A consequência é o decaimento da magnetização no plano x-y com uma constante de tempo característica, e este processo pode ser descrito pela equação:

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2} \quad \text{Equação A2-4}$$

em que  $M_x$  é a magnetização resultante no eixo x e  $T_2$  é o tempo de relaxação transversal ou spin-spin, característico da perda de coerência dos spins no plano x-y. Esta equação também é válida para  $M_y$ .

Conhecer o tempo  $T_2$  é importante, pois este se relaciona com a mobilidade molecular. O tempo  $T_2$  é inversamente proporcional ao tempo de correlação,  $\tau_c$ , que é o tempo característico dos movimentos moleculares de difusão rotacional, definido como o tempo médio necessário para que uma molécula rotacione 1 radiano ( $\approx 60^\circ$ ) a partir da sua orientação inicial. De maneira geral, moléculas muito pequenas, ou em solventes muito pouco viscosos, apresentam movimentos moleculares mais rápidos e, por isso, possuem tempos de correlação muito pequenos e, conseqüentemente, maiores valores de  $T_2$ . O contrário ocorre com as moléculas que apresentam movimentação mais restrita, cujos valores medidos de  $T_2$  são menores. Neste sentido, medidas de  $T_2$  podem fornecer informações sobre a dinâmica dos movimentos moleculares de difusão rotacional, sendo ainda sensíveis à microviscosidade à qual moléculas e grupos moleculares estão submetidos.