

Otimização da preparação de amostras de hidroxiapatita para gerar imagens de microscopia de varredura de alta resolução

(Optimization of the preparation of hydroxyapatite samples to generate high resolution scanning microscopy images)

A. C. Quizunda(adyquizunda@hotmail.com)¹; J. B. Campos (brantjose@gmail.com)¹, V. Ramos (vramos00@gmail.com)¹; M. A. Sampaio (marilzasa@oi.com.br)²; Marla K. S. Horta(marla.horta@hotmail.com)³

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua Fonseca Teles, 121, Prédio anexo, São Cristóvão, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20940-903

² Universidade Estácio R. do Bpo., 83 - Rio Comprido, Rio de Janeiro - RJ, 20261-063

³ PUC- RIO R. Marquês de São Vicente, 225 - Gávea, Rio de Janeiro - RJ, 22451-045

Resumo

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos que apresentam propriedades particulares como biocompatibilidade e similaridade química com os tecidos ósseos e dentários dos seres vivos. Sua morfologia porosa permite que estes se apresentem como material apropriado para a utilização em substituição de pequenas partes de tecido ósseo, já que proporciona o crescimento de canais de sistemas nervosos, suporte para vasos sanguíneos como também suporte para deposição de fármacos. Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HA) se apresenta como fosfato mais estável, o qual é encontrado em maior proporção nos tecidos ósseo e dentário no organismo. A inovação desse trabalho é sintetizar HA utilizando cascas de ovos como precursor de óxido de cálcio. A maior dificuldade é conseguir caracterizar as partículas nanométricas das HA auxiliando na desaglomeração das mesmas, utilizando microscopia de varredura eletrônica de alta definição (MEV-FEG). Nesse contexto, esse trabalho tem por finalidade otimizar a preparação de pós de HA de tamanhos nanométricos, para serem geradas imagens de alta qualidade no MEV. Por isso, foram estabelecidas novas metodologias para dispersar as partículas em álcool isopropílico com auxílio de um equipamento de ultrassom e também procedimento para posicionar as partículas em pós, diretamente sobre os suportes de amostras, os “Stubs”.

Palavras chave: Otimização, preparação, hidroxiapatita

Abstract

Calcium phosphates are ceramic materials that have particular properties such as biocompatibility and chemical similarity with bone and dental tissues of living beings. Their porous morphology allows them to present themselves as suitable material for use in replacing small parts of bone tissue, as it provides for the growth of nerve system channels, support for blood vessels as well as support for drug deposition. Among calcium phosphates, hydroxyapatite (HA) appears as a more stable phosphate, which is found in greater proportion in bone and dental tissues in the body. The innovation of this work is to synthesize HA using eggshells as a precursor of calcium oxide. The greatest difficulty is to characterize the nanometric particles of the HAs by helping to de-agglomerate them using high-resolution electronic scanning (SEM-FEG) microscopy. In this context, this work aims to optimize the preparation of HA powders of nanometric sizes, to generate high quality images in SEM. Therefore, new methodologies were established to disperse the particles in isopropyl alcohol with the aid of an ultrasound equipment and also a procedure to position the particles in powders, directly on the sample supports, the "Stubs".

Keywords: Optimization, preparation, hydroxyapatite

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os compostos derivados do fosfato de cálcio, em particular a hidroxiapatita, têm sido objeto de intensas investigações como material de implante, como sistema de cobertura para superfícies de estruturas metálicas, como catalisador, suporte para catalisadores, fertilizantes, e no tratamento de água. Esta diversidade de aplicações à torna objeto de inúmeras pesquisas seja no desenvolvimento de novos materiais ou na melhoria da tecnologia da sua fabricação. Desta forma, diversos métodos de síntese de hidroxiapatita vêm sendo estudados, tais como: precipitação, técnica hidrotérmica, método de fluxo, eletro-cristalização, pirólise, liofilização, irradiação por micro-ondas e sol-gel. (Dourado, 2006)

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio, cuja fórmula é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um dos fosfatos mais estudados em função da sua ampla aplicação em diversas áreas. As propriedades físicas e químicas da hidroxiapatita são modificadas de acordo com o método, o precursor e as condições reacionais, através do qual ela foi sintetizada. Desta forma, diversos métodos de síntese de hidroxiapatita vêm sendo estudados, tais como: precipitação, técnica hidrotérmica, método de fluxo, eletro-cristalização, pirólise, liofilização, irradiação por micro-ondas e sol-gel (Costa, et al., 2010)

Na linha de controle ambiental, a hidroxiapatita vem sendo estudada como catalisador na decomposição de compostos orgânicos. Ela é um catalisador efetivo para desidratação e desidrogenação de álcoois primários para aldeídos e cetonas, a altas temperaturas (Dourado, 2006). Continuando na área ambiental, a hidroxiapatita tem uma alta capacidade de remover metais pesados, sendo utilizada na área de refino de petróleo para a remoção de impurezas presentes no petróleo, assim também como em águas e solos contaminados, como também de dejetos industriais. Esta aplicação tem sido objeto de grandes investigações devido ao alto grau de toxicidade proveniente desses metais, aliado ao fato da hidroxiapatita representar um material de baixo custo que poderia ser usado no controle da poluição ambiental (Costa, et al., 2010).

Nesse contexto, esse trabalho tem por finalidade otimizar a preparação de pós de hidroxiapatita (HA) de tamanhos nanométricos, para serem geradas imagens de alta qualidade no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Por isso, foram estabelecidas novas metodologias para dispersar as partículas em álcool isopropílico com auxílio de um equipamento de ultrassom e também procedimento para posicionar as partículas em pós, diretamente sobre os suportes de amostras, os “Stubs”.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta etapa, foram condicionados os *stubs* e a amostra de HA, visando alcançar uma preparação que resulte em uma geração de imagem do MEV de alta resolução.

2.1 CONDICIONAMENTO DO STUB

O suporte primário de metal, geralmente referido como stub de amostra, é usado para conter a amostra. A composição, forma e o condicionamento do stub são principalmente projetadas para otimizar o desempenho do microscópio. Esses stubs metálicos também são os suportes mais convenientes para amostras que não precisam de muita preparação. A maioria dos *stubs* de 12 e 25,4 mm são usinados a partir de alumínio ou duralumínio, uma liga de alumínio (90-92%), cobre (4%) e pequenas quantidades de magnésio e manganês. Os stubs também podem ser de cobre puro, latão, utilizado neste trabalho, temos também o de aço inoxidável.

2.1.1 PREPARAÇÃO DO STUB

Nesta etapa, o stub foi submetido aos processos de preparação metalográfica e o uso da tinta de carbono e fita de carbono. O processo metalográfico composto por lixamento e polimento, efetuado da seguinte maneira:

1. O lixamento do stub foi feito com uma lixa de 8000 mexes, variando o seu posicionamento a 90^0 , cada 10 voltas;
2. Para o polimento do stub, foi efetuado utilizando pastas de diamante com 3 e 1 micrometro;
3. Na etapa final, logo após o polimento, o stub foi colocado no ultrassom em acetona PA, afim de retirar qualquer particulado de diamante impregnado no stub. Abaixo é apresentado imagens do condicionamento do stub.

Figura 1 - processo de condicionamento do stub



Fonte: O autor, 2019.

2.1.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HA PARA O MEV

Este processo consistiu em:

1. Pesagem antes e depois de serem aquecidas a uma temperatura de 120°C, com a finalidade de retirar qualquer partícula de líquido que poderia estar impregnado na amostra;
2. O pó foi macerado previamente na tentativa de soltar as partículas, isso quando HA é utilizada naturalmente. Para a dispersão do pó sobre o stub com fita, tinta e espelhado, foi utilizado um pincel estéreo.

2.1.3 PREPARAÇÃO DE AMOSTRA DE HA USANDO REAGENTES (TOLUENO, ÉTER E ALCÓOL ISOPROPÍLICO)

A preparação das amostras de HA consistiu na pesagem antes e depois de serem aquecidas a uma temperatura de 120°C, durante 10, 20 e 30 minutos, respectivamente, colocadas no álcool isopropílico, éter e tolueno, submetidas a 10, 20 e 30 minutos de ultrassom para desaglomerar as partículas e na última etapa foi feita a preparação das amostras no stubs(espelhado, com tinta e fita de carbono). Segue um detalhamento mais específico do processo abaixo:

- 1) A pesagem da HAP, foi feita em uma Balança de precisão 0.001 g, TOLLEDO, modelo AB204, de 5 mg;
- 2) A amostra foi submetida a temperatura de 120°C para retirar qualquer unidade remanescentes na mesma. Para esse estudo foram aquecidas duas amostras por três tempos distintos, 10, 20 e 30 minutos;

- 3) Após o aquecimento, amostra foram separadas varias alíquotas contendo 5 mg, em eppendorfs de 2 mL;
- 4) As amostras foram misturadas a 1,8 mL de álcool isopropílico, éter e tolueno, e agitadas em ultrassom (BRANSON, 1800) por 10, 20 e 30 minutos;
- 5) Os stubs foram limpos com acetona (remover materiais orgânicos, plásticos) e, depois, com álcool isopropílico (garantir a retirada total de resíduos deixados pela acetona), antes de colocar a finta ou tinta (dissolvida com água destilada);
- 6) A fixação da amostra liquida no stub foi feita através de uma fita de carbono dupla face, e também por meio de uma tinta de carbono (o carbono é um dos materiais condutores que auxilia a condução dos elétrons que é amplamente utilizado no MEV) e em um stub que foi condicionado para este efeito.

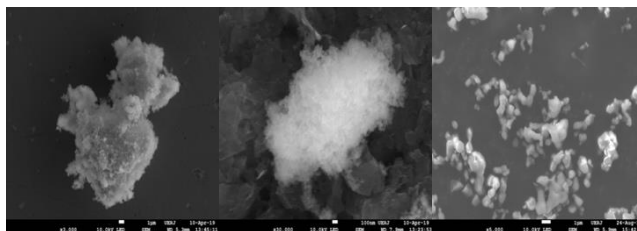
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa, foram apresentados os resultados obtidos que demonstram os diferentes efeitos, que cada forma de preparação apresenta, desde o tempo de ultrassom, o uso dos reagentes de dispersão (tolueno, éter e álcool isopropílico) e o uso das diferentes formas de cobertura do *stub* (espelhado, tinta de carbono e fita de carbono), apresentado também desvantagens na utilização dos mesmos.

3.1.1 ANÁLISE QUANTO AO USO DA FITA, TINTA E O STUB CONDICIONADO SEM REAGENTES

Um dos fatores que podem influenciar diretamente nos resultados, quanto a qualidade de imagem gerada no MEV, durante o processo de preparação da amostra esta ligado ao uso fita de carbono e a tinta, que na maior parte das preparações tem tido um impacto negativo. Desta forma, adotamos o stub condicionado para tentarmos solucionar esse problema, como mostra a figura 3, que buscam fazer uma comparação entre essas três formas de fixador ou cobertura no *stub* da amostra, utilizando a HA natural.

Figura 2 - stub polido, revestido com fita de carbono e tinta, gerando diferenças de qualidade de imagens.



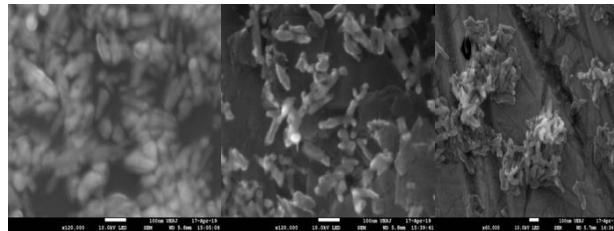
Fonte: O autor, 2019.

Após aos testes de utilização da fita de carbono, tinta e stub condicionado para a HA sem reagentes de dispersão, podemos afirmar que tanto a fita e o stub condicionado apresentaram resultados mais satisfatório, quanto à sua aplicação para esta finalidade, gerando imagens com boa qualidade.

3.1.2 ANÁLISE QUANTO AO USO DA FITA, TINTA E O STUB CONDICIONADO COM REAGENTES

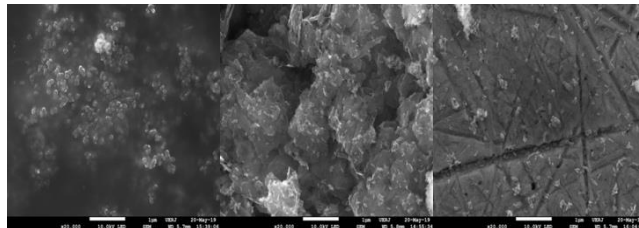
Na etapa final, foram testados três tipos de reagentes para dispersão, que apresentaram diferentes resultados, em que o uso do álcool isopropílico, apresentou melhores resultados quanto a dispersão, quanto manter as características das partículas de HA, mesmo usando um maior de tempo ultrassom (30 minutos), como podemos observar nas figuras 3,4 e 5.

Figura 3 - partículas de HA usando álcool isopropílico com agente de dispersão com um tempo de ultrassom de 30 minutos.



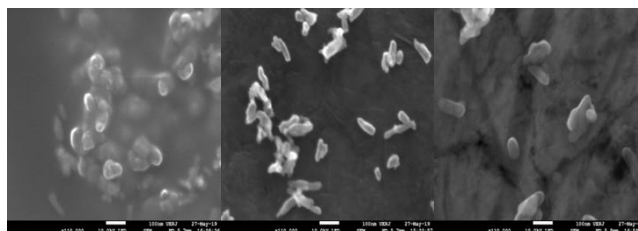
Fonte: O autor, 2019.

Figura 4 - partículas de HA usando álcool isopropílico com agente de dispersão com um tempo de ultrassom de 20 minutos.



Fonte: O autor, 2019.

Figura 5 - partículas de HA usando álcool isopropílico com agente de dispersão com um tempo de ultrassom de 10 minutos, observando a morfologia.



Fonte: O autor, 2019.

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados observados, concluímos que a busca por uma metodologia adequada para atender todos os objetivos deste trabalho levou a vários experimentos a fim de alcançar as melhores técnicas de preparação de amostra de HA. Elas foram desenvolvidas para o MEV, tais como, a preparação usando fita de carbono ou tinta de carbono. Essa última apresentou melhor eficiência quando foi utilizado agentes de dispersão como o tolueno, éter álcool isopropílico e o stub condicionado para amostra em pó natural.

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste projeto, algumas instituições e pessoas merecem um agradecimento especial, como a Universidade do Estado do Rio de Janeiro e a Universidade Estácio, pela oportunidade de realizar esse trabalho, a todo o corpo docente, e também a CAPES pelo financiamento da bolsa.

REFERÊNCIAS

- al, A. C. (18 de 11 de 2009). Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações , 10. Campina Grande, pernabumco, Brasil.
- Costa, A. F., Lima, M. G., Lima, L. H., Cordeiro, V. V., Viana, K. M., Souza1, C., et al. (2010). Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. p. 10.
- Dourado, E. R. (2006). PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA DOPADA COM ESTRÔNCIO. Dissertação , p. 128.
- Echlin, P. (Janeiro de 2009). Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. Cambridge, Reino Unido.
- Goldstein, J. (2003). Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis (Vol. 2). New York.
- Kawachi, E. Y. (2000). Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Em E. Y. KAWACHI, & Q. Nova (Ed.), Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. (Vol. 23, pp. 518 - 522). São Paulo, São Paulo, Brasil: Química Nova.
- M. S. Aguilar, J. B. (14 de 11 de 2014). SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA COM O USO DE CARBONATO DE CÁLCIO DE ORIGEM BIOLÓGICA COMO PRECURSOR. 21o CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais , p. 08.

Maia, M. D. (2009). A Hidroxiapatita Contendo Zinco a 0,5% como Substituto Ósseo. Caracterização Físico-química e Análise Normatizada da Biocompatibilidade. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niteroi.

Rodrigues, L. R. (2008). Síntese e caracterização de hidroxiapatita e titânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos. 100. campinas, sao paulo.