

**PROJETO – DE – PESQUISA**  
**Programa de Iniciação científica e Tecnológica**  
**CBPF**

Nome do pesquisador ou tecnologista (orientador interno):

**Gisele Maria Leite Dalmonico**

Coordenação: **COMAN**

Título do projeto 1: **Produção de grades para Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Título do projeto 2: **Análise da Escala Submicrométrica e Nanométrica de Biomateriais por Técnicas Avançadas em Microscopia Eletrônica e de Suas Aplicações em Testes *In Vivo*.**

Título do projeto 3: **Estudo da Influência da Aplicação de Plasma no Processo de Cristalização de Biocerâmicas, Variação de Parâmetros de Síntese e de Superfície.**

Palavra-chave: **Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopias, CryoTEM, *In situ* TEM.**

Área de conhecimento: **Engenharia de Materiais**

Pré-requisito desejado (se houver):

Possibilidade de orientação remota: (x) Sim ( ) Não

Resultante principal do Projeto:

(x) Publicação (horizonte de 4 anos).

(x) Preparação do bolsista para área científica.

(x) Produto tecnológico.

( ) Produto educacional ou didático.

**Projeto 1**

**Produção de grades para Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Atualmente o Brasil importa a maior parte dos produtos necessários para as pesquisas na área de microscopia eletrônica assim como em muitas outras áreas. Desde produtos de alta tecnologia, como os microscópios eletrônicos e câmeras CCD, ou detectores de elétrons diretos, assim como produtos mais simples, como grades de MET revestidas por filmes finos, pinças e porta-objetos. A área de instrumentação na microscopia é incipiente ou mesmo inexistente. Essa constatação reflete um cenário brasileiro no qual exportamos

**Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas**

Rua Doutor Xavier Sigaud, 150, URCA, Rio de Janeiro, Brasil Tel.: +55 21 2141-7100  
CEP:22290-180

<http://www.cbpf.br>

Rio de Janeiro, 24 de novembro de 2022

produtos primários e importamos produtos industrializados. Desta forma, a seguir, 2 projetos voltados a desenvolvimentos de produtos visando diminuir a dependência brasileira de produtos importados.

### **1.1. Produção de grades para Crio-MET**

Na MET, as amostras devem ser finas ( $< 100$  nm) para que sejam transparentes ao feixe de elétrons e adaptadas em seu tamanho para que possam ser utilizadas em grades de MET com 3 mm de diâmetro. Geralmente são usadas grades de cobre, níquel ou ouro de 3 mm, recobertas por filmes finos de carbono, formar ou SiN. Estes filmes suportam amostras, nanopartículas ou cortes ultrafinos a serem estudados no MET. Grades de diferentes composições e filmes de diferentes tipos e espessuras estão disponíveis comercialmente. O objetivo deste projeto é desenvolver grades com “filmes absorventes”, com o objetivo de remover parte do líquido de soluções para o congelamento ultrarrápido das grades e uso na Crio-MET. O objetivo é produzir um filme ultrafino de água congelada no estado amorfo. O filme absorvente é formado por cristais de cobre (Cu) e ródio (Rh), formando estruturas alongadas e absorventes. Ao inserir pequenos volumes de amostra nestas grades, os fios atuam efetivamente como absorvente, dissipando rapidamente o líquido, formando uma fina película, dispensando o uso do vitrobot, no caso de amostras congeladas. Os filmes absorventes irão auxiliar não apenas no congelamento de amostras, mas em outras amostras frágeis que acumulem carga e contaminação, fazendo o papel da técnica “beam shower”. Este tipo de preparação é uma ótima opção para análises de EELS, por exemplo, que necessitem de um gelo muito fino para análises espectroscópicas de elementos leves, podendo diferenciar ligações do oxigênio da água com o oxigênio que faça parte do material analisado.

### **1.2. Desenvolvimento de célula líquida para MET**

Uso de grades de SiN vedadas com presilhas para visualização de amostras líquidas no MET sem a necessidade de porta-objetos *in situ*. Nesta técnica 2 grades de MET, uma com de NiN e outra de carbono irão fazer um “sanduíche”, retendo o líquido reacional entre elas. O sistema é vedado utilizando uma presilha “Clamp” (ThermoFisher), evitando que o líquido vaze no MET e a reação possa ser observada. A montagem do sistema ocorrerá da seguinte forma: i) será adicionada a solução em uma das grades, ii) outra grade será colocada em cima formando o sanduíche e iii) as 2 grades serão clipadas juntas, retendo o líquido em seu interior. Esse é um sistema como opção para estudos *in situ* em meio líquido para análise por MET. Testes de vedação na estação do plasma cleaner do CBPF serão realizados, de modo a verificar a vedação do sistema. Esta técnica alternativa possibilitará avançarmos nos estudos de cristalização *in situ* em meio líquido, e podem ser associadas a tomografia de elétrons, utilizando porta amostras de tomografia que o CBPF possui.

## **2. Materiais**

Os filmes e grades serão sintetizadas no Laboratório de Nano e Micro Materiais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF

### **Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas**

Rua Doutor Xavier Sigaud, 150, URCA, Rio de Janeiro, Brasil Tel.: +55 21 2141-7100  
CEP:22290-180

<http://www.cbpf.br>

Rio de Janeiro, 24 de novembro de 2022

### 3. Resultados Esperados

- Desenvolver grades de Microscopia eletrônica de Transmissão que possam ser aplicadas para diferentes tipos de materiais
- Desenvolver uma técnica alternativa para *in situ* de célula líquida.

**Observação:** o plano de trabalho poderá ser adaptado de acordo com o andamento do projeto, podendo sofrer algumas alterações no cronograma de acordo com os resultados obtidos.

## Projeto 2

### 1. Estudo de Biomateriais por Microscopia Eletrônica e de suas Aplicações *in vivo*

Existem vários tipos de biomateriais que se destacam como substitutos em tratamentos da estrutura óssea estão os fosfatos de cálcio. A hidroxiapatita, um tipo de fosfato de cálcio, tem demonstrado excelentes resultados em diversas aplicações ortopédicas. Esse destaque como substituto ósseo se deve à sua cristalografia, que é semelhante à apatita óssea do esqueleto humano, tornando-a bioativa e biocompatível. Neste estudo, utilizaremos diversas técnicas avançadas de caracterização por microscopia eletrônica para analisar tanto o biomaterial como sua aplicação na osseointegração da hidroxiapatita. Neste estudo as microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão serão fundamentais nesse estudo, assim como técnicas associadas como a difração de elétrons, espectroscopias, além do uso de porta amostras de criomicroscopia CryoTEM e *in situ* TEM com o objetivo de analisar os materiais em tempo real.

Como objetivo, será avaliado o desempenho dos biomateriais, a estrutura do mineral ósseo formado, as direções preferenciais de crescimento cristalográfico e o processo geral de formação óssea ao longo do tempo. As técnicas de caracterização utilizadas neste estudo permitirão estimar a orientação cristalográfica preferencial do crescimento ósseo com o passar do tempo.

### 2. Materiais

As nanopartículas de fosfatos de cálcio utilizados neste estudo serão sintetizadas nos laboratórios: Laboratório de Nano e Micro Materiais e Laboratório de Materiais Biocerâmicos. As caracterizações serão realizadas no laboratório de microscopia eletrônica do LabNano, todos do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF

### 3. Metodologia

O projeto será dividido em 2 etapas. A primeira está relacionado ao estudo experimental dos biomateriais, que envolve a síntese, caracterização, preparo das amostras e caracterização por técnicas avançadas de microscopia eletrônica, como CryoTEM e *in situ* TEM. Na segunda etapa, os materiais que já foram aplicados *in vivo*, serão preparados para serem caracterizados por microscopia eletrônica, assim como o preparo no FIB (slice view) para reconstrução da estrutura óssea por 3D. Serão avaliados os testes de atividade biológica e as caracterizações físico-química e mecânica.

#### Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

Rua Doutor Xavier Sigaud, 150, URCA, Rio de Janeiro, Brasil Tel.: +55 21 2141-7100  
CEP:22290-180

<http://www.cbpf.br>

Rio de Janeiro, 24 de novembro de 2022

Serão ajustas as condições de síntese dos bioamateriais para análise por criomicroscopia eletrônica de transmissão e *in situ* de aquecimento para analisar as mudanças cristalográficas do material ao ser aquecido a altas temperaturas.

As técnicas de caracterização a serem utilizadas serão:

- Análise química por DRX e XPS da síntese das nanopartículas de fosfato de cálcio
- Ângulo de contato (AG): Monitorar a molhabilidade do material para avaliar o potencial crescimento celular e associar aos resultados dos testes *in vivo*.
- Análise *in situ* de aquecimento e Análise Termogravimétrica (TGA): técnicas associadas para análise das propriedades térmicas do material
- Ensaio de citotoxicidade: meio de cultura  $\alpha$ -MEM com SFB, por 24h, a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
- Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão: Imagem de campo claro, campo escuro, SE, BSE e espectroscopias EDS, EELS. Além do uso dos porta amostras de CryoTEM e *in situ* TEM.

#### **4. Resultados Esperados**

- Aprender como utilizar microscopia eletrônica e técnicas avançadas associadas para uso na caracterização de materiais, biomateriais e materiais biológicos.
- Entender como os materiais são formados a partir de técnicas *in situ*.
- Entender como ocorre o crescimento preferencial do osso saudável.

**Observação:** o plano de trabalho poderá ser adaptado de acordo com o andamento do projeto, podendo sofrer algumas alterações no cronograma de acordo com os resultados obtidos.

### **Projeto 3**

#### **1. Estudo da Influência da Aplicação de Plasma no Processo de Cristalização de Biocerâmicas, Variação de Parâmetros de Síntese e de Superfície.**

A cristalização de fosfatos de cálcio, em especial da hidroxiapatita (HA), é altamente sensível às condições de síntese, como pH, temperatura, natureza dos precursores e cargas superficiais são geradas durante a síntese. O uso do plasma é uma opção para modificar cargas superficiais, permitindo a introdução de grupos funcionais e o controle da nucleação, impactando diretamente a morfologia, a cristalinidade e a bioatividade de materiais.

Esse estudo propõe avaliar como diferentes parâmetros de síntese de fosfatos de cálcio, associados ao tratamento por plasma, e verificar a influência na cristalização, orientação cristalográfica e a estrutura de superfície dos materiais obtidos. A caracterização será realizada por técnicas avançadas de microscopia eletrônica, permitindo correlacionar as mudanças estruturais e químicas com o potencial de aplicação biomédica desses materiais, especialmente em regeneração óssea.

#### **Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas**

Rua Doutor Xavier Sigaud, 150, URCA, Rio de Janeiro, Brasil Tel.: +55 21 2141-7100  
CEP:22290-180

<http://www.cbpf.br>

Rio de Janeiro, 24 de novembro de 2022

## **2. Materiais**

Síntese: Nanopartículas de fosfatos de cálcio (principalmente hidroxiapatita) serão sintetizadas variando-se pH, tempo de reação e precursores (CaO, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> com e sem NaOH).

Tratamento: Parte dos materiais será submetida a plasma atmosférico para modificação superficial e indução de nucleação/cristalização.

Laboratórios envolvidos:

Laboratório de Nano e Micro Materiais (CBPF)

Laboratório de Materiais Biocerâmicos (CBPF)

Laboratório de Microscopia Eletrônica do LabNano-CBPF

## **3. Metodologia**

O projeto será dividido em três etapas principais:

Etapa 1 – Síntese e tratamento

Síntese controlada de fosfatos de cálcio variando pH, concentração dos reagentes e tempo de reação.

Tratamento com plasma atmosférico para modificação superficial e indução de cristalização.

Etapa 2 – Caracterização físico-química

DRX: Determinar fase cristalina e grau de cristalinidade.

XPS e FTIR: Avaliar grupos funcionais induzidos pelo plasma.

Ângulo de contato: Analisar molhabilidade e possíveis implicações na adesão celular.

TGA/DSC: Avaliar estabilidade térmica e transformações de fase.

Etapa 3 – Microscopia eletrônica avançada

MEV e MET: Imagens de morfologia, campo claro/escuro, SE, BSE.

Espectroscopias (EDS, EELS): Análise química e mapeamento elementar.

CryoTEM e in situ TEM de aquecimento: Avaliar transformações cristalográficas em tempo real.

FIB (slice & view): Preparar amostras e reconstruções 3D de regiões tratadas.

## **4. Resultados Esperados**

Compreender a influência do plasma sobre a cristalização e a morfologia das biocerâmicas.

Correlacionar parâmetros de síntese e modificação superficial com propriedades químicas, estruturais e cristalográficas.

Obter reconstruções tridimensionais de regiões tratadas por plasma para análise detalhada da estrutura.

Contribuir para o desenvolvimento de biocerâmicas avançadas, com maior controle estrutural e melhor desempenho em aplicações biomédicas.

Observação: O plano de trabalho poderá ser adaptado de acordo com os resultados experimentais, garantindo flexibilidade metodológica.

## **Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas**

Rua Doutor Xavier Sigaud, 150, URCA, Rio de Janeiro, Brasil Tel.: +55 21 2141-7100  
CEP:22290-180

<http://www.cbpf.br>

Rio de Janeiro, 24 de novembro de 2022