

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO IN SITU DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

Pesquisador Responsável: Carlos Alberto Ospina Ramirez

Grupo: Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME)

LN: Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)

RESUMO

Este projeto propõe usar as vantagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) in situ para estudar processos dinâmicos de nanopartículas de hidroxiapatita, quando submetidas a variações de temperatura. Esta pesquisa será dividida em duas etapas. A primeira consiste em avaliar os parâmetros de preparação de amostras, por imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Na segunda etapa, pretende-se realizar experiências variando a temperatura dos nanocristais, dentro do TEM usando um porta-amostra dedicado para aquecimento, entre 200 °C e 800 °C. O aluno de Iniciação Científica (IC) será treinado na operação básica dos microscópios de varredura e de transmissão.

CONTEÚDO

1. Introdução
 - 1.1. Enunciado do(s) problema(s)
2. Justificativa e objetivos
 - 2.1. Objetivo geral
 - 2.2. Objetivos específicos
 - 2.2.1. SEM
 - 2.2.2. TEM in situ
 - 2.3. Resultados esperados
3. Metodologia
 - 3.1. Descrição das condições de medida de TEM in situ
4. Cronograma
5. Pesquisadores e instituições colaboradoras
6. Lista de siglas
7. Referências

1. INTRODUÇÃO

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) permite caracterizar de forma local e de forma simultânea, a morfologia, cristalografia e composição química dos materiais. As medidas podem ser realizadas com resolução espacial e em energia de alguns angströms e elétron-volts, respectivamente, geralmente sob condições de alto vácuo [1, 2]. É possível também observar e registrar processos dinâmicos, quando as amostras são submetidas a estímulos (físicos e químicos) dentro de um TEM. Esse tipo de experimentos é definido com Microscopia Eletrônica de Transmissão in situ.

Graças aos avanços na ótica eletrônica, na tecnologia das câmeras digitais, na instrumentação de porta-amostras dedicados e ao desenvolvimento de TEMs ambientais (E²TEM¹), é possível modificar as condições sobre as amostras e estudar suas respostas e diferentes fenômenos dinâmicos, com resolução atômica e em energia em tempo real [3].

¹ Ver Lista de Siglas, sessão 6.

Um microscópio eletrônico é ambiental quando é possível submeter a amostra a pressão variáveis de até algumas dezenas de mbar. Isto tem sido possível graças a um sistema de bombeamento diferenciado, permitindo o fluxo de gases, sem que altere o vácuo no canhão de elétrons [4]. As aplicações dos ETEM abrangem estudos de nanopartículas, catalisadores, células de combustíveis, deposição induzida por feixe de elétrons focado, etc. [5], para a determinação de diagramas de fase de nanopartículas, o entendimento de reações e funções catalíticas, e para a formação de novas estruturas [6].

Na TEM in situ, usando porta-amostras dedicados, é possível fazer experimentos modificando a temperatura sobre a amostra (aquecimento / resfriamento); a magnetização; a polarização elétrica; e aplicar esforços mecânicos [7 – 11]. Existe outro tipo de porta-amostras equipados com células ambientais, com fluxo de líquidos ou gases, e variação da temperatura e corrente elétrica, dedicados ao crescimento de estruturas e análises em condições mais reais [12, 13]. Assim é possível estudar as interações e reações entre sólido-sólido, sólido-líquido e sólido-gás a escalas nanométricas [3].

Todas essas possibilidades podem conduzir à correlação direta entre os fenômenos observados com as propriedades e aplicações dos materiais, e à criação de modelos dinâmicos mais exatos. Mas, existem várias limitações [14]. O tempo de registro de um quadro de vídeo é um deles. Alguns processos dinâmicos ocorrem em tempos bem menores que o tempo de registro que é de algumas dezenas de microssegundos [3]. Portanto, nem toda informação estaria sendo registrada.

Outra condição adversa são os danos causados na amostra pela radiação devido aos longos tempos de observação. A resolução lateral durante um experimento in situ piora, devido às instabilidades mecânicas e térmicas no próprio porta-amostras, se observando vibrações e movimento de deriva da amostra durante as análises [3, 14]. No ETEM, a cinética e os produtos de reação são difíceis de medir; as pressões usadas estão bem a baixo das condições de reatores reais; o feixe de elétrons pode ionizar as moléculas dos gases, fazendo-os mais reativos [5].

Mesmo com essas limitações, muita informação pode ser adquirida e interpretada apropriadamente, levando em consideração as interferências delas nos dados adquiridos; mas principalmente, do planejamento criterioso das condições experimentais [14]. Assim, a partir das observações, podem-se criar modelos dinâmicos e dar resposta às perguntas elementares

e aos quesitos que a ciência dos materiais propõe: Criar novas estruturas e novas propriedades dos materiais.

Por sua vez, os sistemas particulados nanométricos são projetados para serem os componentes primários dos materiais, e para melhorarem e obterem novas funcionalidades dos materiais. Muitos dos fenômenos associados à produção e reação de estruturas nanométricas não estão completamente estabelecidos. Na maior parte dos casos são estudados por TEM ex situ ou outras técnicas in situ que não trazem informação local.

Entre os sistemas particulados nanométricos, a hidroxiapatita (biomaterial) é de especial interesse para este projeto, devido às suas aplicações na medicina e engenharia e aos problemas ainda não resolvidos.

1.1. ENUNCIADO DO(S) PROBLEMA(S)

A hidroxiapatita (HA) é um cerâmico sintético quimicamente muito similar à fase inorgânica achada em tecidos calcificados como ossos e dentes [15]. A HA pode ser obtida por precipitação por via úmida, a partir da adição de uma concentração aquosa de íons de cálcio a uma solução aquosa de íons de fosfato, em condições básicas e em temperaturas menores do que 100 °C [16]. Nessas condições, a fase obtida caracteriza-se pela estequiometria $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A via inversa, adição da solução de cálcio na solução de fosfato também é aplicada. Apesar da HA ter outras aplicações como sorção iônica [17], o principal interesse desta proposta são suas características como biomaterial.

As propriedades da HA precipitada dependem muito dos parâmetros de síntese, especialmente a temperatura [16]. Além disso, podem-se conseguir facilmente uma grande quantidade de substituições iônicas em cada um dos sítios da rede ocupados pelos grupos funcionais da HA [18]. Cada uma dessas substituições tem influência nas propriedades da HA e até conduz à possível precipitação de outras fases apatitas [15]. Alguns desses íons inibem ou reduzem a cristalização da hidroxiapatita, e.g. CO_3 e Zn nos sítios do fosfato e do cálcio, respectivamente; enquanto outros a estimulam, e.g. F no sítio da hidroxila (OH) [16].

O processo de formação e evolução da fase HA ainda não está completamente identificado. Existem trabalhos teóricos e experimentais estudando os processos de cristalização e crescimento da fase de HA [19, 20]. Estudos por TEM in situ, por sua vez, são

escassos. Nesta linha, tem-se reportado a transformação induzida pelo efeito térmico da radiação do feixe de elétrons, a partir de um fosfato de cálcio precursor, o octacálcio fosfato (OCP²) em HA [21].

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Usar as vantagens da TEM in situ para estudar processos dinâmicos, em tempo real e na escala nanométrica, relacionados com a variação da temperatura em nanopartículas de hidroxiapatita.

2.1. OBJETIVO GERAL

- Realizar experimentos de TEM in situ, focados em mudanças estruturais de nanopartículas, em função da temperatura e do tempo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. SEM

- i) Treinar o aluno de IC na operação básica de um SEM.
- ii) Avaliar amostras preparadas para TEM por SEM.

2.2.2. TEM in situ

- i) Treinar o aluno de IC na operação básica de um TEM.
- ii) Realizar experimentos de TEM in situ, variando a temperatura de nanopartículas de hidroxiapatita, para estudar a sua evolução cristalográfica, com resoluções atômicas e em energia em tempo real.
- iii) Aplicar as técnicas e metodologias de análise de microscopia eletrônica.

² Do inglês Octacalcium Phosphate.

2.3. RESULTADOS ESPERADOS

- i) Determinar um modelo para a cristalização e evolução da HA em função da temperatura. Isto contribuirá para o entendimento da mineralização deste importante fosfato de cálcio em aplicações médica.

3. METODOLOGIA

O presente projeto será dividido em duas etapas. Na primeira etapa, utilizar-se-á um SEM para avaliar a dispersão de nanopartículas de hidroxiapatita, usando um detector de elétrons transmitidos. Na segunda fase, utilizar-se-á um TEM, e um porta-amostra dedicado para aquecimento.

Na primeira etapa, o aluno de IC será treinado na operação básica do FEI Inspect F50, assim como orientado a preparar amostras para TEM por gotejamento de dispersão coloidal de nanopartículas de hidroxiapatita sobre grades de cobre com filme de carbono amorfo. Os treinamentos têm por objetivo determinar as melhores condições de preparação, que serão aplicadas na preparação das grades de aquecimento.

Na segunda etapa, o aluno de IC também será treinado na operação básica do JEM-2100 LaB₆ TEM. Realizar-se-ão experimentos de aquecimento, usando um porta-amostra AduroTM, que tem curvas de calibração de 200 °C a 1200 °C; e grades comerciais DuraSiNTM para aquecimento. A aquisição dos dados será feita de forma conjunta.

Os sistemas nanoestruturados serão sintetizados pelo Laboratório de Biomateriais (LABIOMAT) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

3.1. DESCRIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MEDIDA DE TEM IN SITU

- Microscópio: JEM-2100 LaB₆ TEM, operando a 200 kV, com 0,25 nm de resolução ponto a ponto; podendo ser operado no modo varredura (STEM³) e no modo convencional (TEM). Caracterizações analíticas e cristalográficas podem ser realizadas usando o espectrômetro de raios X (EDS⁴) acoplado e os diferentes modos

³ Ver Lista de Siglas, sessão 6.

⁴ Ver Lista de Siglas, sessão 6.

de difração (BF, DF, SAED, NBD e CBD ⁵). Este microscópio está equipado com duas câmeras para o registro de imagens: ES 500W Model 782 e MultiScan Câmera Model 794 (Gatan, Inc.). A primeira câmera é dedicada para o registro de vídeos e aquisição de imagens a baixa e intermédia magnificação. A segunda câmera é dedicada para o registro de imagens de alta resolução.

- Porta-amostra: AduroTM, da Protochips, para controle de temperatura, diretamente sobre o filme fino de cerâmica condutora que suporta as amostras. Este porta-amostras conta com curvas de calibração de 200 °C a 1200 °C, redução da temperatura instantânea, e grades para aquecimento DuraSiNTM. A Figura 1 exibe as características físicas do equipamento que compõe o porta-amostra AduroTM, com o seu sistema de controle e aquisição de dados e sua fonte de voltagem (a), uma vista detalhada da ponta do porta-amostra, com 1,42 mm de espessura e 6,55 mm de largura (b), e as grades usadas para as caracterizações térmicas (c). Este porta-amostra faz uso da tecnologia MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems), diminuindo o deslocamento da amostra, com rampas rápidas de aquecimento / esfriamento. A estrutura e composição da cerâmica condutora fina serão caracterizadas em função da temperatura, para determinar de forma indireta, a sua interação com as nanopartículas durante as variações de temperatura, e que poderia influenciar na composição dos produtos resultantes do aquecimento.

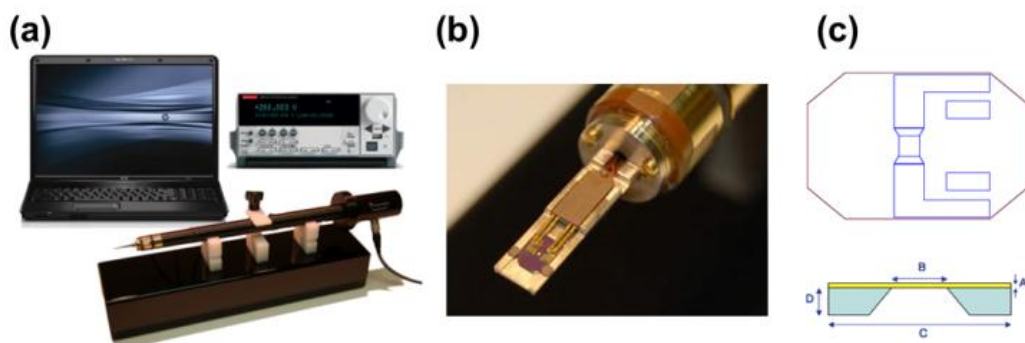


Figura 1. (a) Equipamento do porta-amostra AduroTM. (b) Detalhe da ponta do porta-amostra, com a montagem da grade DuraSiNTM. (c) Desenho de uma grade para deposição de amostras e sua respectiva vista transversal.

⁵ Ver Lista de Siglas, sessão 6.

- Aquisição e processamento de imagens: Os processos dinâmicos a serem estudados serão filmados com as câmeras digitais acopladas ao JEM-2100. Os quadros (*frames*) serão extraídos usando programas computacionais, analisados usando as ferramentas do DigitalMicrograph™ (Gatan Inc.) e interpretados usando o Java Electron Microscopy Software (JEMS) [22].

4. CRONOGRAMA

Para a realização desta pesquisa propõe-se o período de 12 meses, onde se prevê a realização das atividades de acordo com o cronograma mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Cronograma de trabalho de PIBIC.

| ATIVIDADE | Trimestre | | | |
|-------------------------------|-----------|----|----|----|
| | 1º | 2º | 3º | 4º |
| <i>Preparação de amostras</i> | | | | |
| SEM Inspect | | | | |
| <i>Treinamento</i> | | | | |
| <i>Aquisição de dados</i> | | | | |
| <i>Análise de dados</i> | | | | |
| JEM-2100 | | | | |
| <i>Treinamento</i> | | | | |
| <i>Aquisição de dados</i> | | | | |
| <i>Análise de dados</i> | | | | |
| <i>Redação de resultados</i> | | | | |

5. PESQUISADORES E INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

- Dr. Alexandre Malta Rossi

<http://lattes.cnpq.br/0561802115181270>

Laboratório de Biomateriais (LABIOMAT), Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), Rio de Janeiro, SP, Brasil.

Tipo de apoio: Preparação de amostras e discussão conjunta dos resultados

6. LISTA DE SIGLAS

| | |
|--------|--|
| BF: | Bright-Field |
| CCD: | Charge-Coupled Device |
| CBED: | Convergent-Beam Electron Diffraction |
| DF: | Dark-Field |
| XEDS: | Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy |
| ETEM: | Environmental Transmission Electron Microscopy |
| MEMS: | Micro-Electro-Mechanical Systems |
| HRTEM: | High-Resolution Transmission Electron Microscopy |
| NBD: | Nano Beam Diffraction |
| SAED: | Selected-Area Electron Diffraction |
| SEM: | Scanning Electron Microscopy |
| STEM: | Scanning Transmission Electron Microscopy |
| TEM: | Transmission Electron Microscopy |

7. REFERÊNCIAS

- [1] D. B. Williams, C. B. Carter; *Transmission Electron Microscopy. A Text Book for Materials Science*, Plenum Press, New York, 1996.
- [2] L. Reimer; *Transmission Electron Microscopy*, W.T. Rhodes (Ed.), Springer, Berlin, 1989.
- [3] F. Banhart (Ed.); *In-situ Electron Microscopy at High Resolution*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2008.
- [4] T.W. Hansen, J.B. Wagner, R.E. Dunin-Borkowski; *Mat. Sci. Technol.* **26**, 1338 (2010).

- [5] T.W. Hansen; *Environmental Transmission Electron Microscopy*, IV Curso Teórico-Prático de Microscopia Eletrônica de Transmissão, Campinas, 09 a 27 de Janeiro de 2012.
- [6] <http://www.fei.com/products/transmission-electron-microscopes/titan/etem.aspx>
- [7] A.R. Harutyunyan, G. Chen, T.M. Paronyan, E.M. Pigos, O.A. Kuznetsov, K. Hewaparakrama, S.M. Kim, D. Zakharov, E.A. Stach, G.U. Sumanasekera; *Science* **326**, 116 (2009).
- [8] A. Budruk, C. Phatak, A.K. Petford-Long, and M. De Graef; *Acta Mater.* **59**, 6646 (2011).
- [9] M. De Graef. EPJ B Condensed Matter and Complex Systems, ESOMAT 2009, 01002, (Section 2), 2009.
- [10] S. Meister, D.T. Schoen, M.A. Topinka, A.M. Minor, Yi Cui; *Nano Lett.* **8**, 4562 (2008).
- [11] A.N. Chiamonti, L.J. Thompson, W.F. Egelhoff, B.C. Kabius, A.K. Petford-Long; *Ultramicroscopy* **108**, 1529 (2008).
- [12] US Patent No: 8,059,271. Reusable sample holding device permitting ready loading of very small wet samples.
- [13] US Patent No: 8,102,523. Method of use of reusable sample holding device permitting ready loading of very small wet samples.
- [14] R. Sharma; *Micron, In Press, Corrected Proof* (2012).
- [15] R.Z. LeGeros; *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science* Vol.15. Howard M. Myers (Ed.), Basel, Switzerland, 1991.
- [16] J.C. Elliot; *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry* 18. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1994.
- [17] M. Islam, P.C. Mishra, R. Patel; *J. Environ. Manage.* **91**, 1883 (2010).
- [18] Carlos Alberto Ospina Ramirez; *Estudo por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução de nanopartículas de hidroxiapatita e hidroxiapatita carbonatadas em diferentes estágios de cristalização*. Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Física do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, 2010.

- [19] L. Wang, G.H. Nancollas; *Chem. Rev.* **108**, 4628 (2008).
- [20] J.V. Rau, V.S. Komlev, A. Generosi, M. Fosca, V. Rossi Albertini, S.M. Barinov; *J. Cryst. Growth* **312**, 2113 (2010).
- [21] R. Xin, Y. Leng, N. Wang; *J. Cryst. Growth* **289**, 339 (2006).
- [22] P.A. Stadelmann; *Ultramicroscopy* 21, 131 (1987).