TACIANE PEREIRA DA COSTA

SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA POROSA COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior

Araraquara
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Taciane Pereira da
C837s Síntese de hidroxiapatita porosa com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro/ Taciane Pereira da Costa. – Araraquara : [s.n], 2012
99 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Miguel Jafelicci Junior

1. Físico-Química. 2. Hidroxiapatita. 3. Magnetita. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

TACIANE PEREIRA DA COSTA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 14 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda
Instituto de Química – USP, São Carlos

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas

1. Dados Pessoais

Nome: Taciane Pereira da Costa
Nome em citações bibliográficas COSTA, T. P.; T. P. COSTA
Filiação: Givaldo Silva Costa e Edna Pereira da Costa
Nascimento: 23/11/1985 - São Paulo/SP - Brasil

Endereço residencial: Rua Pedro Álvares Cabral,1090, apto 01
Centro - Araraquara
14801-390, SP - Brasil
Telefone: (16) 31142027

Endereço eletrônico: e-mail para contato: taci.costa@yahoo.com.br
e-mail alternativo : tacy_mi@yahoo.com.br

2. Formação Acadêmica/Titulação

2010 - 2012 Mestrado em QUÍMICA (FÍSICO-QUÍMICA).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Síntese de hidroxiapatita porosa com nanopartículas de óxido de ferro, Ano de obtenção: 2012
Orientador: Miguel Jafelicci Junior
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 - 2010 Graduação em Quimica Bacharelado.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina.
Orientador: Miguel Jafelicci Junior
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

3. Produção bibliográfica

3.1 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. COSTA, T. P.; MARQUES, R. F. C.; JAFELLICI JUNIOR, M.
Hidroxiapatita porosa para aplicações em osteocarcinoma. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,2012, Águas de Lindóia.

2. COSTA, T. P.; MARQUES, R. F. C.; JAFELLICI JUNIOR, M.
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina In: XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2009, São José do Rio Preto.

3. COSTA, T. P.; MARQUES, R. F. C.; JAFELLICI JUNIOR, M.
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina In: XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2008, São José dos Campos.

3.2 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. MARQUES, R. F. C.; COSTA, T. P.;VARANDA, L. C.; SILVA, N. J. J.; SANTOS, F. J.; MILAN, A.; JAFELICCI JR, M. Magnetite nanoparticles tailored with folic acid through modulated surface amine group density In: VI Encontro SBPMat, 2007, Natal. **Abstracts**. p.D579.

3.3 Apresentações de Trabalho

2. COSTA, T. P., BINI, R. A., MARQUES, R. F. C., JAFELICCI JR, M.
Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro: Funcionalização de Superfície com Alcoxissilanos para Controle de Densidade de Amina. Evento: XXXVIII Semana da Química; 2008, Araraquara.

3.4 Participação em eventos

1. Apresentação Oral na: **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012. (Congresso)
Hidroxiapatita porosa para aplicações em osteocarcinoma.

2. Apresentação de Pôster / Painel na: **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012. (Congresso)
Hidroxiapatita porosa para aplicações em osteocarcinoma.

3. Apresentação de Pôster / Painel na: **XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2009. (Congresso)
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina.

4. Apresentação de Pôster / Painel no: **XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2008. (Congresso)
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina.

5. **"Meio Ambiente e Bicombustíveis" - XXXVI Semana da Química, Instituto de Química (Unesp)**, 2006.
.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me ajudaram de alguma maneira durante a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Miguel Jafelicci Junior, pela orientação e pela oportunidade de aprendizado.

Ao Professor Dr. Rodrigo Costa Marques pela ajuda e ensinamentos.

A Maria e a Ana do Instituto de Química pela companhia e suporte nos bons e maus momentos.

Ao Thor pelo companheirismo e pelos diversos momentos de diversão.

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao Instituto de Química, pela infraestrutura e pela formação.

A Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

Nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) funcionalizadas com (3-aminopropil)trimetoxissilano (APTS) foram sintetizadas e inseridas em hidroxiapatita (HA) porosa a fim de se obter um biocompósito para tratamento de osteomielite e osteocarcinoma. A HA é conhecida por ser um constituinte dos ossos e por sua propriedade de osteocondução. As nanopartículas magnéticas são utilizadas em biomedicina como sensores magnéticos e transportadores devido à resposta ao campo magnético externo. Para a preparação da hidroxiapatita porosa, foi utilizado um molde de esferas de sílica. Durante a síntese das esferas, os parâmetros físico-químicos foram testados a fim de se obter esferas de tamanhos diferentes com estreita distribuição de diâmetros. Sendo escolhidas as esferas de 808, 402, e 223nm, o molde foi preparado modificando a superfície das esferas com peróxido de hidrogênio. O produto foi dispersado em etanol e deixado em sedimentação gravitacional, obtendo-se assim omolde empacotado. O método sol-gel foi usado para a síntese do precursor de hidroxiapatita. Calcinando o precursor a 700ºC, foi possível obter a fase hidroxiapatita. O molde foi infiltrado no gel precursor devidamente caracterizado, sendo que após o tratamento térmico, o molde de sílica foi removido com solução de hidróxido de sódio para a formação da hidroxiapatita porosa. Foram obtidas duas amostras, sendo uma com poros na ordem de 350nm, e outra com poros na ordem de 170nm. Como última etapa, nanopartículas de magnetita funcionalizadas com APTS com tamanhos na ordem de 5nm, foram preparadas por meio do método de co-precipitação em meio aquoso, sendo inseridas na hidroxiapatita porosa obtida. Por meio da análise de EDX, comprovou-se a presença das nanopartículas na hidroxiapatita porosa, entretanto a magnetização da amostra precisa ser melhorada para o sucesso na preparação do biocompósito nanoestruturado. Em todas as etapas, foram realizadas análises para as caracterizações dos diferentes materiais, tais como difratometria de raios X, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia na região do infravermelho, e análise térmica.

Palavras chave: Hidroxiapatita, nanopartículas magnéticas, magnetita.

ABSTRACT

Magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) were synthesized and functionalized with (3-aminopropyl)trimethoxysilane (APTS) to be inserted into hydroxyapatite (HA) porous in order to obtain a biocomposite for the treatment of osteomyelitis and osteocarcinoma. HA is known to be a constituent of bones and by its osteoconductivity properties. The magnetic nanoparticles are used in biomedicine as magnetic sensors and drug transporters due to their response to external magnetic field .For the preparation of porous hydroxyapatite, it was used a template of silica spheres. During the synthesis of such spheres, the physicochemical parameters were tested in order to obtain narrow size diameters distribution of different size spheres. Being chosen spheres of 808, 402, and 223nm, the template was prepared by modifying the surface of the spheres with hydrogen peroxide. The sample was then dispersed in ethanol and placed in gravitational sedimentation field, thereby obtaining the close-packed template. The sol-gel method was used for the synthesis of the hydroxyapatite precursor gel. Calcining the gel at 700°C, it was possible to obtain the hydroxyapatite phase. The template was infiltrated into the characterized gel precursor and after the thermal treatment the silica template was removed by a sodium hydroxide solution for the formation of porous hydroxyapatite. Two samples were obtained one having pores of the order of 350nm, and another one with pores ca.170nm. Functionalized magnetite nanoparticles with sizes of 5nm were prepared by the coprecipitation method in an aqueous medium, being inserted in porous obtained hydroxyapatite it was possible to prove the presence of the nanoparticles in porous hydroxyapatite by EDX analysis results. Nevertheless, the magnetization of the sample needs to be improved to the successful preparation of the nanostructured biocomposite. Samples were analyzed in all preparation steps and characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), infrared spectroscopy and thermal analysis.

Keywords: Hidroxyapatite, magnetic nanoparticles, magnetite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do funcionamento do dispositivo para tratamento de osteocarcinoma. Primeiro o biocompósito sendo inserido no osso, depois a área sendo exposta a um campo magnético alternado (hipertermia magnética) e por último a HA ajudando na regeneração óssea.....17

Figura 2 - Esquema de preparação da HA porosa por meio de um molde de esferas de sílica 18

Figura 3 - Estrutura do PMMA. 21

Figura 4 - Implates odontológicos revestidos com hidroxiapatita [42].....24

Figura 5 - Estrutura da fluorapatita [43] 25

Figura 6 - A estrutura da hidroxipatita projetada no eixo c no plano basal [54]. 30

Figura 7 - Mecanismos para as reações de catálise ácida e básica [74, 75]. 32

Figura 8 - Fulereno [92] 35

Figura 9 - Estrutura da magnetita [95] 36

Figura 10 - Alinhamento dos momentos magnéticos atômicos individuais de diferentes tipos de materiais [93]. 38

Figura 11 - À esquerda exemplo de multidomínios magnéticos e a direita um monodomínio magnético. 39

Figura 12 - Magnetização M como a função de um campo magnético aplicado H [93].....40

Figura 13 – Esquema da relação coercitividade e tamanho em pequenas partículas [108] 41

Figura 14 - Esquema do funcionamento da hipertermia magnética. 42

Figura 15 - Esquema da funcionalização da superfície de nanopartículas com APTS. 44

Figura 16 - Estruturas moleculares do TEOS, APTS e TMF. 46

Figura 17 -Esquema da síntese das esferas de sílica 47

Figura 18 - Esquema de preparação do molde empacotado. 48

Figura 19 - Esquema da síntese do precursor de HA. 49

Figura 20 - Esquema da preparação da HA com poros. 50

Figura 21 - Esquema da síntese das nanopartículas de óxido de ferro com APTS. 50

Figura 22 - Esquema da preparação da HA porosa com nanopartículas magnéticas 51

Figura 23 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra S01. 57

Figura 24 - (a) Micrografia eletrônica de varredura da amostra S02 e (b) Micrografia eletrônica de varredura da amostra S03 58

Figura 25 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S04 59

Figura 26 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S05 60

Figura 27 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S06 61

Figura 28 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S07 62

Figura 29 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S08 62

Figura 30 - Difratograma de raios X da amostra S02 63

Figura 31 - Espectro na região do infravermelho da amostra S02. 64

Figura 32 - Fotografia do molde TP2223. 65

Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra TP808. 66

Figura 34 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra TP223 66

Figura 35 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra TP402. 66

Figura 36 - Difratograma de raios X da amostra H01. 67

Figura 37 - Espectro na região do infravermelho da amostra H01 68

Figura 38 - Curva TG da amostra H01 69

Figura 39 - Curva DTA da amostraH01 70

Figura 40 - Difratograma de raios X da amostra H01 e o padrão de difração de raios X da fase HA e CaO 71

Figura 41 - Espectro na região do infravermelho da amostra H01 após o tratamento térmico 72

Figura 42 - Microscopia eletrônica de varredura do pó H01 após o tratamento térmico 73

Figura 43 - Difratograma de raios X da amostra H02 após o tratamento térmico (400,500,600 e 700ºC) e o padrão de difração de raios X da fase HA e β-TCP 74

Figura 44 - Microscopia eletrônica de varredura do pó H02 após o tratamento térmico a 700ºC.....75

Figura 45 - (a) e (b) Micrografias eletrônicas de varredura da amostra H1TP223....76

Figura 46 - (a), (b) e (c) Micrografias eletrônicas de varredura da amostra H1TP402, preparada com o molde sinterizado. 77

Figura 47 - (a), (b) e (c) Micrografias eletrônicas de varredura da amostra H1TP223, preparada com o moldesinterizado. 78

Figura 48 - Difratograma de raios X da amostra M01 e os padrões de difração de raios X da fase magnetita e maghemita. 80

Figura 49 - Fotografia das nanopartículas de magnetita funcionalizadas com APTS, sob a ação de um campo magnético externo.....80

Figura 50 - Espectro na região do infravermelho da amostra M01.....82

Figura 51 - (a) e (b) Micrografias eletrônicas de transmissão da amostra M01.....83

Figura 52 - (a) e (b) HA porosa antese depois de inserir as nanopartículas de magnetita.....84

Figura 53 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) gráfico de EDX da amostra Np-H1TP223. 85

Figura 54 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) gráfico de EDX da amostra Np-H1TP402 86

Figura 55 - Curva de magnetização em função de um campo magnético externo aplicado para a amostra Np-H1TP223. À direita ampliação da região central da curva 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Materiais sintéticos usados como biomateriais [18, 22] 21

Tabela 2 - Classificação dos biomateriais de acordo com Hench [22,28,29]. 23

Tabela 3 - Fosfatos de cálcio e suas razões Ca/P [24] 26

Tabela 4 - Conceitos e suas definições [45,46,47,48,49] 28

Tabela 5 - Amostras de esferas de sílica e seus parâmetros 47

Tabela 6 - Moldes preparados das amostras de sílica.....48

Tabela 7 - Resumo dos parâmetros estudados e diâmetros obtidos das esferas de sílica 63

Tabela 8 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra S02 64

Tabela 9 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra H01 antes do tratamento térmico. 68

Tabela 10 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra H01 após o tratamento térmico 72

Tabela 11 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra M01 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTS	3-aminopropil(trimetoxissilano)
DTA	análise térmica diferencial
EDX	espectroscopia de energia dispersiva de raios X
HA	hidroxiapatita
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PMMA	polimetilmetacrilato
TCP	fosfato tricálcico
TEOS	tetraetilortossilicato
TG	análise termogravimétrica
TMF	trimetilfosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. REVISÂO DA LITERATURA 19

2.1 Biomateriais 19

2.1.1 Biomateriais Cerâmicos 22

2.1.1.1 Fosfatos de Cálcio 25

2.1.1.2 Hidroxiapatita 29

2.2 Esferas de sílica 31

2.3 Nanotecnologia 34

2.3.1 Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro (Magnetita) 36

2.3.2 Propriedades Magnéticas das Nanopartículas de Óxido de Ferro 37

2.3.3 Aplicações em Biomedicina 41

2.3.4 Funcionalização da Superfície (Alcoxissilano) 43

3. OBJETIVOS 45

4. PARTE EXPERIMENTAL 46

4.1 Reagentes e solventes 46

4.2 Preparação das esferas de sílica 47

4.3 Preparação do molde empacotado 48

4.4 Síntese do precursor de HA 49

4.5 Preparação da HA com poros 49

4.6 Preparação das nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas com APTS 50

4.7 Preparação da HA porosa com nanopartículas magnéticas 51

4.7 Técnicas de caracterização 51

4.7.1 Microscópio eletrônico de varredura 51

4.7.2 EDX acoplado a Microscopia eletrônica de varredura 52

4.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão 53

4.7.4 Difração de raios X 53

4.7.5 Espectroscopia na região do infravermelho 54

4.7.6 Análise térmica 55

4.7.7 Medidas de Magnetização 56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
5.1 Esferas de sílica 57
5.2 Molde de esferas de sílica 65
5.3 Precursor de HA 67
5.4 HA porosa 76
5.5 Nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas com APTS 79
5.6 HA porosa com nanopartículas magnéticas 84

6. CONCLUSÃO 88

Referências 89

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas magnéticas despertaram a atenção no que diz respeito às aplicações biomédicas nos últimos anos, sobretudo devido às propriedades físicas e químicas significativas que exibem estes materiais com a conseqüente diminuição de tamanho para escalas nanométricas, tais como o superparamagnetimo, (rápida resposta a um campo magnético aplicado, com o magnetismo residual negligenciável), e a grande área de superfície. Diversas são as potenciais aplicações para as nanopartículas magnéticas no campo da biomedicina, como transportador de fármacos, em separação celular, como agente de contraste em imagem por ressonância magnética, em imunoensaios, em separação de produtos bioquímicos, e em hipertermia magnética [1-5].

Muitos trabalhos tem unido as propriedades das nanopartículas magnéticas e as propriedades dos materiais biocerâmicos, como a hidroxiapatita (HA), um dos principais constituintes minerais naturais encontrado nos ossos, representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. Sendo um material biocompatível, a HA unida às nanopartículas magnéticas, forma um promissor dispositivo (biocompósito), com o potencial para ser usado no tratamento de osteomielite (inflamação óssea causada por infecção bacteriana ou fúngica) e osteorcacinoma (câncer ósseo), por meio da hipertermia magnética,e ao mesmo passo, reforçando a formação óssea[6-9]. Com o dispositivo inserido no osso com osteocarcinoma, a área específica é exposta a um campo magnético alternado, causando a liberação de energia em forma de calor por parte das nanopartículas magnéticas, aquecendo e destruindo o tecido tumoral. Ao mesmo passo, a hidroxiapatita reforça a formação óssea ajudando na regeneração da área afetada. A Figura 1 ilustra o esquema de funcionamento deste possível biocompósito.

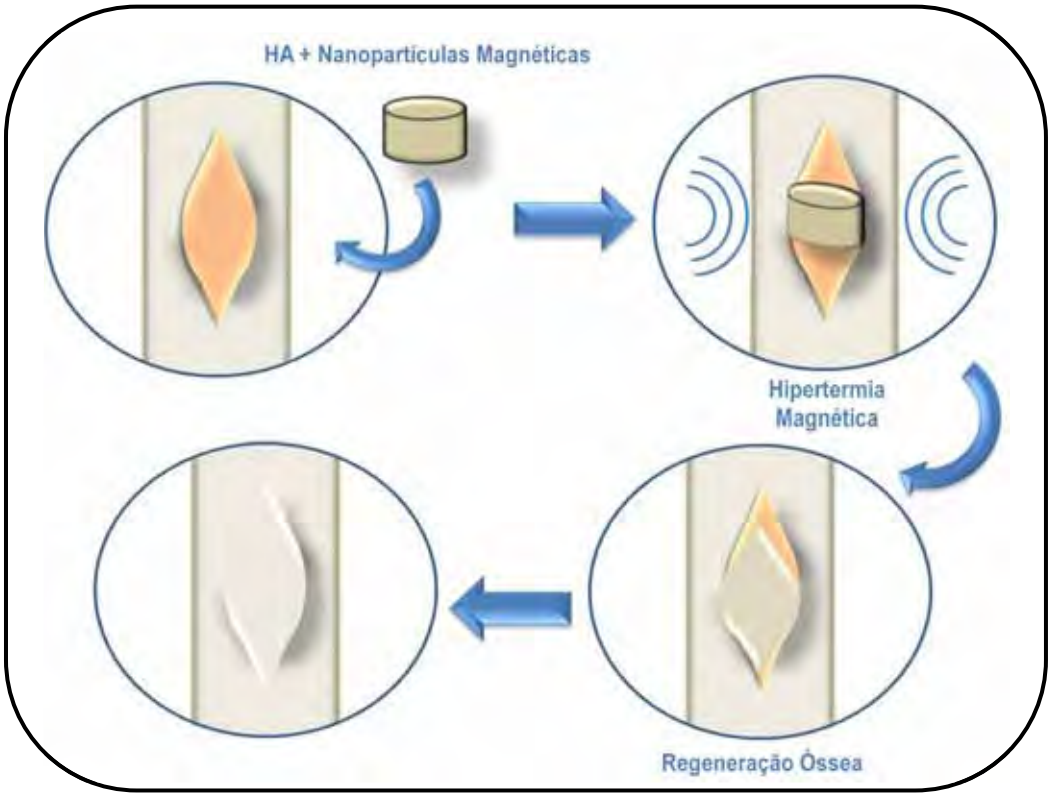


Figura 1 - Esquema do funcionamento do dispositivo para tratamento de osteocarcinoma. Primeiro o biocompósito sendo inserido no osso, depois a área sendo exposta a um campo magnético alternado (hipertermia magnética) e por último a HA ajudando na regeneração óssea. **Fonte**: o próprio autor.

O campo magnético também estimula a proliferação e diferenciação de osteoblastos (células responsáveis pela síntese de componentes orgânicos da matriz óssea), além de promover a expressão da proteína morfológica dos ossos a fim de aumentar a osteointegração e acelerar a formação do osso necessária para a regeneração óssea. Trabalhos recentes mostraram que a presença de nanopartículas de óxido de ferro na hidroxiapatita realçam sua radiopacitividade (propriedade de obstruir a passagem de energia radiante), bem como sua atividade de proliferação dos osteoblastos. Além disso, exibem uma melhor solubilidade em meio fisiológico do que a HA pura [1, 10-12].

Neste trabalho, a estratégia para inserir as nanopartículas de óxido de ferro na HA, foi sintetizar uma HA com morfologia de poros. O fato de obter um material com poros na ordem de centenas de nanômetros tem como objetivo o alojamento das nanopartículas (tamanho na ordem de 10nm) nesses poros, formando assim o dispositivo desejado. Em nanotecnologia tem-se feito o uso de materiais como moldes de sacrifício para a síntese de outros materiais, a fim de se obter uma determinada morfologia. Sendo assim, utilizou-se um molde empacotado de esferas

de sílica para se conseguir a HA porosa (Figura 2). O uso das esferas de sílica como molde foi escolhido, pois é conhecida na literatura a possibilidade de síntese de esferas numa extensa faixa de tamanhos, tanto nanométricos como micrométricos[13].

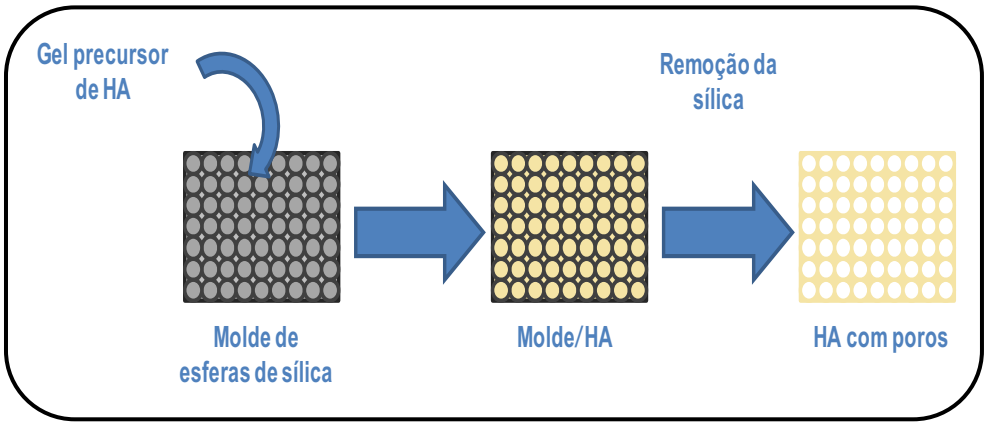


Figura 2 - Esquema de preparação da HA porosa por meio de um molde de esferas de sílica.
Fonte: o próprio autor.

Como citado anteriormente, uma das propriedades das nanopartículas magnéticas é a grande área de superfície, a qual pode ser funcionalizada com diversos materiais, tais como moléculas orgânicas (citrato), polímeros orgânicos (polietilenoglicol, dextrana), surfactantes (CTAB) entre outros. A utilização desses ligantes auxilia na dispersibilidade e na estabilidade química das nanopartículas, bem como podem ser utilizados para ancorar fármacos, hormônios, anticorpos entre outras biomoléculas [14]. A utilização dos organossilanos (silânos orgânicos) para a funcionalização das nanopartículas já é muito conhecida em biomedicina [15,16]. Nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com aminossilanos foram recentemente aprovadas em Berlim, na Alemanha, para tratamento de tumores sólidos no cérebro por meio da terapia com hipertermia [17]. O aminossilano utilizado neste trabalho para funcionalizar as nanopartículas de óxido de ferro foi o (3-aminopropil)trimetoxissilano (APTS), que introduz um grupo ativo $–NH_2$ na superfície[15]. Grupamento o qual pode ser utilizado para ancorar biomoléculas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como qualquer material usado para fazer dispositivos que substituam uma parte ou uma função do corpo de uma maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável. Estes materiais e dispositivos são usados em tratamentos de doenças e ferimentos. Os exemplos mais comuns incluem suturas, obturações dentárias, agulhas, cateteres, placas ósseas, etc. Pode ser descrito também como um material sintético utilizado para substituir uma parte de um sistema vivo, ou para funcionar em contacto íntimo com tecido vivo. O conselho para biomateriais da Universidade de Clemson tem formalmente definido um biomaterial como sendo “uma substância”, sistematicamente e farmacologicamente inerte, desenvolvida para a implantação ou incorporação em sistemas vivos”. Esta descrição se soma a muitas outras formas de enxergar o mesmo conceito, mas expressando-o de maneiras distintas. Ao contrário de um biomaterial, um material biológico é um material como um osso, pele, ou artéria produzidos pelo sistema biológico. Materiais artificiais que simplesmente estão em contato com a pele, como aparelhos auditivos, não estão incluidos na definição de biomateriais, pois a pele age como uma barreira com o mundo externo[18].

O termo mais comumente usado para descrever apropriadamente os requisitos biológicos de um biomaterial, ou biomateriais usados como dispositivos em medicina, é a biocompatibilidade. Uma definição simples de biocompatibilidade seria a propriedade de um material que não crie nenhuma reação adversa ao tecido. Uma melhor definição de biocompatibiidade seria a habilidade do material em desempenhar uma resposta apropriada ao hospedeiro em uma aplicação específica[19,20]. A “resposta apropriada ao hospedeiro” implica identificação e caracterização das reações e respostas do tecido, que poderiam revelar-se prejudiciais para o hospedeiro e ou levar a uma falha do biomaterial, dispositivo médico ou prótese através de mecanismos biológicos. Visto de outra perspectiva, a “resposta apropriada ao hospedeiro” implica identificação e caracterização das reações e respostas críticas do tecido para o uso bem sucessido do biomaterial ou

dispositivo. A avaliação de biocompatibilidade é considerada como uma medida da magnitude e duração das alterações adversas nos mecanismos homeostáticos que determinam a resposta do hospedeiro [19,21].

O uso de biomateriais não se tornou prático até o advento da cirurgia asséptica por Lister, nos anos de 1860. Antigamente, procedimentos cirurgicos, sejam eles envolvendo biomateriais ou não, eram geralmente mal sucedidos devido à infecções. O problema da infecção tende a ser maior na presença de biomateriais, uma vez que implantes podem gerar uma região inacessível para as células imunológicas do corpo. O implante de sucesso mais antigo, bem como a grande fração de implantes modernos, se encontravam no sistema esquelético. Placas ósseas foram introduzidas no início dos anos 1900 para auxiliar na fixação de fraturas. Muitas dessas antigas placas quebraram como um resultado de um design mecânico pouco sofisticado. Eram muito finas e tinham muito estresse concentrado nas bordas. Foi também descoberto que materiais como o aço de vanádio, que foi escolhido por sua boa propriedade mecânica, corroia rapidamente no corpo humano. Sendo assim, iniciou-se a busca por designs e materiais mais apropriados. Seguindo a introdução dos aços inoxidáveis e ligas de cobalto e crômio nos anos 1930, foi obtido maior sucesso na fixação de fraturas, permitindo que a primeira cirurgia de substituição de articulação pudesse ser realizada [18].

Quanto aos polímeros, verificou-se que os pilotos de aviões de guerra na Segunda Guerra Mundial que foram feridos por fragmentos de plástico [polimetilmetacrilato (PMMA)] (Figura 3) das aeronáves, não sofreram reações crônicas adversas devido à presença desses fragmentos no corpo. O PMMA tornou-se então largamente utilizado após essa data, como substituto para córnea e para áreas danificadas nos ossos do crânio. Após avanços na área de materiais e nas técnicas cirúrgicas, foi realizada a substituição de vasos sanguíneos na década de 50, bem como de válvulas cardiacas na década de 60. Nos últimos anos, o uso de compósitos avançados (combinação de diferentes materiais) para aplicações biomédicas tem sido o foco de muita especulação, mas de uso limitado atualmente. Polímeros de fibras de carbono reforçadas tem sido usadas para aplicações estruturais, como em próteses totais de quadris[18]. A lista na Tabela 1 ilustra algumas vantagens, desvantagens e aplicações de quatro grupos de materiais sintéticos.

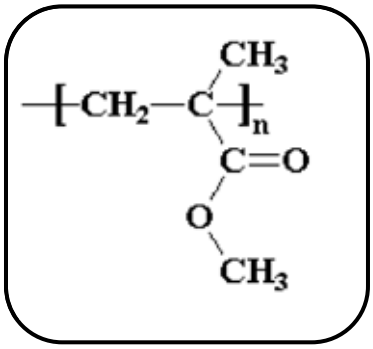


Figura 3 - Estrutura do PMMA.
Fonte: o próprio autor.

Tabela 1 - Materiais sintéticos usados como biomateriais [18, 22].

Materiais	Vantagens	Desvantagens	Exemplos
Polímeros (polietileno, PTFE, poliéster, PMMA, poliuretano, silicone)	Elasticidade Fácil fabricação Baixa densidade	Baixa resistência mecânica Degradação dependente do tempo	Sutura, artérias, veias; maxilofacial (nariz, orelha, mandíbula maxilar, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia
Metais (Ti e suas ligas, ligas de cobalto-cromo, aço inoxidável)	Alta força de tensão Resistente a desgaste Alta energia de deformação	Baixa biocompatibilidade Corrosão em meio fisiológico Alta densidade Conectivos moles	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios); implantes dentários.
Cerâmicas e vidros (alumina, zircônia, fosfatos de cálcio, carbono, porcelana, vidros bioativo)	Boa biocompatibilidade Resistência à corrosão Resistência à compressão Inércia	Baixa força de tensão Baixa resistência mecânica Baixa elasticidade Alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traquéias artificiais
Compósitos (fibra de carbono-resina termofixa, fibra de carbono-termoplástico, carbono-carbono, fosfato de cálcio-colágeno)	Boa biocompatibilidade Resistência à corrosão Alta força de tensão Inércia	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade).

Fonte: KAWACHI (2000, p. 519).

2.1.1 Biomateriais Cerâmicos

A cerâmica pode ser geralmente definida como a arte e a ciência de preparar e usar artigos compostos de materiais não metálicos e inorgânicos para aplicações funcionais. Tipicamente, cerâmicas são fabricadas primeiramente sintetizando o pó, seguido pelo processo de molde e consolidação que permitem a fabricação de objetos com diferentes formas e tamanhos [23,24].

Nos anos recentes, descobriu-se que cerâmicas podiam ser utilizadas para acrescentar ou substituir várias partes do corpo, particularmente ossos. Cerâmicas usadas para o corpo são chamadas biocerâmicas. Sua inércia relativa aos fluídos corporais, alta força compressiva e agradável aparência estética, levou ao uso das cerâmicas em odontologia, como por exemplo, em obturações [24].

Diferentemente de metais e polímeros, a maioria das cerâmicas não se rompe plasticamente, isso devido à presença de algum caráter iônico em suas ligações. Também são materiais não dúcteis e quase não sofrem deformações à temperatura ambiente. Entretanto são suscetíveis a rachaduras e entalhes [25].

Pode-se dizer que uma biocerâmica que possui as propriedades desejáveis para o uso, deve-se mostrar: não tóxica, não cancerígena, não alérgica, não inflamatória, biocompativel e biofuncional no seu tempo de vida no hospedeiro [24]. Hulbert et. al. [26] definiram três grandes categorias para as biocerâmicas, baseadas em sua reatividade no ambiente fisiológico:

-Relativamente inerte ou não reabsorvível: são biocerâmicas que mantêm suas propriedades físicas e mecânicas dentro do hospedeiro [24]. Exemplo: Al_2O_3 e ZrO_2;

-Semi-inerte ou bioativa: são biocerâmicas que exercem influência biológica sobre o tecido e são influenciadas por ele. Sendo assim, bioatividade é a resposta interfacial do tecido para o material que resulta em uma ligação com o tecido. Exemplo: HA [27];

-Biodegradável ou reabsorvível: são cerâmicas que como diz o nome, degradam quando implantadas no hospedeiro. Exemplo: Fosfato tricálcico (TCP) [24].

Outra classificação corrente é a estabelecida por Hench [28,29], na qual as cerâmicas são agrupadas em 4 classes de acordo com a resposta desenvolvida na interface tecido vivo/implante [22], conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação dos biomateriais de acordo com Hench [22,28,29].

Tipo de biocerâmica	Interações com os tecidos	Exemplos
Inertes	Não há interações químicas nem biológicas	Alumina
Porosas	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e HA porosos
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implate	Biovidros e HA
Reabsorvíveis	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e TCP

Fonte: KAWACHI (2000, p. 520).

A história das biocerâmicas foi examinada em detalhes por Hulbert, et. al.[26], no começo da década de 80. A primeira biocerâmica largamente estudada foi o gesso de Paris ($CaSO_4.H_2O$). Dreesman [30] publicou o primeiro relato do uso do gesso para reparar defeitos ósseos em 1892. O gesso de Paris continuou extensivamente estudado para essa aplicação através da década de 1950 [31]. Esta biocerâmica pioneira apresenta um bom comportamento físico-químico, entretanto, um pobre desempenho mecânico. Características atrativas deste gesso incluem uma pequena ou nenhuma reação adversa ao tecido, e substituindo um tecido, a sua taxa de absorção pelo sistema fisiológico é comparada a do próprio tecido. Apesar dessas vantagens, o gesso de Paris possui uma fraqueza intrínseca e é facilmente degradado [32].

Na década de 1920, foi reportado o sucesso no estudo da aplicação do fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) [33]. O tempo médio de reparação dos defeitos ósseos em coelhos passou de 41 dias para 31 dias. Em contraste, numerosos estudos utilizando hidróxido de cálcio foram mal sucedidos, pois este composto de cálcio tende a estimular a formação de ossos imaturos[31].

A era moderna da biocerâmica é geralmente traçada em 1963, com o estudo bem sucedido de Smith [34] baseado no Cerosium, uma cerâmica para substituição

óssea composta por poros de aluminato cerâmico impregnados com uma resina epóxi. A porosidade da cerâmica foi controlada a 48% para duplicar o valor do osso natural e produzir uma rede de propriedades físicas muito parecidas. Módulo similar e força flexural, combinadas com uma boa biocompatibilidade, levaram a aplicação do Cerosium como um substituto ósseo durante o final da década de 1960 até o começo dos anos 1970. Durante este período, um interesse generalizado no desenvolvimento da biomedicina na comunidade cerâmica resultou no trabalho de Hulbert et. al. [35], os quais demonstraram a biocompatibilidade de óxidos cerâmicos, e Hench et. al. [36], pioneiros no estudo de materiais de superfície reativas como o Biovidro, nos anos de 1970.

O interesse em biocerâmicas diminuiu no final dos anos 1970, entretanto voltou a aumentar substancialmente nos anos recentes, principalmente nas áreas de ortopedia e odontologia [37-39]. Muito desse renascido interesse é associado a aplicações bem sucedidas da hidroxiapatita. Exemplos incluem revestimentos de HA em próteses ou implantes para ajudar na fixação [40] (Figura 4), além da HA em compósitos para reparar grandes defeitos ósseos [41]. As maiores limitações das biocerâmicas estão na sua fragilidade natural, bem como na dificuldade de se processar estes materiais na forma desejada sob condições fisiológicas. Subseqüentemente mudanças microestruturais fazem estes materiais exibirem uma gama de propriedades mecânicas e biológicas. As propriedades negativas limitam o uso das biocerâmicas. Entretanto, as propriedades positivas inegavelmente oferecem um leque de aplicações biofuncionais como implantes para suportes, e mais recentemente para transportadores de fármacos, genes e proteínas [24].

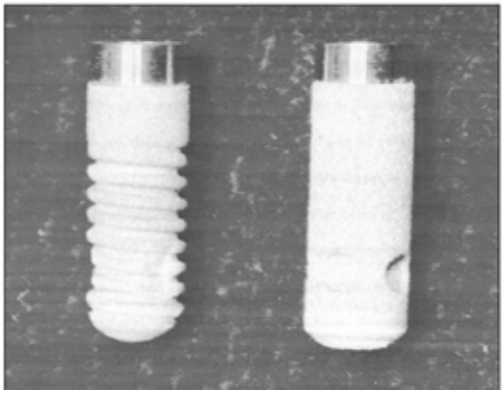


Figura 4 - Implates odontológicos revestidos com hidroxiapatita [42].
Fonte: SIMUNEK (2005, p.393).

2.1.1.1 Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio tipicamente formam uma família de compostos chamados “apatitas”. O nome foi derivado de “apataw”, palavra grega para engano, isto porque, foram confundidos com diversos outros minerais semelhantes até passarem por uma análise química em 1788, provando que eram na verdade fosfatos de cálcio similares ao dos ossos e dentes[24].

O mineral “apatita” é essencialmente a fluorapatita ($Ca_5(PO_4)_3F$) (Figura 5), sendo que todas as outras apatitas são baseadas na sua fórmula estrutural, $X_3Y_2(TO_4)Z$. Esta estrutura permite uma fácil substituição nas apatitas naturais quando:

X e Y= Ca, Sr, Ba, Re, Pb, U, Mn, e raramente, Na, K, Y e Cu;

T= P, As, V, Si, S, e C (como CO_3);

Z= F, Cl, OH e O.

Como biomateriais, as apatitas de interesse são quando X=Y=Ca, T=P e Z=F,OH. Quando Z=F, tem-se a fluorapatita (Fap). Quando Z=Cl, tem-se a cloroapatita (ClAp). Quando T=P e Z=OH, tem-se a hidroxiapatita (HA) [24].

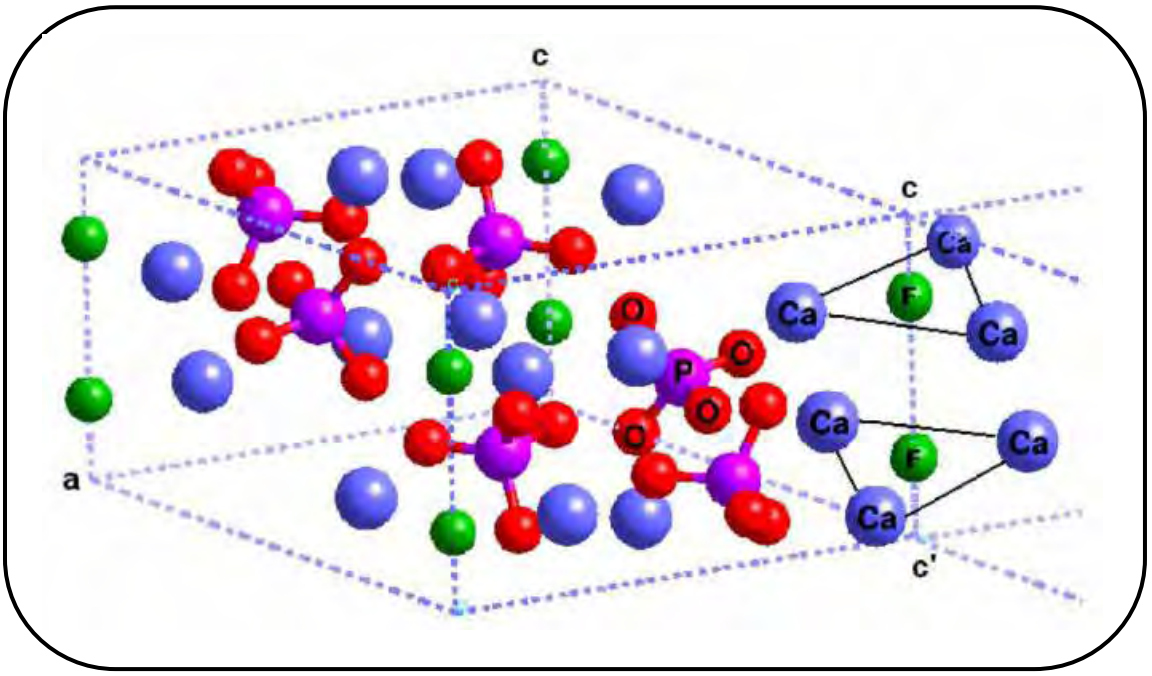


Figura 5 - Estrutura da fluorapatita [43].
Fonte: CALDERÍN; SCOTT; RUBIO (2003, p. 1341060/1).

Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é por meio de sua razão molar Ca/P. Vários fosfatos de cálcio que possuem razão variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfatos, sob condições alcalinas ou ácidas [22,44]. A Tabela 3 ilustra alguns fosfatos de cálcio de uso biológico e suas razões Ca/P.

Tabela 3 - Fosfatos de cálcio e suas razões Ca/P [24].

Fosfato de cálcio	**FórmulaQuímica**	**Razão Ca/P**	**Estrutura**
Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$	0,5	Triclínica
Fosfato monocálcico anidro (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,5	Triclínica
Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4.H_2O$	1,0	Monoclínica
Fosfato dicálcico anidro (DCPA)	$CaHPO_4$	1,0	Triclínica
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$	1,33	Triclínica
Fosfato tricálcico (TCP) Fases α e β	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5	α Monoclínica β Romboédrica
Fosfato tetracálcico (TetCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	2,0	Monoclínica
Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	Monoclínica
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$Ca_3(PO_4)_{2.}\ nH_2O$	1,5	-

Fonte: KUMTA (2006, p. 311).

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as denominadas biocerâmicas por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais que, por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica [22].

A maioria dos compostos bioativos são fosfatos de cálcio. Os mais utilizados para aplicação biológica são a HA ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) e o TCP ($Ca_3(PO_4)_2$). A principal aplicação para estes materiais é nos ossos, onde existe um componente mineralizado com composição química similar a da HA. Sendo assim, a função da HA e do TCP é geralmente sustentar, reparar ou desenvolver o crescimento do osso[38].

Como já descrito anteriormente, bioatividade é a resposta interfacial do tecido para o material que resulta em uma ligação com o tecido. No osso, a bioatividade dos materiais pode ser dividida em: osteoindução (bioestimulação celular ou da atividade do tecido para reparação ou crescimento devido a íons livres no sistema biológico) e osteocondução (processo pelo qual o osso é direcionado de modo a estar em conformidade com a superfície do material). No ambiente biológico estes materiais podem sofrer bioreabsorção (o processo de remover um material por biodegradação exercida pelo sistema biológico), ou exibirem uma bioestabilidade (capacidade do material em resistir a mudanças no sistema biológico). A HA, por exemplo, sendo similar a componentes estáveis presentes nos ossos, é termodinamicamente estável (bioestável) no osso, enquanto o TCP é lentamente bioreabsorvido. Cerâmicas bioreabsorvíveis normalmente apresentam alta capacidade de osteindução. Já a HA confere a superfície uma boa ligação e adesão entre o tecido e o material [38]. A Tabela 4 sumariza alguns conceitos e seus significados.

Tabela 4 - Conceitos e suas definições [45,46,47,48,49].

Termo	Definição
Bioatividade	Um material bioativo é um material que pode induzir a uma atividade biológica específica [48].
Biodegradação	É um processo destrutivo que envolve a transformação de uma substância em novos compostos por meio de reações químicas (hidrólise ou oxidação) ou bioquímicas (clivagem enzimática), ou ainda pela ação de microorganismos, tais como bactérias [46].
Osteocondutividade	A propriedade de um biomaterial que facilita a formação de novas estruturas ósseas. Biocerâmicas osteocondutoras permitem a ligação, proliferação, migração e expressão fenótica das células ósseas, levando a formação de novos ossos [49].
Osteoblastos	Osteoblastos são células mononucleares originadas de células progenitoras mesenquimais, responsáveis pela produção e mineralização da matrix óssea, regulando a concentração local de cálcio e fósforo para promover a mineralização da apatita. Osteoblastos sintetizam colágeno e glicoproteínas para formar a matrix óssea, consequentemente podendo se tornar osteocitos.
Osteoclastos	Células ósseas mononucleadas associadas com a quebra e reabsorção dos tecidos ósseos por meio de ação enzimática.
Osteoindutividade	A habilidade de um biomaterial de induzir a formação de um novo osso [47]. Osteoindução pode ser definido como o processo de recrutamento e estimulação de células não diferenciáveis pluripotentes para formar células de formação óssea, como preosteoblastos, osteoblastos e finalmente osteocitos [47].
Osteogenesis	O processo de crescimento e regeneração óssea. Inclui osteoindução e osteocondução.
Angiogenesis	O processo de desenvolver novos vasos sanguíneos. Os novos vasos formados são envolvidos em um suprimento de nutrientes e transportam macromoléculas durante a reparação e regeneração óssea.

Fonte: BOSE; TARAFDER (2012, p. 1404).

2.1.1.2 Hidroxiapatita

Hidroxiapatita é um dos mais importantes compostos de cálcio para a aplicação biológica, visto que pode ser encontrada em tecidos duros naturais como uma fase mineral. Ela age como um reforço nestes tecidos e é responsável pela rigidez dos ossos, dentes e esmalte dos dentes [18]. De diversas biocerâmicas, a HA é mundialmente usada em várias aplicações biomédicas, possuindo uma excepcional biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução no que se diz respeito à células e tecidos ósseos. Ela também é conhecida como um efetivo substrato de adesão para proteínas, peptídios, lipídios, bactérias e cepas [50-52].

Estequiométricamente a HA possui uma estrutura monoclínica com grupo espacial $P2_1/b$, e com parâmetros de unidade de célula a=9,42148Å, b=2a e c=6,88147Å [24]. Novos estudos mostram que a HA pode exibir uma estrutura hexagonal com grupo espacial $P6_3/m$. De acordo com Hench [28,29] a HA ocorre nas duas formas estruturais com a forma hexagonal sendo normalmente formada por precipitação de soluções supersaturadas e a forma monoclínica sendo primariamente formada pelo aquecimento da forma hexagonal a 850ºC em ar, depois sendo resfriada a temperatura ambiente [53]. A estrutura atômica da hidroxiapatita projetada no eixo c no plano basal é ilustrada na Figura 6. Nota-se que os íons hidroxila ficam nas pontas do plano basal projetado, ocorrendo a intervalos eqüidistantes com metade da célula unitária e com colunas perpendiculares ao plano basal e paralelas ao eixo c. Seis dos dez íons cálcio na célula unitária estão associados com as hidroxilas nessas colunas, resultando numa forte interação [18].

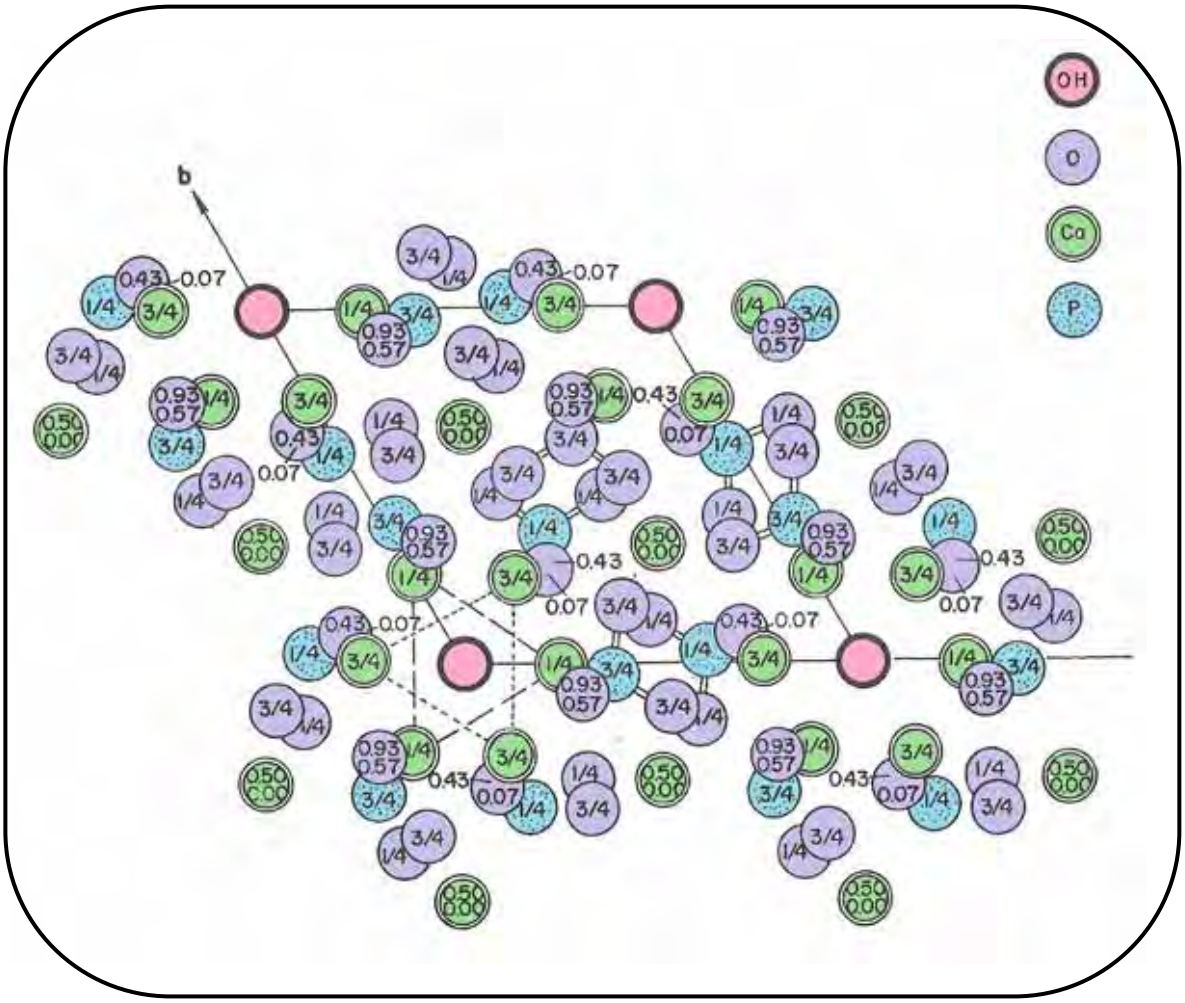


Figura 6 - A estrutura da hidroxipatita projetada no eixo c no plano basal [54].
Fonte: POSNER; PERLOFF; DIORIO (1958, p.308).

A HA pode ser preparada por várias técnicas que incluem hidrólise, síntese hidrotérmica, spray pirólise, método biomimético, método via-úmida, método sol-gel, entre outros [53,55]. A principal contribuição do método sol-gel em relação aos outros métodos é a baixa temperatura de formação da fase HA. Geralmente são necessárias temperaturas maiores que 1000ºC para a formação dos cristais de apatita no método de via-úmida, enquanto várias centenas de graus a menos são necessárias no método sol-gel. Mesmo para o método sol-gel a síntese de HA requeruma razão correta de Ca/P de 1,67 no produto final [56].

Nos últimos anos, uma atenção particular tem sido concedida a preparação de HA biocerâmica com morfologia de poros [57]. Entre suas aplicações tem-se: transportadores de células [58-60], agente transportadores de fármacos [61-64], análise de cromatografia [65], e mais extensivamente, para suportes de tecidos duros [66-69]. Em engenharia de tecido ósseo ela tem sido aplicada como material de enxerto ósseo, e

em cirurgias de revisãode prótese. A sua áreade superficie elevada conduz a uma excelente osteocondutividade e resorbatibilidade, proporcionando um rápido crescimento ósseo. Seus métodos de síntese também são os mais diversificados, como: método da esponja polimérica [70,71], técnica de formação de espuma cerâmica[60,72] entre outros.

2.2 Esferas de sílica

Esferas de sílica monodispersas e submicrométricas sintetizadas através da hidrólise e condensação de tetraalcoxissilanos, de acordo com o método desenvolvido por Stöber [13], tem sido usadas como um sistema modelo em diferentes campos como em cerâmica, catálise, cromatografia e colóides [73]. Uma das possíveis aplicações dessas esferas é como molde de sacrificio, visto a possíbilidade de síntese de esferas de tamanhos diferentes, além da facilidade de remoção desse material.

As reações de hidrólise e condensação dos alcoxissilanos ocorrem apenas na presença de um catalisador ácido ou básico. Em meio ácido, as reações de hidrólise são mais rápidas que as reações de condensação, sendo que o inverso ocorre nas reações em meio básico. Esse fato pode levar a formação de materiais diferentes sob condições ácidas ou básicas. Em meio ácido (condesação lenta), a sílica tende a formar moléculas poliméricas linerares que ocasionalmente possuem ligações cruzada. Estas cadeias moleculares se emaranham e formam ramificações adicionais resultando em gelatinização. Sob condições básicas (condensação rápida) formam-se aglomerados altamente ramificados que não são interpenetráveis antes da secagem, levando assim a formação de partículas discretas [74]. O mecanismo das reações nos dois meios [74,75] está ilustrado na Figura 7.

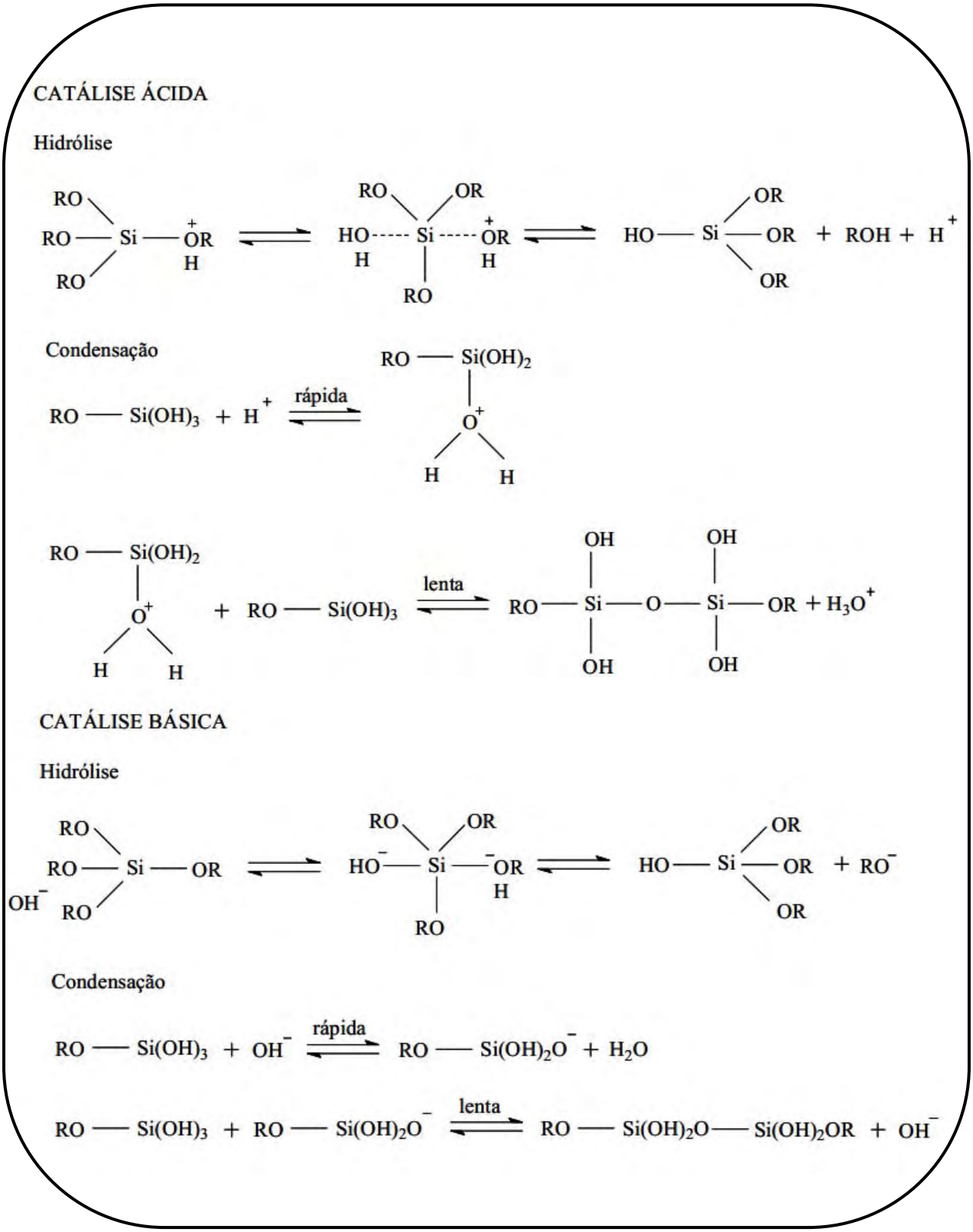
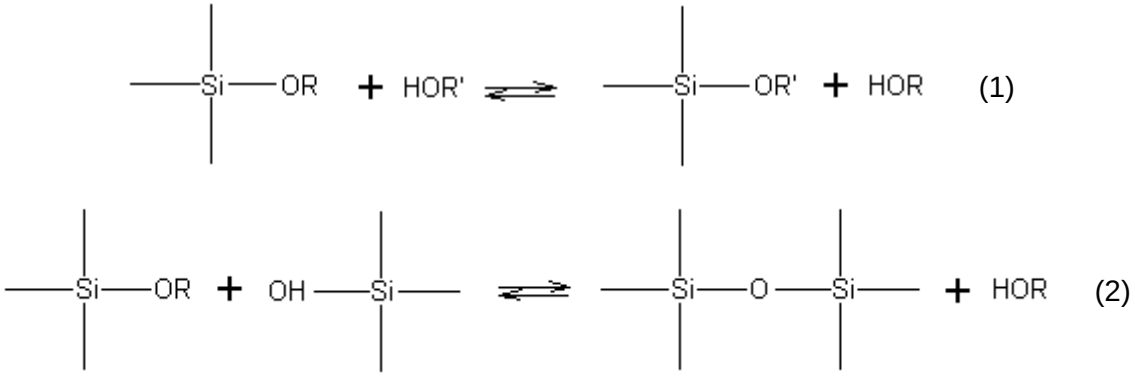


Figura 7 - Mecanismos para as reações de catálise ácida e básica [74, 75].
Fonte: NASSAR; MESSADDEQ; RIBEIRO (2002, p. 29).

Nas reações de catálise básica, alcoxissilanos em mistura de água, amônia e etanol, podem estabelecer diferentes mecanismos de reação. Esquematicamente todas as reações possíveis podem ser representadas por dois caminhos:



Com R e R' representando um átomo de hidrogênio ou um grupo etil. É geralmente aceito que as reações de catálise básica (Equação 1) procedam através de um ataque bimolecular nucleofílico ao átomo de silicio, resultando em uma carga negativa e um estado de transição pentacoordenado (reação S_N2). Na reação de hidrólise (Equação 1), o grupo OH^- é responsável pelo ataque nucleofílico ao átomo de silicio, sendo que um aumento na concentração deste catalisador resulta em aumento da taxa de reação. Portanto, a taxa de reação da hidrólise aumenta se a concentração de amônia e /ou água também aumentarem [73].

A reação de condensação (Equação 2) também ocorre através de um ataque nucleofílico ao átomo de silicio, resultando em um estado de transição pentavalente com carga negativa. Devido a semelhança do mecanismo de hidrólise, a influência da água e amônia na taxa de reação são muito similares [76]. Entretanto, para o entendimento da formação da sílica condensada, é importante ter em mente que para sistemas catalisados por base, a formação da ligação do siloxano é muito mais rápida que a hidrólise do alcóxido [73].

Atualmente existem dois modelos que tentam elucidar o processo de formação de partículas de sílica através do método de Stöber [77]. O primeiro é o modelo de crescimento de adição de monômeros [78]. Em analogia ao diagrama de precipitação de LaMer [79], este descreve a nucleação depois de excedido o limite de supersaturação, além do crescimento por condensação dos monômeros hidrolisados na superfície das partículas já existentes. No segundo, nucleação e crescimento de partículas são modelados por um mecanismo de controle de agregação de

subpartículas que se exibem do tamanho de poucos nanômetros, ocorrendo continuamente no decorrer da reação [80].

Alguns trabalhos como de Van Blaaderen [81] e Harris [82] concluem que os dois métodos são responsáveis pelo crescimento das partículas. A formação da partícula se inicia com a agregação de subestruturas de siloxano, continuando na superfície através de uma reação de condensação de monômeros e pequenos oligômeros hidrolisados.

2.3 Nanotecnologia

Nanotecnologia é o design e a produção de estruturas, dispositivos e sistemas controlando forma e tamanho em escala nanométrica.O desenvolvimento e o avanço nessa área vem aumentando gradativamente devido às novas propriedades, (físicas, químicas e biológicas), além de fenômenos inéditos que as partículas adquirem quando em escala nanométrica [83].

Muitos consideram como o ponto inicial da Nanotecnologia a palestra proferida em 1959 por Richard Feynman, prêmio Nobel de Física, na qual ele sugeriu que um dia seria possível manipular átomos individualmente, uma idéia revolucionária na época. Como ilustração Feynman desafiou a comunidade cientifica a diminuir em 25 mil vezes a página de um livro. Isto tornaria possível condensar, na cabeça de um alfinete, todas as páginas dos 24 volumes da Enciclopédia Britânica, abrindo assim as perspectivas de que muitas descobertas se fariam com a fabricação de materiais em escala nanométrica [83-87].

O Termo Nanotecnologia surgiu apenas em 1974 quando um pesquisador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, fez a distinção entre engenharia em escala micrométrica e o novo campo da engenharia em escala submicrométrica que estava começando a emergir [83,88,89].

Avanços significativos não foram notados até o inicio da década de 80, devido à falta de novos instrumentos que permitissem a nanomanipulação. Somente em 1981, pesquisadores da IBM, Gerd Binning e Henrich Roherer, inventaram o microscópio de varredura por tunelamento, capaz de obter imagens de átomos e moléculas numa escala atômica de 0,2nm [87, 90, 91].

Em 1986 Richard Smalley da Universidade de Rice descobre uma nova forma de blocos de construção: os fulerenos buckminster, ou buckballs (Figura 8). Os fulerenos, ao contrário das outras formas alotrópicas de carbono como diamante e grafite, são uma forma molecular do carbono altamente simétricas e estáveis. Em geral, sua forma é esférica, formada por hexágonos interligados com pentágonos. Devido à sua forma tridimensional, suas ligações insaturadas e sua estrutura eletrônica, os fulerenos apresentam propriedades físicas e químicas únicas que podem ser exploradas em várias áreas da bioquímica e da medicina [83,92].

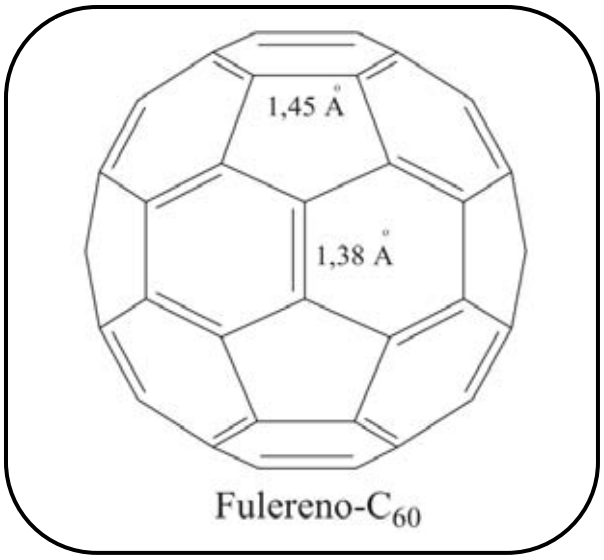


Figura 8 – Fulereno [92].
Fonte: SANTOS (2010, p. 680).

No mesmo ano de 1986 os pesquisadores Gerd Binning e Henrich Roherer inventam agora o microscópio de força atômica, utilizado para visualizar átomos sobre superfícies e revelar como eles se organizam [83].

Em 1991 Somio Iijima descobre os nanotubos de carbono, que vem revolucionando a nanotecnologia por exibirem resistência mecânica extremamente alta e propriedades e aplicações singulares como, por exemplo, ao serem utilizados como nanopinças no posicionamento de átomos ou moléculas [83].

Nos últimos anos, uma enorme quantidade de estudos vem sendo feitos no sentido de concretizar idéias que surgem na área de nanotecnologia. O desenvolvimento dessa área encontra-se principalmente na fase pré-competitiva e espera-se que muitas aplicações de destaque nesse campo surjam nos próximos anos [83].

2.3.1 Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro (Magnetita)

Óxidos de ferro existem em várias formas na natureza, onde a magnetita (Fe_3O_4), maghemita (γ-Fe_2O_3), e a hematita (α-Fe_2O_3) são os mais comuns [93].

A magnetita é conhecida como o óxido de ferro negro, minério de ferro magnético, pedra-ímã, ferrita de ferro e pedra de Hércules. Ela exibe o maior magnetismo de todos os óxidos de metais de transição. Sua estrutura é um espinélio invertido (Figura 9) com íons Fe(III) distribuídos aleatoriamente entre sítios octaédricos e tetraédricos, bem como íons Fe(II) em sítios octaédricos. Os íons oxigênio estão em um arranjo cúbico empacotado [93,94].

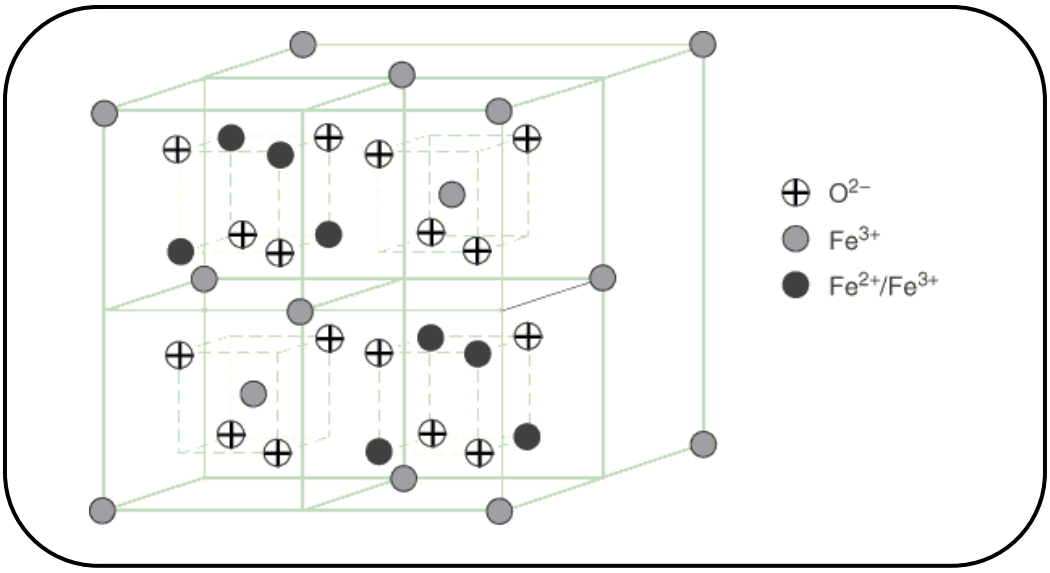


Figura 9 - Estrutura da magnetita [95].
Fonte: GOSSUIN (2009, p. 299).

Várias abordagenstanto físicas quanto químicas são conhecidas para a síntese denanopartículas de óxido de ferro como co-precipitação [96-98], síntese hidrotérmica[99], decomposição térmica[100,101], síntese sonoquímica[102] e microemulsão[103]. Os métodos de preparação são críticos na determinação do tamanho das partículas, distribuição de tamanho das partículas, estrutura, morfologia, composição e funcionalidade da superfície [104,105].

Co-precipitação é provavelmente a rota sintética mais simples e mais eficiente para se obter nanopartículas magnéticas. Na co-precipitação, uma mistura estequiométrica de precursores de Fe (II) e Fe (III), em meio aquoso, são utilizados

como fonte de ferro, que sob condições alcalinas produzem nanopartículas de óxido de ferro [105].

O tamanho, forma e composição das nanopartículas magnéticas dependem muitodo tipo de sais utilizados, (cloretos, sulfatos, nitratos, entre outros), razão de Fe(II) e Fe(III), temperatura de reação, os tipos de agente de estabilização, o valor de pH,além da força iônica do meio reacional [106,107]. De acordo coma termodinâmica desta reação, uma completa precipitação das nanopartículas de magnetita é esperada a um valor de pH entre 8 e 14 e com uma razão estequiométrica de Fe(II)/Fe(III) de 1:2 num ambiente não oxidante [105].

A principal vantagem do processo de co-precipitação é que ele pode gerar nanopartículas em grande quantidade e, em geral, a distribuição de tamanho é relativamente estreita, além de ser um método relativamente barato [105].

2.3.2 Propriedades Magnéticas das Nanopartículas de Óxido de Ferro

Os materiais podem ser classificados de acordo com suas respostas ao campo magnético externo aplicado. Descrições das orientações dos momentos magnéticos em um material ajudam a identificar diferentes formas de magnetismo observadas na natureza. Cinco tipos básicos de magnetismo podem ser descritos: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo. Todos os tipos de comportamento magnético observados nos materiais são pelo menos parcialmente atribuídos aos elétrons desemparelhados em seus orbitais atômicos, geralmente nos orbitais 4f e 3d de cada átomo [108]. O átomo de ferro tem um forte momento magnético devido a quatro elétrons desemparelhados no orbital 3d. Quando os cristais são formados por átomos de ferro, eles podem apresentar 4 dos 5 tipos básicos de magnetismo, como ilustra a Figura 10. No estado paramagnético os momentos atômicos dos átomos individuais são alinhados aleatoriamente e o cristal possui magnetização igual à zero. Se esse cristal é exposto a um campo magnético externo, alguns desses momentos se alinharão ao campo magnético e o cristal terá um pequeno valor de magnetização. Em um cristal ferromagnético todos os momentos individuais estão alinhados mesmo sem a presença de um campo magnético. Por outro lado, os cristais ferrimagnéticos têm momentos magnéticos diferentes e associados à espécies atômicas diferentes.

Estes átomos possuem momentos magnéticos com forças diferentes e estão arranjados antiparalelamente. Se os momentos magnéticos antiparalelos possuírem a mesma magnitude o cristal é dito antiferromagnético e possui uma magnetização nula [93].

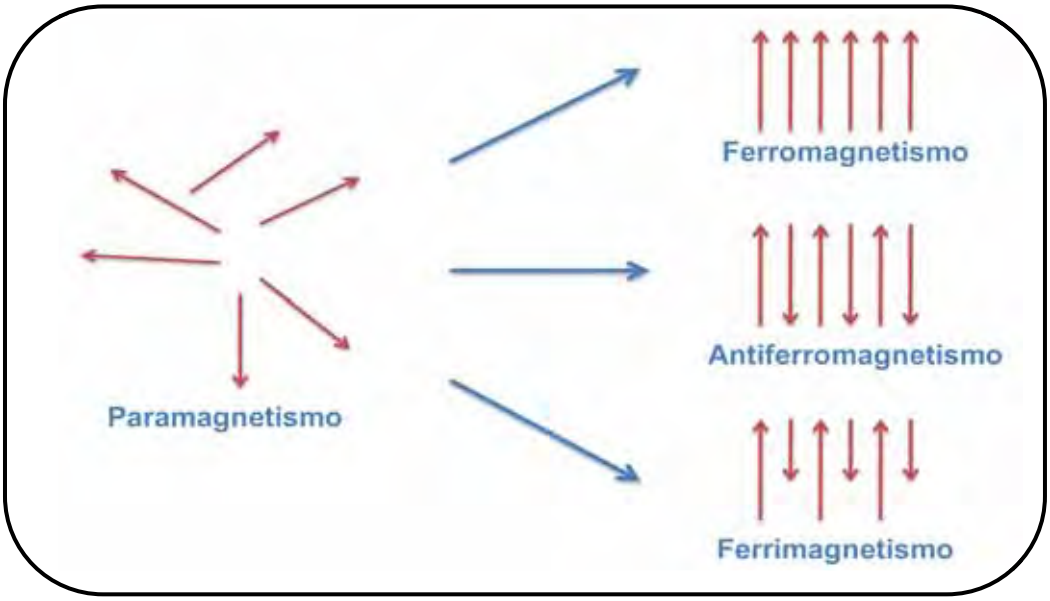


Figura 10 - Alinhamento dos momentos magnéticos atômicos individuais de diferentes tipos de materiais [93].
Fonte: TEJA; KOH (2009, p. 24).

Os efeitos magnéticos em um material são causados pelo movimento das partículas, sendo que essas possuem tanto massa como cargas elétricas. Estas partículas são elétrons, prótons e íons positivos ou negativos. O movimento circular (rotação do elétron) de uma partícula eletricamente carregada cria um dipolo magnético, chamado de magneto. Em um material ferromagnético estendido, os magnetos são associados em grupos denominados de domínio magnético. Um domínio magnético (também chamado de domínio de Weiss) refere-se ao volume de um material ferromagnético no qual todos os magnetos são alinhados em uma mesma direção por forças de interações de troca magnética. O conceito de domínios distingue o ferromagnetismo do paramagnetismo para a amostra de material sob a ação do campo magnético que induz a orientação da amostra paramagnética. A estrutura dos domínios do material ferromagnético determina a influência do tamanho da partícula no comportamento magnético. Quando o tamanho de partícula do material ferromagnético é reduzido abaixo de um valor crítico, ele se torna um material de monodomínio. O magnetismo fino da partícula vem do efeito de

tamanho, o qual é baseado no arranjo da estrutura dos domínios de um material ferromagnético. Admite-se que o estado de menor energia de Gibbs para partículas ferromagnéticas tem magnetização uniforme para partículas menores que um certo tamanho crítico, enquanto a magnetização não é uniforme para partículas maiores que o tamanho crítico. As primeiras são denominadas partículas de monodomínio, enquanto as últimas são chamadas de partículas de multidomínio[109,110] (Figura 11). De acordo com a teoria do domínio magnético, o tamanho crítico de monodomínio é afetado por diversos fatores que incluem: o valor de saturação magnética, as forças anisotrópica do cristal e de interação de troca, a energia de superfície ou de parede de domínio e a forma da partícula [108].

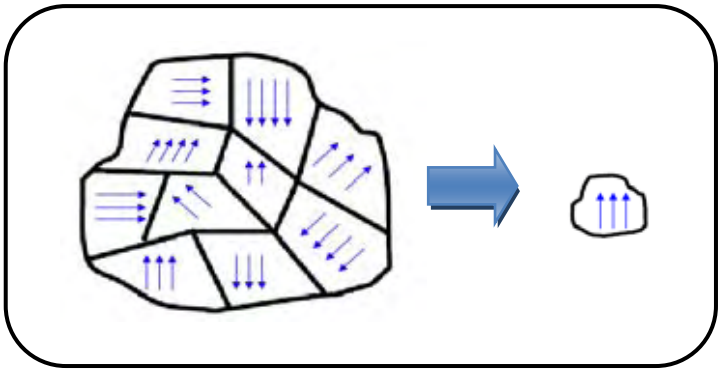


Figura 11 - À esquerda exemplo de multidomínios magnéticos e a direita um monodomínio magnético.
Fonte: o próprio autor.

A reação de um material ferromagnético quando um campo magnético externo é aplicado é descrita por uma curva de magnetização com histerese magnética, que é caracterizada por dois parâmetros principais: remanescência e coercitividade [108] (Figura 12). A curva de magnetização apresenta um ciclo de histerese porque todos os domínios não retornam às suas orientações originais quando o campo (H) é diminuído após a magnetização atingir o valor máximo, denominado magnetização de saturação (M_S). Assim, quando o campo magnético retorna a zero, há uma magnetização remanescente (M_R) que só pode ser removida pela aplicação de um campo magnético de valor definido, H_c (campo coercitivo), na direção oposta a do campo magnético aplicado inicialmente [93].

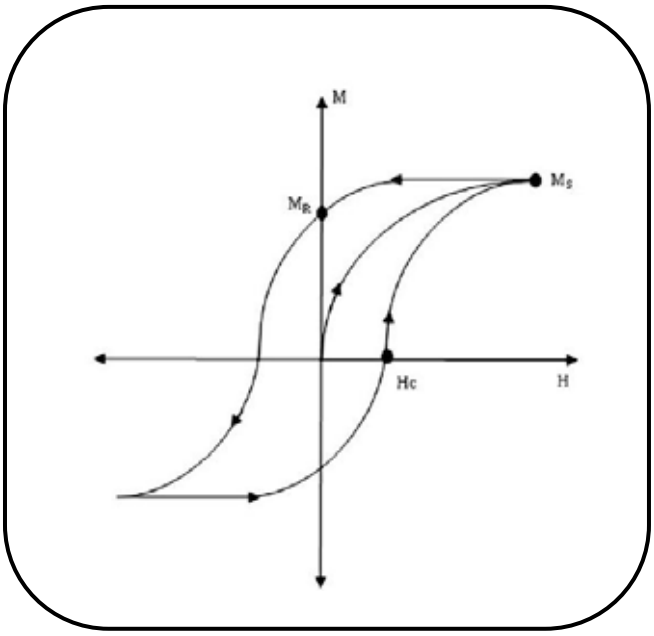


Figura 12 - Magnetização M como a função de um campo magnético aplicado H [93].
Fonte: TEJA; KOH (2009, p. 25).

Quando se considera partículas finas, a coercitividade é a propriedade de maior relevância porque esta é fortemente dependente do tamanho. Foi descoberto que quando o tamanho da partícula é reduzido, a coercitividade aumenta até um valor máximo e então diminui para zero. Quando o tamanho das partículas de monodomínio diminui abaixo de um diâmetro crítico a coercitividade diminui significativamente até o valor de H_C tornar-se zero, e então cada partícula se comporta como um enorme momento magnético, e são denominadas partículas superparamagnéticas (Figura 13). O superparamagnetismo é sensível a efeitos térmicos. Nas partículas superparamagnéticas as flutuações térmicas são fortes o suficiente para desmagnetizar espontaneamente um conjunto previamente saturado, portanto essas partículas têm coercitividade zero e não apresentam histerese. Portanto, nanopartículas abaixo do diâmetro crítico tornam-se magnéticas na presença de um campo magnético externo, mas revertem-se a um estado não magnético quando o campo é removido [108]. No caso dos óxidos de ferro, nanopartículas menores que 20nm freqüentemente apresentam um comportamento superparamagnético em temperatura ambiente [93].

A disposição ordenada dos momentos magnéticos diminui com o aumento de temperatura devido às flutuações térmicas dos momentos individuais. Acima da temperatura de Curie ou Néel, o material se torna desordenado e perde sua

magnetização. A temperatura de transição é denominada temperatura de Curie T_C para materiais ferrimagnéticos e ferromagnéticos, e temperatura de Néel T_N para materiais antiferromagnéticos. Partículas superparamagnéticas são geralmente ordenadas abaixo da temperatura de bloqueio, T_B. Acima dessa temperatura, o ordenamento do monodomínio é perturbado pela energia de agitação térmica [93]. A magnetita é ferrimagnética à temperatura ambiente, e sua temperatura de Curie é 850K. O diâmetro crítico na qual a magnetita passa a ser superparamagnética é da ordem de 15nm [94,108].

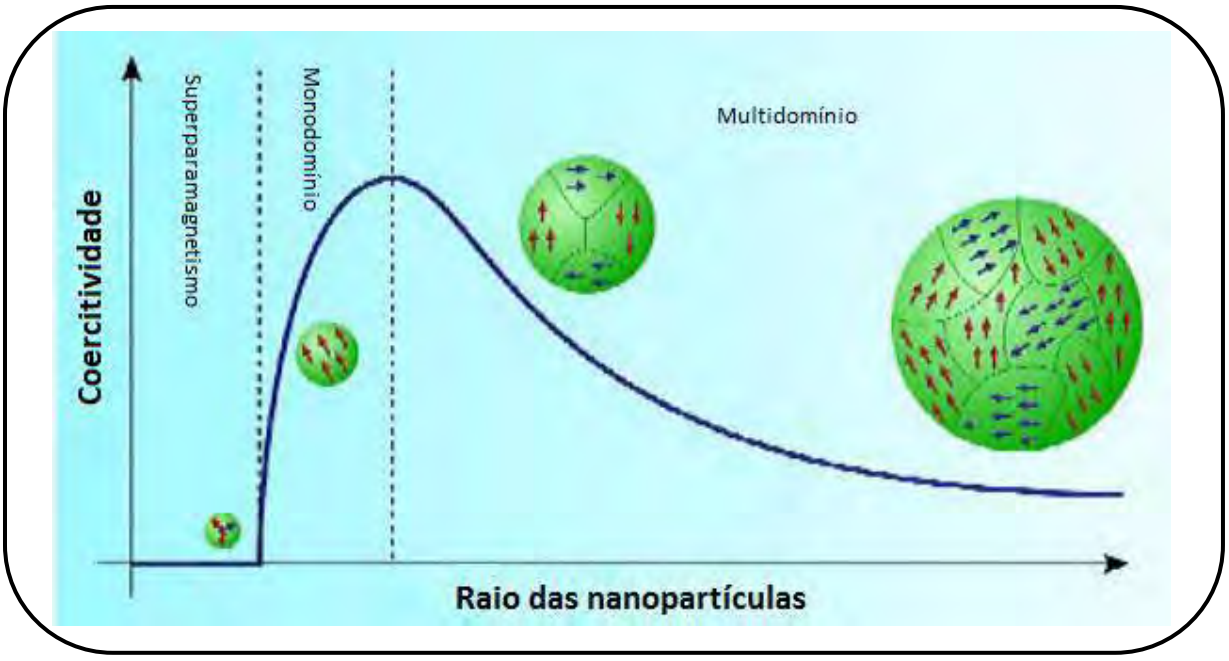


Figura 13 – Esquema da relação coercitividade e tamanho em pequenas partículas[108].
Fonte: AKBARZADEH; SAMIEI; DARAVAN (2012, p. 146).

2.3.3 Aplicações em Biomedicina

Nanopartículas de óxido de ferro como a magnetita, ou sua forma oxidada, maghemita, são de longe as nanopartículas mais comumente empregadas para aplicações biomédicas. Essas aplicações requerem partículas que exibem um comportamento superparamagnético à uma temperatura ambiente. Um magnetismo residual pode levar a uma aglomeração dessas partículas, o que obviamente deve ser evitado para prevenir o bloqueamento dos vasos sanguíneos. As nanopartículas de magnetita também são biocompatíveis e de baixa toxicidade no corpo humano[111,112].

As aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas podem ser classificadas de acordo com suas aplicações dentro ou fora do corpo (*in vivo*, *in vitro*). Dois principais fatores tem uma importante função para a aplicação dessas nanopartículas *in vivo*: tamanho e funcionalização da superfície. Mesmo sem ligantes de superfície biologicamente ativos, os diâmetros das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro afetam de modo mais eficiente a biodistribuição *in vivo*. Partículas com diâmetros entre 10 e 40 nm são importantes para prolongar seu tempo na corrente sanguínea. Elas podem atravessar as paredes dos capilares e são frequentemente fagocitadas por macrofagos que traficam até os nódulos linfáticos e medula óssea [108,113].

Na hipertermia magnética, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sob a exposição de um campo magnético alternado mudam aleatoriamente a direção da magnetização entre orientações paralelas e antiparalelas, permitindo a transferência da energia magnética para as partículas na forma de calor. Uma propriedade que pode ser usada *in vivo* para aumentar a temperatura de um tecido tumoroso a temperaturas em torno de 42ºC e destruir as células patológicas por hipertermia (Figura 14). Células tumorais são mais sensiveis ao aumento de temperatura do que as células saudáveis [114,115]. Em estudos passados, nanopartículas de magnetita funcionalizadas com dextrana dentro de lipossomas catiônicos [116] mostraram um aumento efetivo na temperatura das células tumorais com o tratamento por hipertermia. A vantagem dessa terapia é permitir que o aquecimento seja restrito a área do tumor [108].

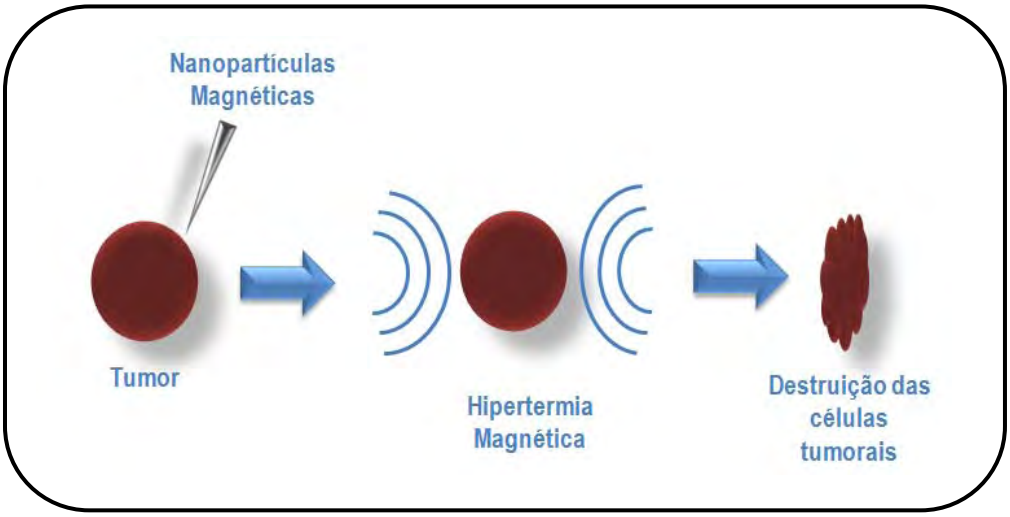


Figura 14 - Esquema do funcionamento da hipertermia magnética.
Fonte: o próprio autor.

2.3.4 Funcionalização da Superfície (Alcoxissilano)

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com modificação de superfície apropriada têm sido amplamente utilizadas para aplicações que incluem nanobiologia [107], nanomedicina [117,118] e ciências ambientais [119]. Geralmente, estas aplicações precisam de um revestimento de superfície específico para desempenhar uma determinada funcionalidade, tais como solubilidade, biocompatibilidade, fluorescência, e capacidade de adsorção [105].

Vários materiais têm sido aplicados como revestimento de superfície, incluindo materiais orgânicos, materiais poliméricos e moléculas inorgânicas. O princípio de revestimento pode ser baseado em ligações covalentes, interação de Van der Waals, e interações eletroestáticas [105].

Alcoxissilanos ou organossilanos são sílicas modificadas com grupos orgânicos. Seu uso crescente advém da sua capacidade de funcionalizar superfícies inorgânicas. Dentre os grupos alcóxidos mais comuns, encontram-se o metóxi (OCH_3), o etóxi (OCH_2CH_3), o n-propóxi [$O(CH_2)2CH_3$], e o séc-butóxi [$H_3C(O)CHCH_2CH_3$][120].

Os alcóxidos sofrem facilmente reações de hidrólise devido ao forte efeito polarizante da ligação metal oxigênio para formar silanóis (Si-OH). Entretanto, este produto é pouco estável e condensa-se com outros monômeros para formar siloxanos (Si-O-Si) que são muito estáveis. A condensação dos grupos silanóis também pode ocorrer na superfície de óxidos de ferro devido aos grupos hidroxilas expostos [73,121]. A Figura 15 ilustra o esquema de funcionalização da superfície com o APTS.

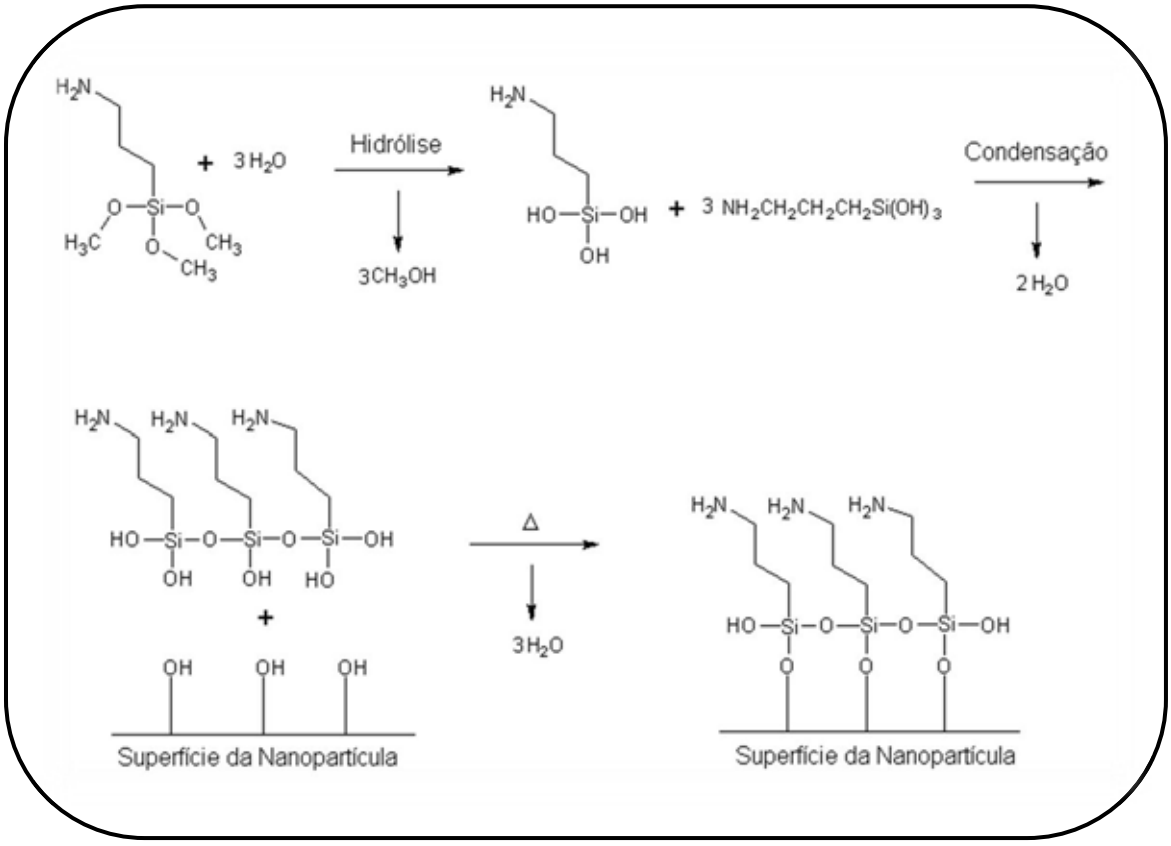


Figura 15 - Esquema da funcionalização da superfície de nanopartículas com APTS.
Fonte: o próprio autor.

Para aplicações em biomedicina, as nanopartículas magnéticas também podem ser biofuncionalizadas com moléculas biologicamente ativas, como hormônios e anticorpos, ou mesmo fármacos. O fator mais importante que influência a aplicabilidade destas partículas magnéticas é a ligação bem sucedida destas biomoléculas [122]. Neste contexto, a modificação da superfície com organossilanos é uma abordagem interessante, visto que eles são compatíveis com muitos materiais usados para fins biológicos [123]. O alvo funcional mais comum para imobilização de proteínas é o grupo amina, que está presente na grande maioria das proteínas. Por isso, embora existam alcoxissilanos com várias funcionalidades disponíveis, os que possuem grupamento amina são os mais freqüentemente usados para a finalidade biológica como o APTS [122].

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é preparar o biocompósito de HA e nanopartículas magnéticas para tratamento de osteocarcinoma e regeneração óssea. Sendo que para isso serão realizadas as seguintes etapas:

- Sintetizar esferas de sílica utilizando o método de Stöber[13] e preparar o molde empacotado;

- Sintetizar o precursor de HA utilizando o método sol-gel;

- Preparar a hidroxiapatita porosa infiltrando o precursor de HA no molde de esferas de sílica e depois removendo-as;

- Sintetizar nanopartículas de magnetita funcionalizadas com APTS;

- Inserir as nanopartículas funcionalizadas à hidroxipatita porosa.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e solventes

Os solventes empregados neste trabalho foram: etanol (Panreac, absoluto, grau PA) e água ultra pura.

Os reagentes utilizados foram: tetraetilortossilicato (Aldrich, 99%), (3-aminopropil)trimetoxisilano (Aldrich, 97%), hidróxido de amônio (Alfa AESAR, 28-30%), peróxido de hidrogênio (Panreac, 30% v/v, grau PA), nitrato de cálcio tetrahidratado (Alfa AESAR, 99-103%), trimetilfosfato (Aldrich, 99%), Brometos de Ferro (II) e (III) (Aldrich, 98%), e hidróxido de sódio (Synth, PA).

As estruturas moleculares do tetraetilortossilicato (TEOS), (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTS) e trimetilfosfato (TMF) estão ilustradas na Figura 16.

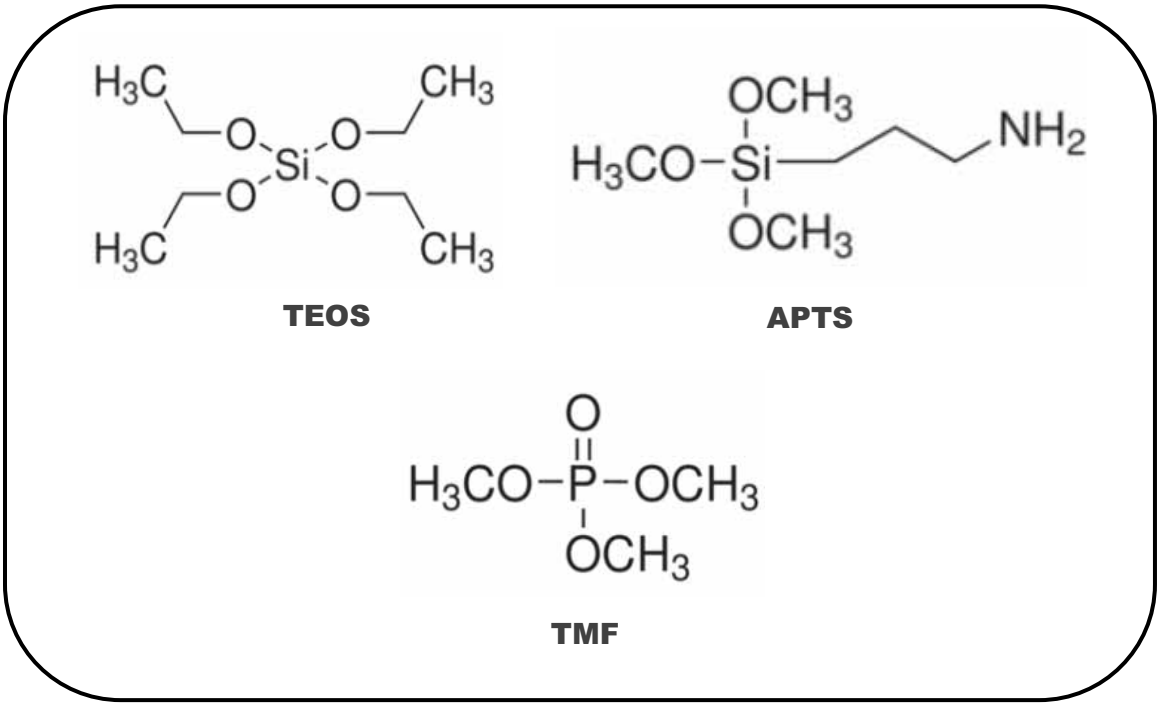


Figura 16 - Estruturas moleculares do TEOS, APTS e TMF.

4.2 Preparação das esferas de sílica

As esferas de sílica foram preparadas através das reações de hidrólise e condensação do tetraetilortossilicato (TEOS), em meio básico, adicionando uma mistura de água, amônia e etanol. Apesar da mudança de alguns parâmetros, o processo principal consistiu em misturar 22mL de TEOS em 24mL de etanol (solução A), e 30mL de etanol em 18mL de água ultra pura e 6mL de hidrôxido de amônio por 15 min (solução B). Então a solução A foi adicionada à solução B e mantida sob agitação por 2h em diferentes temperaturas. As esferas de sílica obtidas foram centrifugadas, lavadas com água destilada, e finalmente secadas a 50ºC por 12h (Figura 17). A Tabela 5 apresenta a série de amostras preparadas e os parâmetros modificados para cada uma.

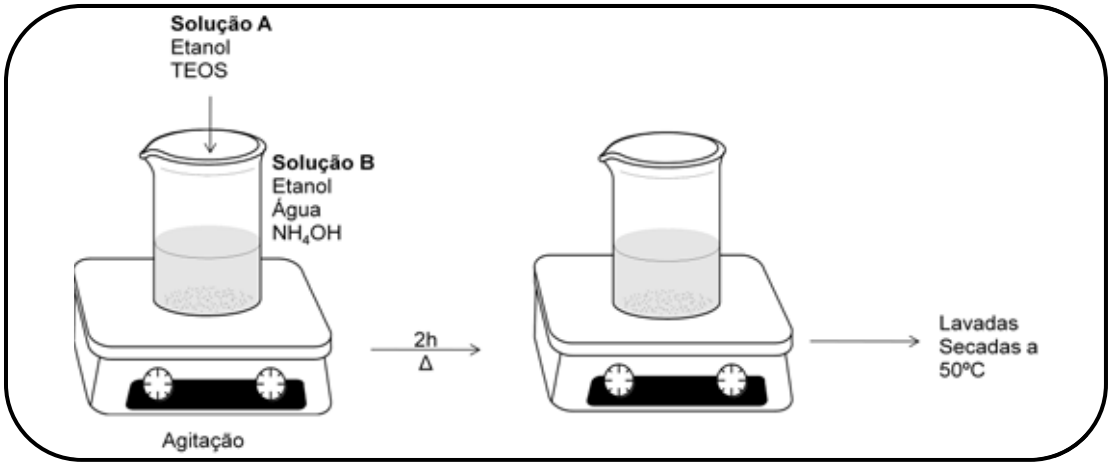


Figura 17 -Esquema da síntese das esferas de sílica.

Tabela 5 - Amostras de esferas de sílica e seus parâmetros.

Amostra	Etanol (mol/L)	Água (mol/L)	$NH_4(OH)$ (mol/L)	TEOS (mol/L)	Agitação Magnética	Agitação Mecânica	Temperatura (ºC)	Adição do TEOS
S01	9,30	10,00	1,50	0,99	Sim		25	Lenta
S02	9,30	10,00	1,50	0,99	Sim		40	Lenta
S03	9,30	10,00	1,50	0,99	Sim		60	Lenta
S04	9,30	10,00	1,50	0,99	Sim	-	40	Lenta
S05	9,30	20,00	1,50	0,99	Sim	-	40	Lenta
S06	9,30	20,00	1,50	0,99	-	Sim	40	Lenta
S07	11,30	10,70	1,50	0,40	Sim	-	40	Rápida
S08	11,30	10,70	1,50	0,40	-	Sim	40	Rápida

4.3 Preparação do molde empacotado

1g das esferas de sílica obtidas foram dispersadas em uma solução de 100mL de H_2O_2 (30% v/v) , e então mantidas sob agitação por 48h. As esferas de sílica modificadas por peróxido de hidrogênio foram centrifugadas e secadas a 50ºC por 12h. Subseqüentemente, 0,5g das esferas modificadas foram dispersadas em 50mL de etanol e agitadas ultrasonicamente por 15 min, sendo então mantidas sob agitação (magnética) constante por 1h. A suspensão resultante foi sedimentada por 24h para obter o molde empacotado (Figura 18). A modificação das esferas de sílica com peróxido de hidrogênio foi realizada para aumentar e melhorar as cargas na superfície. Escolhidas as amostras de esferas de sílica de maior, médio e menor tamanho, foram preparados 3 moldes empacotados.Para melhor entendimento, na nomenclatura dos moldes foi utilizado o tamanho das esferas de sílica pelo qual foram preparados (Tabela 6).

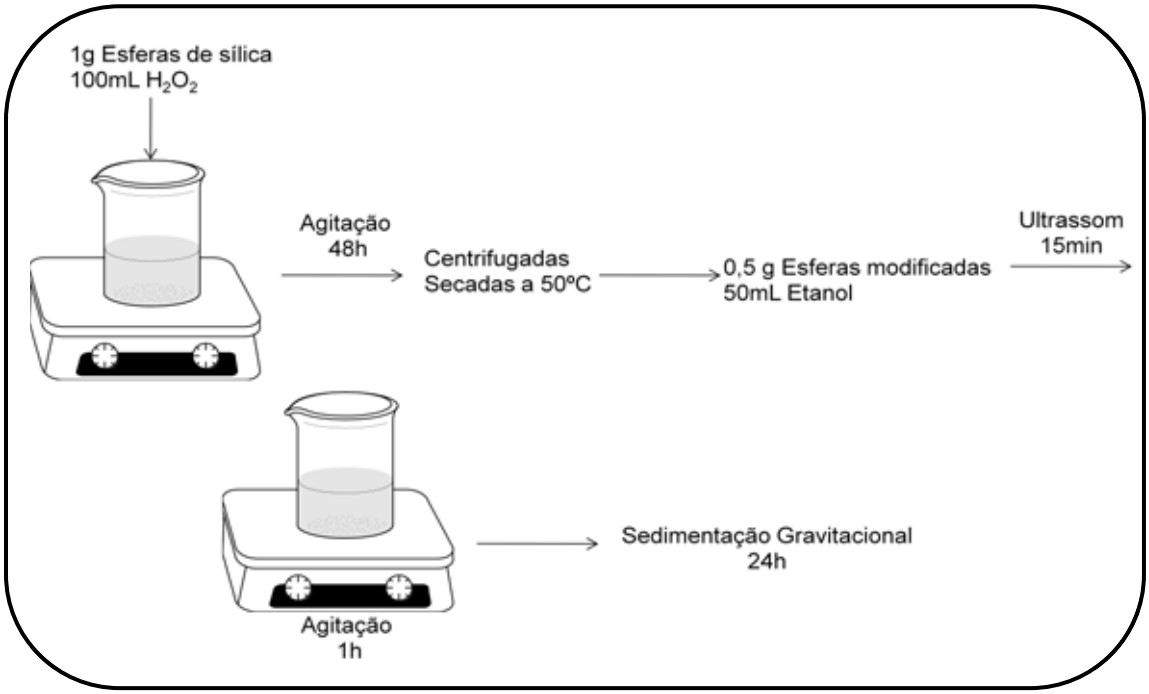


Figura 18 - Esquema de preparação do molde empacotado.

Tabela 6 - Moldes preparados das amostras de sílica.

Molde	Amostra de sílica
TP808	S04
TP223	S07
TP402	S08

4.4 Síntese do precursor de HA

O precursor de HA foi preparado utilizando o método sol-gel. Uma mistura de 5g de $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 7,6mL de etanol foi adicionada em um balão e deixada sob agitação, então lentamente foi adicionado 1,9mL de trimetilfosfato. A solução final foi mantida em banho de óleo a 80ºC por 24h (Figura 19). Após a sintense era obtido um gel transparente. O qual era aquecido e precipitado na forma de pó para a realização das diversas análises de caracterização do precursor. Foram preparadas duas amostras de gel precursor, a primeira H01 com 24h de envelhecimento e a H02 com 72h de envelhecimento.

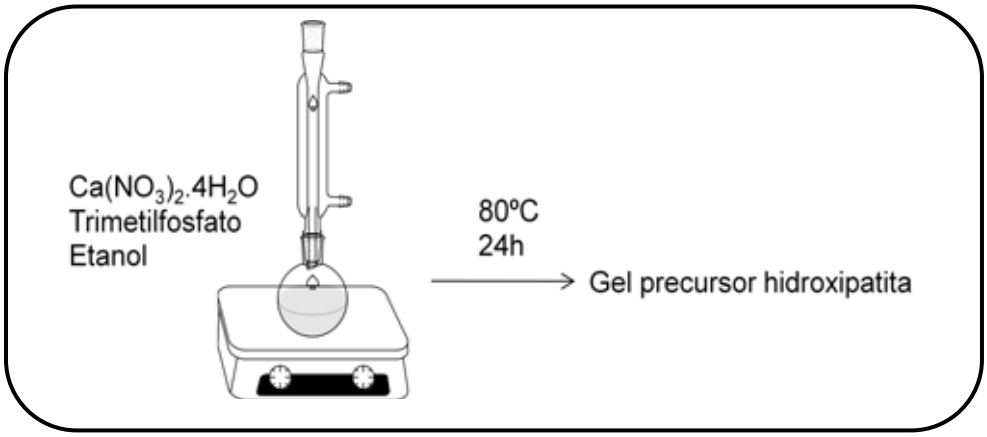


Figura 19 - Esquema da síntese do precursor de HA.

4.5 Preparação da HA com poros

O gel precursor de HA foi infiltrado no molde de sílica por 3 minutos, depois a mistura do molde/HA foi secada a 100ºC por 12h e então calcinada a 700ºC por 2h. Finalmente o molde de sílica foi removido pela imersão em solução de NaOH 5 $mol.L^{-1}$ por 4 dias (Figura 20). Foram preparadas duas amostras de HA porosa H1TP223 e H1TP402, feitas com os moldes TP223 e TP402 respectivamente.

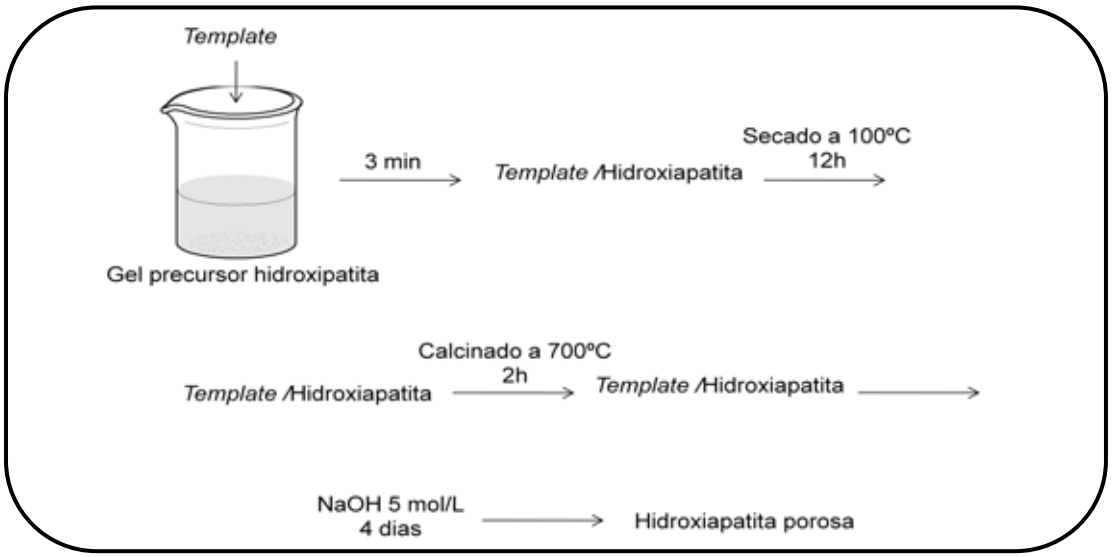


Figura 20 - Esquema da preparação da HA com poros.

4.6 Preparação das nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas com APTS

As nanopartículas de magnetita foram preparadas usando o método de co-precipitação em meio aquoso. A síntese se deu com a adição de uma mistura de sais de Fe^{+2} e Fe^{+3} em uma solução de NaOH, reação representada abaixo [91] (Equação 3):

$$Fe^{2+} + 2\,Fe^{3+} + 8OH^{-} \longrightarrow Fe_3O_4 + 4\,H_2O \quad (3)$$

Para a funcionalização com o alcoxissilano, foi adicionada uma alíquota de APTS durante a co-precipitação. O produto foi lavado com água e secado em estufa à vácuo por 8h a 50ºC (Figura 21).

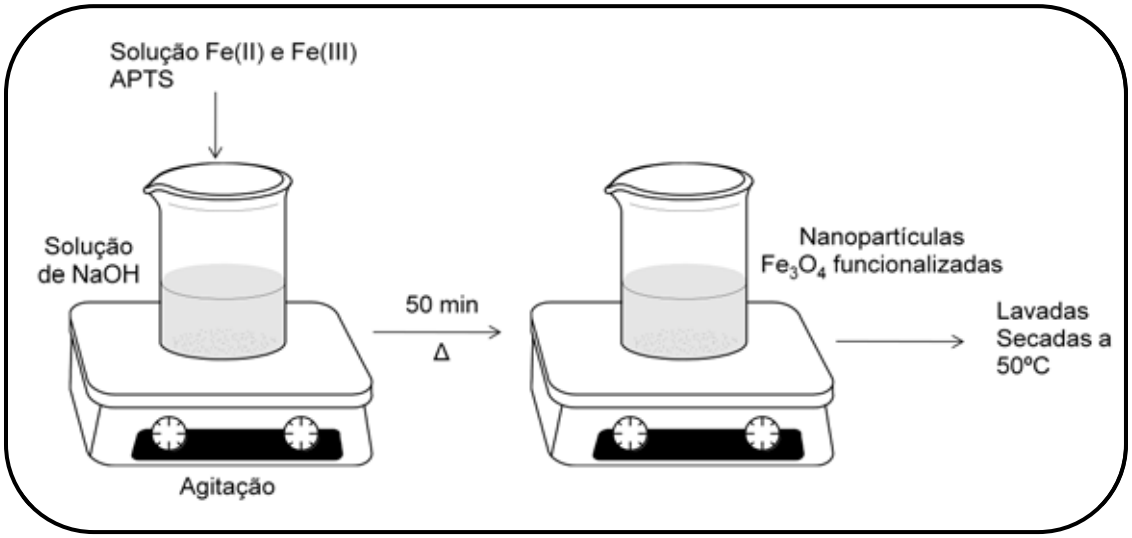


Figura 21 - Esquema da síntese das nanopartículas de óxido de ferro com APTS.

4.7 Preparação da HA porosa com nanopartículas magnéticas

Primeiramente, as nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas com APTS foram dispersadas em 10mL de etanol. Após esse processo, foi adicionada 0,02g de hidroxiapatita porosa. A solução foi então mantida por 24h sob agitação constante. O produto foi então lavado diversas vezes com água e seco em estufa a vácuo por 8h a 50ºC (Figura 22).

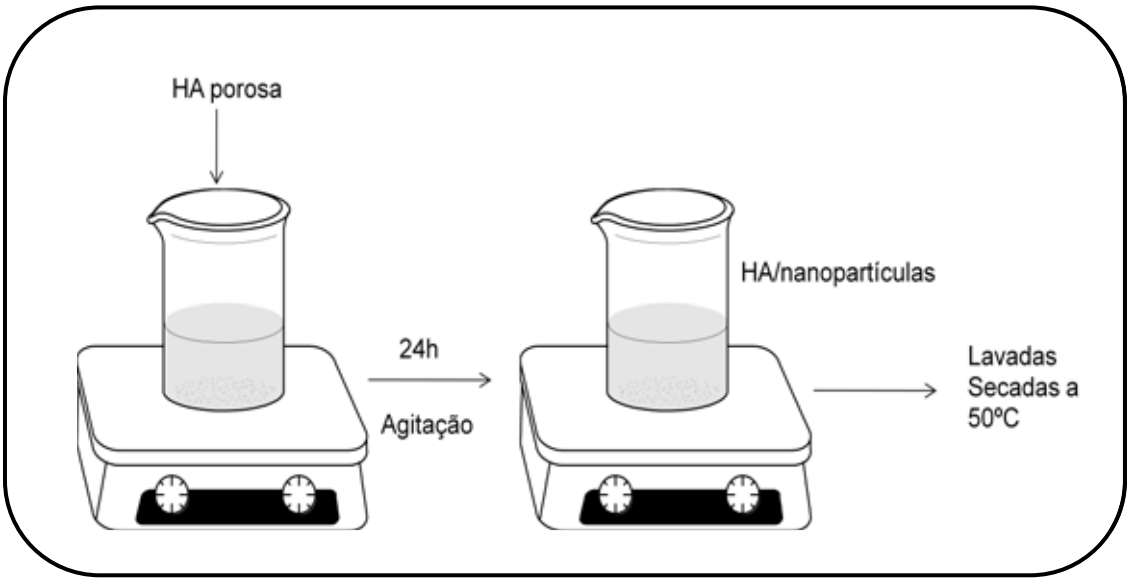


Figura 22 - Esquema da preparação da HA porosa com nanopartículas magnéticas.

4.7 Técnicas de caracterização

Para avaliar a forma, estrutura e o tamanho das amostras sintetizadas, foi necessário o uso de algumas técnicas de caracterização.

4.7.1 Microscópio eletrônico de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica usada para se obter imagens de morfologia externa similares áquelas vistas pelo olho humano [124]. A obtenção de uma imagem por um microscópio eletrônico é feita através de um procedimento semelhante ao usado por um microscópio óptico convencional, mas ao invés de se utilizar fótons da luz visível, os microscópios eletrônicos usam feixes de elétrons. Nestes instrumentos, feixes de elétrons são acelerados através de uma

diferença de potencial de 1 a 200kV, e para focar os elétrons, são empregados campos elétricos e magnéticos. Na microscopia eletrônica de varredura o feixe é varrido sobre a amostra, e o feixe refletido espalhado é usado para construir imagens pelo detector. A melhor resolução possível da MEV depende de quão colimado é o feixe incidente que é focado sobre a amostra, de como ele é movido sobre a amostra, e de quanto do feixe se espalha sobre a amostra antes de refletir. Para análise de MEV, as amostras necessitam ser condutoras, pois de outra forma os elétrons podem se acumular na amostra e interagir com o próprio feixe de elétrons, resultando numa perda de definição da imagem. Assim, as amostras não-condutoras devem ser recobertas com uma fina camada de metal, geralmente ouro ou alumínio [125].

As micrografias eletrônicas de varredura desse trabalho foram realizadas em um microscópio TOPCOM modelo SM-300 (IQ-UNESP Araraquara). Todas as amostras foram depositadas em porta amostras de alumínio e recobertas com ouro. Os histogramas foram obtidos medindo-se o diâmetro médio de cerca de 200 nanopartículas nas micrografias obtidas.

4.7.2 EDX acoplado a Microscopia eletrônica de varredura

Espectroscopia de energia por dispersão de raios X (EDX ou EDS) é uma técnica analítica usada para a análise elementar ou caracterização química de uma amostra. Em um MEV, o feixe de elétrons varre e penetra na superfície da amostra, interagindo com átomos da mesma, e produzindo diferentes sinais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X, elétrons Auger, e luz visível que podem ser capturados por detectores apropriados [126].

As energias produzidas durante a formação dos elétrons secundários e liberadas juntamente com o elétron Auger (elétrons de baixa energia que carregam informações sobre a natureza química da amostra), normalmente são sinais de raios X. Os raios X emitidos pelo átomo tem energia característica dependendo do elemento do qual foi originado. Com detectores de raios X acoplados ao MEV, esses raios X podem ser detectados e usados para quantificar a constituição química dos materiais [126].

As micrografias eletrônicas de varredura acopladas a um EDX deste trabalho foram realizadas em um microscópio JEOL modelo JSM-7500F (IQ-UNESP

Araraquara). Todas as amostras foram depositadas em porta amostra de alumínio e recobertas com ouro.

4.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica que investiga a estrutura interna de sólidos e fornece informações sobre detalhes microestruturais que não são habituais. Na MET, o feixe de elétrons passa através de uma amostra fina que está sendo examinada, e a imagem bi-dimensional é construída numa tela fosforescente. O brilho de uma área em particular é proporcional ao número de elétrons que são transmitidos através do material [125].

A MET é frequentemente usada para se obter imagens de amostras biológicas transparentes aos elétrons e, oferecendo resolução atômica, para estudos de materiais em alta resolução[125].

As micrografias de transmissão desse trabalho foram realizadas em um microscópiode transmissão Zeiss CEM-902 (IQ – Unicamp), 120kV. Para a preparação das telas de cobre revestidas com carbono, as amostras já previamente secadas na forma de pó foram dispersadas em isopropanol.

4.7.4 Difração de raios X

O método de difração de raios X permite a determinação das posições dos átomos e íons que constituem um composto iônico ou molecular, permitindo assim a descrição das estruturas cristalinas em termos de detalhes, tais como comprimento de ligação, ângulos e posições relativas de íons e moléculas numa célula unitária [125].

Difração é a interferência entre ondas, que ocorre como resultado da presença de um objeto no caminho destas. Os raios X são espalhados pelos elétrons dos átomos e a difração pode ocorrer para um arranjo periódico de centros espalhadores separados por distâncias semelhantes à do comprimento de onda da radiação, tais como os que existem nos cristais. Se pensarmos no espalhamento como equivalente à reflexão por dois planos paralelos adjacentes, separados por uma distância *d*, então o ângulo para o qual uma interferência construtiva pode ocorrer entre ondas de comprimento de onda *l,* é dado pela equação de Bragg:

$$2d\text{sen}\theta = \lambda \quad (4)$$

A intensidade da difração depende de detalhes da estrutura do cristal e da identidade dos átomos. A facilidade dos átomos espalharem os raios X depende de quantos elétrons eles possuem e das suas posições na célula unitária [125].

Para as medidas de raios X nesse trabalho, utilizou-se um difratômetro de raios X modelo Rigaku Rint 2000 (IQ-UNESP Araraquara), operando com tamanho de passo de 0,02º e tempo por passo de 3s no intervalo de 2θ de 20º a 80º e para algumas amostras no intervalo de 4º a 80º. Todas as amostras foram analisadas na forma de pó.

4.7.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Através do espectro na região do infravermelho podemos obter informações sobre as vibrações moleculares, ou seja, as deformações e os estiramentos das ligações nas moléculas. O espectro vibracional de um composto é obtido pela exposição da amostra à radiação infravermelha, e pelo registro da variação da transmissão com a frequência (ou número de onda). Nos primeiros espectrômetros, a transmissão era medida enquanto a freqüência era varrida entre dois limites. Agora, o espectro é extraído de um interferograma por transformada de Fourier, que converte a informação do domínio do tempo para o domínio da freqüência. A amostra deve estar contida num material que não absorva radiação infravermelha, o que significa que não se pode usar vidro e nem soluções aquosas, a não ser que as bandas espectrais de interesse ocorram em freqüências que não são absorvidas pela água[125].

Os espectros na região do infravermelho das amostras foram obtidos em um espectrômetro FTIR-IR Affinity-1 Shimadzu (IQSC-USP), e faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1}. Para todas as análises foram prensados discos da amostra com KBr.

4.7.6 Análise térmica

A análise térmica é a análise da variação de uma propriedade da amostra, a qual está relacionada com uma mudança imposta na temperatura. A amostra geralmente está em estado sólido e as variações que ocorrem durante o aquecimento incluem fusão, mudança de fase, sublimação e decomposição[125].

Dentre as análises térmicas temos a análise termogravimétrica (TG), onde a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente em função da temperatura ou do tempo, enquanto a temperatura da amostra é aumentada[121]. As medidas são feitas usando-se uma termobalança, a qual consiste de uma microbalança eletrônica, um forno de temperatura programável e um controlador que permite que a amostra seja simultaneamente aquecida e pesada[122]. Como a TG monitora a massa do analito em função da temperatura, a informação fornecida é quantitativa, mas limitada às reações de decomposição e oxidação e aos processos físicos, como vaporização, sublimação e dessorção [124].

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica na qual a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a um programa de temperatura controlada [124]. Num instrumento de DTA, a amostra e a referência são colocadas em porta amostras de baixa condutividade térmica, situados dentro de cavidades do bloco de um forno. A temperatura do forno é aumentada linearmente e a diferença de temperatura entre a amostra e a referência é lançada em gráfico contra a temperatura do forno. Ocorrendo um evento endotérmico dentro da amostra, a temperatura da amostra ficará atrás da referência e aparecerá um mínimo na curva DTA. Se ocorrer um evento exotérmico, então a temperatura da amostra excederá a da referência e aparecerá um máximo na curva[125]. Em geral, a DTA é considerada uma técnica qualitativa [124].

As curvas TG/DTA desse trabalho foram realizadas em um aparelho TG/DTA simultâneo com temperatura máxima de 1500ºC, NETZSCH, modelo STA 409. (IQ – Unesp). A taxa de aquecimento utilizada foi de 10ºC/min, em uma atmosfera oxidante, na faixa de temperatura de 0 até 1000ºC.

4.7.7 Medidas de Magnetização

A forma clássica de observação das propriedades magnéticas de uma amostra é pela medida da atração ou repulsão por um campo magnético, através da medida da variação do peso aparente da amostra quando o campo magnético é ligado em uma “balança de Gouy”. O magnetômetro de amostra vibrante(VSM) mais moderno mede as propriedades magnéticas deum materialusandouma versão modificadade uma “balança de Gouy”. A amostra é colocada em um campo magnético uniforme, o que induz uma rede de magnetização. À medida que a amostra é vibrada, um sinal elétrico é induzido e adequadamente colocado em bobinas.O sinal tem a mesma frequência de vibração e a sua amplitude é proporcional à magnetização induzida [125].

As propriedades magnéticas das amostras foram obtidas a temperatura ambiente por meio de um magnetômetro de amostra vibrante (VSM), ADE-MAGNETICS, modelo EV9 (IF-UnB).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Esferas de sílica

Estudado por Stöber [13], é sabido da possibilidade de se controlar o tamanho e a distribuição de diâmetros das esferas de sílica, alterando parâmetros diferentes durante a síntese. A fim de se obter esferas uniformes em uma primeira etapa, foram testadas diferentes temperaturas durante a síntese, sendo elas 25, 40 e 60ºC.

A Figura 23 ilustra a micrografia eletrônica de varredura da amostra S01, obtida à temperatura ambiente. Observa-se que as esferas de sílica não se formaram. Tem-se então, a formação de aglomerados que tendem a forma esférica, mas sem nenhum tipo de controle de tamanho. Em seu trabalho, Giesche [77] definiu a taxa de reação de crescimento das esferas de sílica pela Equação 5:

$$\frac{d[SiO_2]}{dt} = 2{,}36\ s^{-1}\,(mol\ dm^{-3})^{-2{,}15}\ \exp\left\{\frac{-3256K}{T}\right\} X\ [H_2O]^{1{,}18}\ [NH_3]^{0{,}97}\ [TEOS] \quad (5)$$

Sendo assim, a taxa de crescimento das partículas é lenta em baixas concentrações de amônia, em baixas concentrações de água, ou em temperaturas baixas. Visto a temperatura que foi preparada a amostra S01, acredita-se que o tempo de síntese não foi suficiente para o crescimento das esferas.

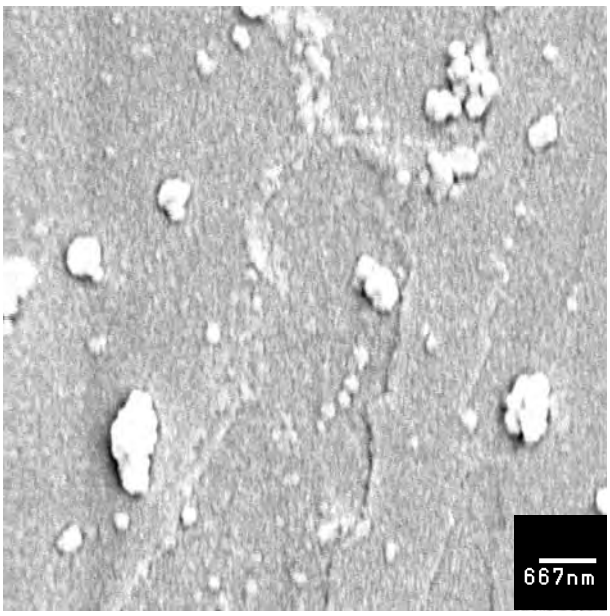


Figura 23 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra S01.

As micrografias das amostras S02 obtidas à 40ºC e S03 obtida à 60ºC, estão ilustradas na Figura 24. Observa-se a formação das esferas de sílica com sucesso nas duas amostras. Entretanto, as esferas da amostra S02 estão mais definidas, enquanto na amostra S03, há um grande aglomerado de esferas, com formas mais ovais. Nesta primeira etapa, concluiu-se que o melhor resultado foi obtido a 40ºC, sendo que todas as sínteses subseqüentes foram realizadas nesta temperatura.

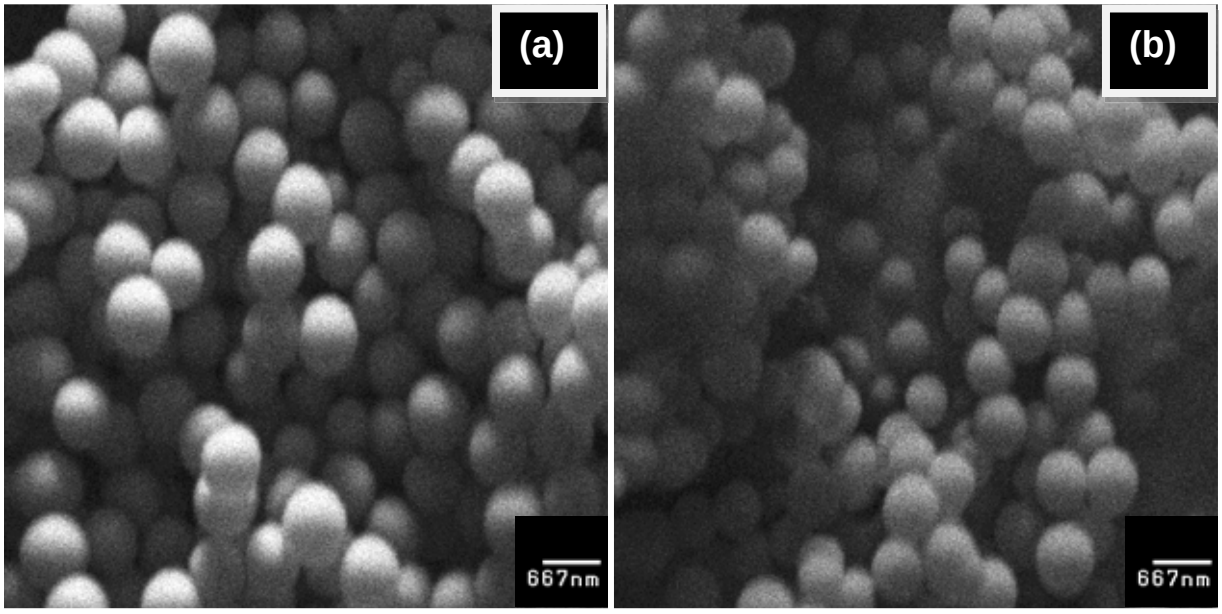


Figura 24 - (a) Micrografia eletrônica de varredura da amostra S02 e (b) Micrografia eletrônica de varredura da amostra S03.

Numa segunda etapa, alguns parâmetros foram alterados conforme descrito anteriormente na Tabela 1, a fim de se obter esferas com tamanhos diferentes e pequena distribuição de diâmetros. Para todas as amostras (S04-S08), foram preparados histogramas por meio da contagem de 200 esferas nas micrografias obtidas, sendo que o diâmetro médio foi obtido estatisticamente por meio desses histogramas.

Para discutir os resultados, as amostras foram separadas em dois grupos. O primeiro é formado pelas amostras S04, S05 e S06, todas preparadas com adição lenta de TEOS e com a mesma concentração de etanol, hidróxido de amônio e TEOS, com variação apenas da concentração de água e o tipo de agitação. O segundo grupo é formado pelas amostras S07 e S08, sendo preparadas com adição rápida de TEOS e com as mesmas concentrações dos reagentes. No entanto, o tipo de agitação foi modificado.

A amostra S04 foi preparada com os mesmos parâmetros de síntese da amostra S02. Sua micrografia e seu histograma estão representados pela Figura 25.

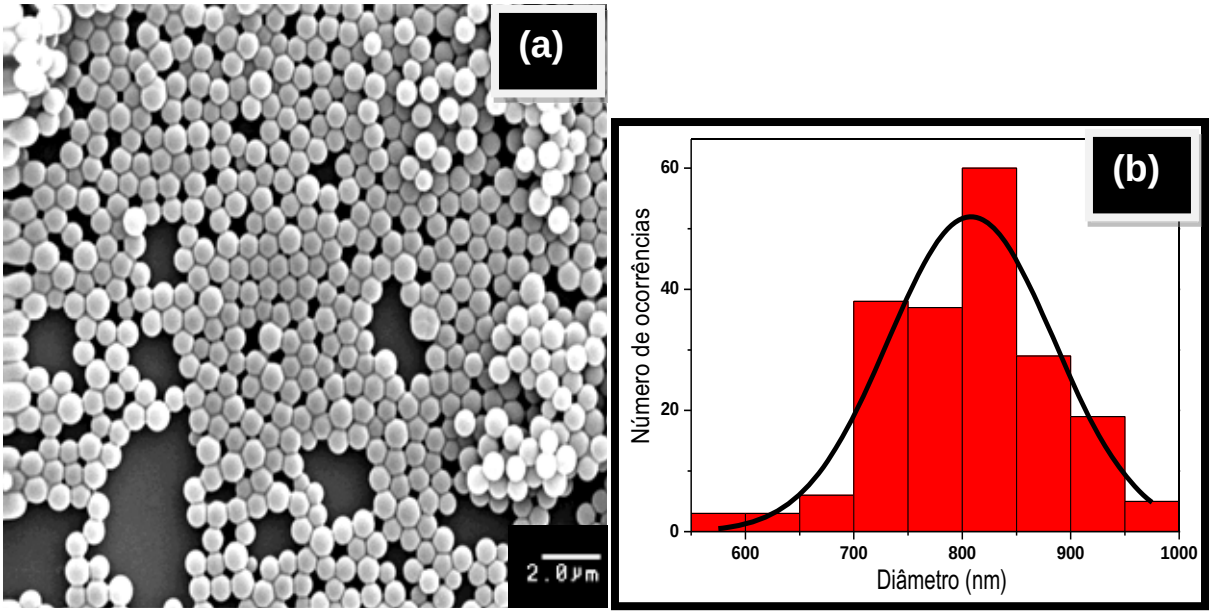


Figura 25 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S04.

Ajustando o histograma à uma função Gaussiana (R^2 = 0,85), o valor médio do diâmetro obtido para a amostra S04 foi 808±80nm. Apesar da larga faixa de distribuição de diâmetros, foram obtidas esferas bem definidas e com pequenas deformações. Também de acordo com Giesche [77], o fator distribuição de diâmetros está mais relacionado com a proporção de água usada na síntese do que com os demais parâmetros. Sendo assim, quanto maior a proporção de água, menor será a distribuição de diâmetros. A agitação também é um parâmetro experimental importante. Uma agitação não homogênea durante a adição de TEOS gera microflutuações da sua concentração, levando a diferentes taxas de crescimento para cada partícula. Para testar esse parâmetro, foram realizados experimentos com agitação magnética e mecânica.

A Figura 26 ilustra a micrografia da amostra S05 e seu histograma. Da amostra S04 para a S05, o único parâmetro modificado foi a concentração de água adicionada em dobro. Era esperado que com essa alteração, a distribuição de diâmetros diminuísse. Para se obter o diâmetro médio da amostra, o histograma foi ajustado a uma função Log-normal (R^2 = 0,99). O resultado encontrado foi de 364±42nm. Como esperado, a distribuição de diâmetros encontrada S05 foi menor do que da amostra S04, sendo que o tamanho das esferas também diminuiu.

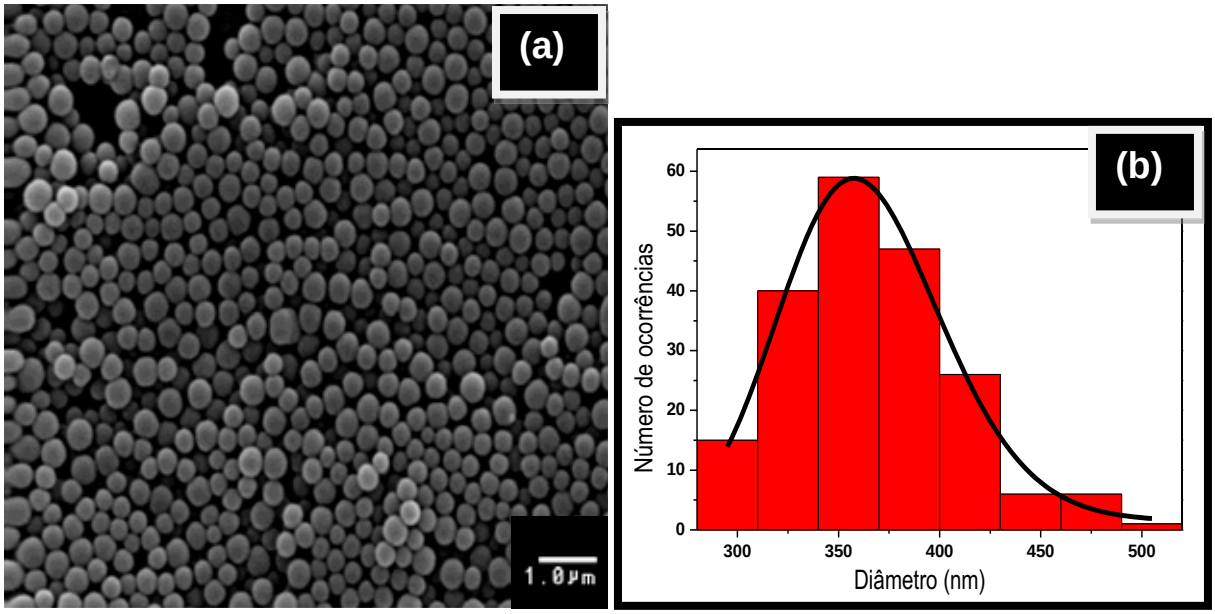


Figura 26 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S05.

A amostra S06 foi preparada com as mesmas concentrações de reagentes da amostra S05, destacando o fato de que apenas a agitação magnética foi mudada para mecânica. A micrografia e o histograma da amostra S06 estão ilustrados na Figura 27. A função Log-normal (R^2 = 0,88) foi usada para ajustar o histograma e o diâmetro médio obtido foi de 223±22nm. O resultado foi mais interessante do que o esperado pois, anteriormente, aumentando a concentração de água, obteve-se uma distribuição de diâmetro menor, bem como esferas de tamanhos menores. Entretanto, mudando apenas a agitação, esperava-se que apenas a distribuição de diâmetros diminuisse. Acredita-se que, agitação magnética não estava sendo satisfatória para homogeneizar a solução enquanto o TEOS era adicionado, gerando as microflutuações descritas anteriormente. Modificando a agitação para mecânica, esse problema foi sanado.

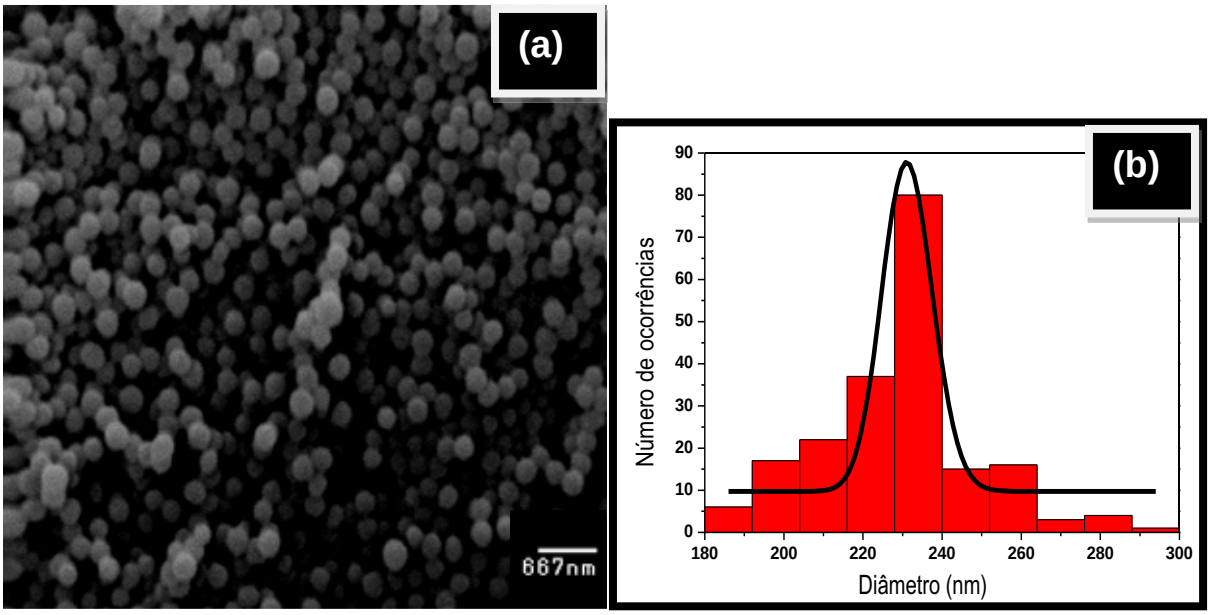


Figura 27 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S06.

As micrografias e os histogramas das amostras S07 e S08 estão representados pela Figura 28 e 29, respectivamente. O histograma da amostra S07 foi ajustado com uma função Log-normal (R^2 = 0,89). O diâmetro médio obtido foi de 399±40nm, enquanto que, para a amostra S08, o histograma também foi ajustado com uma função Log-normal (R^2 = 0,98). O diâmetro médio obtido foi de 402±35nm. Os resultados indicam que a agitação não teve influência durante a síntese. Diferentemente do primeiro grupo de amostras, onde a adição do TEOS foi realizada lentamente e a agitação homogênea era um fator crucial durante a síntese. Nesse segundo grupo, o TEOS foi adicionado rapidamente. Sendo assim, a agitação após a adição do TEOS já não era um parâmetro que poderia influenciar na formação e crescimento das esferas.

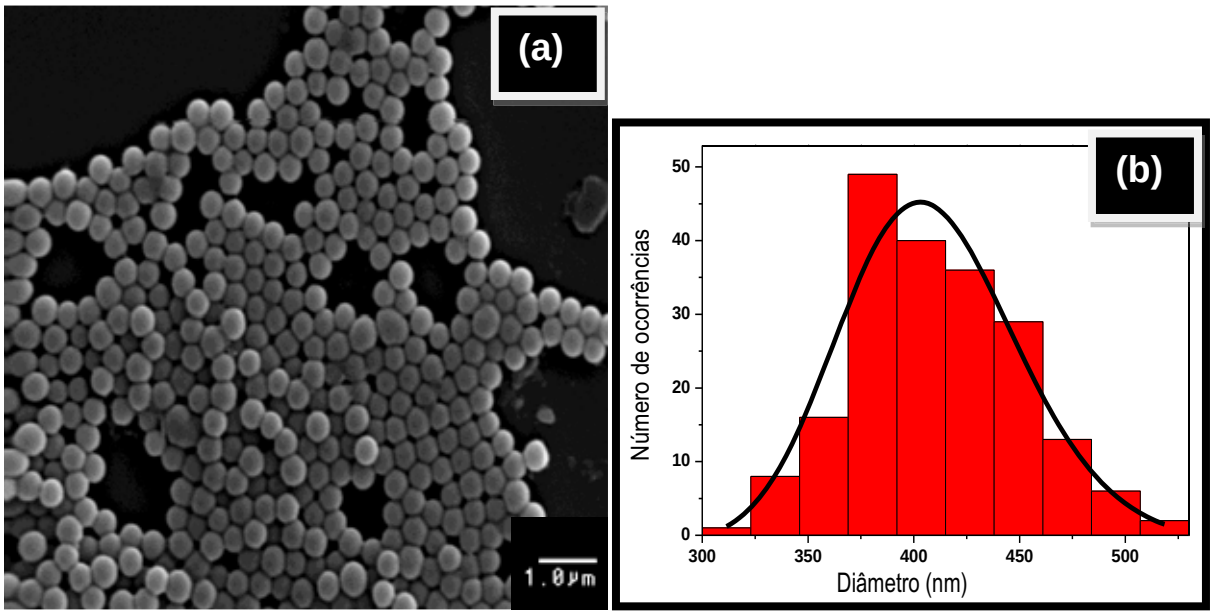


Figura 28 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S07.

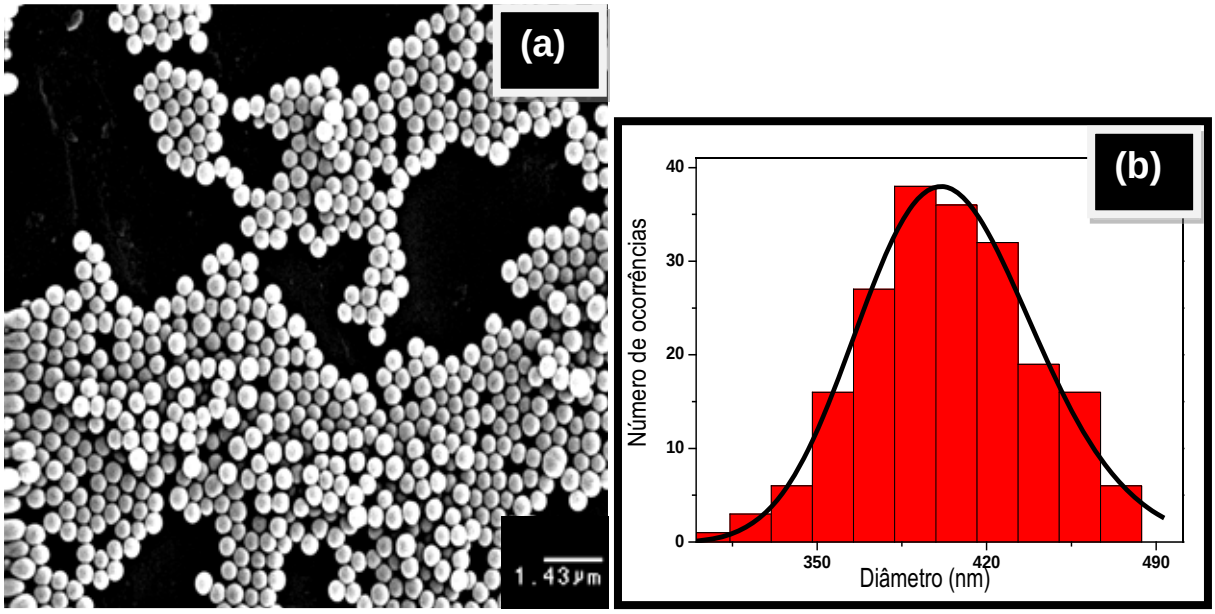


Figura 29 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) histograma da amostra S08.

A Tabela 7 resume os parâmetros modificados e os diâmetros obtidos estatisticamente para as amostras de S04 a S08.

Tabela 7 - Resumo dos parâmetros estudados e diâmetros obtidos das esferas de sílica.

Amostra	Água (mol/L)	Agitação	Adição do TEOS	Diâmetro (nm)
S04	10,00	Magnética	Lenta	808±80
S05	20,00	Magnética	Lenta	364±42
S06	20,00	Mecânica	Lenta	223±22
S07	10,70	Magnética	Rápida	399±40
S08	10,70	Mecânica	Rápida	402±35

As esferas de sílica também foram caracterizadas por análise de difração de raios X. O difratograma da amostra representativa S02 está ilustrada na Figura 30. Analisando o difratograma, observa-se um halo na região de 15º a 35º 2θ, que está relacionada ao estado amorfo da sílica [127]. Este resultado era esperado, pois é sabido que a sílica é um material amorfo mesmo após calcinação a 1100ºC. Apenas após calcinação a 1300ºC tem-se a formação da fase α-cristobalita[77].

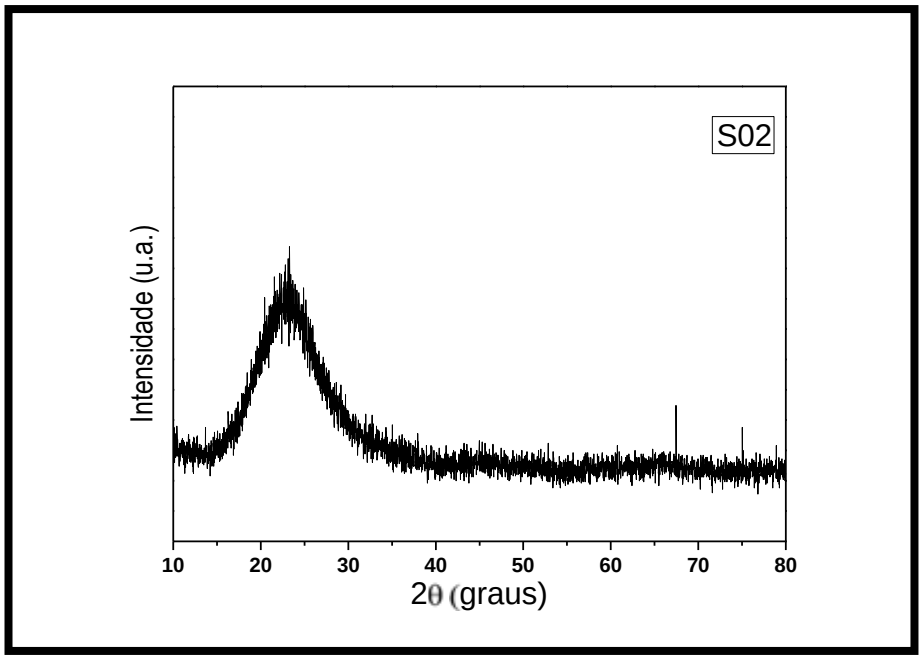


Figura 30 - Difratograma de raios X da amostra S02.

Uma última análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada também com a amostra representativa S02. A Figura 31 ilustra o espectro na região do infravermelho da amostra S02.

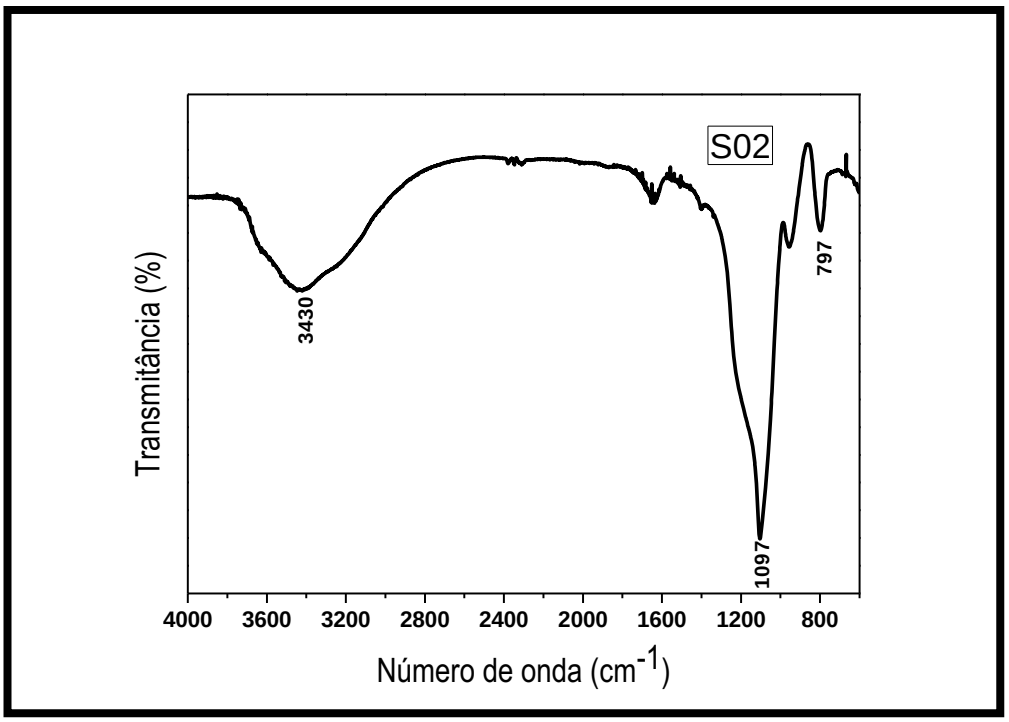


Figura 31 - Espectro na região do infravermelho da amostra S02.

As regiões demarcadas no espectro caracterizam as principais bandas encontradas para a sílica. Em 797cm^{-1}, atribui-se à banda a deformação axial do Si-O do grupo Si-OH, e em 1097cm^{-1} tem-se uma banda muito forte da deformação axial do Si-O-Si dos siloxanos. Por último, em 3430cm^{-1}, observa-se a banda de deformação axial do OH , proveniente do grupo Si-OH [128,129]. Todas as bandas atribuídas para a sílica estão sumarizadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra S02.

Número de onda (cm^{-1})	**Atribuições de bandas**
800	Deformação axial Si-O do grupo Si-OH
1097	Deformação axial Si-O-Si dos siloxanos
3430	Deformação axial OH do grupo Si-OH

5.2 Molde de esferas de sílica

Seguindo o experimental descrito anteriormente, a partir das amostras de esferas de sílica obtidas, foram preparados os moldes empacotados. As amostras escolhidas foram a de menor tamanho, de maior tamanho e de tamanho intermediário, que seriam respectivamente as amostras S06, S04 e S08. Para facilitar o entendimento, a nomenclatura utilizada para essas amostras será modificada. Assim, S06, S04 e S08 passarão a ser S223, S808 e S402 respectivamente, indicando o diâmetro obtido para essas amostras. Assim foram preparados os moldes TP808, TP223 e TP402. A Figura 32 ilustra uma fotografia do TP223. As Figuras 33, 34 e 35 ilustram as micrografias eletrônicas de varredura dos moldes TP808, TP223 e TP402, respectivamente.

É sabido que as cargas na superfície das esferas de sílica preparadas através do método sol-gel são desiguais devido a grupos hidroxilas dissociativos presentes na sua superfície. Por meio da literatura sabe-se que é possível aumentar o potencial zeta e as cargas na superfície de esferas coloidais modificando sua superfície [130]. Para melhorar e aumentar essa carga na superfície das esferas, elas foram modificadas com peróxido de hidrogênio. Acredita-se que uniformizando a carga na superfície torna-se mais fácil o ordenamento das esferas, uma vantagem quando o objetivo é conseguir um arranjo empacotado de esferas. Observa-se nas três micrografias (Figura 33, 34 e 35), a formação de um molde empacotado, como foi esperado. Mesmo utilizando amostras com tamanhos e com faixa de distribuição de diâmetros variados, em todas essas amostras o molde empacotado foi obtido com sucesso. Nota-se também que as esferas possuem a tendência de se organizarem em um empacotamento hexagonal a pequenas distâncias. A longa distância, essa organização vai se perdendo.

Figura 32 - Fotografia do molde TP2223.

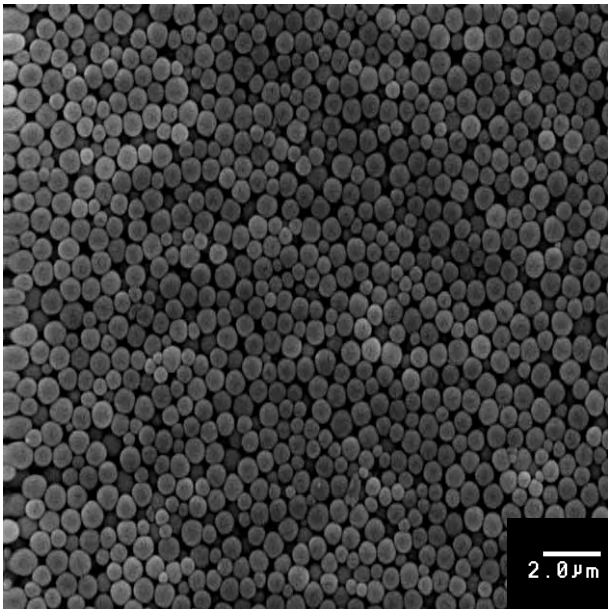


Figura 33 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra TP808.

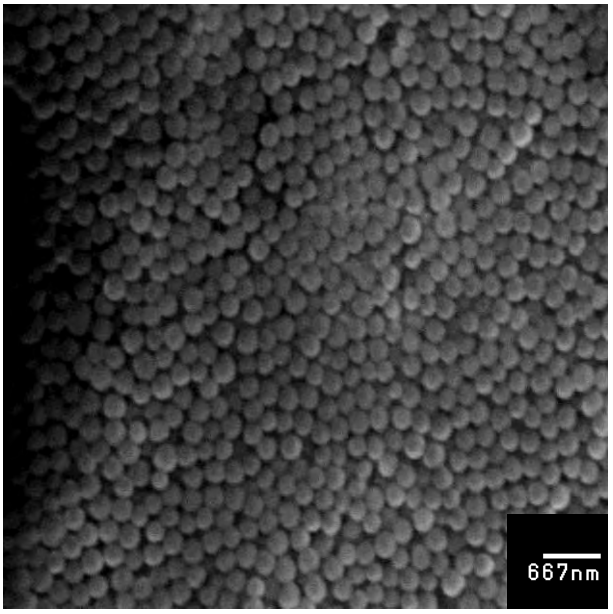


Figura 34 - Micrografia eletrônica de varredura da amostra TP223.

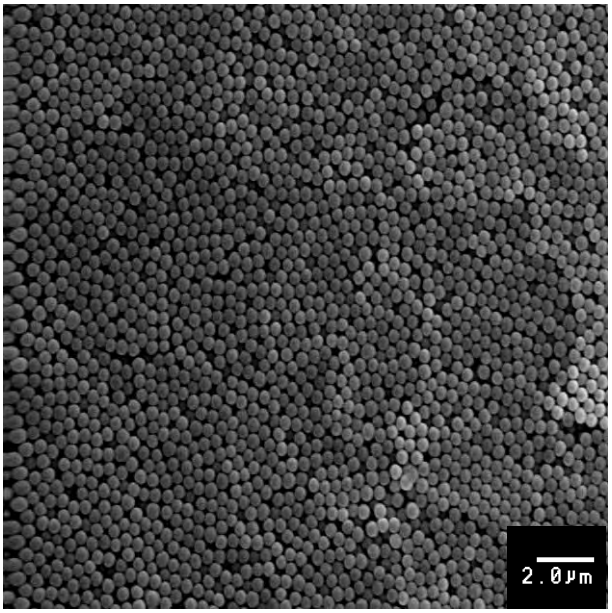


Figura 35 – Micrografia eletrônica de varredura da amostra TP402.

5.3 Precursor de HA

Com o molde de sílica preparado e caracterizado, passou-se para a síntese do gel de HA, que será usado como precursor. Análises de difratometria de raios X e espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas para o precursor antes do tratamento térmico, como descrito no experimental um pouco do gel precursor foi aquecido e precipitado e o pó do material foi utilizado nas análises. O difratograma de difração de raios X da amostra H01 é ilustrado na Figura 36.

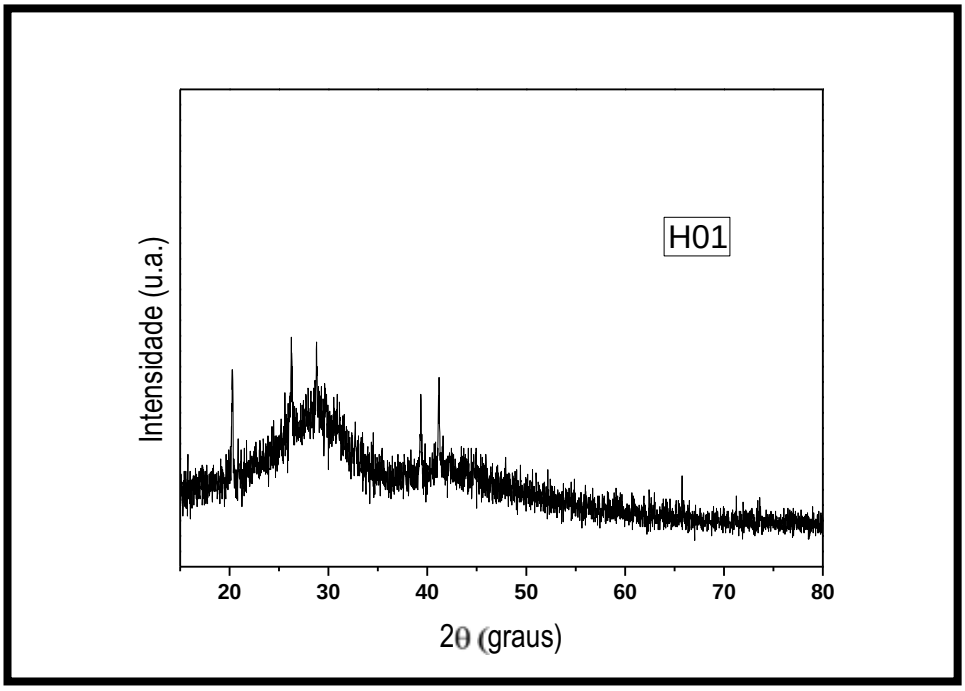


Figura 36 - Difratograma de raios X da amostra H01.

Como era esperado, o material não possui fase HA cristalina. Sendo possível atribuir os picos no difratograma a presença da fase de fosfato de cálcio hidratado ($Ca_2P_2O_7$. $2H_2O$). Para se obter a fase HA se faz necessário o tratamento térmico da amostra.

O espectro na região do infravermelho da amostra H01 está ilustrado na Figura 37. Em 576cm^{-1},encontra-se a banda característica da deformação angular do grupo PO_3 (O–P–O). Em 1043cm^{-1} e 1095cm^{-1}, encontram-se as bandas de deformação axial do grupo PO_3 (P–O) [131]. Na região entre 1500 e 1200cm^{-1}, observam-se bandas em 1355 e 1430cm^{-1}, as quais podem ser atribuídas a deformação axial do grupo NO_3, que pode estar presente devido a traços do precursor de cálcio, ao grupo CO_3 presente devido a adsorção de carbonato do ar

durante a síntese, ou mesmo a deformações angulares do C-H de cadeias carbônicas, devido a presença de traços de etanol na amostra que também pode se corroborada com uma pequena banda em aproximadamente 2850 cm^{-1} da deformação axial do C-H [128],[132]. Em 1642cm^{-1}, tem-se a banda de deformação angular do O-H [132]. A Tabela 9 resume todas as bandas de absorção encontradas para a amostra H01.

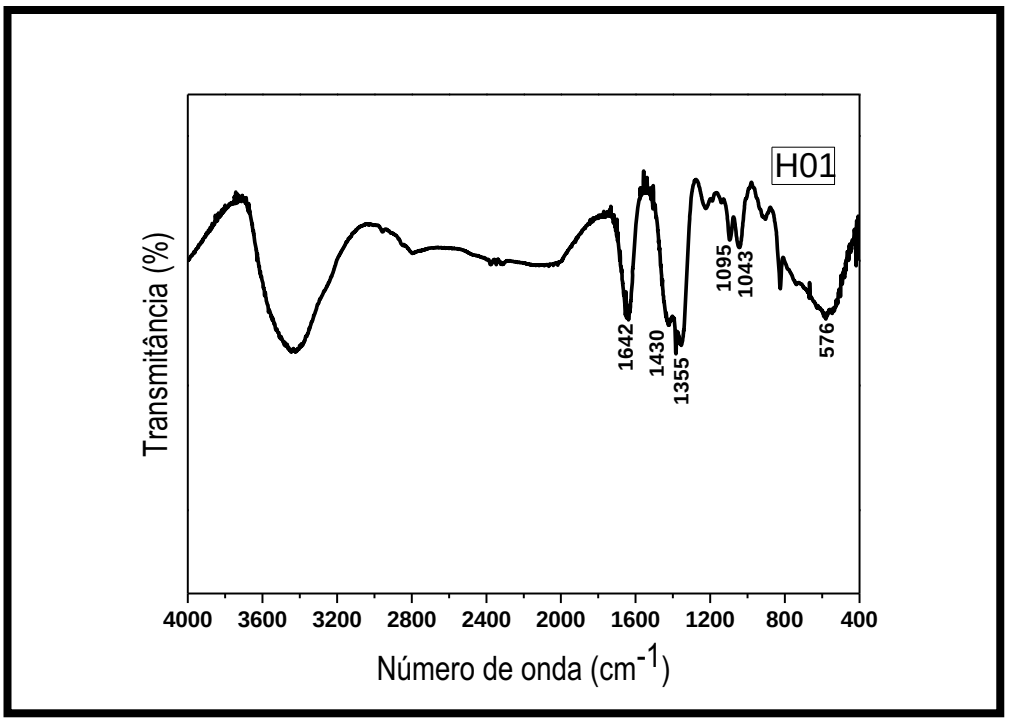


Figura 37 - Espectro na região do infravermelho da amostra H01.

Tabela 9 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra H01 antes do tratamento térmico.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuições de bandas
576	Deformação axial O–P–O do PO_3
1043 e 1095	Deformação angular P–O do PO_3
1355 e 1430	Deformação axial do grupo nitrato ou grupo carbonato ou deformação angulas C-H
1642	Deformação angular do O-H

É conhecido na literatura que a formação dos cristais de apatita pelo método sol-gel se dá a temperaturas muito menores que os métodos convencionais. Centenas de graus a menos são necessários em comparação a esses métodos que utilizam temperaturas acima de 1000ºC [56].

A fim de se estudar o comportamento térmico da amostra (precursor de HA), realizou-se uma análise térmica do material recém sintetizado. As Figuras 38 e 39 ilustram a curva TG e DTA da amostra H01, respectivamente. O grande pico endotérmico em aproximadamente 127ºC corresponde a duas perdas de massa, no total de 37% da amostra. Essa perda pode ser atribuída à água, componentes voláteis como etanol, água estrutural e outros tipos de resíduos [133]. O terceiro evento que acompanha uma perda de massa de 10% pode ser atribuído a decomposição do nitrato. Um último pico endotérmico a 540ºC, na qual ocorre a última perda de massa de 8% da amostra, pode ser atribuído a liberação de CO_2 [134]. Vários trabalhos têm relatado a obtenção da fase HA a baixas temperaturas. Brendel et al.[135] obtiveram a fase HA em temperaturas tão baixas quanto a 400ºC, usando nitrato de cálcio e fenildiclorofosfito como precursores. No entanto, a HA resultante tinha baixa pureza e cristalinidade. Liu. D. M. et. al.[134] conseguiram uma fase cristalina de apatita em temperaturas de 300-400ºC, utlizando trietilfosfito e nitrato de cálcio como precursores. Visto os relatos da literatura, observa-se um pequeno pico exotérmico na DTA a 394ºC que pode indicar a formação da uma fase cristalina de apatita. Após 600ºC não há mais nenhum evento de perda de massa e nem mudança na curva DTA da amostra. Por esse motivo, foi escolhida a temperatura de 700ºC para fazer o tratamento térmico.

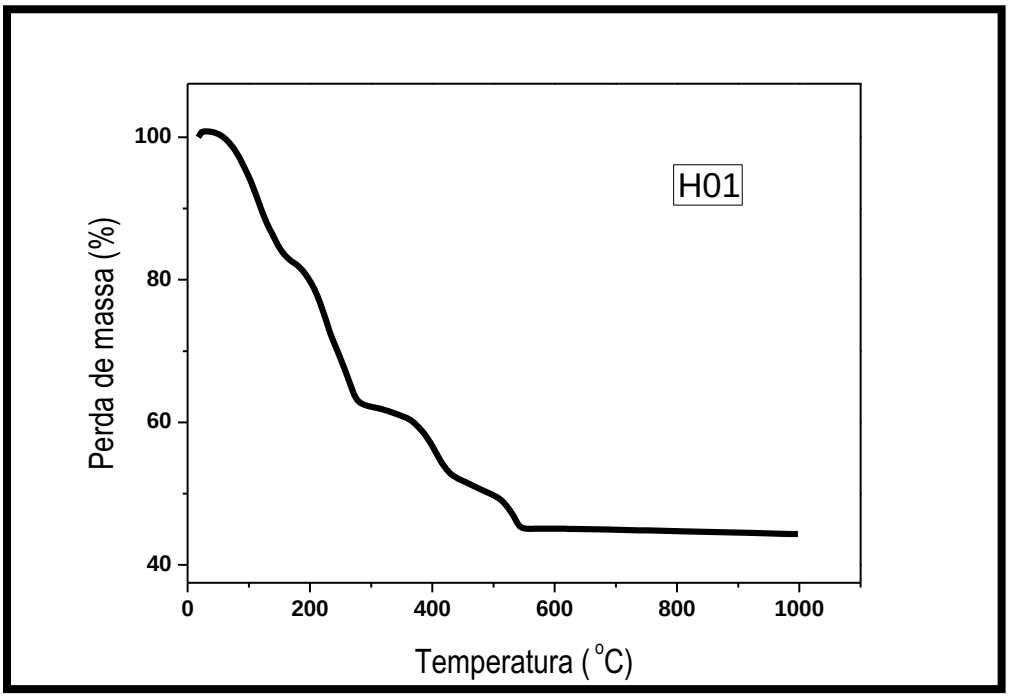


Figura 38 - Curva TG da amostra H01.

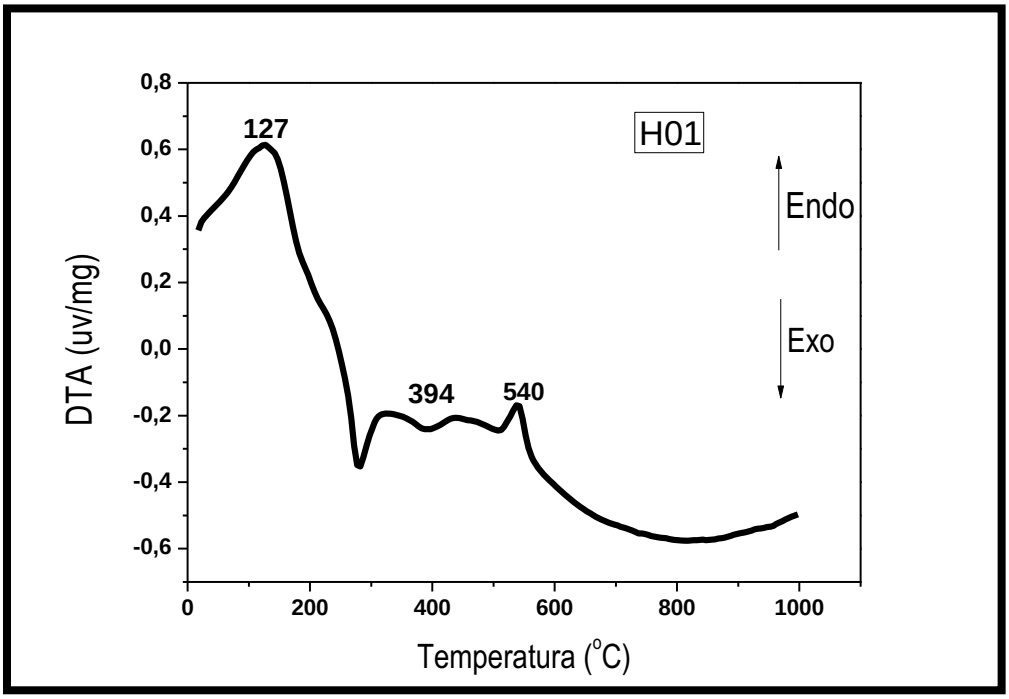


Figura 39 - Curva DTA da amostra H01.

Análises de difratometria de raios X, espectroscopia na região do infravermelho e MEV foram realizadas no gel precursor de HA após o tratamento térmico a 700ºC. A Figura 40 ilustra a comparação dos difratogramas de raios X da amostra representativa H01, sendo o padrão de HA e CaO obtidos no banco de dados de estrutura cristalina JCPDS-74-565 e JCPDS-82-1691. Observa-se que todos os picos demarcados característicos da fase HA estão presentes na amostra [131,132], indicando o sucesso na obtenção do cristal de HA. O pico em 37,5º 2θ é característico do óxido de cálcio.Liu et. al[134]. também descreveram a presença de óxido da cálcio na fase HA em seu trabalho. A presença dessa fase foi atribuída a espécies de fósforo que não reagiram, deixando uma mistura de apatita e CaO a elevadas temperaturas. Beganskiene et. al. [133] além da presença de óxido de cálcio, observaram a fase de hidróxido de cálcio presente na HA preparada com nitrato de cálcio e trimetilfosfato. A razão para presença dessas duas fases foi atruibuída a falta de estequiometria entre os precursores de partida, devido à baixa taxa de hidrólise do trimetilfosfato.

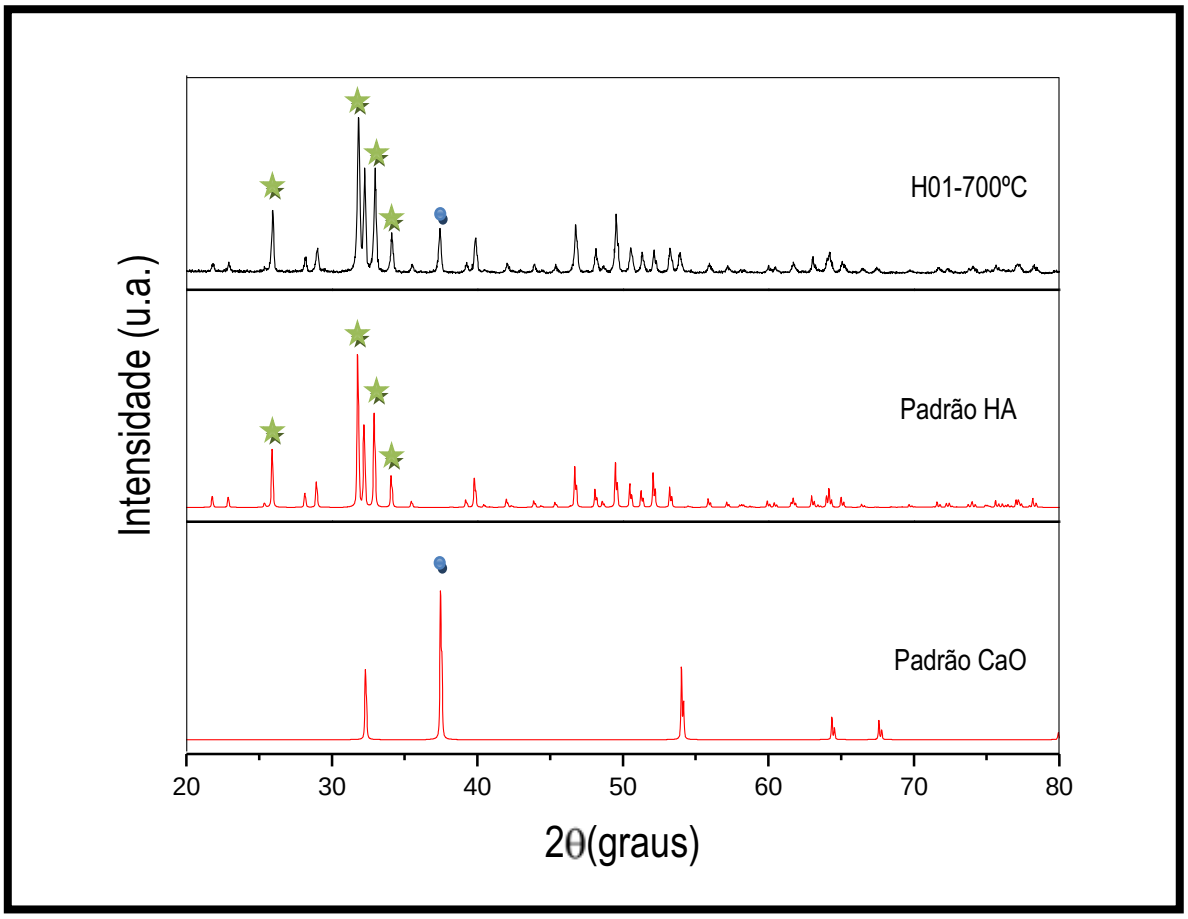


Figura 40 - Difratograma de raios X da amostra H01 e o padrão de difração de raios X da fase HA e CaO.

O espectro na região do infravermelho da amostra representativa H01 está ilustrado na Figura 41. A banda em 3650cm^{-1} é proveniente a um hidróxido presente na amostra, acredita-se que possa ser hidróxido de cálcio visto relatos na literatura[133] . Para o óxido de cálcio, fase encontrada no difratograma de raios X, não foi possível detectar suas bandas no infravermelho, já que suas vibrações ocorrem a números de onda menores que 400cm^{-1} [133]. Bandas características do OH estrutural da HA estão presentes em 3570cm^{-1} (deformação axial), e em 630cm^{-1} (deformação angular), indicando o sucesso na formação da fase HA. A banda larga em 3450cm^{-1} é proveniente de H_2O absorvida na amostra. As bandas em 1450, 1419 e 876cm^{-1} são referentes a íons carbonatos [136]. Os íons carbonatos normalmente estão presentes na hidroxiapatita devido a substituição de grupos fosfatos (PO_3) por espécies carbonatos (CO_3) [134], entretanto neste caso acredita-se que os íons carbonatos estão apenas adsorvidos na amostra, devido à exposição ao ar durante a síntese. Em 1093, 1040 e 961cm^{-1}, observam-se as bandas de deformação axial do fosfato (PO_3, P-O). Enquanto que, em 604, 566 e 475cm^{-1}, observam-se as

bandas de deformação angular do fosfato (PO_3, O-P-O) [9,131]. A Tabela 10 resume todas as bandas atribuídas para a amostra H01 após o tratamento a 700ºC.

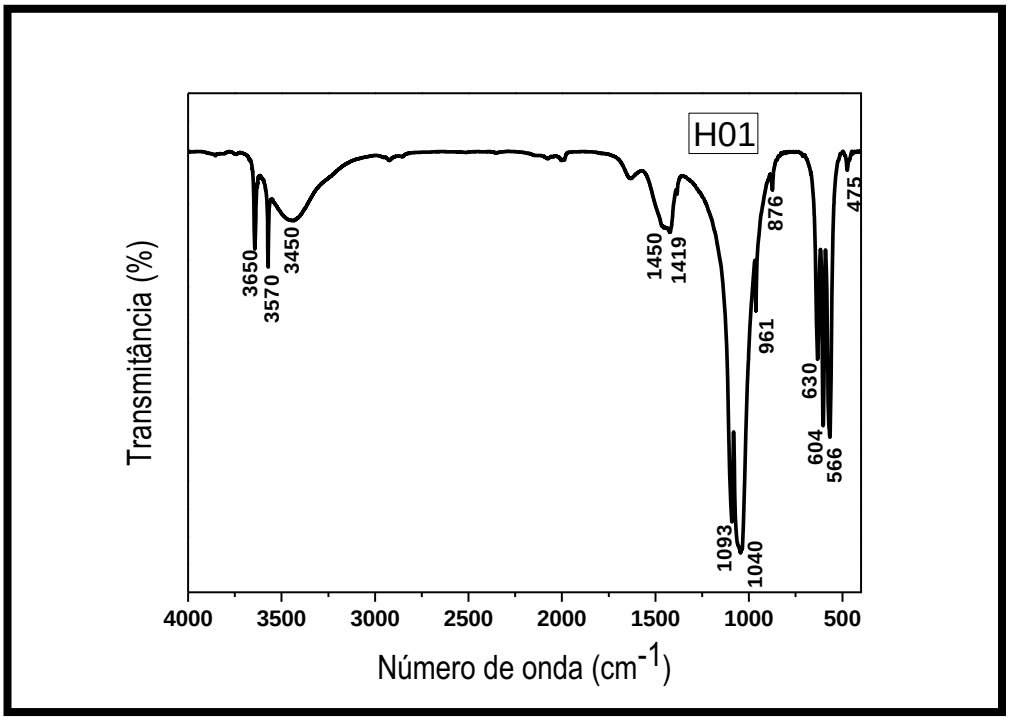


Figura 41 - Espectro na região do infravermelho da amostra H01 após o tratamento térmico.

Tabela 10 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra H01 após o tratamento térmico.

Número de onda (cm^{-1})	**Atribuições de bandas**
475, 566 e 604	Deformação angular O–P–O do PO_3
630	Deformação angular do OH estrutural da HA
876, 1419 e 1450	C-O de carbonatos
961, 1040 e1093	Deformação axial P–O do PO_3
3450	Deformação axial O-H da H_2O (absorvida)
3570	Deformação angular do OH estrutural da HA
3650	Deformação axial O-H de hidróxidos

A Figura 42 ilustra a micrografia eletrônica de varredura obtida do pó de HA (700ºC). É possível observar um aglomerado de partículas com tamanhos de cristalitos aproximados na ordem de 100nm.

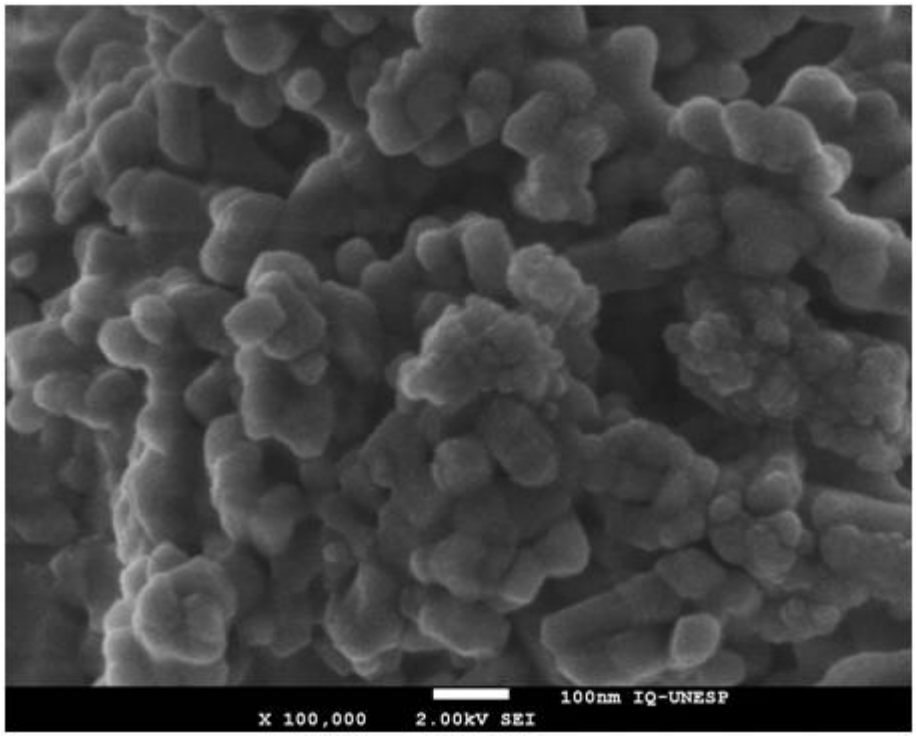


Figura 42 - Microscopia eletrônica de varredura do pó H01 após o tratamento térmico.

De acordo com Beganskiene et. al.[133], para diminuir a presença das fases CaO e $Ca(OH)_2$ na HA, é necessário um maior período de envelhecimento durante a síntese. Usando o trimetilfosfato como precursor, é necessário um tempo de envelhecimento maior que 72h. Assim uma nova síntese foi realizada aumentando o tempo de envelhecimento para 72h à temperatura ambiente, com mais 24h a 80ºC. O novo gel obtido foi tratado térmicamente a temperaturas diferentes a fim de se observar a formação da fase HA. A Figura 43 ilustra os difratogramas de raios X da amostra H02 em 400, 500, 600 e 700ºC, os padrões de HA e β-TCP, obtidos no banco de dados de estrutura cristalina JCPDS-74-565 e JCPDS-70-2065 respectivamente.

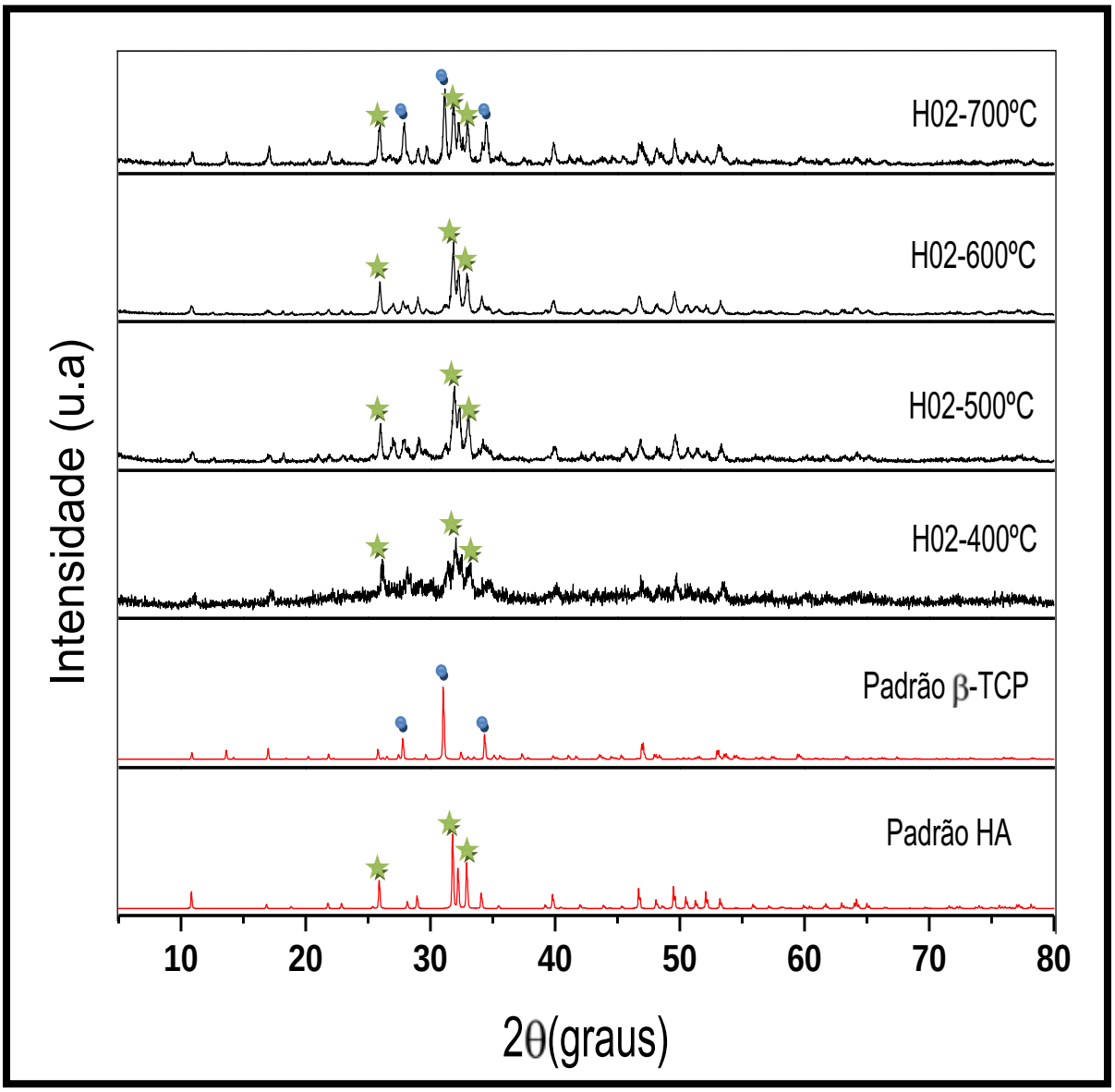


Figura 43 - Difratograma de raios X da amostra H02 após o tratamento térmico (400, 500, 600 e 700ºC) e o padrão de difração de raios X da fase HA e β-TCP.

Observando os difratogramas, é interessante notar como a cristalinidade da amostra H02 vai aumentando conforme aumenta a temperatura do tratamento térmico. No difratograma da amostra H02-400ºC, mesmo com características amorfas, já é possível observar a presença de picos característicos da fase HA. A 500ºC, o material se encontra muito mais cristalino. Pouca diferença é notada em relação ao difratograma da amostra a 600ºC, onde é possível observar picos referentes a fase cristalina da HA. A 700ºC, observa-se que além da presença da fase HA, há picos característicos da fase β-TCP na amostra. Para a aplicação biológica, a presença das duas fases é muito interessante visto a possibilidade de se

controlar as propriedades de degradação do material no meio fisiológico [45]. Em todos os difratogramas de todas as temperaturas de calcinação da amostra H02, também não foram observados picos característicos da fase CaO (37,5º 2θ), e nem da fase $Ca(OH)_2$ (17,8º e 34º 2θ). Pode-se concluir que, de fato, aumentando o tempo de envelhecimento da amostra, é possível dimuinuir, ou no caso, eliminar a presença dessas duas fases, com o aumento do tempo houve uma hidrólise mais completa do TMF, não gerando assim diferença de estequiometria entre os íons cálcio e fosfato durante a síntese, e consequentemente sem sobrar íons cálcio não há a formação das outras fases.

Visto a característica bifásica da amostra H02-700ºC, foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura (Figura 44) para se observar a morfologia da amostra. Observa-se na micrografia blocos aglomerados com tamanhos variados.

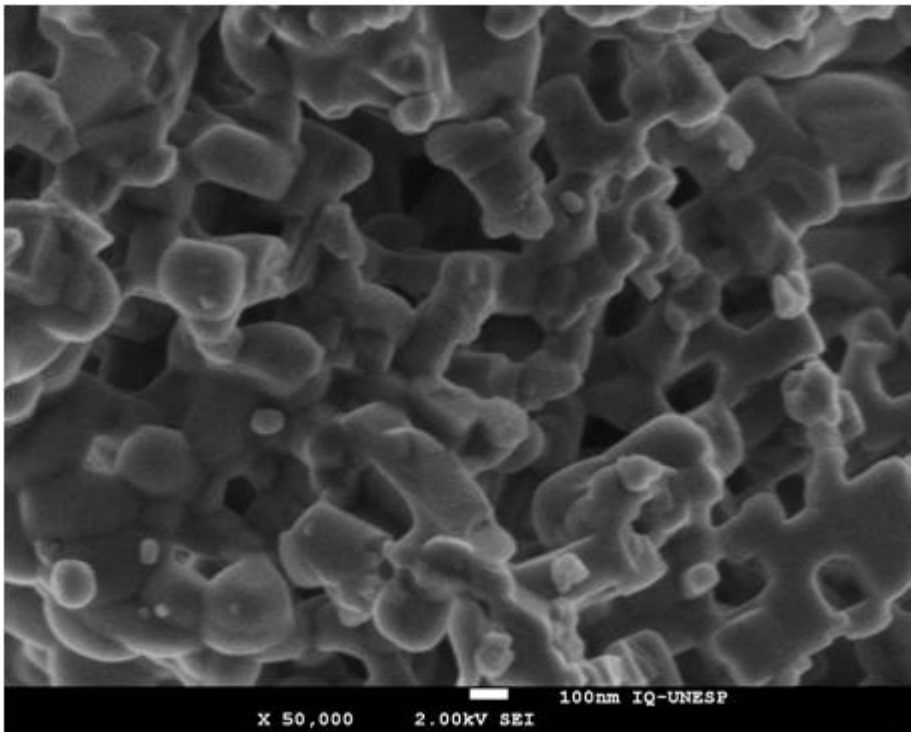


Figura 44 - Microscopia eletrônica de varredura do pó H02 após o tratamento térmico a 700ºC.

5.4 HA porosa

Caracterizado o precursor de HA e o molde de sílica, os dois materiais foram utilizados para sintetizar a HA porosa, como foi detalhado anteriormente na parte experimental. Após a remoção da sílica, foi realizada microscopia eletrônica de varredura no material obtido. A Figura 45 ilustra micrografias eletrônicas de varredura da amostra H1TP223, obtida através do molde TP223.

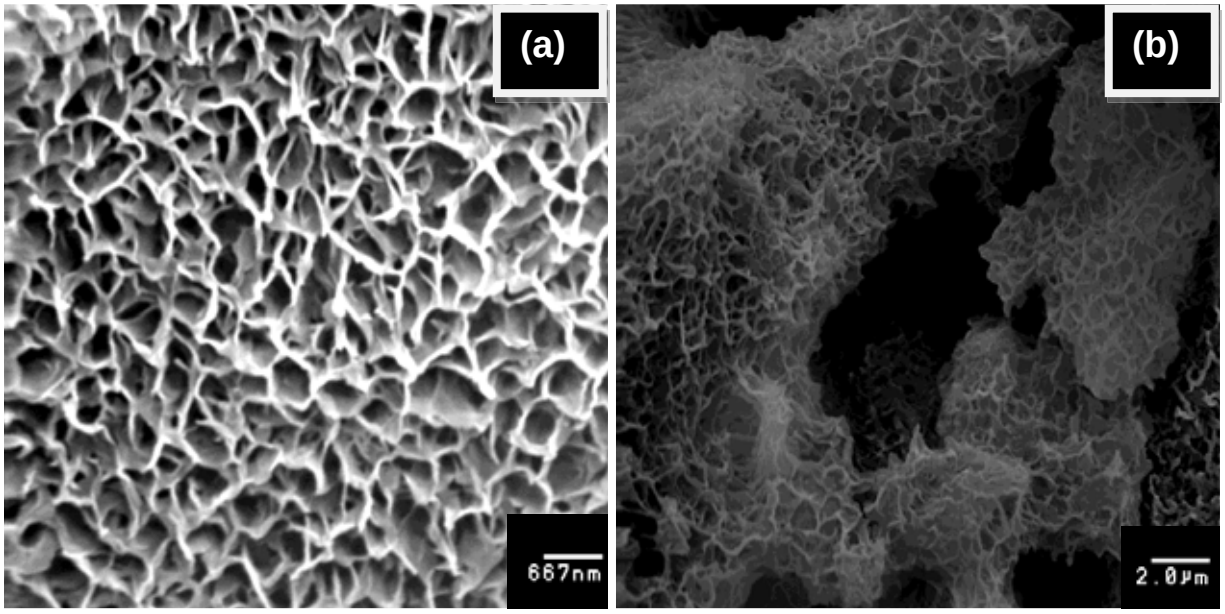


Figura 45 - (a) e (b) Micrografias eletrônicas de varredura da amostra H1TP223.

É possível observar os poros formados após a remoção do molde. Com este material, já era possível inserir as nanopartículas magnéticas. Entretanto, esperava-se que os poros estivessem de uma maneira mais ordenada, visto a própria ordenação do molde de sílica utilizado. Por essa razão, novos estudos foram realizados a fim de se obter um material mais organizado.

De acordo com Zakhidov et. al. [138], em seu trabalho, o qual usou um molde de esferas de sílica na forma de opala para sintetizar estruturas de carbono com periodicidade tridimensional a ondas opticas, é necessário sinterizar o molde de esferas para que se crie interconecções interesferas, que também permitem que as esferas sejam quimicamente removidas depois da infiltração. Entretanto, não se pode sinterizar muito o molde, para não fechar totalmente os espaços entre as esferas, proibindo a infiltração. Pode-se confirmar a ausência de espaços fechados, observando a transformação de uma aparência branca opaca inicial, para uma transparente quando o molde for submerso em um líquido com indíce de refração

próximo aos das esferas de sílica (1,42). Este índíce de refração relativamente alto é consistente com as esferas, sendo substancialmente libertadas. Sendo assim, os moldes (TP223 e TP402) foram sinterizados a 500ºC e infiltrados no gel transparente precursor de HA. Durante o procedimento, foi possível observar a mudança de cor do molde de um branco opaco para transparente, indicando que a sinterização não fechou os espaços entre as esferas. Novamente, após a remoção da sílica, foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura nas amostras de HA obtidas. A Figura 46 ilustra as micrografias obtidas para a amostra H1TP402.

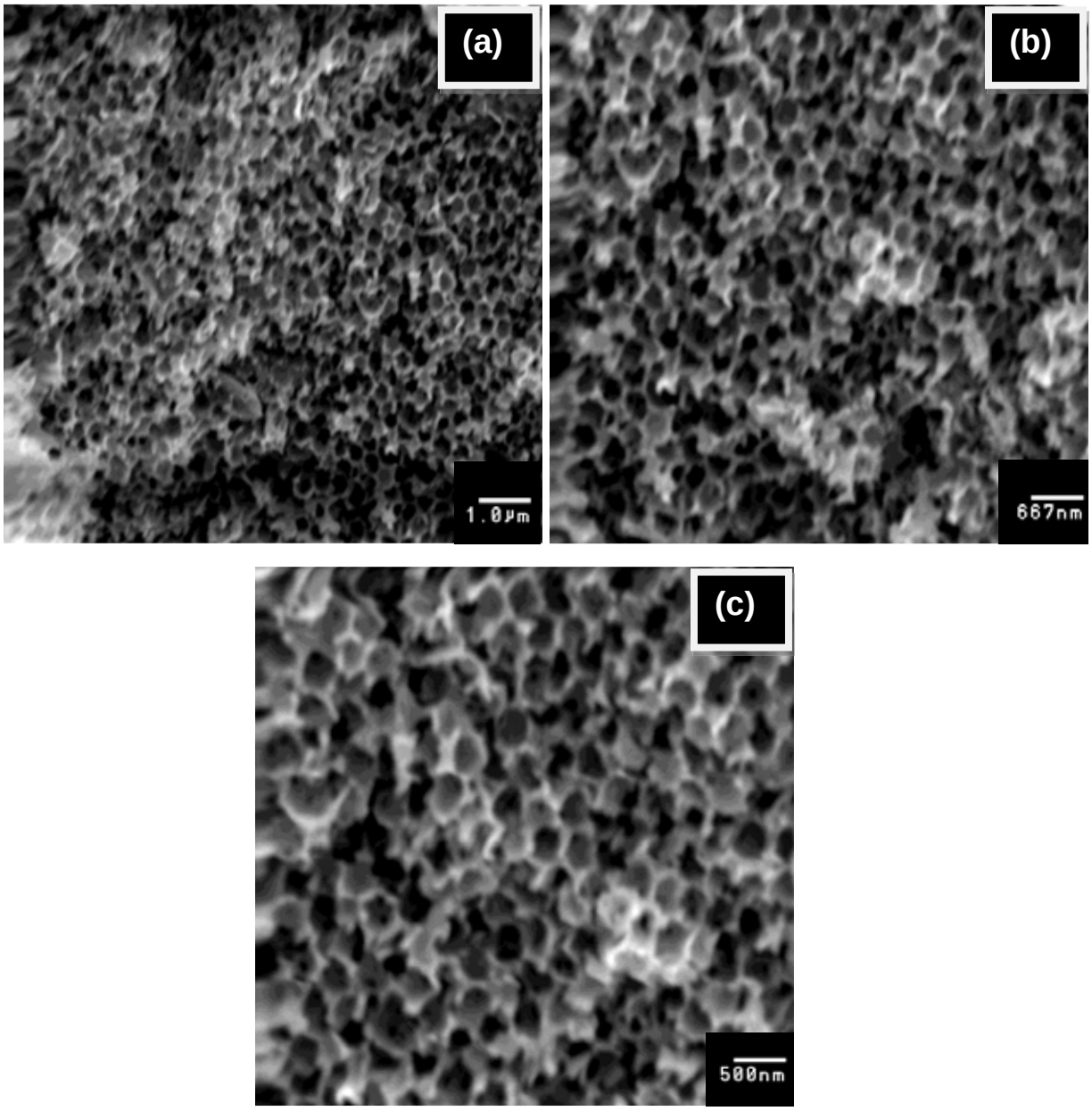


Figura 46 - (a), (b) e (c) Micrografias eletrônicas de varredura da amostra H1TP402, preparada com o molde sinterizado.

Nas micrografias, observam-se poros muito mais ordenados, com médias de tamanhos na ordem de 350nm. Este fato era esperado pois com o aquecimento do molde a água adsorvida na superfície da sílica é liberada e há a condensação dos grupos silanóis presentes na superfície em grupos siloxanos, o que leva a uma maior aproximação (adesão) das esferas. Observou-se também que após a sinterização houve o aumento na resistência mecânica do molde. Para a amostra H1TP223 (Figura 47), a média de tamanhos dos poros obtida foi de 170nm. A partir dos dois moldes, foi possível preparar HA com poros de tamanhos aproximados aos das esferas, tornando esse método versátil na preparação de materiais porosos, visto a possibilidade de se controlar o tamanho desejado dos poros.

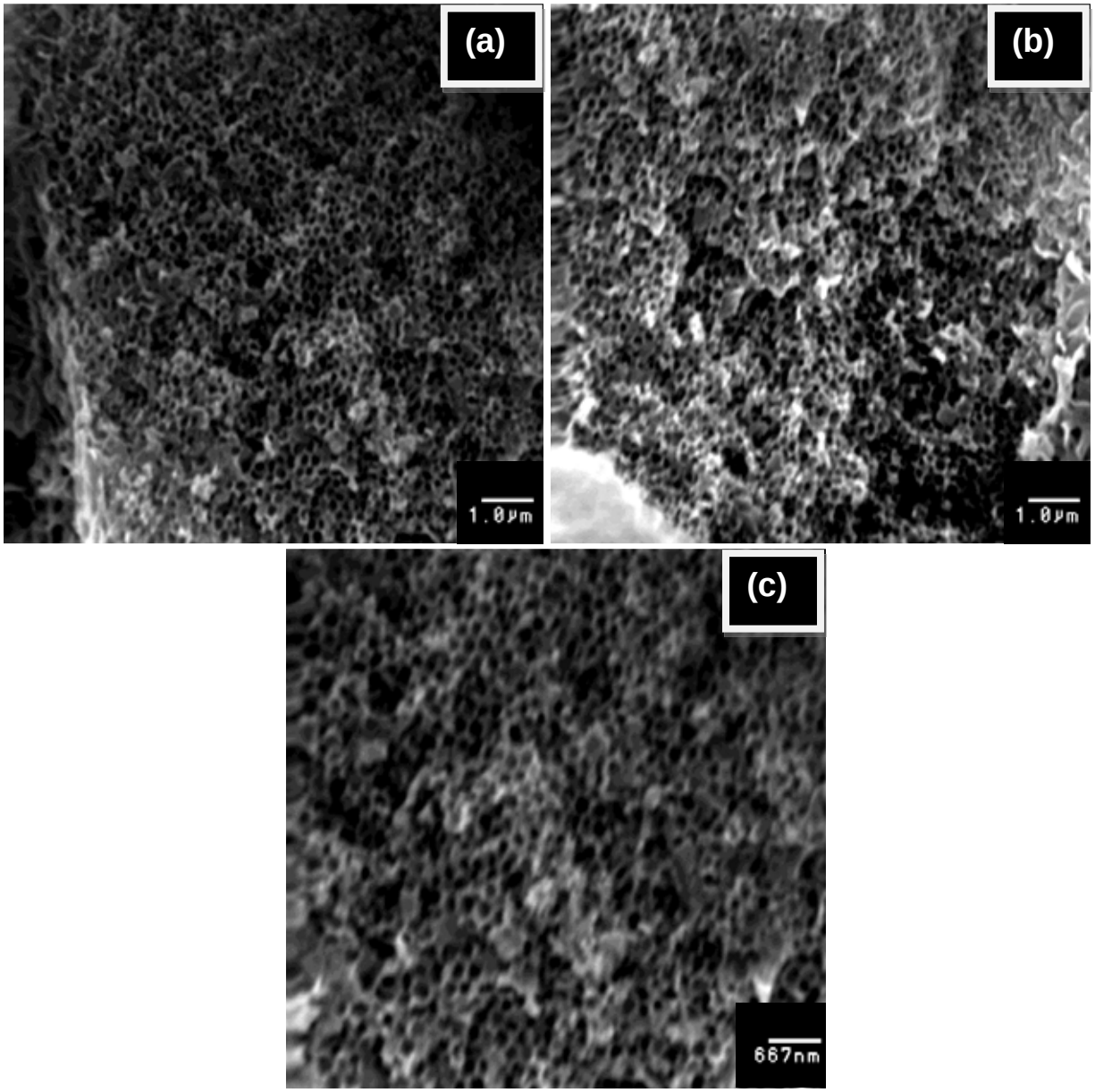


Figura 47 - (a), (b) e (c) Micrografias eletrônicas de varredura da amostra H1TP223, preparada com o molde sinterizado.

5.5 Nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas com APTS

O estudo das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS foi otimizado anteriormente durante a iniciação científica. A amostra com o melhor resultado obtido foi sintetizada para este trabalho. Para a caracterização das nanopartículas, foram realizadas análises de difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, e microscopia eletrônica de transmissão.

A magnetita (Fe_3O_4) é um óxido de ferro sensível ao oxigênio, e na presença de ar pode oxidar a $Fe(OH)_3$,ou para a fase maghemita (Fe_2O_3). Por outro lado, a magnetita é transformada em maghemita (γ–Fe_2O_3) na presença de H^+. Portanto, para evitar reações secundárias, é necessário.um controle cuidadoso do valor de pH da mistura da reação durante a precipitação [105].

A Figura 48 ilustra a comparação dos difratogramas de raios X da amostra representativa M01, com os padrões de difração de raios X da magnetita e da maghemita obtidos no banco de dados de estrutura cristalina, padrão JCPDS 88-315 e padrão JCPDS 39-1346, respectivamente. Apenas com difração de raios X não é possível diferenciar a fase magnetita da fase maghemita, visto a semelhança da estrutura cristalina dessas duas fases, os picos principais dos dois óxidos de ferro se encontram em regiões semelhantes. Sendo assim para diferenciar as fases se faz necessária uma análise de espectroscopia Mössbauer, a qual revela informações sobre os estados de oxidação do ferro. No projeto do Dr. Rodrigo F. C. Marques, durante seu Pós-doc no Instituto de Química (Unesp - Araraquara), por meio de análise de espectroscopia Mössbauer foi comprovada a obtenção de magnetita através da mesma síntese de co-precipitação. Pode-se observar que os picos de difração de raios X da amostra indicam a formação da fase magnetita. Durante a síntese, também foi observada a obtenção de nanopartículas pretas, outro indicativo da formação de magnetita, já que a cor da maghemita é marrom [94]. Para calcular o tamanho médio de cristalito obteve-se a largura meia altura (FWHM) do pico mais intenso no difratograma da magnetita ((311) em 35,55º 2θ.) sendo esta igual a 2,70. Usando a equação de Scherrer[139], chegou-se a um diâmetro de cristalito igual a 3,10nm para as nanopartículas de magnetita. Na fotografia da amostra M01 (Figura 49), é possível observar o pó formado por nanopartículas de magnetita funcionalizadas sob a presença de um campo magnético externo.

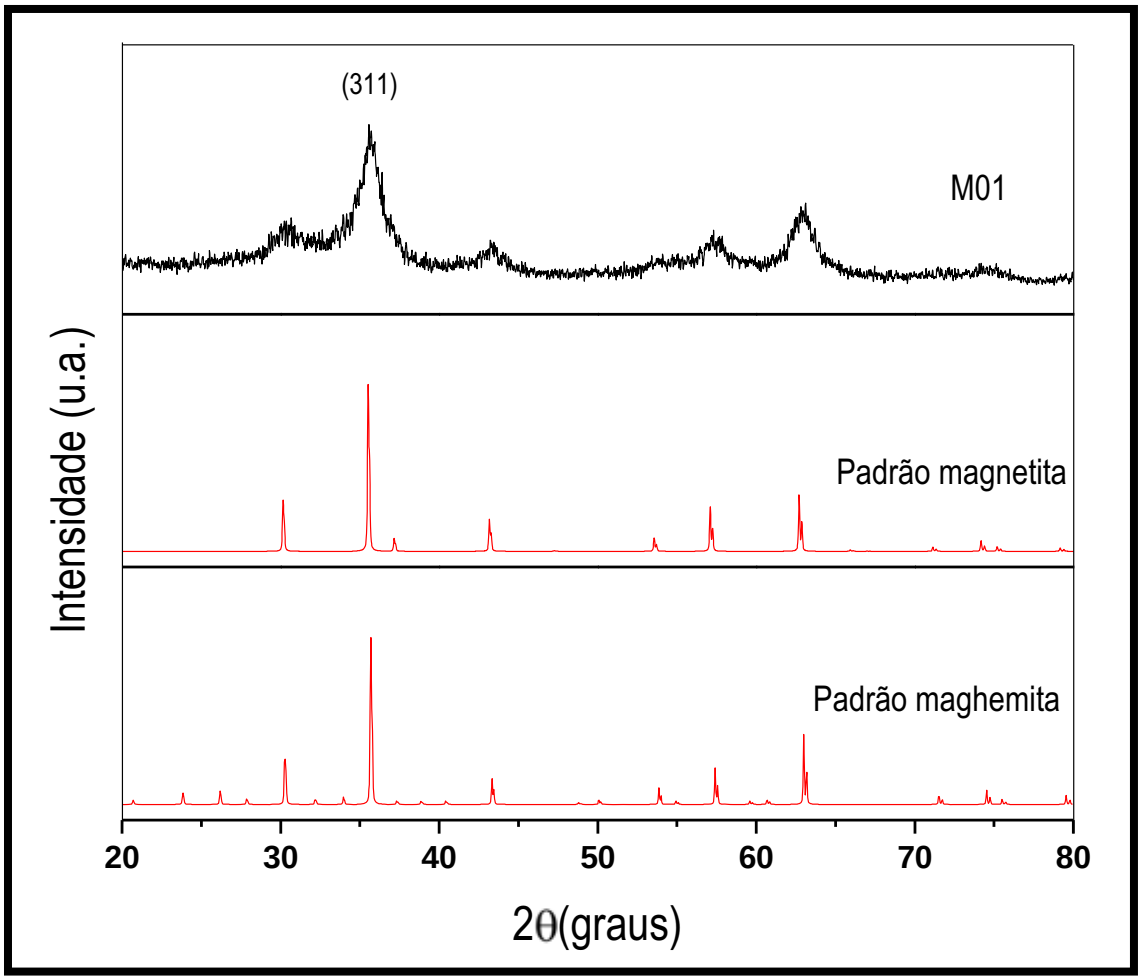


Figura 48 - Difratograma de raios X da amostra M01 e os padrões de difração de raios X da fase magnetita e maghemita.

Figura 49 - Fotografia das nanopartículas de magnetita funcionalizadas com APTS, sob a ação de um campo magnético externo.

A Figura 50 ilustra o espectro de absorção na região do infravermelho para a amostra M01. As bandas características de absorção Fe-O da magnetita se encontram entre 570 e 375cm^{-1}, conforme Waldron[140]. Contudo, o efeito da diminuição do tamanho das nanopartículas quebra um número muito grande de ligações na superfície dos átomos, resultando num rearranjo desordenado de elétrons na superfície da partícula. Como resultado, a força de ligação da superfície aumenta quando o tamanho da magnetita (Fe_3O_4) é reduzido a dimensões nanométricas. Logo, as bandas de absorção do infravermelho são deslocadas para valores maiores de número de onda. Dessa forma, as bandas que deveriam estar entre 570 e 375cm^{-1}, estão entre 600 e 440cm^{-1}. No espectro, é possível localizar essas bandas em 609 e 440cm^{-1}[115,141].

Caracterizando o alcoxissilano (APTS) utilizado para funcionalizar a superfície das nanopartículas, observam-se bandas características da deformação axial do Si-O do grupo Si-OH em 970cm^{-1}, deformação axial do Si-O-Si dos siloxanos em 1042cm^{-1}, e a deformação axial do OH do grupo Si-OH em 3414cm^{-1}. Para a amina R-NH_2, observa-se no espectro de absorção uma banda em 1618cm^{-1} da deformação angular do N-H [128,129]. Todas essas bandas comprovam que a metodologia utilizada neste trabalho permitiu a funcionalização da superfície das nanopartículas magnéticas com a presença de amina em sua superfície.

No espectro observa-se ainda uma banda de deformação angular do C-H em 1341cm^{-1}, e de deformação axial do C-H em 2927cm^{-1}. As bandas de C-H são provenientes das cadeias carbônicas presente no APTS [128]. A Tabela 11 resume as atribuições dadas ao espectro de absorção da amostra M01.

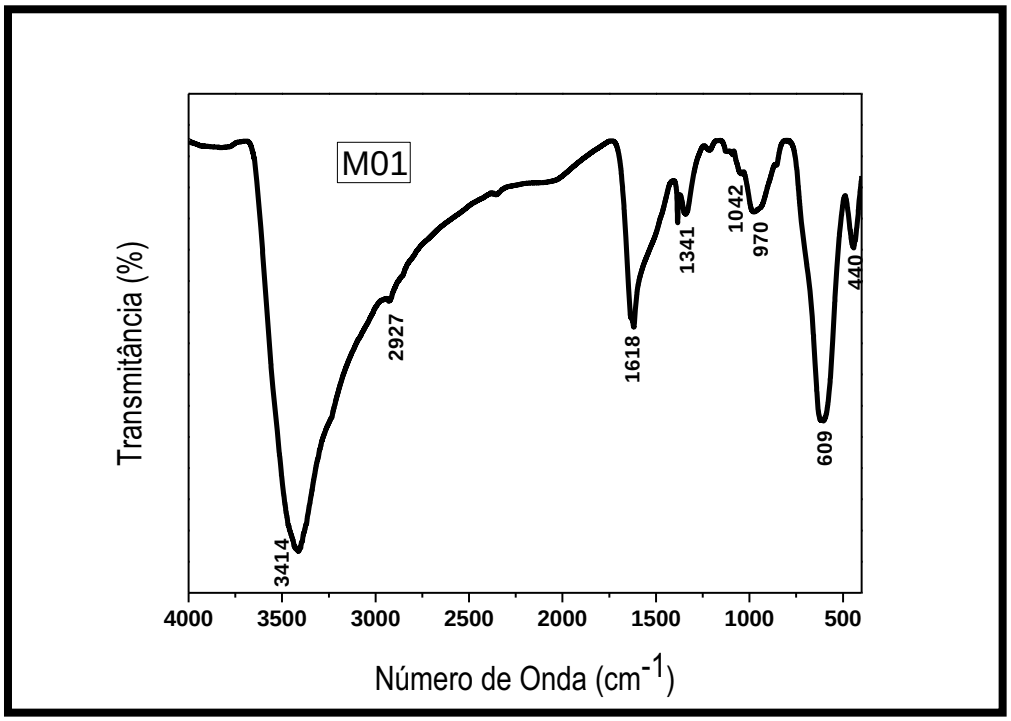


Figura 50 - Espectro na região do infravermelho da amostra M01.

Tabela 11 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho da amostra M01.

Número de onda (cm^{-1})	**Atribuições de bandas**
440 e 609	Fe-O da magnetita
970	Deformação axial Si-O do grupo Si-OH
1042	Deformação axial Si-O-Si dos siloxanos
1341	Deformação angular C-H
1618	Deformação angular N-H
2927	Deformação axial C-H
3414	Deformação axial OH do grupo Si-OH

Uma última análise de microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para a amostra M01. Suas micrografias estão ilustradas na Figura 51 (a) e (b). Apesar da baixa resolução das micrografias, é possível observar a formação de nanopartículas esféricas distribuídas em aglomerados disformes, com tamanhos estimados em 5nm, muito próximos do tamanho calculado anteriormente pela equação de Scherrer[139]. As nanopartículas encontram-se abaixo do diâmetro crítico para a magnetita, indicando a formação de nanopartículas superparamagnéticas.

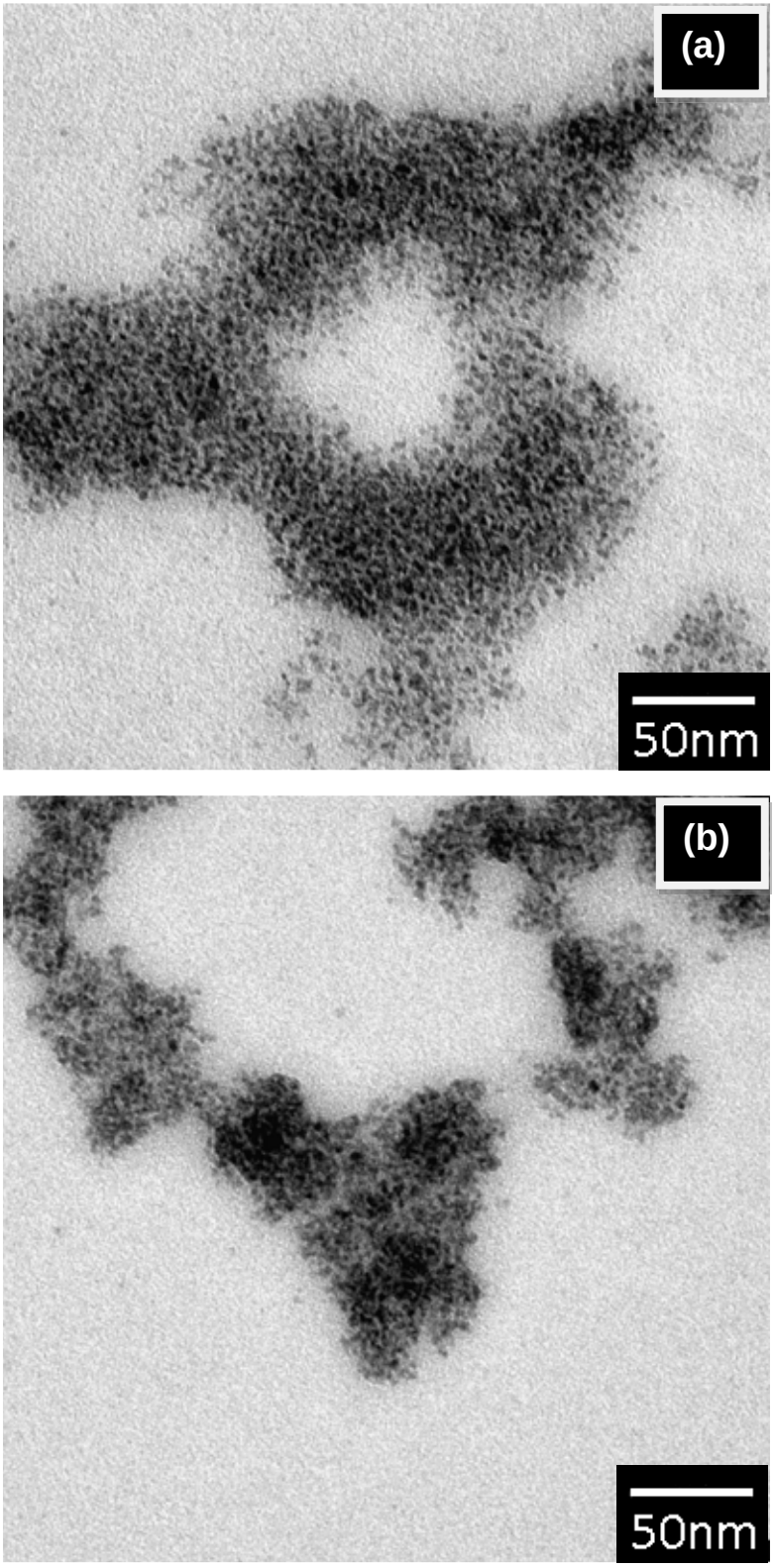


Figura 51 - (a) e (b) Micrografias eletrônicas de transmissão da amostra M01.

5.6 HA porosa com nanopartículas magnéticas

Nesta última etapa, depois de preparada a HA porosa e as nanopartículas de magnetita funcionalizadas, passou-se para a preparação do biocompósito propriamente dito. A Figura 52 ilustra fotografias da HA porosa antes e depois de inserir as nanopartículas. É possível observar que a HA passa de uma cor branca para uma cor marrom, da esquerda para a direita, indicando a presença das nanopartículas no material. A amostra sem nanopartículas é a H1TP402, e a com nanopartículas é a Np-H1TP402.

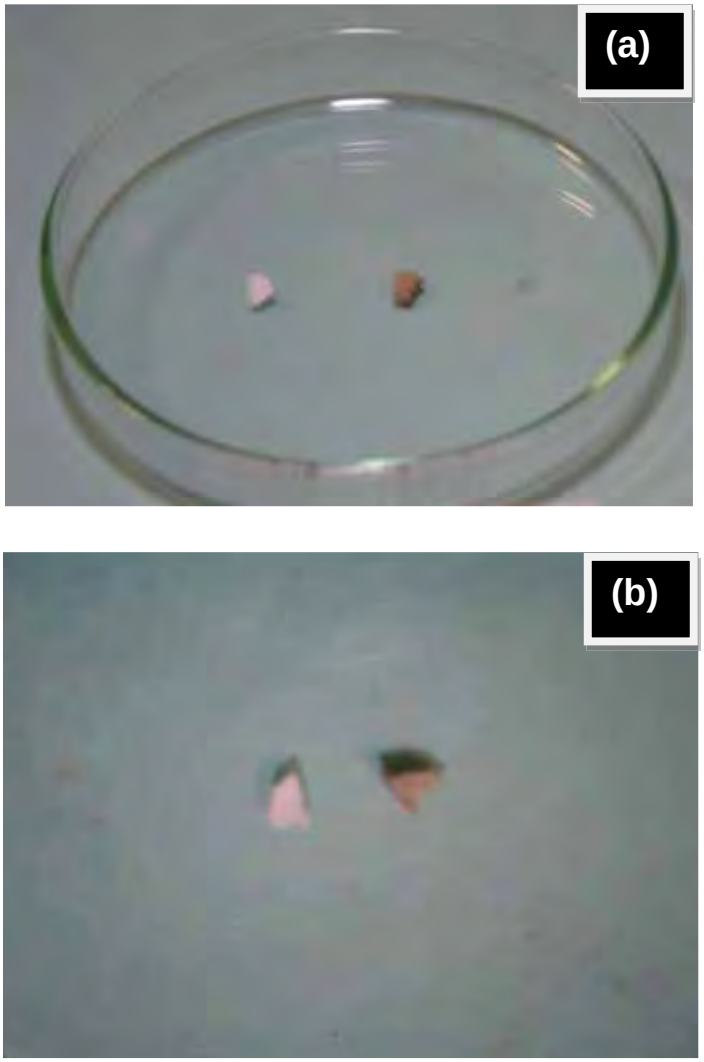


Figura 52 - (a) e (b) HA porosa antese depois de inserir as nanopartículas de magnetita.

A fim de se comprovar a presença das nanopartículas de magnetita na HA, realizou-se análise de microscopia eletrônica de varredura acoplada a um EDX. A Figura 53 ilustra a micrografia eletrônica (a) e o gráfico de EDX (b) da amostra Np-H1TP223.

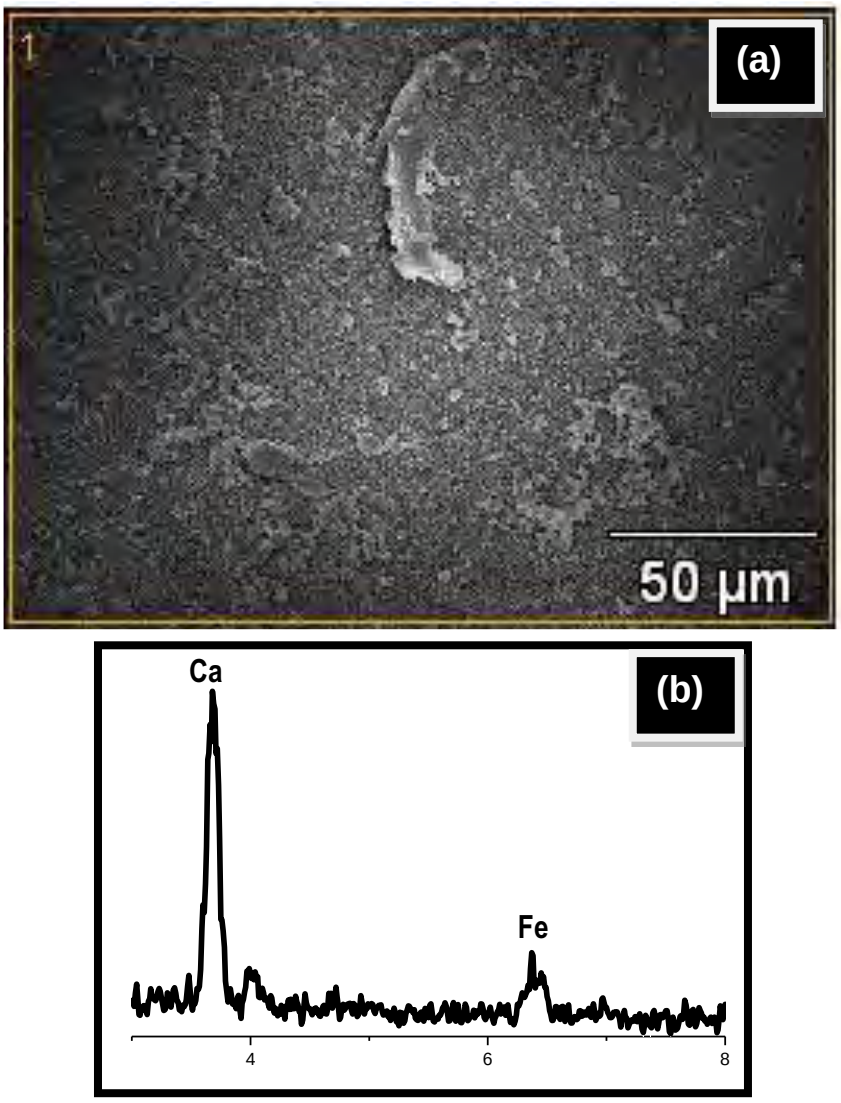


Figura 53 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) gráfico de EDX da amostra Np-H1TP223.

Por meio do EDX, foi possível confirmar a presença de ferro na amostra, ou seja, a presença das nanopartículas. A mesma análise foi realizada para a amostra Np-H1TP402 (Figura 54), a qual também se obteve o mesmo resultado. Apesar da presença de ferro nas duas amostras, a quantidade de ferro observada por meio do gráfico de EDX foi muito pequena em relação ao esperado. Para a preparação das duas amostras usou-se uma proporção de 1:1 (nanopartículas/HA), visto esta quantidade de nanopartículas utilizadas, esperava-se um sinal muito mais intenso no

gráfico de EDX. Acredita-se que uma explicação para este fato, é a possibilidade das nanopartículas de magnetita se encontrarem aglomeradas em uma espécie de camada formada pelo APTS, dessa maneira as nanopartículas não conseguem penetrar e se alojar nos poros da HA, ficando somente sobre a superfície. Por isso perde-se a proporção original, sendo que boa parte das nanopartículas não se adere a HA porosa.

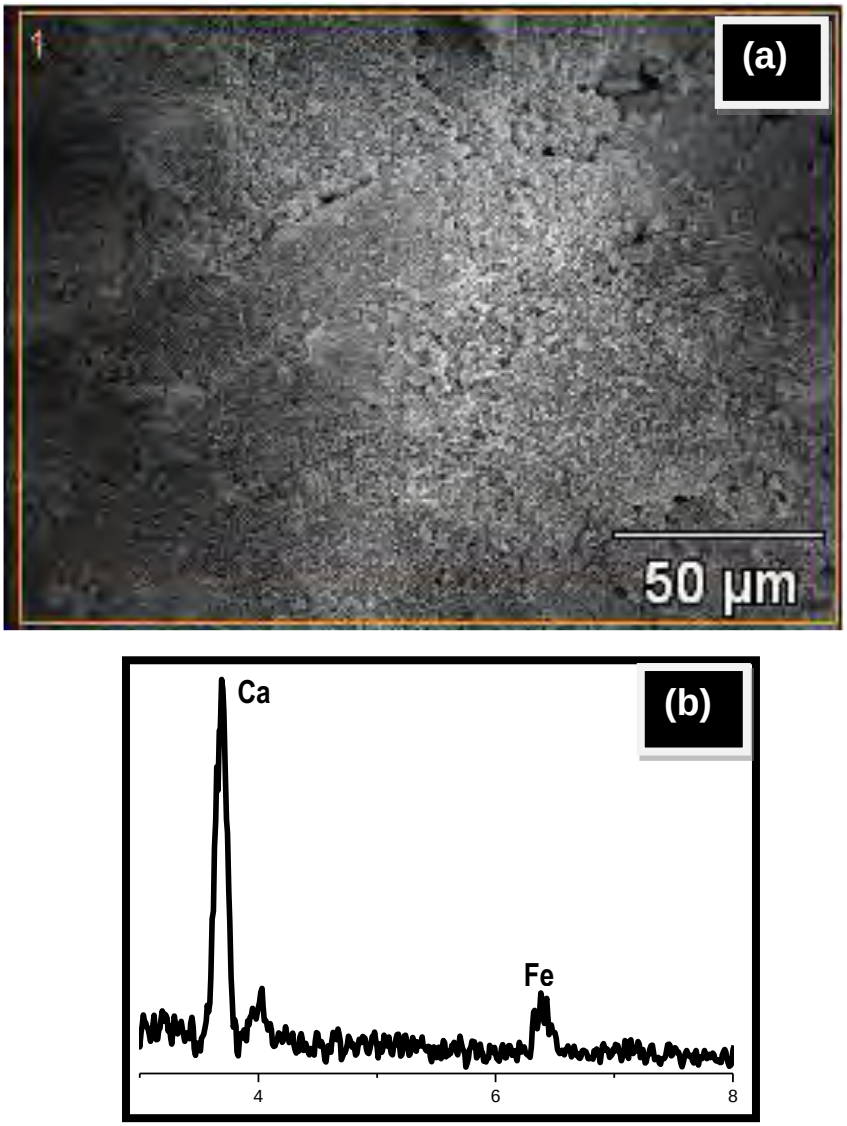


Figura 54 - (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) gráfico de EDX da amostra Np-H1TP402.

O comportamento magnético da amostra Np-H1TP223 foi estudado por meio de uma curva de magnetização em função de um campo magnético externo aplicado (Figura 55). É possível observar que a curva obtida a temperatura ambiente não apresenta histerese, bem como magnetização remanescente e campo coercitivo,

indicando o comportamento superparamagnético da amostra. A magnetização de saturação da magnetita bulk é de 92 emu/g, entretanto é conhecido na literatura que a magnetização de saturação de nanopartículas de ferrita diminui quando o tamanho da partícula diminui [122]. Yamaura et. al. [141] obtiveram uma magnetização de saturação de 62 emu/g para nanopartículas de magnetita funcionalizadas com (3-aminopropriltrietoxissilano), já Mohapatra et. al [122] obtiveram uma magnetização de saturação de 41 emu/g para o mesmo material. Para a amostra Np-H1TP223 a magnetização de saturação obtida foi muito próxima de zero, indicando que apesar da presença das nanopartículas de magnetita funcionalizadas na HA, a quantidade de partículas não foi satisfatória. Esse fato corrobora com o resultado obtido no EDX, fazendo-se necessários maiores estudos na preparação das nanopartículas magnéticas para que estas possam se alojar com maior eficiência nos poros da HA, como utilizar nanopartículas de magnetita sem APTS, e assim obter um material com maior volume magnético e conseqüentemente com uma maior magnetização.

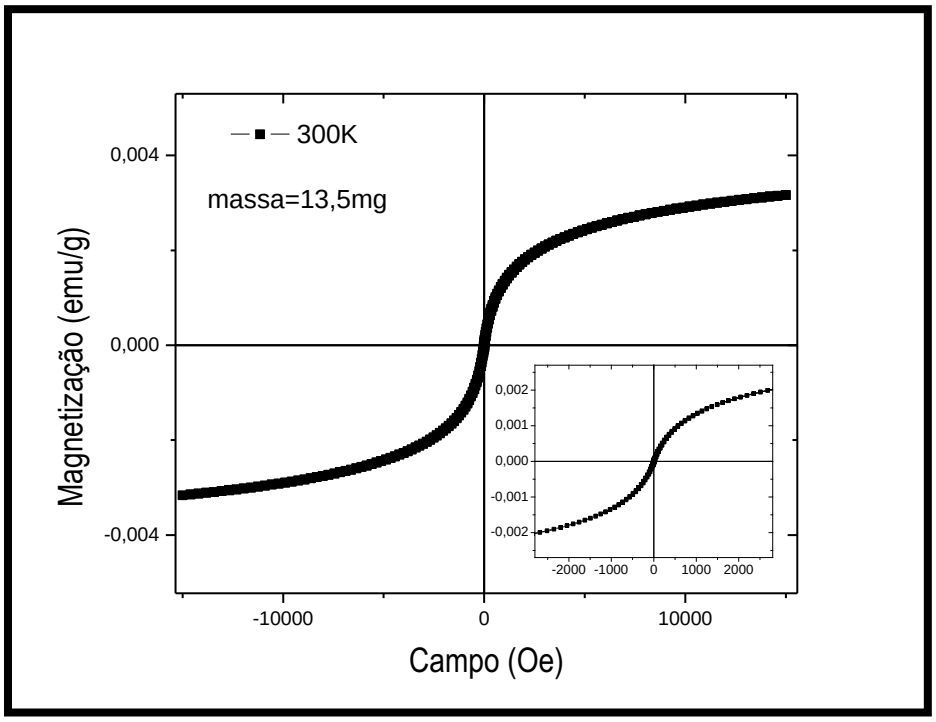


Figura 55 - Curva de magnetização em função de um campo magnético externo aplicado para a amostra Np-H1TP223. À direita ampliação da região central da curva.

6. CONCLUSÃO

Esferas de sílica de tamanhos diferentes foram sintetizadas por meio da mudança de alguns parâmetros de síntese como temperatura e tipo de agitação, mas principalmente pela concentração de água que influência, tanto na distribuição de diâmetros, quanto no tamanho das esferas. Sendo assim as esferas de maior, menor e tamanho médio (S808, S223 e S402) foram escolhidas para a preparação do molde empacotado. Modificando a superfície das esferas de sílica com peróxido de hidrogênio e mantendo-as sob sedimentação, foi possível obter moldes empacotados para as 3 amostras respectivamente TP808, TP223 e TP402.

O gel precursor de HA foi sintetizado por meio do método sol-gel e caracterizado. Na amostra H01, após o tratamento térmico, foi observada a presença da fases HA, CaO e $Ca(OH)_{2.}$ Aumentando o tempo de envelhecimento da amostra para mais de 72h, as fases CaO e $Ca(OH)_2$ foram eliminadas, e com o tratamento térmico a 700ºC, obteve-se uma material bifásico (fases HA e β-TCP).

Para a preparação da HA porosa, observou-se que era necessária uma prévia sinterização do molde de esferas de sílica. O calor faz com haja a formação de interconecções interesferas, e assim obtem-se um material com poros mais ordenados. Foram obtidas HA com poros na ordem de 350nm e 170nm por meio dos moldes TP402 e TP223, respectivamente.

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS com tamanhos na ordem de 5nm também foram obtidas e caracterizadas. Estas foram utilizadas para a preparação do biocompósito HA/nanopartículas (Np-H1TP223 e Np-H1TP402). A presença de ferro (nanopartículas) no biocompósito foi confirmada com a análise de EDX, e também com a mudança de cor do material de um branco para marrom. A curva de magnetização da amostra indicou um comportamento superparamagnético o que corrobora com a presença das nanopartículas no biocompósito, entretanto a magnetização de saturação obtida foi muito próxima de zero.

Como perspectivas para esse trabalho, estão a investigação das propriedades magnéticas do dispositivo HA/napartículas bem como a melhora de sua magnetização, visto a sua aplicação em hipertermia magnética e a execução de testes biológicos, tanto *in vitro,* quanto *in vivo* para se investigar o crescimento de células ósseas sobre o suporte obtido.

Referências

1 GOPI, D. et. al. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. **Spectrochimia Acta Part A**: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 87, n. 1, p. 245-250, Feb. 2012.

2 KIM, J. et. al. Magnetic fluorescent delivery vehicle using uniform mesoporous silica spheres embedded with monodisperse magnetic and semiconductor nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 3, p. 688-689, Jan. 2006.

3 ARRUEBO, M. et. al. Development of magnetic nanostructured silica-based materials as potencial vectors for drug-delivery applications. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 7, p. 1911-1919, Apr. 2006.

4 ZHANG, H.; MEYERHOFF, M. E. Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: enhancing immobilized antibody biding efficiency and analytical performance. **Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 609-616, Jan. 2006.

5 BEE, A.; MASSART, R.; NEVEU, S. Synthesis of very fine maghemite particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.149, n. 1/2, p. 6-9, Aug. 1995.

6 GAIHRE, B. et al. Gelatin stabilized iron oxide nanoparticles as a three dimensional template for the hydroxyapatite crystal nucleation and growth. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 8, p. 1297-1303, Dec. 2008.

7 TAKEGAMI, K. et. al. New ferromagnetic bone cement for local hyperthermia. **Journal of Biomedical and Materials Research**, v. 43, n. 2, p. 210-214, Dec. 1998.

8 ARCOS, D.; DEL REAL, R. P.; VALLET-REGÍ, M. A novel bioactive and magnetic biphasic material. **Biomaterials**, v. 23, n. 10, p. 2151-2158, May 2002.

9 HENCH, L. L.; BEST, S. Ceramics, glasses, and glass-ceramics. In: RATNER, B. D. et al. (Ed). **Biomaterial science**: an introduction to materials in medicine. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. Cap. 2, p.153-170.

10 OHKUBO, C.; XU, S. Acute effects of static magnetic fields on cutaneous microcirculation in rabbits. **In Vivo**, v. 11, n. 3, p. 221-225, May/June 1997.

11 YAMAMOTO, Y. et. al. Effects of static magnetic fields on bone formation in rat osteoblast cultures. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 12, p. 962-966, Dec. 2003.

12 YAN, Q. C.; TOMITA, N.; IKADA, Y. Effects of static magnetic fields on bone formation of rat femurs. **Medical Engineering & Physics**, v. 20, n. 6, p. 397-402, Sept. 1998.

13 STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micronsizerange. **Journal of Colloid and Interface Science**,v. 26, n. 1, p. 62-69, Jan. 1968.

14 TARTAJ, P. et. al. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 290/291, n. 2001, p. 28-34, Apr. 2005.

15 MING, M. et. al. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by aminosilane. **Colloids and Surfaces A**: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 212, n. 2/3, p. 219-226, Jan. 2003.

16 ROTHER, D. et al. Silicon, silica and its surface patterning/activation with alkoxy- and amino-silanes for nanomedical applications. **Nanomedicine**, v. 6, n. 2, p. 281-300, Feb. 2011.

17 MAGFORCE®. **Nanomedicine**. Disponível em: < http://www.magforce.com>. Acesso em: 26 jun. 2012.

18 PARK, J. B.; LAKES, R. S. **Biomaterials**: an introduction. 3rd ed. New York: Springer, 2007. 561 p.

19 ANDERSON, J. M. Fundamental biological requirements of a biomaterial. In: GUELCHER, S. A.; HOLLIGER, J. O. (Ed.). **An introduction to biomaterials**. Boca Raton: CRC Press, 2006. Cap. 2, p. 3-13.

20 WILLIAMS, D. F. (Ed.). **Definitions in biomaterials**: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 1987. 72 p.

21 ANDERSON, J. M. Biological responses to materials. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, p. 81-110, Aug. 2001.

22 KAWACHI, E. Y. et. al. Biocerâmicas: tendendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, ago. 2000.

23 KINGERY, W. D. B.; BOWEN, H. K.; UHLMANN, D. R. **Introduction to ceramics**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1976. 1032 p.

24 KUMTA, P. N. Ceramic biomaterials. In: GUELCHER, S. A.; HOLLIGER, J. O. (Ed.). **An introduction to biomaterials**. Boca Raton: CRC Press, 2006. Cap. 18, p. 311-339.

25 BILLOTTE, W. G. Ceramic biomaterials. In: BRONZINO, J. D. (Ed.). **The biomedical engineering handbook**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. v. 1, cap. 38, p. 38-31.

26 HULBERT, S. F. et al. History of bioceramics. **Ceramurgia International**, v. 8-9, n. 4, p. 131-140, Oct./.Dec. 1982.

27 KRAJEWSKI, A.; RAVAGLIOLI, A. Bioceramics and biological glasses. In: BARBUCCI, R. (Ed.). **Integrated biomaterials science**. 2nd ed. New York: Kluwer Academic, 2002. Cap. 5, p. 189-254.

28 HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, July 1991.

29 HENCH, L. L. Bioceramics.**Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705-1728, July 1998.

30 DREESMAN, H. Ubberknochenplombierung. **BrunsBeitrKlinChir**, v. 9, p. 804-810, 1892.

31 PELTIER, L. F. et. al. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. **Annals of Surgery**, v. 146, n. 1, p. 61-69, July 1957.

32 SHACKELFORD, J. F. Bioceramics – an historical perspective. In: SHACKELFORD, J. F. (Ed.). **Bioceramics**: applications of ceramic and glass materials in medicine. Uetikon-Zuerich: Trans Tech Publications, 1999. p. 1-4.

33 ALBEE, F. H.; MORRISON, H. F. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. **Annals of Surgery**, v. 71, n. 1, p. 32-39, Jan. 1920.

34 SMITH, L. Ceramic-plastic material as a bone substitute. **Archives Surgery**, v. 87, n. 4, p. 653-661, Oct. 1963.

35 HULBERT, S. H. et. al. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 4, n. 3, p. 433-456, Sept. 1970.

36 HENCH, L. L. et. al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 5, n. 6, p. 117-141, Nov. 1971.

37 BONFIELD, W.; HASTINGS, G. W.; TANNER, K. E. (Ed.). **Bioceramics**: proceedings of the 4th International Symposium on Ceramics in Medicine. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. 378 p.

38 KRAJEWSKI, A.; RAVAGLIOLI, A. (Ed.).**Bioceramics and the human body**: proceedings of the International Congress on Bioceramics and the Human Body. New York: Elsevier Applied Science, 1992. 519 p.

39 FISHMAN, G. S.; CLARE, A.; HENCH, L. L. (Ed.). **Bioceramics**: materials and applications, proceedings symposia at Indianapolis, Indiana and Alfred, NY, 1994. Westerville: American Ceramic Society, 1995. 392 p.

40 DE LANGE, G. L.; DONATH, K. Interface between bone tissue and implants of solid hydroxyapatite or hydroxyapatite-coated titanium implants. **Biomaterials**, v. 10, n. 2, p. 121-125, Mar. 1989.

41 McINTYRE, J. P. et. al. Characterization of a bioceramic composite for repair of large bone defects. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 70, n. 9, p. 1499-1503, 1991.

42 SIMUNEK, A. et. al. A six-year study of hydroxyapatite-coated root-form dental implants. **West Indian Medical Journal**, v. 54, n. 6, p. 393-397, Dec. 2005.

43 CALDERÍN, L.; SCOTT, M. J.; RUBIO, A. Electronic and crystallographic structure of apatites. **Physical Review B**, v. 67, n. 13, p. 1341060/1-13106/7, Apr. 2003.

44 ANDO, J. Tricalcium phosphate and its variation.**Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 31, n. 2, p. 196-201, 1958.

45 BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 4, p. 1401-1421, Apr. 2012.

46 BANDYOPADHYAY, A. et. al. Calcium phosphate-based resorbable ceramics: influence of MgO, ZnO, and SiO_2 dopants. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, n. 9, p. 2675-2688, Sept. 2006.

47 PALMER, L. C. et. al. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 11, p. 4754-4783, Nov. 2008.

48 BOHNER, M.; LEMAITRE, J. Can bioactivity be tested *in vitro* with SBF solution? **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2175-2179, Apr. 2009.

49 PIETRZAK, W. S. (Ed.). **Musculoskeletal tissue regeneration**: biological materials and methods. New Jersey: Humana Press, 2008. 649 p.

50 ARONOV, D.; KARLOV, A.; ROSENMAN, G. Hydroxyapatite nanoceramics: basic physical properties and biointerface modification. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 27, n. 13/15, p. 4181-4168, 2007.

51 JELINSKI, J. Biologically related aspects of nanoparticles, nanostructured and nanodevices. In: SIEGEL, R. W.; HU, E.; ROCO, M. C. (Ed.). **Nanostructure science and technology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. Cap. 7, p. 113-130.

52 CLARK, W. B. et. al. Relative hydrophobicities of actinomyces viscosus and actinomyces naeslundii strains and their adsorption to saliva-treated hydroxyapatite. **Infection and Immunity**, v. 47, p. 3, p. 730-736, Mar. 1985.

53 PATTANAYAK, D. K.; RAO, B. T.; RAMA MOHAN, T. R. Calcium phosphate bioceramics and bioceramic composites. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 59, n. 3, p. 432-447, Nov. 2011.

54 POSNER, A. S.; PERLOFF, A.; DIORIO, A. F. Refinement of the hydroxyapatite structure.**Acta Crystallographica**, v. 11, n. 4, p. 308-309, Apr. 1958.

55 NISSAN, B. B.; CHAI, C.; EVANS, L. Crystallographic and spectroscopic characterization and morphology of biogenic and synthetic apatites. In: WISE, D. L. et al. (Ed.). **Encyclopedia handbook of biomaterials and bioengineering**, **Part B**: applications. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1995. v. 1, p. 191-121.

56 FERRAZ, M. P.; MONTEIRO, F. J.; MANUEL, C. M. Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies.**Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 2, n. 2, p. 74-80, May/Aug. 2004.

57 SOPYAN, I. et. al. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 1-2, p. 116-123, Oct./Nov. 2007.

58 OHGUSHI, H.; CAPLAN, A. I. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, n. 6, p. 913-927, Nov. 1999.

59 BANFI, A. et. al. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 6, p. 707-715, June 2000.

60 AOKI, S. et. al. Preparation of porous calcium phosphates using a ceramic foaming technique combined with a hydrothermal treatment and the cell response with incorporation of osteoblast-like cells. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 112, n. 1304, p. 193-199, Apr. 2004.

61 SHARMA, S. et. al. Adsorption of meloxicam on porous calcium silicate: characterization and tablet formulation. **AAPS PharmaSciTech**, v. 6, n. 4, p. E618-E625, Dec. 2005.

62 PALAZZO, B. et. al. Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: an experimental and theoretical approach. **Materials Science and Engineering**: C, v. 25, n. 2, p. 207-213, Apr. 2005.

63 KANELLAKOPOULOU, K.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. **Drugs**, v. 59, n. 6, p. 1223-1232, June 2000.

64 HASEGAWA, M. et. al. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**: Applied Biomaterials, v. 70B, n. 2, p. 332-339, Aug. 2004.

65 CaP BIOTECHNOLOGY INC. (United States). B. L. Starling; J. E. Stephan. **Calcium phosphate microcarriers and microspheres**. US 006210715B1, 2 Feb. 2000, 3 Apr. 2001.

66 MOORE, W. R.; GRAVES, S. E.; BAIN, G. I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ Journal of Surgery**, v. 71, n. 6, p. 354-361, June 2001.

67 BOYDE, A. et. al. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. **Bone**, v. 24, n. 6, p. 579-589, June 1999.

68 MARCACCI, M. et. al. Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. **Calcified Tissue International**, v. 64, n. 1, p. 83-90, Jan. 1999.

69 KON, E. et. al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 49, n. 3, p. 328-337, Mar. 2000.

70 TAMPIERI, A. et. al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1365-1370, June 2001.

71 TIAN, J.; TIAN, J. Preparation of porous hydroxyapatite. **Journal of Materials Science**, v. 36, n. 12, p. 3061-3066, June 2001.

72 TAMAI, N. et. al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo.* **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 1, p. 110-117, Jan. 2002.

73 VAN BLAADEREN, A.; VRIJ, A. Synthesis and characterization of monodisperse colloidal organo-silica spheres. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1, p. 1-8, Mar. 1993.

74 BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. The sol-gel preparation of silica gels. **Journal of Chemical Education**, v. 71, n. 7, p. 599-602, July 1994.

75 NASSAR, E. J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Influência da catálise ácida e básica na preparação da sílica funcionalizada pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 27-31, jan./fev. 2002.

76 BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol gel science**: the physics chemistry of sol-gel processing. San Diego: Academic Press, 1990. 912 p.

77 GIESCHE, H. Synthesis of monodispersed silica powders I. Particle properties and reaction kinetics. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 14, n. 3, p. 189-204, 1994.

78 MATSOUKAS, T.; GULARI, E. Monomer-addition growth with a slow initiation step: a growth model for silica particles from alkoxides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 132, n. 1, p. 13-21, Oct. 1989.

79 LA MER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 11, p. 4847-4854, Nov. 1950.

80 BOGUSH, G. H.; ZUKOSKI, C. F. Uniform silica particle precipitation: an aggregative growth model. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 142, n. 1, p. 19-34, Mar. 1991.

81 VAN BLAADEREN, A.; VAN GEEST, J.; VRIJ, A. Monodisperse colloidal silica spheres from tetraalkoxysilanes: particle formation and growth mechanism. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 154, n. 2, p. 481-501, Dec. 1992.

82 HARRIS, M. T.; BASARAN, O. A.; BYERS, C. H. The precipitation dynamics of silica particles. In: MESSING, G. L. et. al. (Ed.).**Ceramic transactions**: ceramic powder science III. Westerville: The American Ceramic Society, 1990. v. 12, p. 119-127.

83 MEDEIROS, E. S.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Nanotecnologia. In: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006. Cap. 1, p. 13-29.

84 ERIC DREXLER, K. **Engines of creation**: the coming era of nanotecnhology. New York: Archor Books, 1986. 320 p.

85 ERIC DREXLER, K. **Nanosystems**: molecular machinery, manufacturing, and computation. New York: John Wiley & Sons, 1992. 576 p.

86 ERIC DREXLER, K.; PETERSON, C.; PERGAMIT, G. **Unbounding the future**: the nanotechnology revolution. New York: Willian Morrow, 1991, 166 p.

87 FISHBINE, G. **The investor's guide to nanotechnology & micromachines**. New York: John Wiley & Sons, 2002. 288 p.

88 TANIGUCHI, N. Current status in, and future trends of ultraprecision machining and ultrafine materials processing. **CIRP Annals- Manufacturing Technology**, v. 32, n. 2, p. 573-582, Feb. 1983.

89 TANIGUCHI, N. et. al. (Ed.). **Nanotechnology** : integrated processing systems for ultra-precision and ultra-fine products. Oxford: Oxford University Press. 1996. 424 p.

90 LANE, R.; CRAIG, B.; BADCOCK, W. Materials engineering with nature's building blocks. **The AMPTIAC Newsletter**, v. 6, n. 15, p. 31-36, 2002.

91 REED, M. A. Molecular electronics: current status and future prospects. **FED**, v. 11, n. 1, p. 57-66, 2000.

92 SANTOS, L. J. et. al. Fulereno[C60]: química e aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 680-693, 2010.

93 TEJA, A. S.; KOH, P. Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in crystal growth and characterization of materials**, v. 55, n. 1/2, p. 22-45, Mar./June 2009.

94 SCHERTMANN, U.; CORNELL, R. M. **Iron oxides in the laboratory**: preparation and characterization. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. 188 p.

95 GOSSUIN, Y. et. al. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. **Wiley Interdisciplinary Reviews**: Nanomedicine and Nanobiotechnology, v. 1, n. 3, p. 299-310, May/June 2009.

96 BABES, L. et. al. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 212, n. 2, p. 474-482, Apr. 1999.

97 LEE, et. al. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 9, p. 1371-1379, Aug. 2008.

98 MAHMOUDI, M. A new approach for the *in vitro* identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Colloids and Surfaces B**: Biointerfaces, v. 75, n. 1, p. 300-309, Jan. 2010.

99 FAN, R. et. al. A new simple hydrothermal preparation of nanocrystalline magnetite Fe_3O_4. **Materials Research Bulletin**, v. 36, n. 3/4, p. 497-502, Feb./Mar. 2001.

100 MÜLLER, K. et. al. Atorvastatin and uptake of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) in human monocyte-macrophages: implications for magnetic resonance imaging. **Biomaterials**, v. 29, n. 17, p. 2656-2662, June 2008.

101 YANG, H. et. al. Targeted dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging of tumors using multifunctional gadolinium-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 20 p. 4584-4593, July 2011.

102 SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, n. 1, p. 295-326, 1999.

103 ZHOU, Z. H. et. al. Synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles from emulsions. **Journal of Materials Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 1704-1709, Apr. 2001.

104 TONG, L. et. al. Synthesis and application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in targeted therapy and imaging of cancer. **Frontiers of Medicine**, v. 5, n. 4, p. 379-387, Dec. 2011.

105 LI, M. X. Magnetic Fe_3O_4 nanoparticles: synthesis and application in water treatment. **Nanoscience & Nanotechnology-Asia**, v. 1, n. 1, p. 14-24, July 2011.

106 LAURENT, S. et. al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, June 2008.

107 GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, June 2005.

108 AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 144-157, 2012.

109 QU, L.; PENG, A.; PENG, X. Alternative routes toward high quality CdSe nanocrystals. **Nano Letters**, v. 1, n. 6, p. 333-337, June 2001.

110 HINES, M. A.; GUYOT-SIONNEST, P. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 468-471, Jan. 1996.

111 TARTAJ. P. et. al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D**: Applied Physics, v. 36, n. 13, p. R182-R197, July 2003.

112 MAJEWSKI, P.; TIHIERRY, B. Functionalized magnetite nanoparticles-synthesis, properties, and bio-applications.**Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 32, n. 3-4, p. 203-215, Dec. 2007.

113 LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **AngewandteChemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, Feb. 2007.

114 MIKHAYLOVA, M. et. al. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification. **Langmuir**, v. 20, n. 6, p. 2472-2477, Mar. 2004.

115 KIM, J. et. al. Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy. **AngewandteChemie International Edition**, v. 45, n. 46, p. 7754-7758, Nov. 2006.

116 WANG, L. et. al. Multifunctional nanoparticles displaying magnetization and near-IR absorption. **AngewandteChemie International Edition**, v. 47, n. 13, p. 2439-2442, Mar. 2008.

117 CORR, S. A.; RAKOVICH, Y. P.; GUN'KO, Y. K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 3, p. 87-104, Mar. 2008.

118 FANG, C. et. al. Functionalization of iron oxide magnetic nanoparticles with targeting ligands: their physicochemical properties and *in vivo* behavior. **Nanomedicine**, v. 5, n. 9, p. 1357-1369, Nov. 2010.

119 LIM, S. F.; ZHENG, Y. M.; CHEN, J. P. Organic arsenic adsorption onto a magneticsorbent. **Langmuir**, v. 25, n. 9, p. 4973-4978, Mar. 2009.

120 AIROLDI, C.; FARIAS, R. F. Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 84-88, jan./fev. 2004.

121SUBRAMANIAN, V.; VAN OOIJ, W. J. Silane based metal pretreatments as alternatives to chromating. **Surface Engineering**, v. 15, n. 2, p. 168-175, Apr. 1999.

122 MOHAPATRA, S. et. al. A simple synthesis of amine-derivatised superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bioapplications. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 17, p. 7566-7574, Sept. 2007.

123 CORADIN, T.; LOPEZ, P. J. Biogenic silica patterning: simple chemistry or subtle biology? **ChemBioChem**, v. 4, n. 4, p. 251-259, Apr. 2003.

124 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

125 SHRIVER, D. C.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 847 p.

126 AZEVEDO, R. B. Microscopia eletrônica. In: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 2. ed. São Paulo:Artliber, 2006. Cap. 5, p. 101-109.

127 GOLÇALVES, G. E. et. al. Síntese e caracterização de mulita utilizando sílica obtida da casca de arroz. **Revista Escola de Minas**, v. 62, n. 3, jul./set. 2009.

128 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed.Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

129 LIN-VLEIN, D. et al.**The handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules**. New York: Academic Press, 1991. 503 p.

130 HUANG, Z. B. et. al. Preparation of the modified polystyrene microspheres and the assemble of the colloid crystal with high crystalline quality. **Acta Physico-Chimica Sinica**, v. 20, n. 6, p. 651-655, 2004.

131 WU, H. C. et. al. A novel biomagnetic nanoparticle based on hydroxyapatite. **Nanotechnology**, v. 18, n. 16, p. 165601/1-165601/9, Apr. 2007.

132 LIU, D. M.; TROCZYNSKI, T.; TSENG, W. J. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. **Biomaterials**, v. 22, n. 13, p. 1721-1730, July 2001.

133 BEGANSKIENE, A. et. al. Water based sol-gel synthesis of hydroxyapatite. **Materials Science**, v. 9, n. 4, p. 383-386, 2003.

134 LIU, D. M. et. al. Structural evolution of sol-gel hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 23, n. 7, p. 1679-1687, Apr. 2002.

135 BRENDEL, T.; ENGEL, A.; RÜSSEL, C. Hydroxyapatite coating by a polymeric route. **Journal of Materials Science**: Materials in Medicine, v. 3, n. 3, p. 175-179, May 1992.

136 MONMA, H.; UENO, S.; KANAZAWA, T. Properties of hydroxyapatite prepared by the hydrolysis of tricalcium phosphate. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 15-24, 1981.

137 KUMTA, P. N. et. al. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 1, p. 65-83, Jan. 2005.

138 ZAKHIDOV, A. A. et. al. Carbon structures with three-dimensional periodicity at optical wavelengths. **Science**, v. 282, n. 5390, p. 897-901, Oct. 1998.

139 CULLITY, B. D. **Elements of X-ray difracction**. 2nd ed. Massachusetts: Addison-Wesley, 1978. 555p.

140 WALDRON, R. D. Infrared spectra of ferrites.**Physical Review**, v. 99, n. 6, p. 1727-1735, Sept. 1955.

141 YAMAURA, M. et. al. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 279, n. 2/3, p. 210-217, Aug. 2004.