



Soraya Rodrigues dos Santos

**Estudo da determinação da razão Ca/P em
hidroxiapatita por métodos espectrométricos**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da PUC-Rio como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Reinaldo Calixto de Campos

Rio de Janeiro
Junho de 2011



Soraya Rodrigues dos Santos

**Estudo da determinação da razão Ca/P em
hidroxiapatita por métodos espectrométricos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Reinaldo Calixto de Campos

Orientador

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. Alexandre Malta Rossi

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - CBPF

Prof^a. Tatiana Dillenburg Saint´ Pierre

Departamento de Química – PUC-Rio

Prof. José Eugênio Leal

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2011

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Soraya Rodrigues dos Santos

Graduada em Química Industrial pela Universidade Federal Fluminense (UFF) em 2008.

Ficha Catalográfica

Santos, Soraya Rodrigues dos

Estudo da determinação da razão Ca/P em hidroxiapatita por métodos espectrométricos / Soraya Rodrigues dos Santos; orientador: Reinaldo Calixto de Campos. – 2011.

85 f. : il. (color.) ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2011.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Razão Ca/P. 3. Hidroxiapatita. 4. HR-CS AAS. 5. ICP OES. I. Campos, Reinaldo Calixto de. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Dedico esta aos meus avós maternos e aos
meus pais Fernando e Elizabeth

Agradecimentos

Ao meu orientador Reinaldo Calixto, pela oportunidade de crescimento acadêmico, contribuindo para meu aperfeiçoamento profissional, de forma exigente e crítica. Todo meu respeito e admiração.

Ao CNPq, à CAPES e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Em especial ao professor Luna, não só pela ajuda na elaboração e correção dos cálculos estatísticos, mas principalmente por ter representado meu orientador na fase final da dissertação.

A Deus, fonte de toda a sabedoria, criador do céu e da terra e de tudo que há, que sempre esteve e estará presente em todos os momentos de nossas vidas, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força. A Ele dedico essa e muitas outras vitórias que estão por vir.

Aos meus avós, Gilberto e Maria Rosa, minha eterna gratidão por terem me proporcionado chegar até aqui, me incentivando e acreditando no meu potencial. Hoje, tenho a certeza de que, onde vocês estiverem, estarão repartindo comigo esta alegria.

Aos meus pais, Fernando e Elizabeth, que me deram a vida e ensinaram a vivê-la com dignidade. Em especial, à minha mãe, que riu e chorou, que ouviu minhas angústias e se alegrou com minha conquista e que me estimulou a seguir em frente, quando a vontade era de parar.

Ao meu irmão Sherman, espelho de dedicação, que me incentivou a prosseguir em busca de um ideal.

Ao meu primo Carlos Alberto, pela paciência e compreensão, após chegar em casa, cansada de passar horas nos engarrafamentos.

Às minhas amigas Ilene e Andréa, pelo incentivo, apoio e por não terem medido esforços em me ajudar na formatação da dissertação.

A todos do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, em especial à Sílvia e ao Dr. Alexandre Rossi, por terem cedido amostras de hidroxiapatita essenciais à conclusão deste trabalho.

À professora Dr. Tatiana, por ter facilitado o uso do laboratório e ao André e Maurício, por terem me ajudado na realização das análises.

Ao Thiago, pela paciência e pelo conhecimento estatístico, de suma importância para a conclusão deste trabalho.

Ao Rodrigo e ao Douglas pela boa vontade em servir e agradar, e a todos do LAATOM, pela compreensão, tornando possível a realização das minhas atividades.

A todos os meus amigos da PUC-Rio, pela amizade plantada durante esse tempo de convívio e pela ajuda essencial na conclusão das disciplinas obrigatórias.

À Carolina, minha grande amiga, por ter me ajudado na parte experimental e por ter me acolhido várias vezes em sua casa, poupando-me do cansaço de ter que percorrer o trajeto diário Gávea-Niterói.

Aos demais familiares, amigos da UFF e da Perícia Criminal que, indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui.

Ao Departamento de Química, em especial à Fátima, pela dedicação e pela lembrança dos prazos importantes.

Resumo

Santos, Soraya R. dos; Campos, Reinaldo, Calixto. **Estudo da determinação da razão Ca/P em hidroxiapatita por métodos espectrométricos**. Rio de Janeiro, 2011. 85p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A hidroxiapatita (Hap) é um mineral bastante estudado, devido à sua excelente biocompatibilidade e similaridade química com a porção mineral do osso humano. A hidroxiapatita estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67, pode ser de origem natural ou sintética. Os processos de fabricação são os mais diversos e a qualidade do produto dependente da natureza dos reagentes e dos parâmetros utilizados no processo, sendo importante, posteriormente, a sua caracterização estrutural e elemental. O presente trabalho tem como objetivo estudar a determinação da razão Ca/P em hidroxiapatita utilizando duas técnicas analíticas distintas: espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). No caso da HR-CS AAS, os parâmetros instrumentais estudados foram vazão de acetileno, altura do queimador, taxa de aspiração e em seguida, número de pixels e tempo de integração. Já na técnica de ICP-OES, os parâmetros foram taxa de aspiração, potência da radiofrequência e vazão do gás de nebulização. Foi realizada uma otimização multivariada e as condições ótimas para cada parâmetro estudado foram determinadas pela função desejabilidade. O meio de leitura por HR-CS AAS para o cálcio foi uma solução HNO_3 0,2 % v/v e KCl 1% m/v e, para o fósforo, HNO_3 5% e KCl 0,1%, já por ICP OES só foi empregado o HNO_3 nas concentrações já especificadas. A maior contribuição à incerteza do resultado final foi devido às soluções de calibração. Uma amostra de hidroxiapatita, produzida no Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) apresentou resultados de suas razões molares concordantes quando analisada pelas técnicas empregadas neste trabalho.

Palavras-chave

Razão Ca/P; hidroxiapatita; HR-CS AAS; ICP OES.

Abstract

Santos, Soraya. R. dos.; Campos, Reinaldo Calixto. (Advisor). **Study for determination of the Ca/P ratio in hydroxyapatite by spectrometric methods.** Rio de Janeiro, 2011. 85 p. MSc. Dissertation – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Hydroxyapatite is a widely studied mineral due to its excellent biocompatibility and chemical similarity with the mineral portion of human bone. Stoichiometric hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ with a Ca/P ratio of 1.67 can be natural or synthetic. Its manufacturing processes are diverse and the final product depends on the mineral type and the parameters used in the process, and subsequent structural and elemental characterizations are important. This study aims to determine hydroxyapatite Ca/P ratios by using two different analytical techniques: HR-CS AAS and ICP OES. In the case of HR-CS AAS the following instrumental parameters were studied: acetylene flow rate, burner height, rate of aspiration, pixels and integration time. In the ICP-OES technique, the parameters were rate of aspiration, radiofrequency power and nebulizer gas flow rate. We performed a multivariate optimization and optimal conditions for each studied parameter were determined by the function of desirability. The HR-CS AAS measurements for calcium were conducted in a medium containing HNO_3 0.2 % v/v and KCl 1 % m/v and, for phosphorous, a medium containing HNO_3 5% and KCl 0.1% was used. For the ICP OES measurements we used only HNO_3 at the concentrations specified above. The major contribution to the uncertainty of the final results was from the calibration solutions. A hydroxiapatite sample, produced in the Biomaterial Laboratory at the Brazilian Center for Physical Research (CBPF), presented compatible molar ratio results among themselves when analyzed by the techniques utilized in the present study.

Keywords

Ca/P ratio; hydroxyapatite; HR-CS AAS; ICP OES.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A hidroxiapatita e a importância da determinação da razão Ca/P em seus estudos	16
1.2 Métodos utilizados na determinação da razão Ca/P e suas limitações	21
1.3 Alguns aspectos relevantes para o presente trabalho relativos à determinação de cálcio e fósforo por espectrometria atômica	24
1.3.1 Absorção atômica com fonte contínua	24
1.3.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	26
1.4 Aspectos metrológicos das medidas em espectrometria atômica	29
1.5 Objetivos	31
1.5.1 Objetivo Geral	31
1.5.2 Objetivos Específicos	31
2 PARTE EXPERIMENTAL	32
2.1 Instrumentação	32
2.1.1 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS)	32
2.1.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	33
2.2 Reagentes, soluções e amostra	34
2.3 Procedimentos	35
2.3.1 Preparação da amostra	35
2.3.2 Curvas de calibração do cálcio e fósforo	35
2.3.3 Otimização	36
2.3.4 Estudos de exatidão em HR-CS AAS e ICP OES	36

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1. Estratégia metodológica	37
3.2. Determinação da razão Ca/P por HR-CS AAS	38
3.2.1 Otimização da determinação de cálcio em chama C ₂ H ₂ -N ₂ O por HR-CS AAS	38
3.2.2 Otimização da determinação de fósforo utilizando a banda molecular PO e chama C ₂ H ₂ -N ₂ O por HR-CS AAS	48
3.3 Determinação da razão Ca/P por ICP OES	57
3.3.1 Otimização da determinação de cálcio por ICP OES (vista radial)	57
3.4 Determinação da razão Ca/P em uma amostra nas condições otimizadas	62
 4 AVALIAÇÃO METROLÓGICA DOS MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS UTILIZADOS QUANTO À SUA ADEQUAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE RAZÕES Ca/P EM AMOSTRA DE HIDROXIAPATITA	 66
 5 CONCLUSÕES	 72
 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 74
 7 APÊNDICES	 81

Lista de figuras

Figura 1 – Representação esquemática do HR-CS AAS	33
Figura 2 – Representação esquemática simplificada do sistema óptico do ICP OES	34
Figura 3 – Curvas de nível da razão sinal/ruído para a 1ª etapa da otimização da determinação de cálcio em hidroxiapatita	43
Figura 4 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento composto central	44
Figura 5 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento composto central	47
Figura 6 – Superfície de resposta da função desejabilidade global (D)	48
Figura 7 – Espectro da molécula de PO	49
Figura 8 – Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) da razão sinal/ruído para a 1ª etapa da otimização da determinação de fósforo (PO) por HR-CS AAS com vazão de acetileno fixada em 170 L h ⁻¹	52
Figura 9 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da função de desejabilidade para o planejamento fatorial 3 ²	53
Figura 10 – Superfície de resposta da razão sinal/ruído para a 2ª etapa da otimização da determinação de fósforo (PO) por HR-CS AAS	55
Figura 11 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento fatorial 3 ²	56
Figura 12 – Superfícies de resposta da razão sinal/ruído para a otimização do cálcio e fósforo por ICP OES	60
Figura 13 – Perfil dos valores previstos/otimizados e da desejabilidade para o planejamento fatorial 3 ³	61
Figura 14 – Curva de calibração para cálcio por HR-CS AAS, preparada a partir da diluição de uma solução 1000 mg L ⁻¹	

cálcio, $A=0,2285 (\pm 0,0012)$ C, $R^2=0,9996$	62
Figura 15 – Curva de calibração para o fósforo por HR-CS AAS utilizando sua banda molecular de 324,62 nm preparada a partir da dissolução do sal $\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$, $A= 1\text{E}-05 (\pm 6,2\text{E}-08)$ C, $R^2=0,9994$	63
Figura 16 – Curva de calibração para o cálcio (vista axial) por ICP OES; $I=275709 (\pm 1541,7)$ C; $R^2= 0,9993$	63
Figura 17 – Curva de calibração para o fósforo (vista axial) por ICP OES; $I=387,2 (\pm 1,59)$ C; $R^2= 0,9999$	64
Figura 18 – Diagrama de causa e efeito	66
Figura 19 – Fontes de incerteza na determinação de cálcio em hidroxiapatita por HR-CS AAS	68
Figura 20 – Fontes de incerteza na determinação de fósforo em hidroxiapatita por HR-CS AAS usando a banda de PO	69
Figura 21 – Fontes de incerteza na determinação de cálcio em hidroxiapatita por ICP OES	70
Figura 22 – Fontes de incerteza na determinação de fósforo em hidroxiapatita por ICP OES	71

Lista de tabelas

Tabela 1 – Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio [14]	18
Tabela 2 – Métodos utilizados na determinação da razão Ca/P em hidroxiapatitas	19
Tabela 3 – Parâmetros e intervalos investigados na otimização da determinação de cálcio em hidroxiapatita por HR-CS AAS	39
Tabela 4 – Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento composto central 2^3	41
Tabela 5 – ANOVA para o planejamento composto central 2^3	42
Tabela 6 – Parâmetros investigados e seus respectivos valores otimizados	45
Tabela 7 – Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento composto central 2^2	46
Tabela 8 – ANOVA para o planejamento composto central 2^2	46
Tabela 9 – Parâmetros e valores investigados na determinação de fósforo (PO) em hidroxiapatita por HR-CS AAS	50
Tabela 10- Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial 3^2	51
Tabela 11 - ANOVA para o planejamento fatorial 3^2	51
Tabela 12 - Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial 3^2	54
Tabela 13 - ANOVA para o planejamento fatorial 3^2	54
Tabela 14 - Parâmetros experimentais e respectivos valores empregados na otimização do método para determinação do cálcio e fósforo em hidroxiapatita, por ICP OES empregando-se as configurações radial e axial, respectivamente	57
Tabela 15 - Estimativa dos efeitos e coeficientes para o planejamento fatorial 3^3	59
Tabela 16 – Valores (mg L^{-1}) dos limites de detecção e quantificação instrumentais para o cálcio e fósforo empregando-se as técnicas de HR-CSAAS e	

ICP OES (visão axial)	64
Tabela 17 – Razões Ca/P obtidas por diferentes métodos	65
Tabela 18 – Fontes de incerteza estimadas consideradas para a determinação da concentração de cálcio por HR-CS AAS	68
Tabela 19 – Fontes de incerteza estimadas consideradas para a determinação da concentração de fósforo em hidroxiapatita por HR-CS AAS	69
Tabela 20 – Fontes de incerteza estimadas consideradas para a determinação da concentração de cálcio em hidroxiapatita por ICP OES	70
Tabela 21 – Fontes de incerteza estimadas consideradas para a determinação da concentração de fósforo em hidroxiapatita por ICP OES	70

Lista de Abreviaturas

AAS	Espectrometria de absorção atômica
AES	Espectroscopia de elétrons auger
EDL	Lâmpada de descarga sem eletrodo
EDS	Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
Hap	Hidroxiapatita
HCL	Lâmpada de catodo oco
HR-CS AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua
ICP-DRC-MS	Espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado equipado com célula de reação
ICP MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
INAA	Análise instrumental por ativação com nêutrons
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LS AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte de linhas
RF	Radiofrequência
UV-Vis	Espectrofotometria de ultravioleta-visível
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons de raios –X