



**Ana Filipa Ferreira Esteves**

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

**Estudo das Propriedades Elétricas de Filmes de Quitosano  
e Quitosano/Hidroxiapatite para Possíveis Aplicações em  
Implantes ósseos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria do Carmo Lança (DCM, FCT-UNL)

Co-orientador: Prof.<sup>o</sup> Doutor João Paulo Borges (DCM, FCT-UNL)



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março, 2016**



**Estudo das propriedades elétricas de filmes de quitosano e quitosano/hidroxiapatite para possíveis aplicações em implantes ósseos**

Copyright © Ana Filipa Ferreira Esteves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,  
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.”*

**Charles Chaplin**



# Agradecimentos

---

Gostaria de começar por agradecer à Orientadora e Professora Doutora Maria do Carmo Lança e ao Co-Orientador e Professor Doutor João Paulo Borges por todo o apoio e dedicação que me prestaram ao longo deste percurso. Pela oportunidade que me foi dada em poder trabalhar com os Professores, que muito me ensinaram e ajudaram, o meu muito obrigada!

Ao Professor Doutor Jorge Silva, agradeço a simpatia, a disponibilidade para trabalhar comigo, a ajuda e todos os conhecimentos e conselhos que me transmitiu.

Agradeço ao Departamento de Ciências dos Materiais da FCT-UNL e ao CENIMAT/I3N as atenções que tiveram para comigo que muito contribuíram para a realização do presente trabalho.

Agradeço às ex-Bolseiras do Projeto POLARBONE, Ana Cláudia Videira e Ana Filipa Correia, que, apesar do pouco tempo em que pudemos trabalhar juntas, me ajudaram a familiarizar-me com os equipamentos do laboratório que usei ao longo de todo o trabalho. Prontificaram-se sempre a demonstrar-me os procedimentos que estavam a realizar, permitindo que colocasse todas as questões que tivesse.

Queria agradecer às pessoas que pude conhecer ao longo da elaboração desta dissertação. À Doutora Ana Baptista, à Cláudia, à Inês Ropio, ao Filipe Silvestre, à Filipa Belo, ao Tomás Correia, à Susana Oliveira, à Susana Marques, ao João Carmo, à Mariana Amaro e à D. Augusta. Muito obrigada por toda a entajuda, por todo o apoio, por toda a disponibilidade, pela boa disposição, pelas playlists inesquecíveis que ouvimos dias e dias a fio e por todos os bons momentos que irei sempre recordar.

Ao Bernardo, ao Diogo Braga, ao Filipe Mealha e à Liliana obrigada por todas as horas de almoço com boa disposição, por todas as horas de trabalho juntos, por todo o apoio e, sobretudo, pela amizade que construímos.

À família Fertagus: à Débora, ao Gonçalo, à Joana, à Luísa e à Soraia. Obrigada pela amizade e pelos muitos bons momentos que passámos, juntos, ao longo destes anos de curso.

À Maria Portugal e à Ana Fradinho por todas brincadeiras, por todo o companheirismo e pela amizade.

Ao meu irmão de coração, Tonel, obrigada por teres marcado a minha vida, por teres sido inspirador, por me teres mostrado que os guerreiros marcam a História e por seres a estrelinha que sempre estará lá, a torcer por mim, cheio de orgulho.

Às minhas irmãs de coração, Ana Lúcia e Caty, obrigada por tudo, por todos os momentos que passámos juntas, por terem estado sempre que precisei, por serem as minhas irmãs. No fundo, obrigada por esta bonita amizade que construímos ao longo destes quase 6 anos e que espero que continuemos a construir pela vida fora.

Queria agradecer a dois dos elementos do “quarteto fantástico”, à Tânia, minha parceira, e ao Luís, por estarem sempre, sempre lá, por me apoiarem, por me ensinarem a crescer, por todas as gargalhadas e por serem de quase sempre e para sempre.

Aos meus Pais pelo amor e apoio incondicionais! Por terem feito de mim a pessoa que sou hoje! Por nesta, como em todas as outras etapas da minha vida, terem estado sempre ao meu lado, por me terem dado os melhores conselhos e por serem as pessoas extraordinárias que são. Muito obrigada é pouco para agradecer tudo o que vocês fazem por mim, todos os dias.

Ao meu irmão, João, obrigada pelo exemplo que és para mim! Obrigada por todos os conselhos, por toda a motivação e, sobretudo, obrigada por acreditares.

Agradeço à restante família pela força e carinho que me transmitiram durante a realização do presente trabalho.

E, por último e não menos importante, ao meu namorado André por ser a pessoa mais incrível que conheço. Obrigada por estares em todos os momentos, obrigada pela paciência, por toda a preocupação e por todo o amor.

# Resumo

---

O aumento de doenças e fraturas ósseas tem suscitado um grande interesse no desenvolvimento de biomateriais para aplicação em substituição e regeneração ósseas.

Tem aumentado recentemente o interesse em aliar o quitosano, um polímero natural biocompatível, biodegradável e flexível, à hidroxiapatite, um biocerâmico bioativo, osteocondutor e com boas propriedades mecânicas. Simultaneamente, vários estudos demonstram, que polarizando a hidroxiapatite, há uma melhoria da osteointegração e, conseqüentemente, da regeneração óssea.

O presente trabalho centrou-se no estudo da influência da polarização elétrica na bioatividade de filmes de quitosano e quitosano/hidroxiapatite.

Produziram-se filmes de quitosano e quitosano/hidroxiapatite, preparando soluções homogêneas que foram vertidas em caixas de Petri e secas. Algumas amostras foram polarizadas a 130°C, durante 1 hora, sob ação de um campo elétrico constante de 4.5 kV/cm. Amostras polarizadas e não polarizadas foram caracterizadas quanto às propriedades morfológicas, estruturais e elétricas. Por fim, realizaram-se ensaios de bioatividade, onde se procedeu à imersão de amostras numa solução simuladora do fluido corporal, SBF, a 37°C. Decorridos estes ensaios, as superfícies de amostras não polarizadas e polarizadas positiva e negativamente foram caracterizadas através de Microscopia Eletrônica de Varrimento com Espectrometria de Energia Dispersiva de raios-X, SEM-EDS, para se avaliar e comparar a deposição de cristais apatíticos, de modo a concluir qual das superfícies promoveria uma maior osteointegração.

**Palavras-chave:** Regeneração Óssea; Quitosano; Hidroxiapatite; Filmes; Polarização Elétrica; Ensaio de Bioatividade.

---



# Abstract

---

The increase of bone diseases and fractures has evoked great interest in the development of biomaterials for use in bone replacement and regeneration.

Recently has increased the interest in combining chitosan, a natural polymer, biocompatible, biodegradable and flexible, with hydroxyapatite, a bioactive bioceramic, osteoconductive and with good mechanical properties. Simultaneously, several studies have shown that by polarizing hydroxyapatite, there is an improvement in osteointegration and therefore in bone regeneration.

This work focused on the study of the influence of the electric polarization in the bioactivity of chitosan and chitosan / hydroxyapatite films.

Chitosan and chitosan / hydroxyapatite films were produced by preparing homogeneous solutions that were poured into Petri dishes and subsequently dried. Some samples were polarized at 130°C for 1 hour under the action of a 4.5 kV/cm constant electric field. Polarized and non-polarized samples were characterized in terms of morphological, structural and electrical properties. Finally, bioactivity assays were conducted by immersing samples in simulated body fluid solution, SBF at 37°C. Afterwards, non-polarized, positive and negative polarized surfaces were characterized by Scanning Electron Microscopy with Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, SEM-EDS, to evaluate and compare the deposition of apatite crystals in order to determine which surface would promote a greater osteointegration.

**Keywords:** Bone Regeneration; Chitosan; Hydroxyapatite; Films; Electric Polarization; Bioactivity Assays.

---



# Índice

<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 ENQUADRAMENTO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. O Osso .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Matriz Celular do Tecido Ósseo .....	3
2.1.2. Componentes da Matriz Extracelular Óssea .....	4
2.1.3. Remodelação do Tecido Ósseo .....	5
2.1.4. Piezoelectricidade do Osso .....	5
<b>2.2. Biomaterial.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.Polímeros.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4.Quitina e Quitosano .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5.Biocerâmicos – Fosfatos de Cálcio .....</b>	<b>10</b>
2.5.1.Hidroxiapatite .....	10
<b>2.6.Compósitos CS/HAp .....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Materiais .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. Princípios Básicos das Técnicas de Produção e Caracterização .....</b>	<b>17</b>
3.2.1.Técnica de Eletrofição para Produção de Membranas .....	17
3.2.2. Técnicas de Caracterização Morfológica e Estrutural das Amostras.....	19
3.2.2.1. SEM.....	19
3.2.2.2. FTIR.....	20
3.2.2.3. DRX.....	20
3.2.2.4. Análise Diferencial Calorimétrica e Termogravimetria (DSC-TGA) .....	21
3.2.3. Caracterização Elétrica das Amostras .....	22
3.2.3.1. Correntes de Descarga Termoestimuladas (TSDC) .....	22
3.2.4. Ensaio de Bioatividade .....	24
<b>3.3. Métodos .....</b>	<b>13</b>
3.3.1. Método de Produção de Soluções para Membranas de Eletrofição.....	13
3.3.1.1. Solução para Produção da Membrana de Quitosano .....	13
3.3.2. Método de Produção de Filmes .....	13
3.3.2.1. Produção de Filmes de CS.....	14
3.3.2.2. Produção de Filmes de CS70/HAp30 .....	14
3.3.2.3. Produção de Filmes de CS50/HAp50 .....	14
3.3.3. Métodos de Caracterização das Amostras.....	14
3.3.3.1.SEM.....	14
3.3.3.2.FTIR.....	15

3.3.3.3.DRX.....	15
3.3.3.4.DSC-TGA.....	15
3.3.3.5.TSDC.....	15
3.3.3.6.Ensaio de Bioatividade .....	16
<b>CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
4.1. Membranas de Quitosano Produzidas pela Técnica de Eletrofiação.....	25
4.2. Filmes de Quitosano e Quitosano/Hidroxiapatite .....	27
4.3. FTIR.....	27
4.4. DRX.....	31
4.5. DSC-TGA.....	33
4.6. TSDC.....	34
4.7. Ensaio de Bioatividade .....	44
<b>CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO I - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>59</b>

# Índice de Figuras

FIGURA 2.1 ORIGEM E LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA MATRIZ EXTRACELULAR DO TECIDO ÓSSEO.....	4
FIGURA 2.2 NO EFEITO DIRETO, UMA FORÇA COMPRESSIVA (A) OU DISTENSIVA (B).....	5
FIGURA 2.3 ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITINA E DO QUITOSANO.....	8
FIGURA 2.4 TIPOS DE ESTRUTURAS POSSÍVEIS DE PRODUZIR COM QUITOSANO.....	9
FIGURA 2.5 SUBSTITUIÇÕES IÔNICAS POSSÍVEIS DA HAP BIOLÓGICA.....	11
FIGURA 3.1 MONTAGEM DA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO.....	14
FIGURA 3.2 PICO INERENTE DE CORRENTE . .....	18
FIGURA 3.3 REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DA TSDC.....	20
FIGURA 4.1 MEMBRANA DE QUITOSANO .....	26
FIGURA 4.2 MEMBRANA DE QUITOSANO .....	26
FIGURA 4.3 FILMES DE CS, CS70/HAP30 E CS50/HAP50.....	27
FIGURA 4.4 ESPECTRO DE FTIR DOS NANOPÓS DE HAP PRODUZIDOS PELO MÉTODO SOL-GEL. ....	28
FIGURA 4.5 AMPLIAÇÃO DOS NÚMEROS DE ONDA MAIS BAIXOS DO ESPECTRO DE FTIR DA FIGURA 4.5.....	28
FIGURA 4.6 AMPLIAÇÃO DOS NÚMEROS DE ONDA MAIS BAIXOS DO ESPECTRO DE FTIR DA FIGURA 4.7. ....	29
FIGURA 4.7 ESPECTRO DE FTIR DAS DIFERENTES AMOSTRAS PRODUZIDAS. ....	30
FIGURA 4.8 DIFRACTOGRAMA DOS NANOPÓS DE HAP SIMETRIZADOS A 700°C. ....	31
FIGURA 4.9 DIFRACTOGRAMA DAS AMOSTRAS DE CS.....	32
FIGURA 4.10 DIFRACTOGRAMA DAS AMOSTRAS DE CS E CS70/HAP30 PRODUZIDAS.....	33
FIGURA 4.11 DIFRACTOGRAMA DE DSC-TGA DE UMA AMOSTRA DE CS. ....	34
FIGURA 4.12 COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TSDC .....	35
FIGURA 4.13 MÉDIA DOS ESPECTROS DE TSDC DAS AMOSTRAS DE CS .....	36
FIGURA 4.14 AMPLIAÇÃO DO TSDC DA FIGURA 4.14 PARA TEMPERATURAS ENTRE 110°C E 180°C. ....	37
FIGURA 4.15 ESTUDO DE DECAIMENTO DE CARGA ATRAVÉS DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DE TSDC .....	39
FIGURA 4.16 ESTUDO DE DECAIMENTO DE CARGA ATRAVÉS DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DE TSDC .....	41
FIGURA 4.17 MÉDIA DOS ESPECTROS DE TSDC DAS AMOSTRAS DE CS70/HAP30.....	42
FIGURA 4.18 ESTUDO DE DECAIMENTO DE CARGA ATRAVÉS DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DE TSDC .....	43
FIGURA 4.19 ESTUDO DE DECAIMENTO DE CARGA ATRAVÉS DAS MÉDIAS DOS ESPECTROS DE TSDC .....	44
FIGURA 4.20 IMAGENS DE SEM DAS AMOSTRAS DE CS IMERSAS 7 DIAS EM SBF .....	45
FIGURA 4.21 IMAGEM DE SEM DE UMA AMOSTRA DE CS , IMERSA 7 DIAS EM SBF.....	46
FIGURA 4.22 IMAGENS DE SEM DE AMOSTRAS DE CS, POLARIZADAS NEGATIVAMENTE, E IMERSAS EM SBF.....	47
FIGURA 4.23 IMAGENS DE SEM, COM AMPLIAÇÃO DE 200 NM, DAS AMOSTRAS DE CS/HAP IMERSAS 3 DIAS .....	48
FIGURA 4.24 IMAGENS DE SEM, DE AMOSTRAS DE CS/HAP, POLARIZADAS NEGATIVAMENTE, E IMERSAS EM SBF ..	49



# Índice de Tabelas

<b>TABELA 2.1</b> CLASSIFICAÇÃO DE BIOMATERIAIS TENDO EM CONTA O SEU COMPORTAMENTO BIOLÓGICO .....	7
<b>TABELA 3.1</b> PARÂMETROS POSSÍVEIS DE VARIAR NA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO .....	14
<b>TABELA 3.2</b> LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DO SBF. ....	24



# Lista de Símbolos e Acrónimos

---

## Lista de Símbolos:

$E_p$	Campo elétrico de polarização
$t_0$	Tempo de espera desde a remoção do campo elétrico e o início da medição das correntes termoestimuladas
$T_p$	Temperatura de polarização
$t_p$	Tempo de polarização
$A_s$	Área Superficial da amostra
$V$	Volume de solução de SBF

## Lista de Acrónimos:

<b>CaP</b>	Fosfato de Cálcio
<b>c.d.o</b>	Comprimento de onda
<b>CS</b>	<i>Chitosan</i> - Quitosano
<b>CS50/HAp50</b>	Quitosano/Hidroxiapatite numa proporção de 50/50 % (m/m)
<b>CS70/HAp30</b>	Quitosano/Hidroxiapatite numa proporção de 70/30 % (m/m)
<b>DC</b>	<i>Direct Current</i> – Corrente Contínua
<b>DSC</b>	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
<b>DRX</b>	<i>X-Ray Diffraction</i>
<b>EDS</b>	<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
<b>FTIR</b>	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
<b>HAp</b>	Hidroxiapatite
<b>SBF</b>	<i>Stimulated Fluid Body</i>
<b>SEM</b>	<i>Scanning Electron Microscope</i>
<b>TGA</b>	<i>Thermogravimetry</i>
<b>TSDC</b>	<i>Thermally Stimulated Discharge Current</i>



# 1

## Introdução

Na sociedade atual há um crescente aumento de doenças e fraturas ósseas. Estima-se que ocorram mais de 10 milhões de fraturas, por ano, em todo o mundo. E ainda, segundo a Fundação Internacional contra a Osteoporose, que 1 em cada 5 homens e 1 em cada 3 mulheres, com mais de 50 anos, correm o risco de sofrer uma fratura óssea. Esta realidade origina elevados custos diretos e indiretos, como consultas, operações, internamentos, baixas médicas, entre outros. Sentiu-se, portanto, a necessidade de recorrer a biomateriais biodegradáveis, utilizando-os como substitutos ósseos [1].

Na última década, o recurso a polímeros naturais tem aumentando por dois grandes motivos: as propriedades que os caracterizam, entre elas a biocompatibilidade, e a vasta aplicabilidade, que permitem o seu uso na indústria farmacêutica, na agricultura, na engenharia de tecidos, entre outras. No presente trabalho, o polímero natural utilizado foi o quitosano, um polissacarídeo derivado da quitina, que apresenta características como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a não toxicidade, entre outras, que o tornam um forte candidato em aplicações na área da regeneração óssea [2].

A hidroxiapatite é um biocerâmico que se caracteriza por ser biocompatível, bioativo, osteocondutor e não tóxico. Sendo vantajosa pelas suas propriedades mecânicas (resistência mecânica e resistência a ambientes húmidos) esta foi aliada ao quitosano proporcionando, esta combinação, um aumento da bioatividade e da osteocondução e, conseqüentemente, uma melhoria na regeneração óssea [3].

O tecido ósseo desempenha um papel fundamental no suporte muscular e na produção de células sanguíneas e imunitárias através da medula óssea. Sabe-se que este se encontra em constante remodelação, num ciclo que pressupõe destruição e formação de tecido ósseo. O carácter piezoelétrico do osso, ou seja, a sua capacidade de, em resposta à aplicação de uma tensão mecânica, gerar uma carga elétrica, foi pela primeira vez relacionado com a atividade de formação óssea, em 1957, por Fukada e Yasuda [4]. Vários estudos têm permitido perceber que

há uma interligação entre a formação óssea e a polarização elétrica da hidroxiapatite, proporcionando uma regeneração óssea mais rápida, uma maior osteocondução e uma melhor adesão, por parte das células [5].

Deste modo, os objetivos desta dissertação centraram-se, inicialmente, na produção de filmes de quitosano e de quitosano/hidroxiapatite e, posteriormente, na sua polarização elétrica a 130°C, durante um determinado período de tempo. Procedeu-se, posteriormente, a ensaios de bioatividade nas amostras colocando-as numa solução simuladora do fluido corporal, SBF, de modo a perceber qual o tipo de polarização que promovia uma melhor bioatividade.

Esta dissertação foi realizada no Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL e no CENIMAT/I3N. Encontra-se dividida em seis capítulos, sendo o Capítulo 1 uma curta introdução, com o enquadramento e os objetivos deste trabalho. No Capítulo 2 abordam-se os principais conceitos teóricos usados na elaboração desta dissertação, bem como uma breve explicação das técnicas de caracterização utilizadas. No Capítulo 3, descrevem-se os procedimentos experimentais realizados, tanto na produção das amostras como na sua posterior caracterização. No Capítulo 4, apresentam-se os resultados e a discussão dos mesmos. No capítulo 5, são descritas as conclusões mais relevantes retiradas desta dissertação.

## Enquadramento Teórico

### 2.1. O Osso

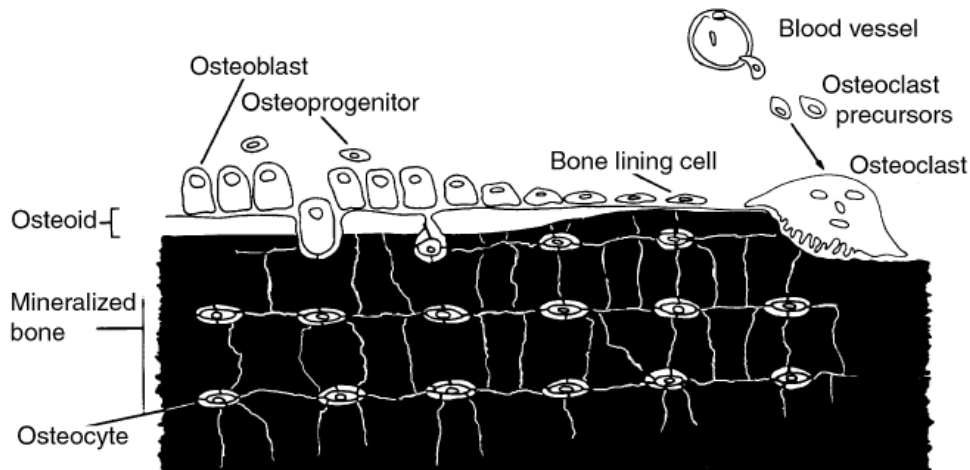
O osso é um tipo de tecido conjuntivo complexo, altamente especializado e organizado, constituído por células ósseas e por uma matriz extracelular mineralizada. Tem como funções o suporte muscular, a produção de células sanguíneas e células imunitárias, e atua como um reservatório mineral de modo a manter o equilíbrio de eletrólitos no corpo [6-8].

Morfologicamente o osso classifica-se como: cortical, ou compacto, e trabecular, ou esponjoso. O osso cortical localiza-se na região exterior do osso e caracteriza-se por ter uma baixa porosidade. Constitui cerca de 90% da massa óssea total, do corpo, permitindo o desempenho de funções mecânicas de suporte, de proteção e de mobilidade do organismo e ainda a libertação de elementos químicos, como o cálcio e o fósforo. Já o osso trabecular localiza-se na região interna do osso, contendo nos seus poros medula óssea. Apresenta uma elevada porosidade e tem uma importante função metabólica, como reservatório de minerais, formação de células sanguíneas e equilíbrio hormonal [9,10].

#### 2.1.1. Matriz Celular do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é composto, ao nível celular, por três tipos de células: os osteoblastos, os osteócitos e osteoclastos, como representado na **Figura 2.1**. A interação destes três tipos de células desempenha um papel importante na remodelação óssea.

Os osteoblastos são células com alguma polaridade, localizadas na superfície do osso, que atuam durante o desenvolvimento ou reparação ósseas. Têm como principal função a formação e organização da matriz extracelular óssea (através da síntese e segregação de constituintes da componente orgânica da matriz óssea, como por exemplo: o colagénio tipo I, e fatores de regulação do crescimento, que se armazenam dentro da matriz) e a sua consequente mineralização [6,8,10].



**Figura 2.1** Origem e localização das células da matriz extracelular do tecido ósseo. [8]

Uma parte das células osteoblásticas diferenciam-se em osteócitos. Estas células estão envolvidas por matriz celular, fixando-se e formando, conseqüentemente, um espaço designado por lacunas. Os osteócitos possuem prolongamentos citoplasmáticos que se localizam em finos canais ou espaços cilíndricos na matriz óssea, denominados canalículos. É através destes canalículos que se interligam as lacunas e são possíveis as trocas metabólicas entre as células e os fluídos orgânicos. Pode dizer-se que os canalículos desempenham um papel bastante importante, uma vez que caso haja uma obstrução num deles as células morrem. Os osteócitos têm como função a comunicação intercelular e são também responsáveis pela quebra da matriz óssea através da osteólise osteocítica. A osteólise osteocítica permite a libertação de cálcio, contribuindo, desta forma, para a homeostase do cálcio [6,8,11].

Os osteoclastos são células polarizadas que aderem à superfície do osso por integrinas, recetores de superfície de células especializadas. Estes são responsáveis pela remodelação óssea que ocorre ao longo do crescimento ósseo ou quando as condições são favorecidas pela remoção e reabsorção óssea, com libertação de cálcio, como é o caso da osteoporose [6,11].

### **2.1.2. Componentes da Matriz Extracelular Óssea**

A matriz óssea pode considerar-se um nanocompósito, organizado à nanoescala, constituído por duas componentes, a orgânica e a inorgânica [6]. A componente inorgânica correspondente a 65% (m/m) da matriz e é composta por hidroxiapatite carbonatada. Esta composição concede à matriz a propriedade de mineralização, que confere rigidez e resistência mecânica ao osso, permitindo que este desempenhe funções de sustentação e proteção. Os restantes 35% (m/m) correspondem à componente orgânica que é constituída por fibras de colagénio, que conferem flexibilidade e maleabilidade ao osso, água, glicosaminoglicanos e glicoproteínas, envolvidas no processo de transformação do tecido osteóide em osso. Esta componente permite ao osso a sua extensão e flexão [7,9,11,12].

### 2.1.3. Remodelação do Tecido Ósseo

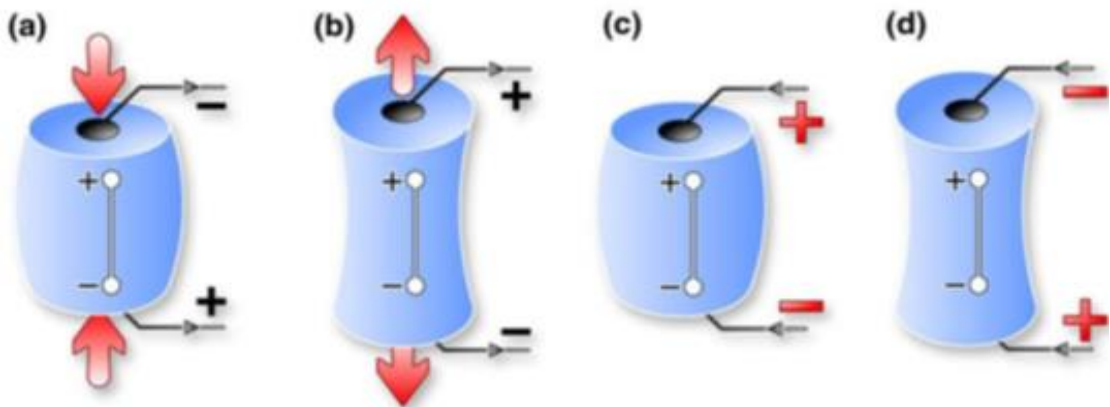
O processo de remodelação óssea permite o crescimento e a reestruturação do tecido ósseo em caso de fratura, por exemplo. É um processo dinâmico que pressupõe dois acontecimentos praticamente simultâneos: o de formação óssea e o de destruição do osso antigo.

O processo de formação do tecido ósseo inicia-se com os osteoblastos, que produzem a componente orgânica da matriz extracelular óssea. Parte dos osteoblastos é aprisionada na matriz orgânica formada, diferenciando-se em osteócitos [11]. Este processo tem merecido, por parte de vários autores, uma atenção especial. Nos anos 50, Yasuda e Fukada, introduziram, aliado a este processo, o conceito de piezoelectricidade. Segundo estes autores o osso tem piezoelectricidade, sendo que ao ser estimulado, eletricamente, promoverá a formação óssea [4].

A par do processo de formação óssea ocorre o de destruição do osso antigo que é realizado pelas células osteoclásticas que catabolizam o osso antigo, destruindo-o [11].

### 2.1.4. Piezoelectricidade do Osso

Certos materiais sólidos têm, como representado na **Figura 2.2**, uma propriedade que se manifesta em resposta à aplicação de uma força mecânica, que faz variar os momentos dos dipolos pré-existentes, gerando uma resposta elétrica (efeito direto); ou em resposta à aplicação de um campo elétrico externo, fazendo surgir forças mecânicas, que geram deformações reversíveis (efeito indireto) [5,13].



**Figura 2.2** No efeito direto, uma força de compressão (a) ou de tração (b) ao fazer variar o momento dipolar, origina uma diferença de potencial no material. No efeito indireto quando um campo elétrico é aplicado no sentido da polarização natural (c) ou no sentido contrário (d) origina uma deformação como resposta às forças elétricas exercidas nos dipolos [5].

Esta propriedade foi observada no osso, por Yasuda e Fukada, em 1957 [4]. Inicialmente o desenvolvimento de substitutos ósseos centrava-se na produção de implantes que se assemelhassem o mais possível à estrutura óssea. Com base nesta descoberta, mais recentemente, o interesse focou-se também no desenvolvimento de biomateriais que promovessem a regeneração óssea através da criação de uma carga, positiva ou negativa, à superfície do mesmo. A alteração das cargas superficiais, positivas ou negativas, de biomateriais polares, pode ser realizada através de dois métodos: o da polarização elétrica, aplicando um campo elétrico DC a temperaturas suficientemente elevadas durante um determinado período de tempo, que permita que haja reorientação dos dipolos, ou um outro método que pressupõe a produção de um biomaterial piezoelétrico que, ao lhe ser aplicada uma força mecânica, produza, como resposta, uma diferença de potencial no material [14].

A piezoelectricidade do osso foi, primeiramente, associada à água incorporada e às fibras de colagénio. No entanto, estudos posteriores realizados com correntes de descarga termicamente estimuladas (técnica descrita na secção 2.8.2.1, do presente capítulo) mostraram que a HAP também é polarizável, pois a sua polarização originava a reorientação dos momentos dipolares existentes entre os iões  $O^{2-}$  e  $H^+$  da rede de iões  $OH^-$  [15].

## 2.2. Biomaterial

Em 1991, na *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, definiu-se biomaterial como “um material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”. Esta interação é feita de modo a que se mantenha a estrutura e propriedades, e sem que haja alterações no meio fisiológico envolvente [11,16].

Os materiais e, por conseguinte os biomateriais, podem classificar-se como: metais e ligas metálicas, cerâmicos, polímeros e compósitos. Neste trabalho serão usados dois tipos de biomateriais: os cerâmicos, concretamente a hidroxiapatite, pois apresenta uma grande semelhança com a fase mineral do tecido ósseo, além de apresentar uma grande biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução; e os polímeros, mais concretamente o quitosano, um biomaterial biodegradável, que permite à medida que é degradado uma substituição gradual pelo tecido hospedeiro [11].

Para ser utilizado como implante em tecido vivo, um biomaterial tem que reunir um conjunto de características, tais como: a biocompatibilidade, a bioatividade, a biodegradabilidade, a não toxicidade, a resistência mecânica, entre outras. Qualquer que seja a aplicabilidade a característica tida como mais importante é a biocompatibilidade, pois só será passível de usar um material que não cause danos locais ou sistémicos, sejam eles tóxicos, cancerígenos ou radioativos, nos tecidos circundantes ao local de implantação [16,17].

Tendo em conta o comportamento biológico é possível classificar um biomaterial como bioinerte, biotolerado ou bioativo, como mostrado na **tabela 2.1** [11,17].

**Tabela 2.1** Classificação de biomateriais tendo em conta o seu comportamento biológico [7,17].

Classificação	Comportamento Biológico
<b>Bioinertes</b>	Não provocam reação de corpo estranho no organismo em que foi implantado. <b>Exemplo:</b> titânio e alumina.
<b>Biotolerados</b>	Têm uma aceitação moderada por parte dos tecidos circundantes. <b>Exemplo:</b> aço inoxidável e liga de cromo-cobalto.
<b>Bioativos</b>	Há uma ligação direta e firme entre a superfície do material e os tecidos onde é implantado. Concretamente, nos materiais bioativos usados em substituições ósseas, a composição química em íons livres de cálcio e fósforo superficiais, leva a uma ligação físico-química do biomaterial com o tecido ósseo envolvente. <b>Exemplo:</b> Hidroxiapatite e biovidros.

Dentro dos materiais bioativos e interligando esta característica com o comportamento do tecido ósseo, há três conceitos a referir: a osteoindução, osteointegração, e a osteocondução.

A osteoindução é um processo onde há um recrutamento de células imaturas que são estimuladas para se diferenciarem, induzindo-se, desta forma, a osteogénese. Por isto, numa fratura ou num outro tipo de cicatrização óssea, a osteoindução tem um papel muito importante [18,19].

A osteointegração define-se como uma fixação estável de um implante através do contacto direto entre o osso e o implante [19]. É, portanto, o processo que garante a estabilidade de um implante ósseo.

A osteocondução ocorre quando o osso cresce sobre uma superfície, como a superfície de um implante ósseo [19].

### 2.3. Polímeros

Os polímeros são macromoléculas constituídas pela repetição de muitas unidades (monómeros ou unidades repetitivas), ligadas por ligações covalentes. O número de vezes que os meros se repetem define o grau de polimerização, que difere de polímero para polímero. De acordo com a estrutura molecular os polímeros podem classificar-se como lineares, ramificados, com ligações cruzadas ou em rede. E quanto à natureza podem classificar-se em naturais ou sintéticos [11,20]. Dentro dos polímeros naturais inserem-se os polissacarídeos. Estes são constituídos por açúcares simples unidos por ligações  $\beta$  (1→4) glicosídicas. Quimicamente, os polissacarídeos podem possuir os grupos funcionais amina, carboxilo e hidroxilo, que podem sofrer modificações e combinações a nível químico, como por exemplo oxidação, redução, reações de reticulação, etc., ou a nível enzimático [17].

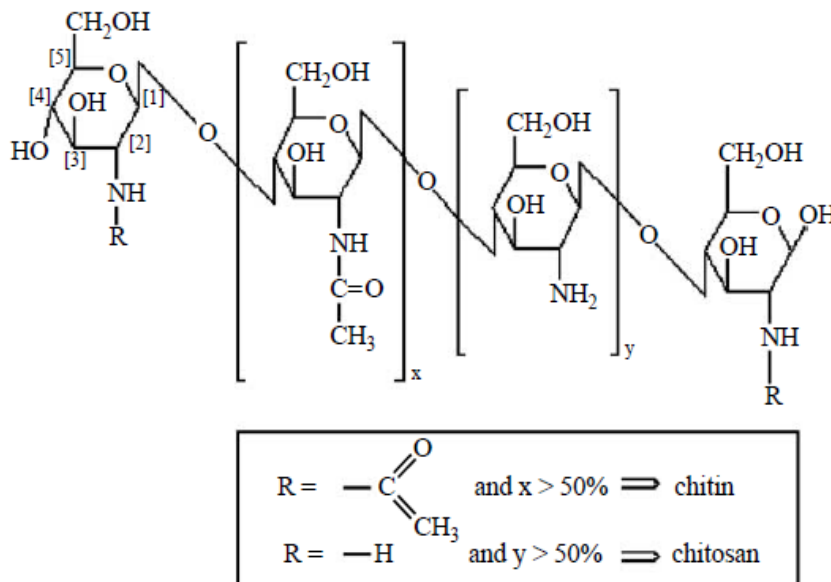
Neste trabalho, o polímero utilizado é o quitosano, um copolímero natural linear.

## 2.4. Quitina e Quitosano

A quitina é um dos polímeros naturais mais abundantes, a seguir à celulose, que pode ser encontrado no exosqueleto de artrópodes e crustáceos ou nas paredes celulares de fungos e leveduras. Ao longo dos anos tem sido uma constante a evolução no uso da quitina em diversas áreas, nomeadamente na área da Engenharia Biomédica [21,22]. No entanto, apesar de todas as vantagens na sua utilização, esta contém uma desvantagem, pois não é facilmente dissolvida na maioria dos solventes orgânicos nem em solventes aquosos[10]. Por esta razão é muitas vezes parcialmente desacetilada, dando origem ao quitosano [21].

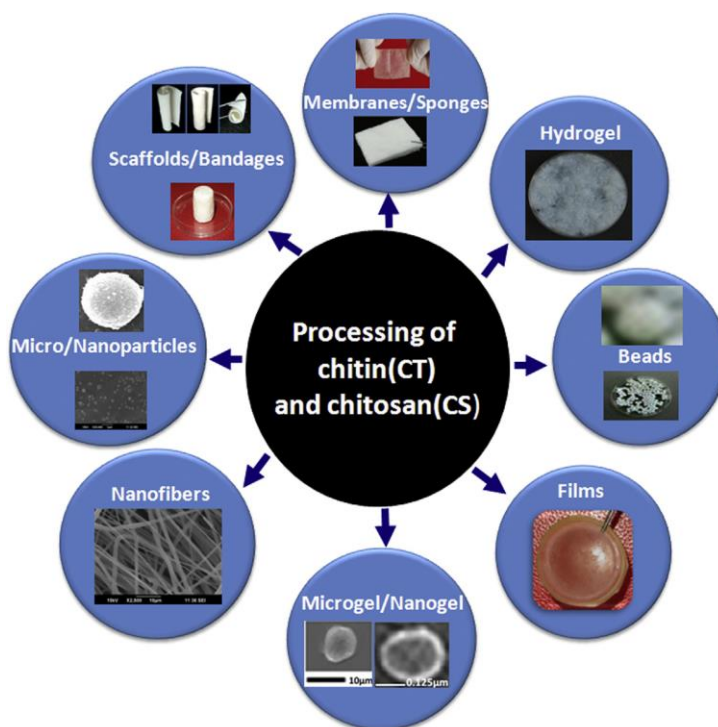
Em 1859, Rouget referiu, pela primeira vez, a desacetilação da quitina, dando origem a um polissacarídeo semicristalino, o quitosano [21,23]. Brimacombe e Webber, reportaram, em 1964, que a estrutura química do quitosano se definia como um conjunto, maioritário, de unidades repetidas de D-glucosamina e, minoritário, de unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina, ligadas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ , próprias dos polissacarídeos (representado na **Figura 2.3**) [21,23].

O grau de desacetilação do quitosano corresponde à fração molar de unidades desacetiladas, D-glucosamina. Tratando-se de quitosano este valor tem que ser superior a 50%. O grau de desacetilação e o peso molecular são fatores que se relacionam com as propriedades biológicas e físico-químicas deste polímero[21].



**Figura 2.3** Estrutura química da quitina e do quitosano conforme a percentagem de unidades de repetição[24].

O quitosano tem uma vasta aplicabilidade nas áreas alimentares, das ciências farmacêuticas, da agricultura, mas sobretudo e, com um maior crescimento e interesse nos últimos anos, na área da engenharia biomédica [25]. Este interesse surge e, no caso concreto da sua aplicação na área da regeneração óssea, pelo facto de o quitosano potenciar a diferenciação de células osteoprogenitoras, facilitando a formação óssea. Isto deve-se ao facto de ser estruturalmente semelhante aos glicosaminoglicanos (polímeros pertencentes à classe dos polissacarídeos que compõem parte da componente orgânica da matriz extracelular do tecido ósseo). Além disso reúne um conjunto de propriedades biológicas, tais como a sua natureza antibacteriana, antifúngica e antiviral, a não toxicidade, a baixa imunogenicidade, as boas propriedades de absorção e o poder hemostático. Destas propriedades biológicas há que evidenciar três que permitem a um biomaterial ser implantado: a biocompatibilidade, a biodegradabilidade (que está diretamente relacionada com o grau de desacetilação e inversamente ligada ao peso molecular) e a bioatividade (atuando como agente hemostático, estimulando o sistema imunitário e favorecendo a regeneração de tecidos moles e duros) [21,25]. São estas três propriedades que motivam o uso do quitosano como biomaterial, uma vez que reúne as principais características que um biomaterial necessita para ser implantado [23,24]. Além disso, este polímero apresenta outras grandes vantagens como o facto de ser barato, de fácil manuseamento e de permitir a produção de vários tipos de estruturas (**Figura 2.4**), possibilitando, nalgumas delas o crescimento celular no seu interior e a osteocondução [21,26].



**Figura 2.4** Tipos de estruturas possíveis de produzir com quitosano[25].

No que respeita à solubilidade, propriedade que torna o uso do quitosano mais vantajoso que o da quitina, o grau de desacetilação relaciona-se diretamente com esta e inversamente com o peso molecular. O quitosano dissolve-se em soluções ácidas com pH menor que 6 e maior que 2, através da protonação dos grupos amina livres (-NH<sub>2</sub>), da cadeia polimérica. Os solventes tipicamente usados para a sua dissolução são ácido láctico, o ácido acético e o ácido fórmico. Em solução, este polímero é um policatión. Esta natureza policatiónica é uma ótima característica na sua aplicação em engenharia de tecidos pois permite que haja interações eletrostáticas, dependentes do pH, com os glicosaminoglicanos aniónicos, os proteoglicanos e outras espécies aniónicas. Quanto maior o número de cargas positivas na molécula de quitosano maior a repulsão entre várias cadeias e melhor a solubilidade [27-29].

Ao contrário da quitina, que é hidrofóbica, o quitosano é altamente hidrofílico. A predominância de grupos amino, fortemente electronegativos, favorece o rearranjo das moléculas de água ao redor das moléculas de quitosano [30]. Este carácter hidrofílico torna-se desvantajoso, pois com a constante humidade na estrutura do polissacarídeo a sua estabilidade vai reduzindo. Uma forma de contornar esta característica, melhorando a estabilidade das cadeias poliméricas e reduzindo a afinidade por moléculas polares, é a reticulação [31]. Esta pode ser feita através de agentes químicos, como o glutaraldeído ou físicos, através da reticulação iónica [32].

## **2.5. Biocerâmicos – Fosfatos de Cálcio**

Os materiais biocerâmicos, como o próprio nome indica, são cerâmicos biocompatíveis. Esta biocompatibilidade deve-se a dois motivos: o facto de estes materiais conterem iões coincidentes com os existentes no meio fisiológico e por conterem iões com toxicidade limitada para os tecidos. Os biocerâmicos caracterizam-se como compostos policristalinos refratários, podendo conter compostos metálicos, sendo os fosfatos de cálcio um exemplo. São muito usados nas áreas da regeneração óssea, pois têm uma elevada bioatividade e promovem a osteocondução [17]. São biomateriais duros, frágeis, com elevadas temperaturas de fusão e baixas condutividades elétricas e térmicas [28].

### **2.5.1. Hidroxiapatite**

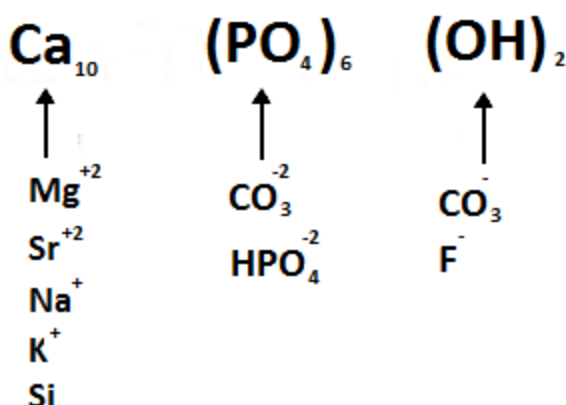
O fosfato de cálcio usado, neste trabalho, a hidroxiapatite sintética (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>), é bastante similar à HAp biológica, maior constituinte da componente inorgânica da matriz extracelular óssea. É o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel. Apesar da baixa solubilidade, a HAp dissolve-se em ácido, através da reação dos iões PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e OH<sup>-</sup> com o H<sup>+</sup> do ácido. Apresenta, quimicamente uma razão molar Ca/P de 1,67, valor idêntico às apatites do tecido ósseo mineralizado. Este valor relaciona-se inversamente com a velocidade de degradação [11,15,17,33].

A sua estrutura cristalina é hexagonal com um grupo espacial P6<sub>3</sub>/m e com parâmetros de rede a=b=9.432Å e c=6.881Å [15].

A HAp é usada na área da regeneração óssea devido, como já referido, à semelhança que apresenta em relação à HAp biológica, conseguindo interagir com o osso *in vivo* e *in vitro*. Mas é também usada por ser bioativa, biocompatível, osteocondutora, não tóxica e não inflamatória [11,15].

No entanto, existem diferenças significativas entre as duas HAp. A HAp biológica tem uma estequiometria variável, com um défice de iões cálcio e enriquecida com outros iões, fruto de substituições iónicas que ocorrem ao longo do tempo e que podem ser variadas. Estas substituições afetam propriedades como a biocompatibilidade, a bioatividade, a solubilidade e a velocidade de degradação, sendo, as duas últimas propriedades, superiores na HAp biológica, devido à presença de iões  $\text{CO}_3^{2-}$  na rede cristalina. Estes iões surgem na rede cristalina da HAp por serem das substituições mais frequentes na HAp biológica, resultando, conseqüentemente, num melhoramento da osteointegração [11,12,15,34,35].

A HAp biológica pode então representar-se com a fórmula química  $\text{Ca}_{10-x}\text{M}_x(\text{PO}_4)_{6-y}\text{X}_y(\text{OH})_{2-z}\text{Z}_z$ , sendo M, X e Z as possíveis substituições, apresentadas na **Figura 2.5**.



**Figura 2.5** Substituições iónicas possíveis da HAp biológica [15].

O facto de estas substituições diminuírem ao longo da vida, fazem com que a HAp biológica se aproxime mais da sua forma estequiométrica, e, portanto, da HAp sintética. Em consequência, a HAp biológica fica mais cristalina e com uma menor velocidade de degradação, o que resulta numa diminuição da remodelação óssea [11,15,17].

A estabilidade da HAp sintética deve-se a uma baixa taxa de biodegradação/reabsorção, o que se torna desvantajoso quando a aplicação pressupõe a implantação, tendo em vista a regeneração óssea. Melhorando o grau de cristalinidade, aproximando-o da HAp biológica (cerca de 60-70%), e reduzindo, à nanoescala, o tamanho dos cristais consegue melhorar-se a biodegradabilidade da HAp sintética [34]. Para se obterem cristais nanométricos uma das técnicas mais utilizadas é o método sol-gel, por ser um método simples e vantajoso, capaz de produzir pós de HAp evitando a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas [36].

## **2.6. Compósitos CS/HAp**

O recurso a materiais compósitos nas áreas da regeneração óssea tem vindo a aumentar. A grande vantagem deste tipo de materiais é o facto de possuírem propriedades físico-químicas, elétricas e mecânicas melhoradas em relação aos materiais utilizados individualmente. Neste sentido, uma das combinações mais usadas, nesta área, é a combinação CS/HAp, pois sabe-se que aumentam a biocompatibilidade e a osteocondução no tecido ósseo [21,37].

O quitosano apresenta como vantagens o facto de ser um polímero natural biocompatível e biodegradável, cujos produtos de degradação não são tóxicos, flexível e barato. No entanto, quando a aplicação pressupõe a existência de regeneração óssea é importante um biomaterial com boas propriedades mecânicas, de modo a conferir ao compósito a resistência mecânica necessária que permita a formação da matriz mineralizada. Deste modo, incorpora-se a HAp (um biocerâmico ativo e osteocondutor), conferindo uma melhoria nas propriedades mecânicas, na biocompatibilidade e na integração no tecido ósseo, bem como a adaptação cinética da degradação e reabsorção (uma vez que haverá um balanço entre a rápida biodegradação do quitosano e a menor taxa de degradação, característica da HAp) [32,38-40]. Esta junção CS/HAp apresenta outra vantagem, pois permite colmatar a fragilidade característica da HAp através da flexibilidade própria do quitosano [37,39,41,42].

## Materiais e Métodos

### 3.1. Materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados dois quitosanos de origem comercial, produzidos pela empresa Altakitin. O quitosano utilizado na produção de membranas, por eletrofição, tinha um peso molecular 260kDa e grau de desacetilação 73.6%. Já as características do quitosano usado na produção de filmes eram: peso molecular de 500 kDa e grau de desacetilação de 76,0%. No que diz respeito aos nanopós de hidroxiapatite utilizados, estes tinham sido obtidos através do método sol-gel e sinterizados a 700°C<sup>1</sup>. Como solventes usaram-se o ácido acético glacial e água destilada millipore.

### 3.2. Métodos Aplicados

#### 3.2.1. Método de Produção de Soluções para Membranas de Eletrofição

##### 3.2.1.1. Solução para Produção da Membrana de Quitosano

Foram testados várias soluções, com a variação de concentrações e diferentes parâmetros de eletrofição, tendo-se chegado a uma solução ótima, que permitiu a melhor produção de membranas. Esta foi produzida dissolvendo 2% (m/m) de quitosano, com peso molecular de 260 kDa, em ácido acético 90% (v/v). Deixou-se em agitação magnética até total dissolução do quitosano. Adicionou-se, posteriormente, 0.67% (m/m) de óxido de polietileno (PEO), com peso molecular de 2MDa, e agitou-se até total homogeneização. A solução foi mantida em repouso durante a noite de modo a não haver bolhas de ar que dificultassem o processo de eletrofição.

---

<sup>1</sup> Estes pós encontravam-se disponíveis no laboratório, tendo sido obtidos e sinterizados antes do início da realização da presente dissertação.

### **3.2.2. Método de Produção de Filmes**

#### **3.2.2.1. Produção de Filmes de CS**

Dissolveram-se 2% (m/m) de quitosano, de peso molecular igual a 500 kDa em ácido acético 2% (v/v), sob agitação magnética. Manteve-se a solução em agitação até total homogeneização da mesma. Colocaram-se as soluções num banho de ultrassons durante 15 minutos, para se retirarem as bolhas de ar existentes. Numa caixa de petri, verteu-se a solução e colocou-se numa estufa a 37°C, durante 24h, para evaporar o solvente. Após secagem do filme, guardou-se num exsiccador em vácuo até ser utilizado.

#### **3.2.2.2. Produção de Filmes de CS70/HAp30**

Tal como em 3.2.2.1, dissolveram-se 2% (m/m) de quitosano, de peso molecular igual a 500 kDa, em ácido acético 2% (v/v), deixando em agitação magnética até total homogeneização. Separadamente preparou-se a solução de HAp dissolvendo 0.86% (m/m) de HAp em ácido acético 2% (v/v), em agitação até haver também uma total homogeneização. Por fim, juntaram-se as duas soluções e colocaram-se em agitação, até total homogeneização. Colocou-se, durante 15 minutos, a nova solução em banho de ultrassons, de modo a remover as bolhas presentes na solução. Verteu-se a solução numa caixa de petri e colocou-se dentro de uma estufa, a 37°C, durante 24h, período ao fim do qual se retirou e guardou num exsiccador em vácuo até ser utilizado.

#### **3.2.2.3. Produção de Filmes de CS50/HAp50**

Na preparação deste tipo de filmes foi seguido o mesmo protocolo das amostras anteriores, mas com uma proporção de quitosano/HAp de 50/50 %(m/m), ou seja, 2% (m/m) de quitosano e 2% (m/m) HAp.

### **3.2.3. Métodos de Caracterização das Amostras**

#### **3.2.3.1.SEM**

Para caracterizar morfologicamente a superfície das amostras e dos pós utilizou-se a microscopia eletrónica de varrimento, por ser uma técnica que permite uma análise de elevada resolução. Previamente à execução do SEM, foi depositada uma camada de irídio nas amostras por pulverização catódica. Estas análises realizaram-se no CENIMAT/I3N, num Microscópio Eletrónico de Varrimento Zeiss, modelo Auriga.

### **3.2.3.2.FTIR**

De modo a identificar os grupos funcionais presentes nos pós de hidroxiapatite, sintetizados pelo método de sol-gel, e nas amostras de quitosano e de quitosano/HAp (sem tratamento térmico, com tratamento térmico e com polarização) recorreu-se à técnica de Espectroscopia de Infravermelho FTIR com Reflexão Total Atenuada (ATR). O equipamento utilizado foi um espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR, localizado no CENIMAT. A análise foi realizada num intervalo espectral entre  $4000\text{cm}^{-1}$  e  $400\text{cm}^{-1}$ . Dos resultados obtidos construiu-se um gráfico da transmitância em função do número de onda.

### **3.2.3.3.DRX**

Recorreu-se à técnica de Difração de Raios-X para identificar as fases cerâmicas presentes nos pós de HAp sintetizados, bem como qual a alteração que se verifica ao adicionar HAp às amostras de quitosano. Além destas análises fez-se também DRX a amostras de CS com tratamento térmico e polarização, tentando perceber quais as alterações ocorridas nas amostras em condições diferentes. A técnica de DRX foi realizada no CENIMAT, num difractor Philips com raios-X gerados a partir de uma ampola de cobre sob um potencial de aceleração de 30kV e um feixe de corrente de 15mA. Os parâmetros utilizados para a execução desta técnica foram  $20^\circ < 2\theta < 60^\circ$  para os pós de HAp e  $5^\circ < 2\theta < 90^\circ$  para os filmes de CS e CS/HAp.

### **3.2.3.4.DSC-TGA**

Para observar a perda de massa e as variações de entalpia das amostras de quitosano, utilizou-se a técnica de Análise Diferencial Calorimétrica e Termogravimétrica, com uma taxa de aquecimento constante de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , entre  $0^\circ\text{C}$  e  $600^\circ\text{C}$ . O equipamento utilizado foi um analisador térmico simultâneo STA 449 F3 Jupiter, localizado no CENIMAT. As análises decorreram em atmosfera de nitrogénio.

### **3.2.3.5.TSDC**

Para se identificarem e medirem os picos de polarização e calcular os seus valores de carga utilizou-se a técnica de TSDC. Esta técnica foi realizada num equipamento, existente no Departamento de Ciências dos Materiais, constituído por uma câmara com um porta amostras que possui uma resistência de aquecimento, um controlador, um eletrómetro e uma fonte de tensão. Com este equipamento foram obtidos os gráficos de TSDC através do procedimento descrito abaixo:

- Aquecimento das amostras até aos  $190^\circ\text{C}$ , sem vácuo, a uma taxa de aquecimento,  $\beta=2^\circ\text{C}/\text{min}$ . Com este procedimento foi possível perceber os picos de polarização presentes nas amostras.

Parte das amostras sujeitas a este procedimento tinham sido submetidas, anteriormente, a um tratamento térmico ou a uma polarização. No procedimento referente ao tratamento térmico a amostra foi previamente aquecida, com uma taxa de aquecimento constante de  $\beta=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , em vácuo até aos  $100^{\circ}\text{C}$ , temperatura a partir da qual o vácuo foi desligado, continuando a amostra em aquecimento até aos  $130^{\circ}\text{C}$ . A temperatura de  $130^{\circ}\text{C}$  mantém-se durante aproximadamente uma hora, período de tempo ao fim do qual a amostra é arrefecida rapidamente até à temperatura ambiente. Passando ao procedimento relativo à polarização elétrica, as amostras foram sujeitas aos mesmos pontos do tratamento térmico. No entanto, atingindo-se a temperatura de  $130^{\circ}\text{C}$  é aplicado, durante 1 hora, um campo elétrico constante de intensidade igual a  $\pm 4.5 \text{ kV}/\text{cm}$ . Ao fim desse tempo a amostra é arrefecida rapidamente, ainda com o campo aplicado, que é removido ao atingir a temperatura ambiente.

### 3.2.3.6. Ensaio de Bioatividade

Os ensaios de bioatividade foram realizados com filmes de quitosano e quitosano/HAp com tratamento térmico e com polarização positiva e negativa, imersos numa solução de concentração iónica  $1,5\times$  a do plasma sanguíneo, SBF (*Simulated Body Fluid*) [48]. Colocou-se cada amostra, num tubo de ensaio, imersa em SBF numa estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . A quantidade de solução em cada amostra foi calculada segundo a fórmula (2):

$$V = A_s / 0,1 \text{ cm}^{-1} \quad (2)$$

Onde:  $A_s$  – Área Superficial da amostra

$V$  – Volume de solução de SBF

O tempo de imersão das amostras em solução de SBF foi de 1 hora, 6 horas, 1 dia, 3 dias e 7 dias. No final de cada período de permanência dentro do SBF retiraram-se as amostras, lavaram-se com água destilada e secaram-se numa estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após secagem, as superfícies das amostras foram observadas pela técnica de SEM e as suas concentrações em íons cálcio e fosfato (presença dos elementos Ca e P no espectro) analisaram-se através da técnica de EDS.

## Preparação da solução SBF (*Simulated Body Fluid*)

### Reagentes:

**Tabela 3.2** Lista de reagentes utilizados na produção de 1L de solução de SBF.

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	9.818g
2	NaHCO <sub>3</sub>	3.402g
3	KCl	0.559g
4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.213g
5	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.457g
6	HCl (1M)	15ml
7	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.582g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.108g
9	Tris	9.095g

### Procedimento Experimental para 1L de solução

Mediu-se com a ajuda de uma proveta graduada 700 mL de água millipore para um copo de precipitação. Colocou-se um agitador magnético dentro do copo e pousou-se sob uma placa de agitação. Inseriu-se posteriormente, a ponta de um medidor de pH dentro do copo de precipitação e ligou-se a placa de agitação com uma velocidade entre 100-300 rpm. Com a ajuda de uma pipeta ou uma espátula e um vidro de relógio mediram-se/pesaram-se as quantidades dos reagentes indicados na **tabela 2.3**, adicionando-os, à solução, pela ordem descrita. Adicionou-se com a ajuda de uma pipeta, 1M HCL à solução (aproximadamente 50 mL) até o pH desta ser próximo de 7,4. Passou-se a solução para um balão volumétrico e adicionou-se água millipore até perfazer 1L. Para posterior utilização, guardou-se a solução a 5°C até ao máximo de 1 mês.

## 3.3. Princípios Básicos das Técnicas de Produção e Caracterização

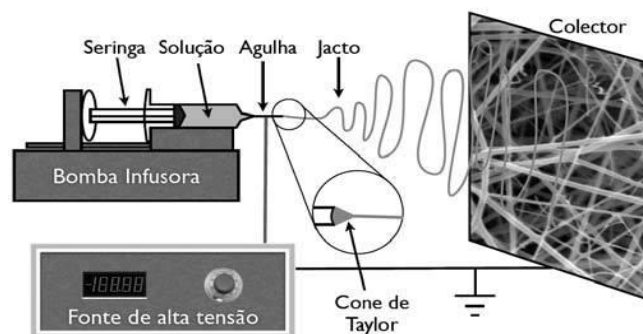
### 3.3.1. Técnica de Eletrofiação para Produção de Membranas

A eletrofiação é uma técnica que permite a produção de fibras a partir de uma solução polimérica e da ação de um campo elétrico. Como se mostra na **Figura 3.1**, nesta técnica, coloca-se uma solução polimérica numa seringa, que contem uma agulha na ponta. O conjunto seringa-agulha coloca-se numa bomba infusora, que permite definir o caudal à saída da agulha. Esta liga-se a uma fonte de alta tensão, fazendo com que se eleve o potencial eletrostático do

fluido, que ao aumentar, elevará a carga superficial do líquido. Pelo facto de se aplicar um campo elétrico, entre a agulha e o coletor (ligação à terra), induz-se uma força elétrica na gota. Esta força elétrica, criada pelo campo sobre as cargas que criam o potencial e carregam o fluido, formam uma estrutura denominada cone de Taylor. Quando a tensão que se aplica cria uma força repulsiva entre as cargas, superior à tensão superficial, a gota é projetada em forma de jato até ao coletor, formando fibras que se depositam [43].

**Tabela 3.1** Parâmetros possíveis de variar na técnica de eletrofiação [44].

<b>Parâmetros de Eletrofiação</b>		
<b>Propriedades da Solução</b>	<b>Viscosidade</b>	<p>É afetada pelos seguintes fatores:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Peso Molecular</u> – numa solução com a mesma concentração de polímero, tem maior viscosidade a que contém o maior peso molecular. Para um processo de eletrofiação de sucesso deverá tentar conciliar-se um peso molecular e uma viscosidade suficientes.</li> <li>• <u>Concentração de Solução</u> – aumentando a concentração de polímero, aumenta-se a viscosidade.</li> </ul> <p>O aumento da viscosidade produzirá fibras com diâmetros maiores.</p>
	<b>Volatilidade do Solvente</b>	O solvente deverá evaporar-se o suficiente entre a agulha e o coletor. A escolha do solvente é por isso um passo muito importante que influenciará além da formação de fibras a sua porosidade.
	<b>Condutividade da Solução</b>	A alta condutividade de uma solução implicará mais cargas em solução e, sob a ação de campos elétricos criará uma instabilidade nas fibras e, conseqüentemente, levará a uma diminuição do diâmetro das fibras.
	<b>Tensão Superficial</b>	O aumento da tensão superficial levará à produção de fibras com diâmetros irregulares.
<b>Parâmetros de Execução</b>	<b>Potencial Aplicado</b>	Quanto maior o potencial aplicado mais irregulares serão as fibras depositadas.
	<b>Caudal</b>	Com o aumento do caudal há um aumento proporcional dos poros e do diâmetro das fibras.
	<b>Distância ao Coletor</b>	O aumento da distância ao coletor pressupõe campos elétricos mais fracos levando à formação de fibras finas
<b>Parâmetros Ambientais</b>	<b>Temperatura</b>	O aumento da temperatura levará ao aumento de fibras com diâmetro menor.
	<b>Humidade Relativa</b>	O aumento da humidade poderá conduzir a uma maior probabilidade de aparecimento de poros circulares.



**Figura 3.1** Montagem da técnica de eletrofiiação [43].

### 3.3.2. Técnicas de Caracterização Morfológica e Estrutural das Amostras

#### 3.3.2.1. SEM

A técnica de SEM (*Scanning Electron Microscopy*), em português, Microscopia Eletrônica de Varrimento, permite o estudo da morfologia/topografia das amostras a observar [14,15].

Esta técnica de caracterização tem como princípio de funcionamento a incidência de um feixe de elétrons altamente acelerados/energéticos sobre a amostra a analisar, que interage com a matéria gerando um conjunto de sinais (como, por exemplo, elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, elétrons de Auger, raio-X característicos e outros fótons de várias energias). Este conjunto de sinais é captado por detetores específicos que convertem os sinais em sinais elétricos que, ao terem intensidades diferentes, modelam a intensidade do feixe de elétrons responsável pela formação de imagem no tubo de raios catódicos. Dos elétrons gerados, os mais relevantes na formação da imagem, da técnica de SEM, são os elétrons secundários e retrodifundidos, uma vez que interagem na zona superficial da amostra [14,15].

As energias tipicamente envolvidas no feixe de elétrons estão compreendidas entre 0,5 keV e 50 keV e a intensidade da emissão está dependente da natureza química da amostra. Tendo uma amostra de natureza metálica, que tem ligações fracas entre elétrons, há uma melhor emissão quando comparada com uma amostra de natureza orgânica, que contém elétrons fortemente ligados aos átomos. Por isto, no caso de amostras com materiais isolantes elétricos (como cerâmicos e polímeros), é necessário cobrir a amostra por finas películas de metal, por exemplo ouro ou irídio, que é um ótimo condutor [14,15].

Há uma ferramenta de análise EDS "*Energy Dispersive X-Ray analyse*" associada ao SEM, que permite determinar a composição química elementar de uma determinada área da amostra [14,15].

### 3.3.2.2. FTIR

O FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), denominado em português, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, é uma técnica usada para identificar os grupos funcionais que constituem as amostras. É uma técnica bastante vantajosa pois permite a análise de compostos orgânicos e inorgânicos em diferentes estados (sólido, líquido e gasoso). Desta técnica resultam espectros característicos de cada composto. A análise destes espectros permite saber a composição da amostra através das ligações presentes ou através da comparação dos espectros obtidos com espectros de referência [14,15].

O princípio físico do FTIR assenta na absorção de radiação infravermelha, que causa alterações nos estados vibracionais das ligações covalentes entre átomos ou moléculas. Assim, quando a frequência da radiação incidente é próxima de uma frequência natural de vibração da rede há absorção da energia e um aumento da amplitude de vibração das ligações covalentes entre os átomos e grupos de átomos. Segundo a mecânica quântica, as frequências referidas correspondem ao estado fundamental, estado de menor energia e frequência, e a estados excitados, estados de maior energia e frequência. Deste modo, a absorção da radiação ocorre apenas em determinadas regiões específicas do espectro e depende de diversos fatores, entre quais se destacam o tipo de ligações covalentes presentes, os átomos envolvidos e o próprio modo de vibração. Generalizando podemos definir dois modos de vibração: aquele que envolve mudanças na distância da ligação e, conseqüentemente, na distância inter-atômica ou não-molecular, consoante o caso, denominado **estiramento** (*“stretching”*); e o que envolve mudanças no ângulo de ligação, ou seja, na posição relativa dos átomos ou moléculas envolvidas, denominado **flexão** (*“Bending”*) [14,15].

“A aquisição do espectro de FTIR pode ser feita no modo de transmissão, detetando a irradiância que atravessa a amostra, ou no modo de absorção, medindo a irradiância absorvida pela amostra. Efetuando um varrimento em frequência da radiação eletromagnética, obtém-se um espectro de transmissão, ou absorção, que evidencia as zonas de absorção dos grupos funcionais na forma de picos ascendentes, ou invertidos, respetivamente” [15].

### 3.3.2.3. DRX

Com a técnica XRD (*“X-ray Diffraction”*) ou DRX (*“Difração por Raios-X”*), em português, pode obter-se informação sobre a estrutura de um determinado material. Se o material for cristalino haverá um arranjo periódico dos iões, átomos ou moléculas (rede cristalina). Caso seja amorfo o arranjo será aleatório [14,15].

“Dado que os comprimentos de onda (c.d.o.) dos raios-X são aproximadamente iguais às distâncias entre os planos atômicos característicos dos sólidos cristalinos, a colisão de um feixe destes mesmos raios com a referida rede cristalina, produz picos reforçados de radiação, responsáveis pelo padrão de difração característico de um determinado sólido cristalino” [14].

A lei de Bragg relaciona o c.d.o. dos raios-X e o respectivo ângulo de incidência com a distância entre as diferentes camadas de átomos. Matematicamente, representa-se pela expressão (1):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

**Onde:**  $n$  – ordem de difração, pertencente aos números naturais;

$\lambda$  – c.d.o. dos raios-X;

$d$  – distância entre os diferentes planos cristalográficos;

$\theta$  – ângulo que o raio incidente faz com os planos de reflexão.

Existindo uma relação apropriada entre o ângulo de incidência,  $\theta$ , e a distância,  $d$ , entre os planos e o comprimento de onda,  $\lambda$ , dos raios-X incidentes, as reflexões reforçam-se umas às outras, dizendo-se que as reflexões estão em fase (interferência construtiva). Porém, se o ângulo  $\theta$  não satisfaz a condição para que as diferentes reflexões estejam em fase, estas interferem destrutivamente umas com as outras e o feixe é fraco ou nulo. Os planos de difração, assim como as suas respectivas distâncias interplanares, as densidades dos átomos ao longo de cada plano cristalino e o padrão de difração por ela gerado, são características específicas e únicas de cada substância cristalina [15].

#### 3.3.2.4. Análise Diferencial Calorimétrica e Termogravimetria (DSC-TGA)

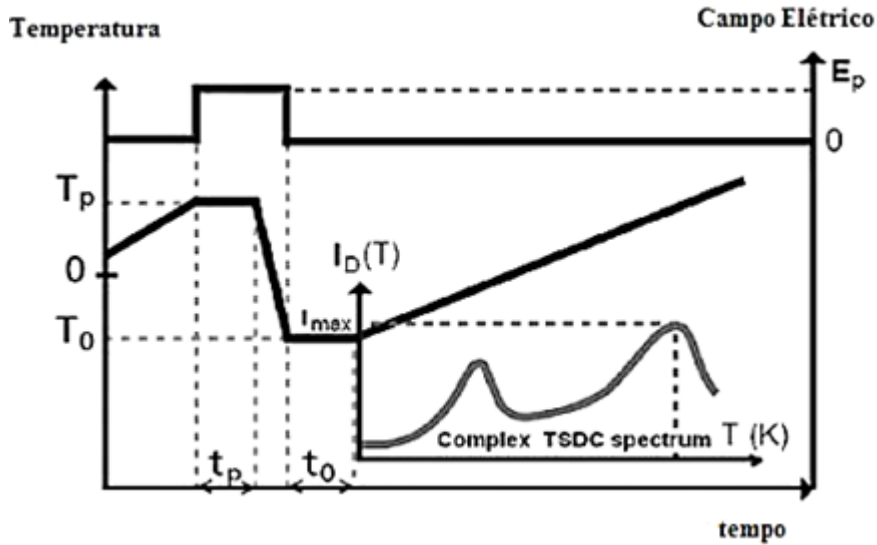
Na técnica de Análise Calorimétrica (DSC, Differential Scanning Calorimetry) submetem-se, em atmosfera controlada, a uma taxa de aquecimento constante, a amostra a analisar e a amostra de referência, de um material termicamente inerte. Durante este processo monitorizam-se as variações de entalpia da amostra a analisar, tendo como comparação a amostra de referência. Sendo assim, quando a amostra a analisar sofre uma alteração física, necessitará de fluxos de calor maiores ou menores de modo a manter a amostra com a mesma temperatura da referência. Esta variação de fluxos origina picos endotérmicos (quando a energia fornecida à amostra tem que ser maior para esta ficar à temperatura da amostra de referência) e exotérmicos (quando a energia fornecida à amostra tem que ser menor para esta ficar à temperatura da amostra de referência) [45-47].

A Análise Termogravimétrica (TGA) é uma técnica termoanalítica onde se observa a perda de massa da amostra em função da temperatura. A curva resultante da análise termogravimétrica permite obter informações como mudanças na composição da amostra, estabilidade térmica e de parâmetros cinéticos de reações químicas na amostra. As diferenças de massa observadas nas amostras podem dever-se a fatores físicos, como transições de fase, ou a fatores químicos, como por exemplo decomposição [46].

### 3.3.3. Caracterização Elétrica das Amostras

#### 3.3.3.1. Correntes de Descarga Termoestimuladas (TSDC)

O TSDC (“*Thermally Stimulated Discharge Current*”), ou, em português, Correntes de Descarga Termoestimuladas é uma técnica utilizada para o estudo das capacidades e características elétricas dos materiais isolantes, esquematizada na **Figura 3.2**.



**Figura 3.2** Representação do processo da TSDC. Polariza-se, uniformemente, a amostra com a aplicação de um campo elétrico,  $E_p$ , a uma temperatura constante,  $T_p$ , durante um período de tempo,  $t_p$ , suficientemente grande para permitir às unidades móveis do material orientarem-se sob a ação do campo elétrico DC. A configuração de polarização “congela-se” mantendo o campo aplicado enquanto se baixa a temperatura rapidamente até ao valor  $T_0$ , suficientemente baixo para a mobilidade molecular ser considerada nula. Atingida esta temperatura “desliga-se” o campo e a amostra é curto-circuitada durante um período de tempo  $t_0$ , para que se possa eliminar a carga espacial de rápida relaxação e estabilizar a amostra a esta temperatura. Finalmente, durante um aumento linear da temperatura, há um retorno ao equilíbrio das entidades previamente orientadas, que gera uma corrente de despolarização,  $I_D$ , que é registada, em função da temperatura, com um eletrómetro de elevada sensibilidade[15].

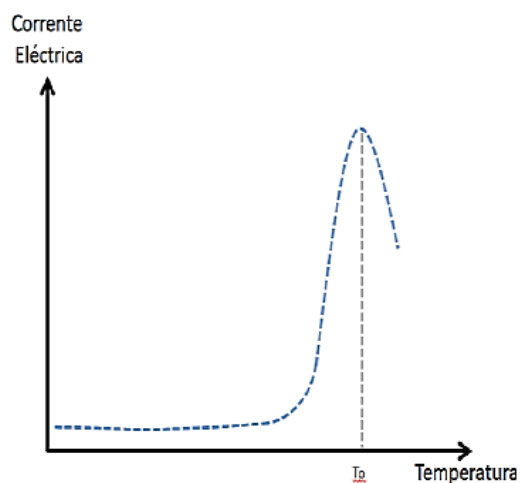
Os materiais são aquecidos, em diferentes atmosferas, sendo possível uma grande amplitude de temperatura. Este aquecimento é precedido de uma polarização com um campo eletrostático com intensidades entre  $E_p \approx 10^1 - 10^4$  kV/m, sob uma temperatura de polarização definida ( $T_p$ ) [15].

A sensibilidade da orientação molecular, fragmentos ou dipolos ligados, e cargas livres (prótons, iões, eletrões e lacunas) ao campo eletromagnético ou eletrostático externo criam os fenómenos observados nesta técnica. Concretamente, a orientação de um sistema de dipolos e distribuição de cargas é caracterizada por determinadas “memórias” estruturais e espaciais específicas para cada material observado. As características de memória relacionam-se com a dependência do tempo/temperatura de relaxação e energias de ativação dos dipolos (cargas

ligadas que causam relaxação dipolar), carga espacial e cargas livres (iões, prótons e eletrões que fornecem relaxações de corrente direta (DC) e relaxação de carga) [15].

Esta técnica é bastante vantajosa pois o seu uso pode ser feito em diversos tipos de materiais, tais como, materiais cristalinos, polímeros e com diferentes geometrias (filmes, pastilhas, etc.), sem que seja necessária uma preparação prévia. Além disso, os fenómenos investigados apresentam uma frequência equivalente baixa ( $10^{-4}$  Hz). A técnica proporciona uma boa resolução e sensibilidade, permitindo uma medição de valores de corrente muito pequena (na ordem dos  $10^{-15}$  A) [15].

Todos os materiais são suscetíveis a polarização, já que a nuvem eletrónica dos átomos e moléculas sente a aplicação de campos produzidos por átomos ou moléculas vizinhas. Se se aplicar, durante um período de tempo suficientemente grande, um campo elétrico suficientemente forte, a estrutura da rede de dipolos pode diferir bastante da estrutura observada na ausência de campo. Se se congelar o sistema com o campo a uma baixa temperatura (que pode ser ou não abaixo da temperatura ambiente mas mais baixa que  $T_p$ ), a rede de dipolos pode diferir da rede observada para a amostra sem aplicação do campo. Ou seja, “a polarização é congelada pelo arrefecimento da amostra até uma temperatura  $T_0$  suficientemente baixa, prevenindo, deste modo, a despolarização do sistema por energia térmica”. Define-se assim o princípio de funcionamento do TSDC que é um processo válido para sistemas com energia de ativação, como orientações de dipolos e cargas espaciais. Caso se aqueça o sistema, posteriormente, a uma determinada taxa constante,  $\beta$ , “descongelar-se-á” o movimento dos dipolos individuais, aglomerados dos mesmos e estruturas contínuas e gera-se uma corrente de despolarização que surge a uma temperatura característica. Sendo os processos de relaxação sensíveis a características químicas e estruturais, para cada mecanismo de polarização, aparece no gráfico um pico inerente de corrente, representado na **Figura 3.3**. A posição do pico na escala da temperatura, a sua amplitude e forma, pode aceder-se a parâmetros dinâmicos e termodinâmicos, entre os quais a energia de ativação da relaxação,  $E_a$ , e o tempo de relaxação,  $\tau$  que são características do mecanismo de polarização que deu origem ao pico [15].



**Figura 3.3** Pico inerente de corrente [14].

#### **3.3.4. Ensaio de Bioatividade**

Quando à superfície de um biomaterial se formam fosfatos de cálcio significa que há bioatividade. Para aferir acerca desta propriedade, imergem-se biomateriais em SBF, soluções simuladoras do fluido corporal (soluções fisiológicas com pH e concentração iónica semelhantes ao plasma sanguíneo), uma vez que a capacidade que um material tem de desenvolver, à superfície, uma camada HAp, em SBF, indica que este é bioativo. A taxa de formação desta camada correlaciona-se com a taxa de ligação ao osso e, como tal é um indicativo do grau de bioatividade do material. A deposição da camada de HAp à superfície envolve dois processos: o de dissolução da superfície do material e o de precipitação de uma camada de fosfatos de cálcio, CaP. O processo de dissolução de iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  na solução fisiológica aumenta a concentração iónica do SBF junto à superfície do material, atingindo um valor superior ao de saturação levando, conseqüentemente, ao processo de precipitação da camada de fosfatos de cálcio. Esta camada precipitada tem, inicialmente, uma estrutura amorfa que amadurece ao longo do tempo resultando numa camada de HAp [48].

# 4

## Resultados e Discussão

### 4.1. Membranas de Quitosano Produzidas pela Técnica de Eletrofiação

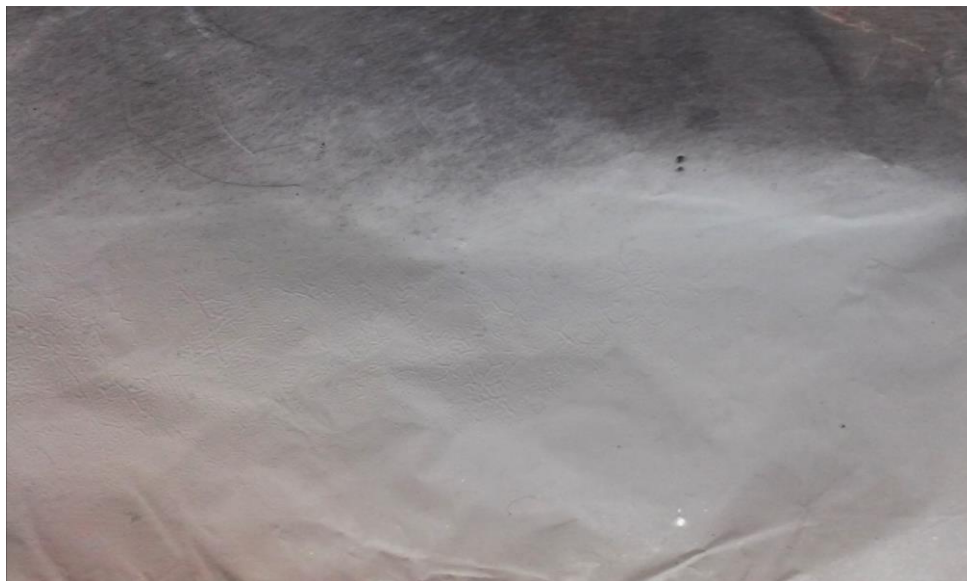
Inicialmente, o objetivo do presente trabalho era usar a técnica de eletrofiação como método de produção de amostras, tentando criar-se membranas uniformes e com espessura, aproximadamente, igual a 100  $\mu\text{m}$ , de forma a poderem ser polarizadas eletricamente.

Procedeu-se primeiramente à otimização da solução usada, uma vez que na técnica de eletrofiação é importante ajustar e otimizar parâmetros da solução, como por exemplo a viscosidade, para que a solução eletrofie corretamente, produzindo fibras. A solução que permitiu resultados mais próximos do pretendido foi a solução de quitosano descrita em 3.2.1.1.

Posteriormente, foram realizadas experiências com diferentes tipos de alvos, obtendo-se os melhores resultados com um alvo quadrado (revestido com folha de alumínio), com rotação segundo o eixo dos xx (perpendicular ao plano do alvo), e um alvo cilíndrico (revestido com folha de alumínio), com rotação segundo o eixo dos yy (eixo “principal” do cilindro). As membranas produzidas não foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, uma vez que os melhores resultados obtidos foram membranas com a espessura pretendida, mas não uniformes, tal como é mostrado na **Figura 4.1**, e membranas uniformes, mas sem a espessura pretendida, tal como é apresentado na **Figura 4.2**. Os parâmetros otimizados que se utilizaram na membrana da **Figura 4.1** foram: distância ao alvo de 22 cm, fluxo de 0.3 ml/h e tensão aplicada de 17 kV. No que respeita aos parâmetros da membrana apresentada na **Figura 4.2** estes foram: distância ao alvo de 25 cm, fluxo de 0.35 ml/h e tensão aplicada de 15 kV.



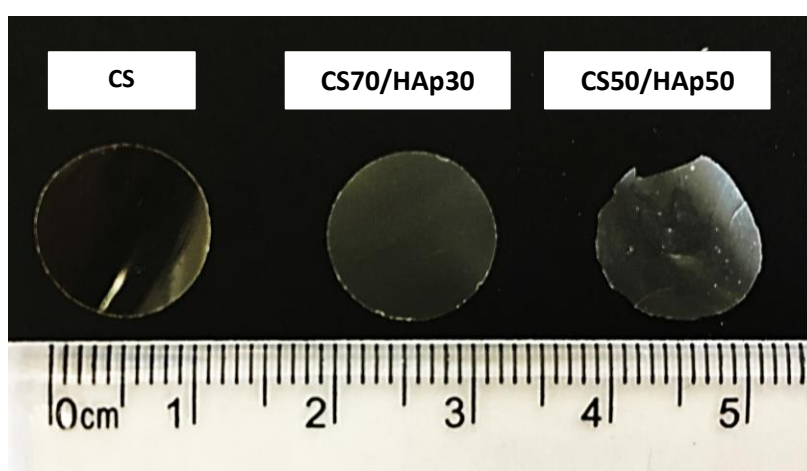
**Figura 4.1** Membrana de quitosano produzida pela técnica de eletrofição, com espessura de 100  $\mu\text{m}$ , mas não uniforme. Tempo de deposição de 8 horas.



**Figura 4.2** Membrana de quitosano produzida através da técnica de eletrofição, uniforme e com espessura de 10  $\mu\text{m}$ , valor inferior ao pretendido. Tempo de deposição 8 horas.

## 4.2. Filmes de Quitosano e Quitosano/Hidroxiapatite

Na **Figura 4.3** é apresentado um exemplo de cada tipo de amostra produzido (CS, CS70/HAp30 e CS50/HAp50, respetivamente). Após secagem, as amostras tinham uma espessura que variava entre os 30 $\mu$ m e os 40 $\mu$ m e foram cortadas com um vazador de 10mm, quando utilizadas para técnicas de caracterização. Observando a amostra de CS50/HAp50 nota-se que esta tem um rebordo irregular e um aspeto frágil. Isto deve-se à %(m/m) de HAp que torna o filme bastante frágil. Após a realização de vários procedimentos, TSDC e ensaios de bioatividade, às amostras com a %(m/m) 50/50 optou por não se usarem durante a realização do presente trabalho uma vez que os resultados obtidos estavam longe do pretendido.



**Figura 4.3** Filmes de CS, CS70/HAp30 e CS50/HAp50.

## 4.3. FTIR

Para observar os modos de vibração dos grupos funcionais presentes nos nanopós de HAp produzidos e das amostras de CS e CS/HAp, recorreu-se à técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, FTIR. Na **Figura 4.4** encontra-se representado o espectro de FTIR dos pós de HAp, que haviam sido produzidos anteriormente à realização do presente trabalho, através do método de sol-gel, com uma sinterização a 700 $^{\circ}$ C durante 1h. Por volta dos 3570  $\text{cm}^{-1}$  e dos 625  $\text{cm}^{-1}$ , observam-se bandas típicas da estrutura apatítica, referentes à deformação simétrica dos grupos hidroxilos, OH $^{-}$ , da HAp [38,39,43].

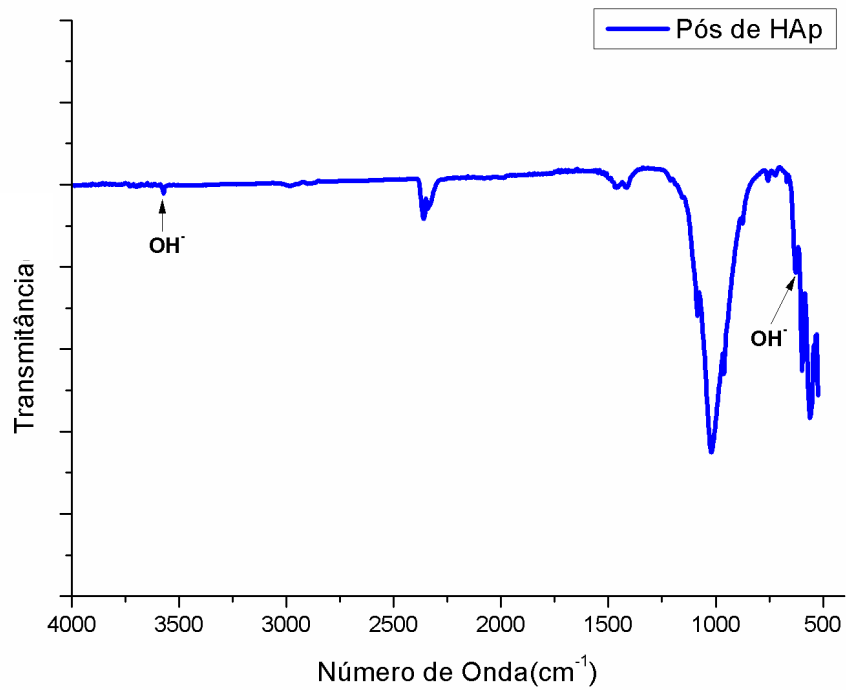


Figura 4.4 Espectro de FTIR dos nanopós de HAp produzidos pelo método sol-gel.

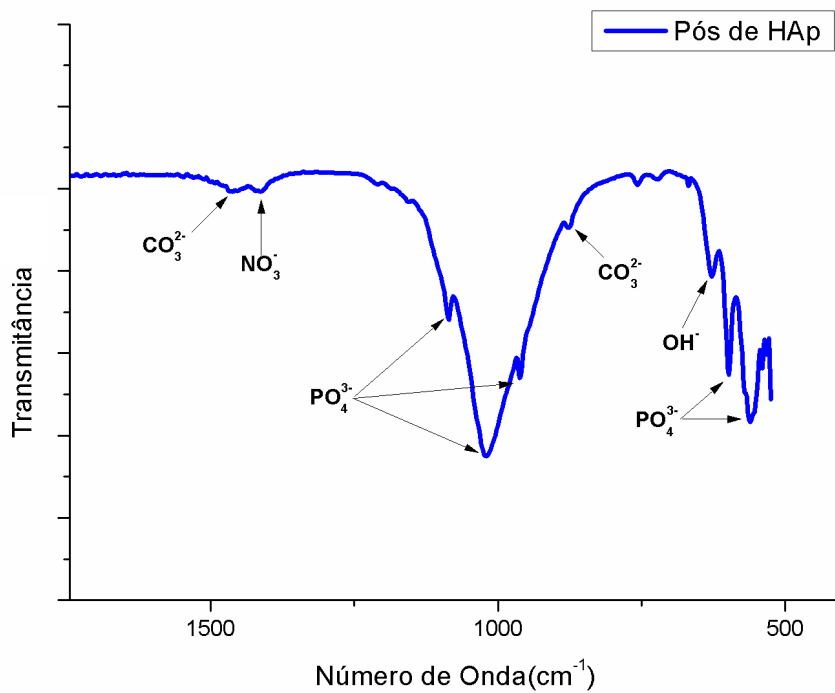
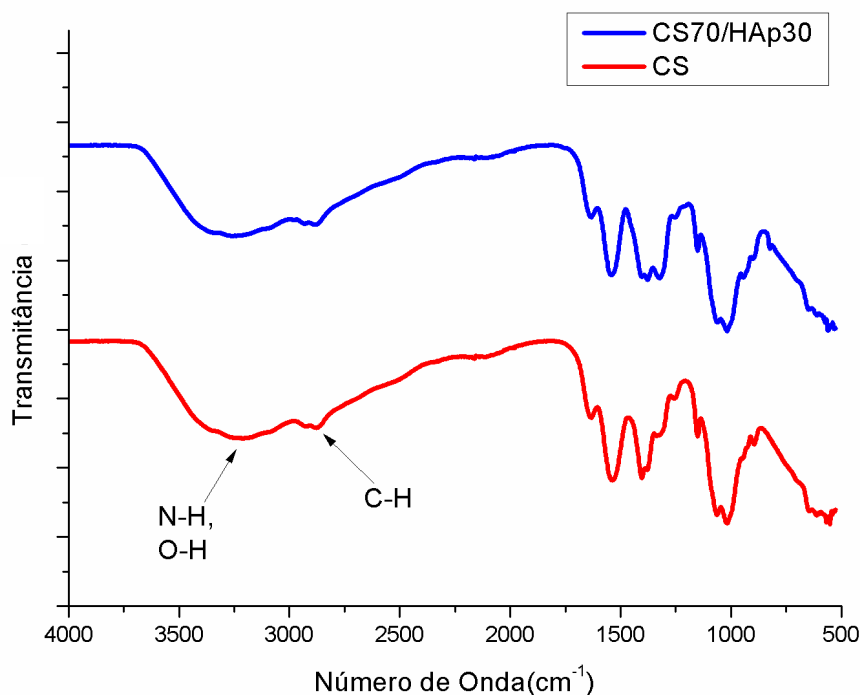
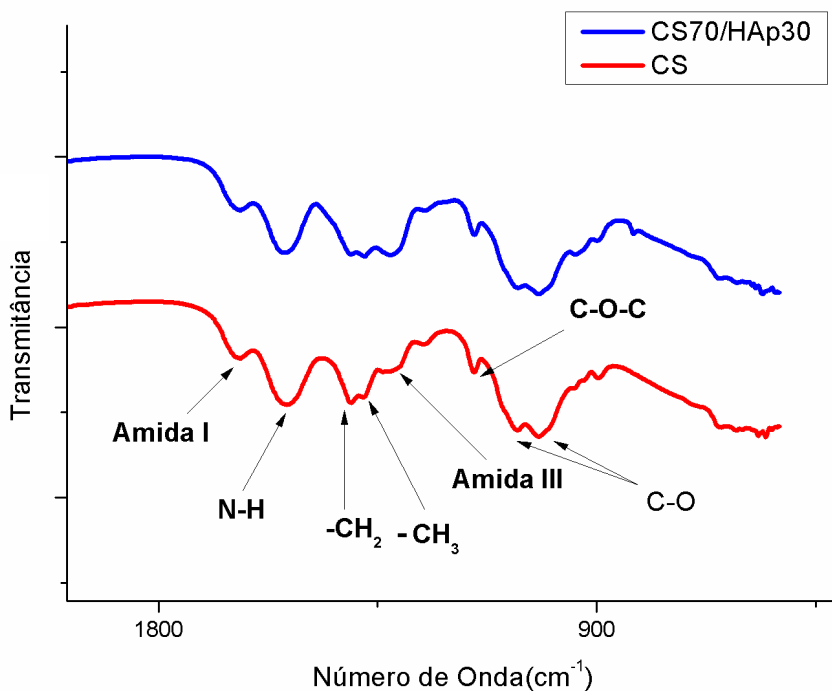


Figura 4.5 Ampliação dos números de onda mais baixos do espectro de FTIR da Figura 4.4.

Na **Figura 4.5** é ampliado o espectro para números de onda mais baixos, de  $1600\text{cm}^{-1}$  a  $500\text{cm}^{-1}$ , observando-se a presença de vários grupos funcionais característicos da HAp. Na banda cujos picos de maior intensidade se encontram localizados perto dos  $1085\text{cm}^{-1}$  e dos  $560\text{cm}^{-1}$  são observadas deformações assimétricas dos grupos fosfato,  $\text{PO}_4^{3-}$ . O pico a  $593\text{cm}^{-1}$  sugere a deformação angular dos grupos fosfatos,  $\text{PO}_4^{3-}$ . Já as bandas com picos perto de  $1021\text{cm}^{-1}$  e  $960\text{cm}^{-1}$  são também características dos grupos fosfatos,  $\text{PO}_4^{3-}$ , mas de uma deformação simétrica. No espectro de FTIR da HAp é ainda possível identificar as substituições dos grupos carbonatados, bem como o tipo de substituição ocorrida, do tipo A (grupos  $\text{OH}^-$  substituídos por grupos  $\text{CO}_3^{2-}$ ) ou do tipo B (grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  substituído por grupos  $\text{CO}_3^{2-}$ ). Analisando a **Figura 4.5** é possível a identificação destes grupos nas bandas por volta dos  $1460\text{cm}^{-1}$  e  $872\text{cm}^{-1}$ . Estes valores de número de onda sugerem uma carbonatação do tipo B e, portanto, a presença de HAp do tipo B. Perto dos  $1412\text{cm}^{-1}$  observa-se um pico que corresponde ao modo de vibração de estiramento simétrico do grupo  $\text{NO}_3^-$ . Este constitui um resíduo que advém da fase de produção dos nanopós com nitrato de cálcio tetra hidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (ver **Anexo I – Procedimento Experimental**) [38,39,43].



**Figura 4.6** Espectro de FTIR das diferentes amostras produzidas.

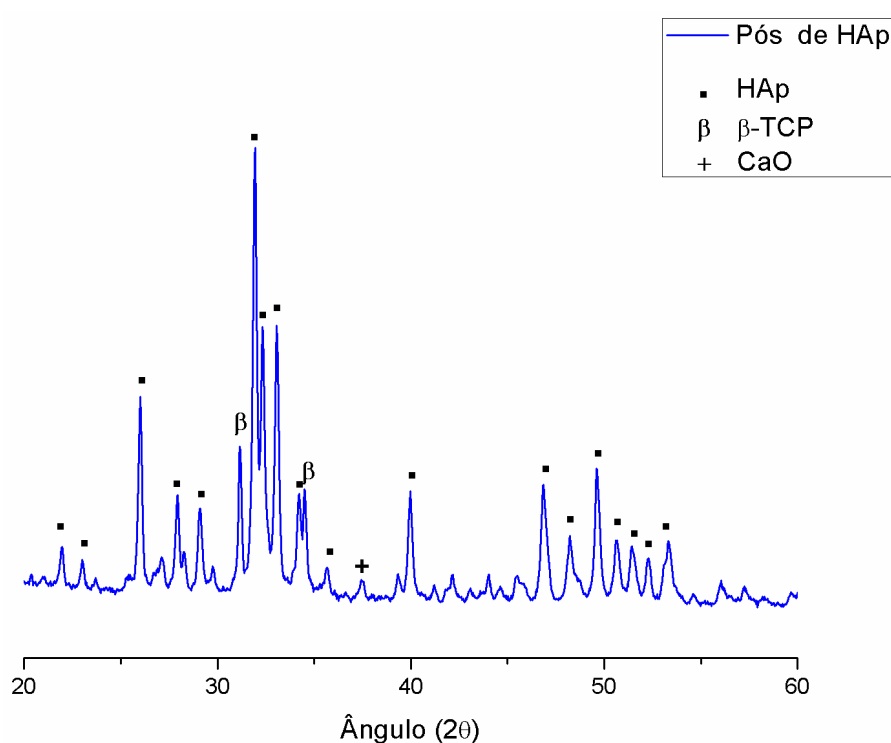
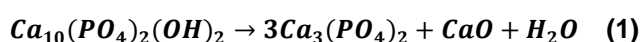


**Figura 4.7** Ampliação dos números de onda mais baixos do espectro de FTIR da **Figura 4.6**.

Analisando o espectro a vermelho, da **Figura 4.6**, correspondente à amostra de CS, pode observar-se uma banda com um pico a  $3228\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda é característica do modo de estiramento simétrico das ligações N-H e O-H. Observa-se uma outra banda, com um pico a  $2866\text{ cm}^{-1}$ , típico do modo de vibração das ligações C-H. Analisando a ampliação do espectro, para números de onda mais baixos, na **Figura 4.7**, observa-se uma banda, característica do quitosano, com um pico a  $1627\text{ cm}^{-1}$  que corresponde à amida I e com um pico, de maior intensidade, em  $1533\text{ cm}^{-1}$  relativo ao modo de deformação angular das ligações N-H provenientes da amida II e da amina. O pico a  $1401\text{ cm}^{-1}$  encontra-se numa banda que se relaciona com o modo de deformação angular das ligações  $-\text{CH}_2$  e o de  $1312\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao modo de deformação simétrica das moléculas  $-\text{CH}_3$ . O pico a  $1243\text{ cm}^{-1}$  corresponde à amida III. O pico observado a  $1146\text{ cm}^{-1}$  relaciona-se com o modo de estiramento antissimétrico das ligações C-O-C. Finalmente, aos picos a  $1071\text{ cm}^{-1}$  e  $1005\text{ cm}^{-1}$  corresponde o modo de estiramento simétrico das ligações C-O. Analisando o espectro a azul, referente à amostra de CS70/HAp30, e comparando com o espectro da amostra de CS não se observa uma diferença significativa. Isto pode significar que a HAp foi encapsulada pelo quitosano quando se produziram os filmes, impedindo a visualização da sua influência através da técnica de FTIR [38,39,50,51].

#### 4.4. DRX

Na **Figura 4.8** está representado o difractograma dos pós de HAp sinterizados a 700°C. Como seria esperado, é já visível, com a sinterização a 700°, a cristalinidade dos pós de HAp, uma vez que os picos correspondentes a cada plano de refração se encontram bem definidos. Quando comparado com as fichas JCPDS, do *International Centre for Diffraction Data*, para a HAp, o difractograma evidencia a presença de compostos de HAp. No entanto, é notória uma ligeira presença de CaO e β-TCP. Esta presença ocorre por decomposição da HAp, quando esta se encontra na presença de água, através da reação **(1)** [43, 52, 53]:



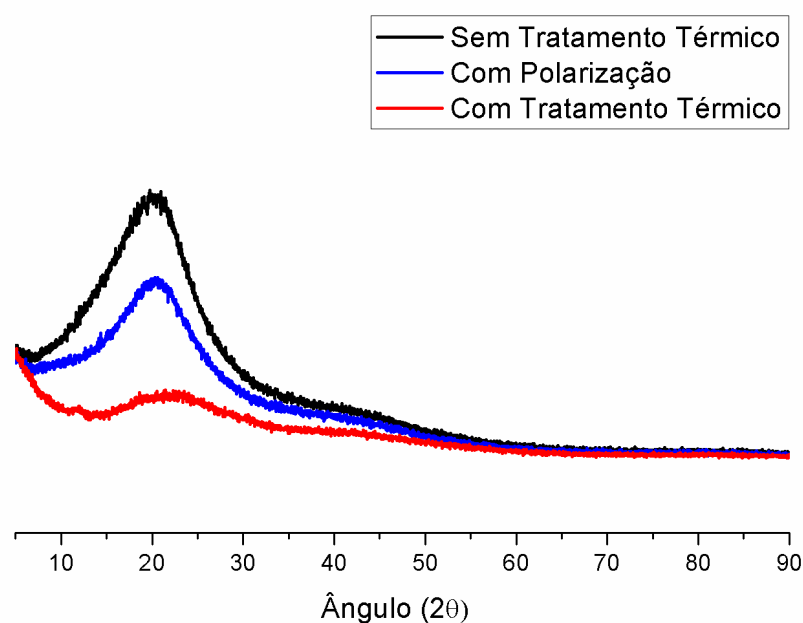
**Figura 4.8** Difractograma dos nanopós de HAp sinterizados a 700°C.

Analisando as três curvas apresentadas na **Figura 4.9**, referentes a três amostras de CS sem tratamento térmico, com tratamento térmico e com polarização observa-se um pico, de base larga, típico de materiais semicristalinos, perto do ângulo 2θ igual a 20°. O carácter semicristalino do quitosano advem de pontes de hidrogénio formadas entre os grupos amina, álcool e os outros grupos funcionais característicos da molécula de quitosano. O ângulo 2θ perto de 20° é atribuído ao plano (110) da rede cristalina do quitosano [51,55,56].

No caso da amostra de CS com tratamento térmico, parece haver também um pico por volta dos 10°. É descrito na literatura que o quitosano contém sempre cerca de 5% de água ligada, mesmo quando bem seco. A incorporação de moléculas de água ligada na rede cristalina,

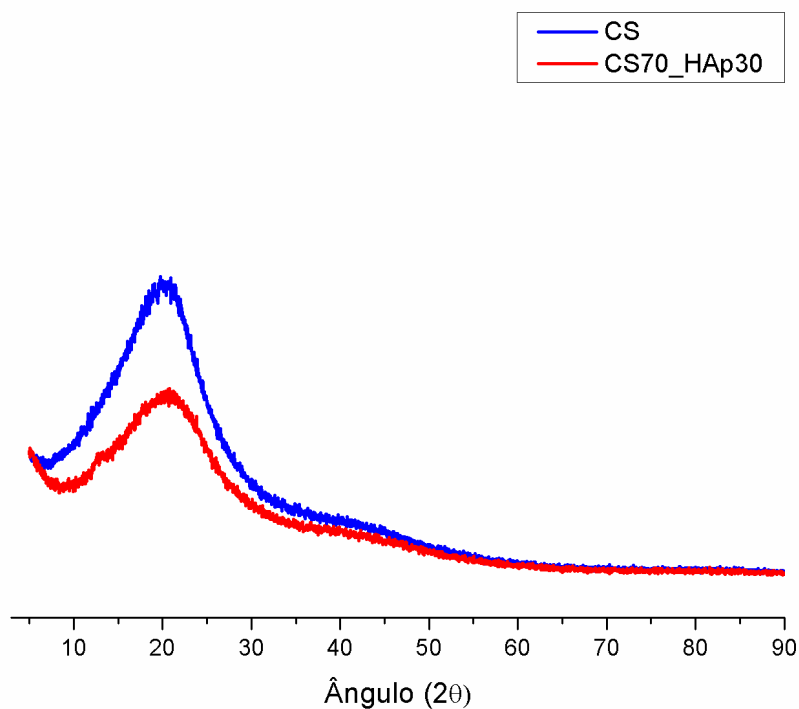
ou seja, a existência de cristais hidratados, origina um cristal polimorfo que se detecta por um pico mais largo no difractograma de DRX. Atribui-se, portanto, à estrutura cristalina hidratada do quitosano o pico perto de  $2\theta$  igual a  $10^\circ$  [51,55].

Na curva referente à amostra sem tratamento térmico é visível uma estrutura semicristalina. Analisando o difractograma de DRX da amostra de CS tratada termicamente há uma diminuição da cristalinidade. Com a amostra polarizada, ou seja, que sofreu um tratamento térmico com aplicação de um campo elétrico constante de intensidade  $4.5\text{kV/cm}$ , há um aumento da cristalinidade, podendo dever-se, provavelmente, a uma reorientação dos grupos  $-\text{NH}_2$ , sugerindo que a polarização é importante no processo de cristalização do quitosano [51,55].



**Figura 4.9** Difractograma das amostras de CS sem tratamento térmico, com tratamento térmico e polarizada.

Quanto aos difractogramas representados na **Figura 4.10**, referentes às amostras de CS e de CS70/HAp30, com a adição da HAp parece haver uma perda de cristalinidade. No entanto, não é evidente a presença de HAp. Deste modo, tal como havia sido visto no difractograma de FTIR dos filmes de CS70/HAp30, durante processo de produção dos filmes, poderá ter ocorrido um encapsulamento da HAp por parte do quitosano, impedindo, também através desta técnica de caracterização, a visualização da presença da HAp nas amostras.



**Figura 4.10** Difractograma das amostras de CS e CS70/HAp30 produzidas.

#### 4.5. DSC-TGA

Com o objetivo de analisar a perda de massa e as variações de entalpia das amostras de CS recorreu-se à técnica de análise diferencial calorimétrica e termogravimétrica. Analisando o gráfico a vermelho, na **Figura 4.11**, referente à análise TGA observam-se duas perdas de massa. A primeira ocorre num intervalo de temperaturas compreendido entre 30°C e 140°C, correspondendo a 9.23% da perda de massa da amostra. Esta perda de massa estará relacionada com a evaporação de solventes (ácido acético e água). A segunda perda de massa inicia-se a 147°C e termina a 650°C, correspondendo a uma percentagem total de massa perdida de 47.20%. Esta perda de massa pode estar relacionada com a decomposição do quitosano. Analisando a curva a preto, correspondente à análise DSC, observa-se, na amostra, um pico endotérmico aos 77°C, que é atribuído à perda de água adsorvida pelos grupos hidrofílicos do quitosano. Este pico e a perda de massa observada no TGA sugerem que a amostra, possivelmente, teria ainda ligações de água que não foram removidas no processo de secagem, na estufa, e, posteriormente, no condicionamento, no exsiccador. É ainda observado um pico exotérmico entre os 251°C e os 355°C, tendo o máximo aos 279°C, que está relacionado com a decomposição dos grupos amida e, conseqüentemente, com a degradação do quitosano[51,57-60].

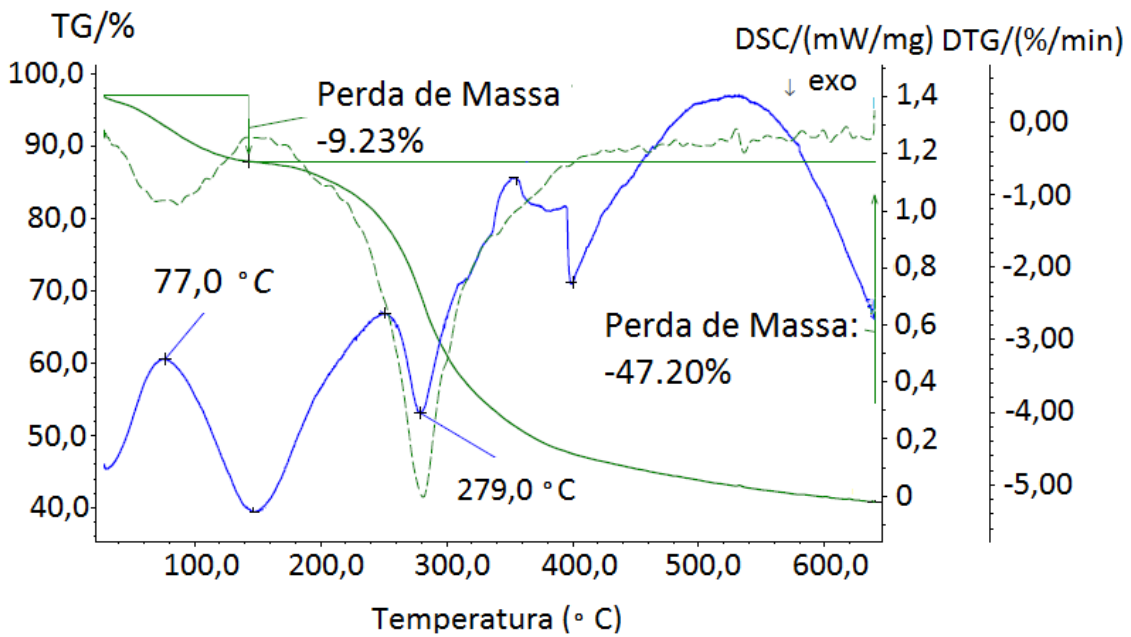


Figura 4.11 Gráfico de DSC-TGA de uma amostra de CS.

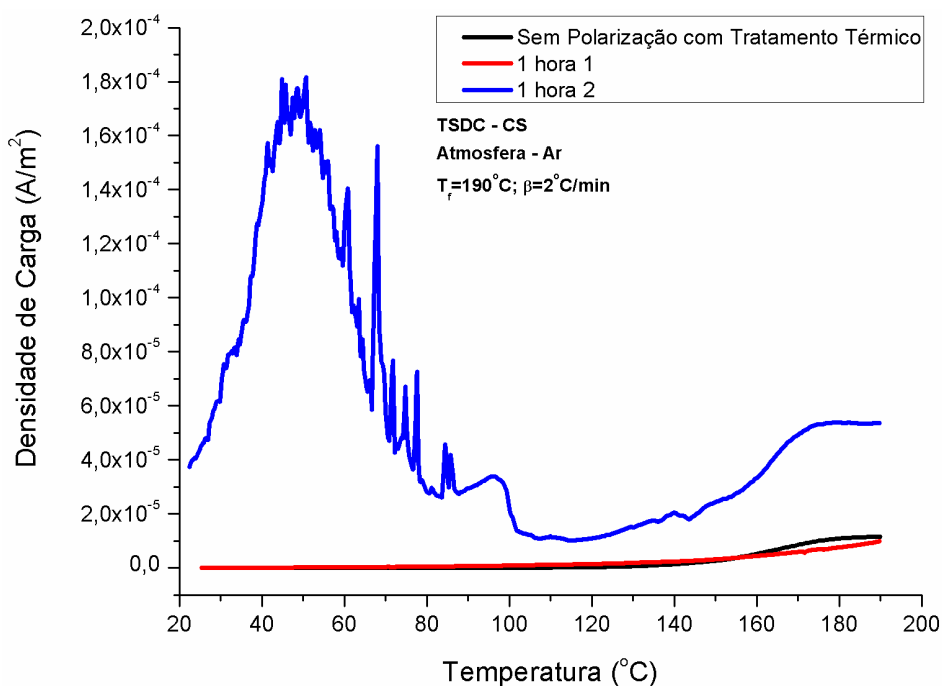
#### 4.6. TSDC

De modo a estudar a resposta elétrica das amostras, de CS e CS70/HAp30, produzidas em função da temperatura foram realizados ensaios de TSDC, em atmosfera de ar, com e sem aplicação de campo elétrico constante, positivo e negativo, de intensidade 4.5 kV/cm. Devido ao processo de secagem dos filmes em caixas de Petri, ficando uma das superfícies (inferior) do filme em contacto com a base da caixa, poderão existir diferenças entre as superfícies superior e inferior. Deste modo, optou-se por colocar a amostra sempre na mesma posição e analisar a superfície superior, exceto quando referido o contrário. Para tal, vários procedimentos foram seguidos consoante o que se pretendia analisar. De salientar que os gráficos de TSDC apresentados foram construídos com base em médias das repetições feitas para cada procedimento (mas sempre com amostras diferentes, porque não é possível usar uma amostra mais que uma vez, como é visível, por exemplo nos resultados de DRX).

Com o intuito de perceber o comportamento natural das amostras, bem como a existência, ou não, de reprodutibilidade entre elas, aqueceram-se as amostras a uma taxa de aquecimento  $\beta=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , desde a temperatura ambiente até aos  $190^{\circ}\text{C}$ . Na **Figura 4.12** estão representadas as curvas referentes a esse procedimento e a sua comparação com uma amostra tratada termicamente, ou seja, uma amostra aquecida, a uma taxa de  $\beta=2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , até aos  $130^{\circ}\text{C}$  (sendo que o aquecimento desde a temperatura ambiente até aos  $100^{\circ}\text{C}$  foi realizado em vácuo e dos  $100^{\circ}\text{C}$  aos  $130^{\circ}\text{C}$  em ar ambiente), sendo mantida a essa temperatura durante 1 hora e, passado esse tempo, arrefecida rapidamente até à temperatura ambiente. Depois procede-se à realização do ensaio de TSDC tal como nas amostras não tratadas de CS. Ao analisar a **Figura 4.12** observam-se dois tipos de comportamento em amostras de CS sem polarização e sem tratamento térmico

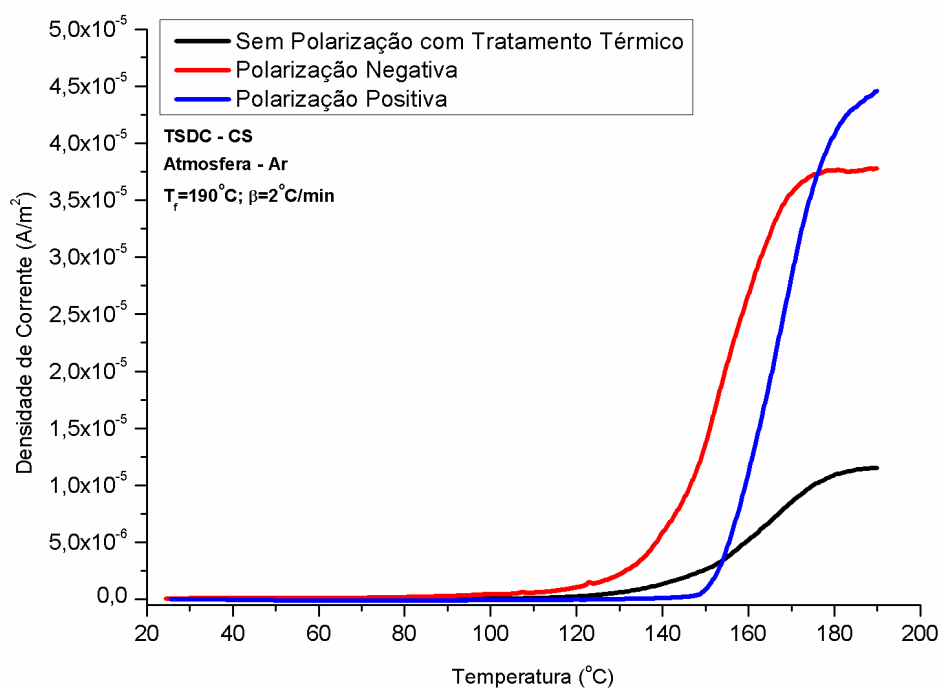
(curvas a azul e vermelho), muito dependentes da quantidade de água e ácido acético presentes na amostra. Isto evidencia a fraca reprodutibilidade entre amostras não polarizadas e sem tratamento térmico. Na curva a vermelho, as amostras têm um comportamento similar às sem polarização e tratadas termicamente, denotando a pouca ou insignificante presença de solventes. Já no que respeita à curva a azul são observados dois picos, o primeiro, de maior intensidade, com um máximo perto dos 50°C, e o segundo, de intensidade menor, por volta dos 100°C. O primeiro pode associar-se à evaporação do ácido acético, ainda presente na amostra. Enquanto o pico perto dos 100°C sugere a evaporação de água, coincidindo com os resultados já obtidos com a técnica de DSC [51,61,62]. Quando condicionadas, ou seja, quando tratadas termicamente, as amostras, que naturalmente apresentam picos nas mesmas zonas da curva azul, deixam de apresentá-los, o que sugere que o condicionamento realizado é eficaz.

Há ainda uma outra conclusão que é possível aferir através da análise da **Figura 4.12**. As densidades de carga, nas curvas a azul e a vermelho, para a temperatura de 190°C, são  $5.38 \times 10^{-5} \text{ A/m}^2$  e  $1.03 \times 10^{-5} \text{ A/m}^2$ , respetivamente. Esta diferença, com um valor de densidade de corrente superior para a curva azul, pode estar relacionada com os picos a 50°C e a 100°C que parecem, também, influenciar o comportamento da amostra a temperaturas mais elevadas, elevando os valores de densidade de corrente devido, possivelmente, a água ligada.



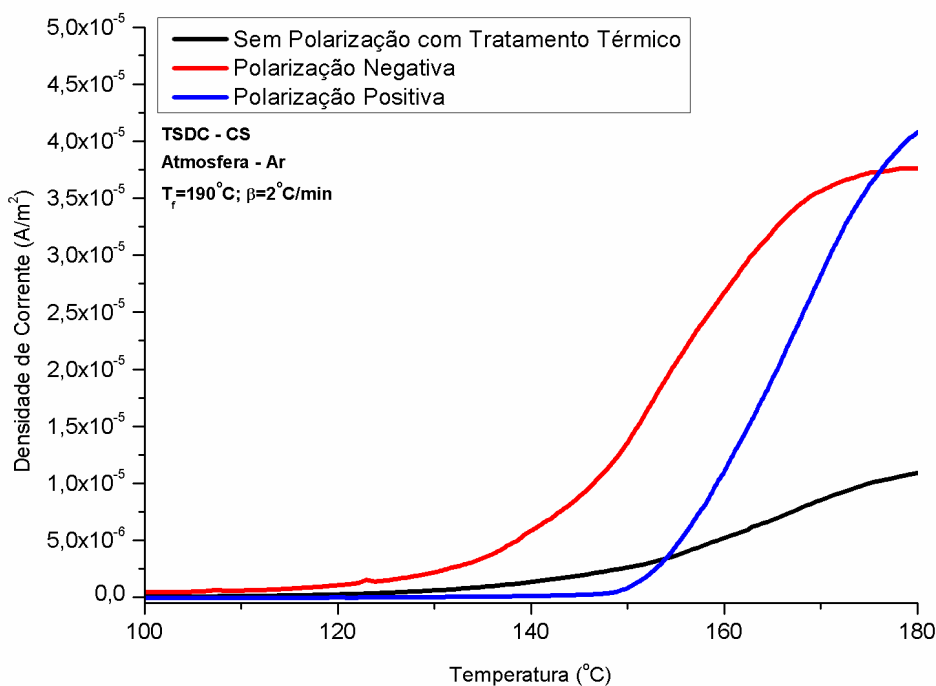
**Figura 4.12** Comparação das médias dos espectros de TSDC das amostras sem polarização sem tratamento térmico, com dois comportamentos distintos, e das amostras sem polarização com tratamento térmico.

Na **Figura 4.13** são apresentados os gráficos das amostras sem polarização e com tratamento térmico e das amostras polarizadas positiva e negativamente. Como seria de esperar quer o gráfico representativo da polarização positiva, quer o da polarização negativa não evidenciam os picos a 50°C e a 100°C, anteriormente referidos. Isto deve-se ao facto de que o procedimento seguido para a polarização pressupõe o mesmo condicionamento feito à amostra durante o tratamento térmico, ou seja, o aquecimento até aos 130°C (sendo até aos 100°C em vácuo, tal como referido anteriormente). A diferença entre estes dois procedimentos reside no facto de, no caso da polarização, chegada à temperatura de 130°C, ser aplicada uma tensão positiva ou negativa, de acordo com o pretendido, durante 1 hora. No final desse tempo a amostra é arrefecida rapidamente com o campo aplicado, de modo a “aprisionar” as orientações dos dipolos e a distribuição de cargas presentes na amostra devido à ação do campo elétrico. Outra característica que se observa é a subida abrupta no final das curvas, característica relacionada com a degradação do quitosano, e que vai ser denominada no texto como subida de degradação.



**Figura 4.13** Média dos espectros de TSDC das amostras de CS com tratamento térmico, com polarização positiva e polarização negativa.

Uma vez que a polarização é feita a 130°C seria de esperar, nos gráficos das amostras polarizadas, um pico de polarização entre os 130°C e os 160°C. No entanto, estas amostras já possuem características que levam à existência de outros picos (como seja a subida de degradação observada a partir dos 120°C no gráfico da amostra tratada termicamente), por consequência, o que é observado nos gráficos é a soma destas características com o pico de polarização. Por isso, na **Figura 4.14**, apesar de nas curvas a vermelho e a azul, não ser visível um pico de polarização, é notória uma diferença entre as curvas de polarização positiva e negativa, sobretudo quando comparadas com a curva relativa ao tratamento térmico. Na polarização positiva, o gráfico desce em relação ao tratamento térmico, uma vez que será de esperar neste tipo polarização um pico de corrente com valores negativos, logo vai subtrair-se ao início da subida de degradação da amostra. Este efeito torna-se evidente com a diminuição dos valores da densidade de corrente do gráfico a azul, um pouco antes dos 130°C. Já a polarização negativa, em que se espera obter um pico de polarização positivo, este vai somar-se ao início da subida da degradação da amostra, apresentando-se por isso o gráfico com densidades de carga superiores ao tratamento térmico. No que diz respeito ao pico de degradação, parece que em ambas as polarizações (positiva e negativa) a aplicação do campo leva a um aumento da densidade de corrente desta subida (observável no final dos espectros, correspondendo às temperaturas mais elevadas, próximo dos 190°C). Pelo que a aplicação do campo elétrico, independentemente do sinal, parece potenciar a degradação.

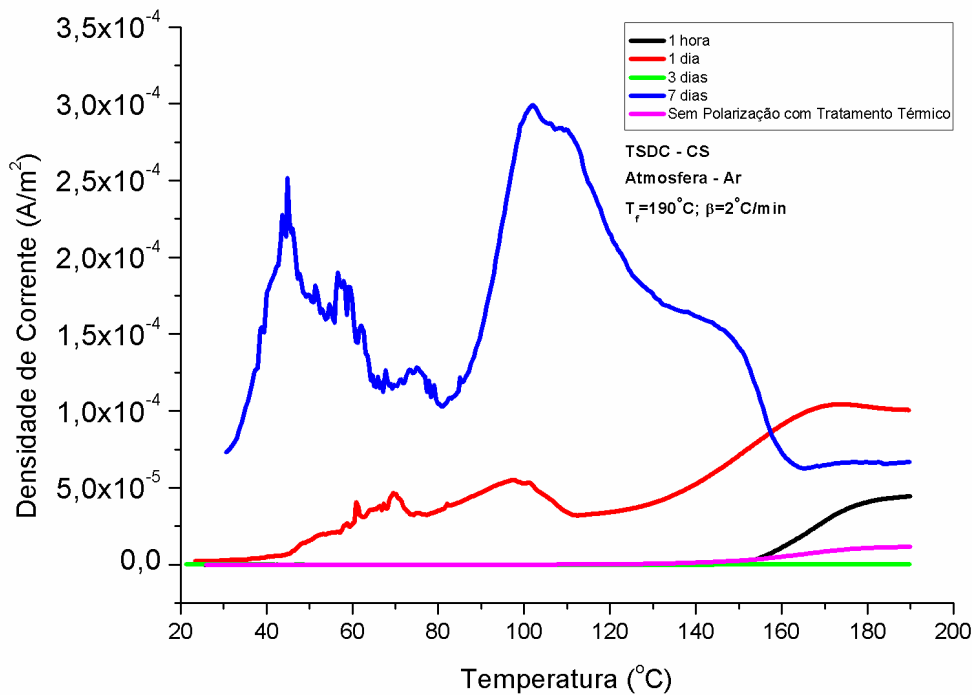


**Figura 4.14** Ampliação dos espectros de TSDC da **Figura 4.13** para temperaturas entre 110°C e 180°C.

Tendo em conta todo o traçado dos gráficos da **Figura 4.13** e, calculando, através do integral de área das curvas, os valores da densidade de carga total que se obtêm são: para o tratamento térmico  $3.55 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$ , para a polarização positiva  $1.03 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$  e para a polarização negativa  $1.43 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$ . Isto sugere, mais uma vez, que há influência no comportamento das amostras quando polarizadas, uma vez que, as densidades de carga total são mais elevadas nestas do que nas amostras só com tratamento térmico.

Foram realizados dois estudos de decaimento, um referente à polarização positiva e outro à negativa, fazendo variar o tempo entre o fim da polarização e a aquisição da corrente de despolarização. As variações de tempo consideradas foram de 1 hora, 1, 3 e 7 dias, sendo as amostras mantidas no exsiccador após serem retiradas do setup de polarização até serem novamente recolocadas para a realização do ensaio de TSDC. Será de esperar que as densidades de carga das curvas vão diminuindo com o aumento do tempo entre o fim da polarização e a aquisição da corrente de despolarização.

Analisando a **Figura 4.15**, referente ao decaimento positivo das amostras de CS, os resultados das curvas relativas a 1 dia e 3 dias não coincidem com o esperado. Como dito acima, seria de esperar que os valores de densidade de corrente diminuíssem ao longo do tempo. Tal não acontece e, com os dados obtidos até este momento, não é possível explicar o que poderá estar a acontecer. O escasso número de resultados existentes na literatura sobre propriedades elétricas e dielétricas de filmes de CS e o facto do número de testes realizados ter sido reduzido para se analisar um padrão de comportamento, impossibilita a justificação completa destes resultados. Para poder perceber o que estará a acontecer será necessário realizar mais testes, procedendo ou a alterações nas condições do TSDC, ou a alterações nas amostras. No que respeita às alterações do TSDC poderá variar-se o campo elétrico aplicado. Já nas condições das amostras, mantendo-se as mesmas matérias-primas, poderia alterar-se a espessura dos filmes ou proceder à reticulação dos mesmos. Caso se alterassem as matérias-primas, podiam produzir-se filmes com quitosano de diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação. Além destas experiências também se poderiam fazer estudos de modo a perceber a influência do tipo de condicionamento das amostras e das condições de armazenamento.



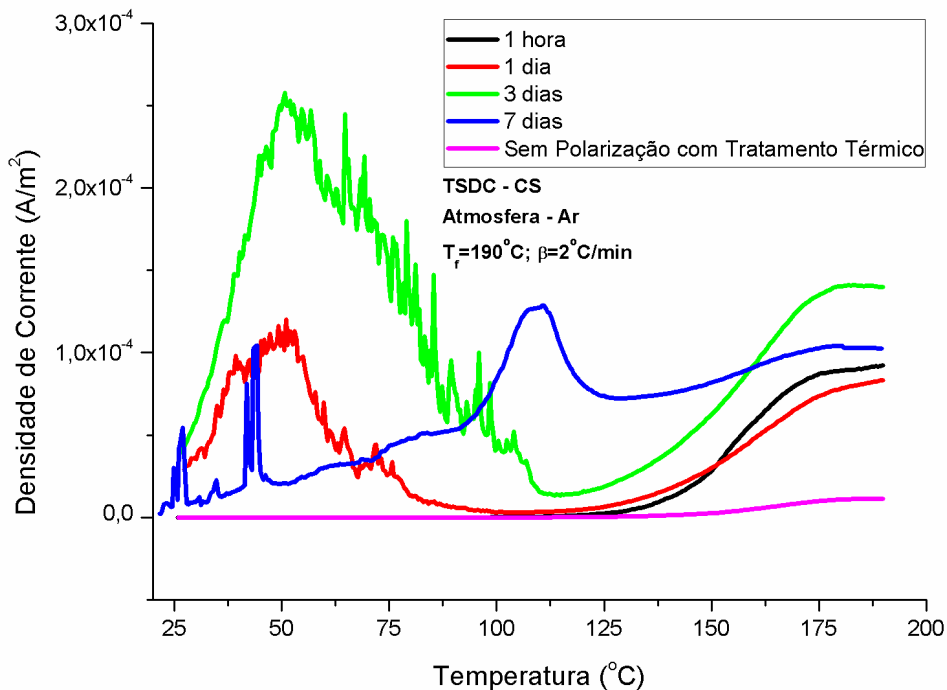
**Figura 4.15** Estudo de decaimento de carga através das médias dos espectros de TSDC das amostras de CS polarizadas positivamente.

Passando aos resultados do decaimento negativo das amostras de CS, apresentados na **Figura 4.16**, observa-se que do gráfico de 1 hora para o de 1 dia há uma diminuição da densidade de corrente por volta dos 150°C. É visível que no final de 1 dia há o aparecimento de um pico perto dos 50°C, indicativo da presença de ácido acético na amostra que vai evaporando. O ácido acético é resultante do processo de obtenção dos filmes a partir de uma solução, e deve ter difundido do interior da amostra para a sua superfície. Isto indica que a diminuição inicial observada (ao fim de 1h) se deve somente à evaporação de ácido acético nas camadas superficiais, quando o aquecimento foi efetuado para se polarizar a amostra a 130°C (ou tratamento térmico). Mais uma vez, a presença do ácido acético superficial, faz com que o comportamento da amostra seja alterado a temperaturas mais elevadas, havendo uma subida das densidades de carga ao longo de todo o gráfico. Isto significa que, apesar do esperado ser que a curva de 1 dia se mantivesse sempre abaixo da de 1 hora, tal não acontece e poderá atribuir-se ao ácido acético.

Passando aos resultados, relativos aos 3 dias, seria de esperar que os valores da densidade de corrente sejam inferiores aos apresentados para os decaimentos de 1 hora e de 1 dia. No entanto, e observando o gráfico, isso não acontece e é evidente, mais uma vez, a presença, de um pico a 50°C, mais elevado do que no gráfico referente a 1 dia de decaimento. O que

poderá estar a originar este comportamento, fora do esperado, é o facto de que no procedimento da polarização há, antes da aplicação do campo elétrico, um tratamento térmico até aos 130°C que permite a evaporação de algum ácido acético presente na superfície da amostra, como referido antes. Esta afirmação pode ser confirmada observando a curva da amostra que sofreu tratamento térmico (a cor-de-rosa) onde se vê que é inexistente a presença de picos, sendo a densidade de corrente para toda a gama de temperatura inferior à registada para as amostras polarizadas. No entanto, o que parece acontecer é que o tratamento térmico não elimina todo o ácido acético presente na amostra e, portanto, aquele que não se encontra à superfície não é detetado, no TSDC, passada um hora, mas provavelmente este ácido acético ainda presente, inicia um processo de difusão até à superfície que começa a ser detetado passado 1 dia e torna-se mais evidente no final de 3 dias.

Na curva (a azul) referente ao comportamento da amostra no final de 7 dias, onde o esperado seria uma curva com as densidades de carga menores que para tempos de decaimento inferior, observam-se dois picos, um perto dos 50°C e outro por volta dos 100°C. Em relação ao pico próximo dos 50°C, este tem densidades de carga menores do que as das curvas de 1 dia e de 3 dias. Isto sugere que aos 3 dias de decaimento o ácido acético já difundiu praticamente todo até à superfície, sendo detetado com maiores intensidades a evaporação do ácido das camadas superficiais da amostra, e, que a partir daí, a presença de ácido acético é bastante menor. Por outro lado, nesta curva deteta-se um pico por volta dos 100°C e inexistente para menos tempo de decaimento. Um pico a esta temperatura é característico da evaporação de água, que poderá ter sido, lentamente, absorvida pela amostra, que é bastante hidrofílica, graças à sua composição em quitosano. O facto de ter sido armazenada no exsiccador tornou mais lenta a absorção de água pelo filme, tendo-se apenas atingindo valores detetáveis no termograma ao fim de 7 dias. Por este motivo, apesar de um pico de menor intensidade por volta dos 50°C, a presença de água revelada pelo pico a 100°C, influencia também os valores da densidade de corrente para temperaturas acima dos 100°C. A densidade de corrente para as temperaturas mais elevadas do TSDC está dependente da diminuição esperada devido ao tempo que passou desde a polarização e à influência das evaporações do ácido acético e da água, presentes no filme. Desta forma para as temperaturas mais altas seria de esperar, com a passagem do tempo, que a densidade de corrente fosse diminuindo. O que é observado nas curvas de 1 hora e 1 dia. Já para os 3 dias há uma subida significativa que provavelmente estará associada ao pico largo e de amplitude elevada que se observa nos 60-70°C (e que deve englobar o efeito do ácido acético e da água). Comparando as curvas de 7 dias e 3 dias, volta-se a verificar uma diminuição da densidade de corrente para as temperaturas mais elevadas, juntamente com o desaparecimento do pico do ácido acético e o aumento do pico da evaporação da água.

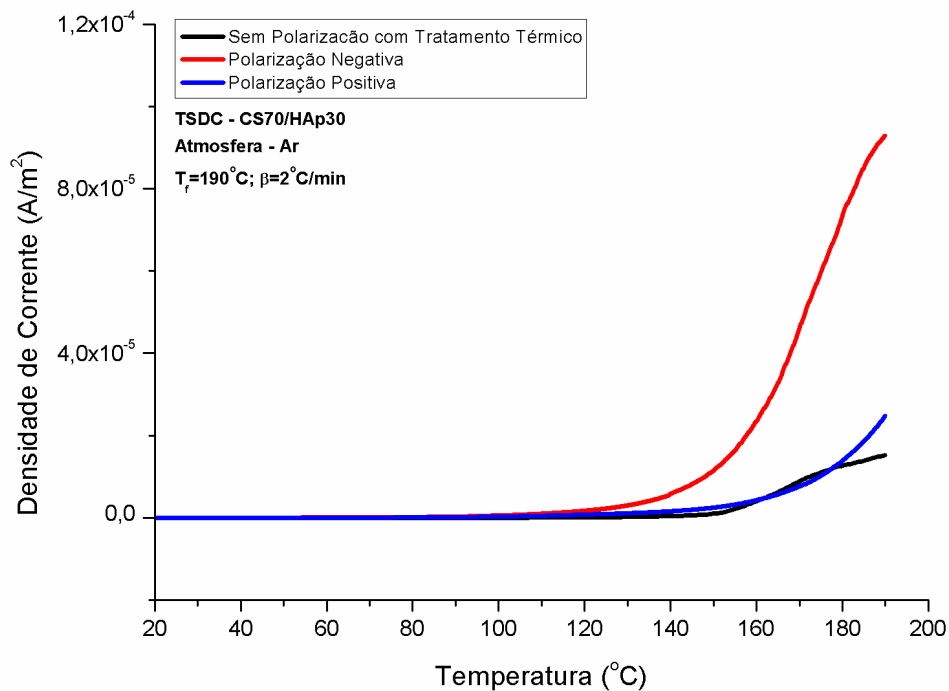


**Figura 4.16** Estudo de decaimento de carga através das médias dos espectros de TSDC das amostras de CS polarizadas negativamente.

No que respeita às amostras de CS/HAp (**Figuras 4.17 a 4.19**), é importante salientar, que também os resultados aqui apresentados são referentes ao cálculo de médias dos vários ensaios realizados.

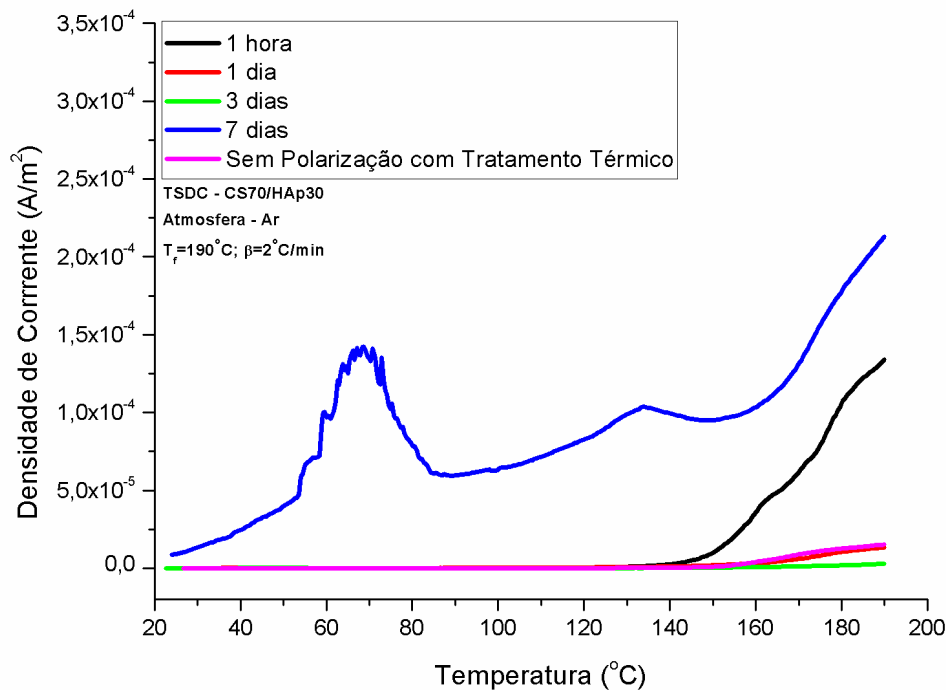
Observando a **Figura 4.17**, é notória uma diminuição das densidades de corrente em comparação com os valores encontrados nos gráficos referentes a amostras compostas somente por CS. Esta diminuição é esperada uma vez que a HAp é um melhor dielétrico que o CS mas dificulta a visualização da influência da polarização em comparação com as amostras não polarizadas e tratadas termicamente. Pela análise mais detalhada das curvas apresentadas, comparando a curva a preto, relativa ao tratamento térmico, e a curva a azul, relativa à polarização positiva, não é visível uma diferença muito significativa entre elas. Comparando os valores de densidade de carga total estes são  $3.49 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$  e  $4.41 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$ , respetivamente. Isto demonstra, mais uma vez, que a polarização positiva nas amostras de CS/HAp tem um efeito menos significativo que nos filmes de CS.

Já no que respeita à curva da polarização negativa, tal como nas amostras de CS, o efeito aumentar a corrente, somando-se à subida devida à degradação, própria das amostras, culminando num aumento dos valores de densidade de corrente da curva em relação ao apresentado pelas amostras tratadas termicamente. Em termos de densidade de carga total a polarização negativa exhibe um valor de  $2.425 \times 10^{-3} \text{ C/m}^2$ , superior ao da positiva.



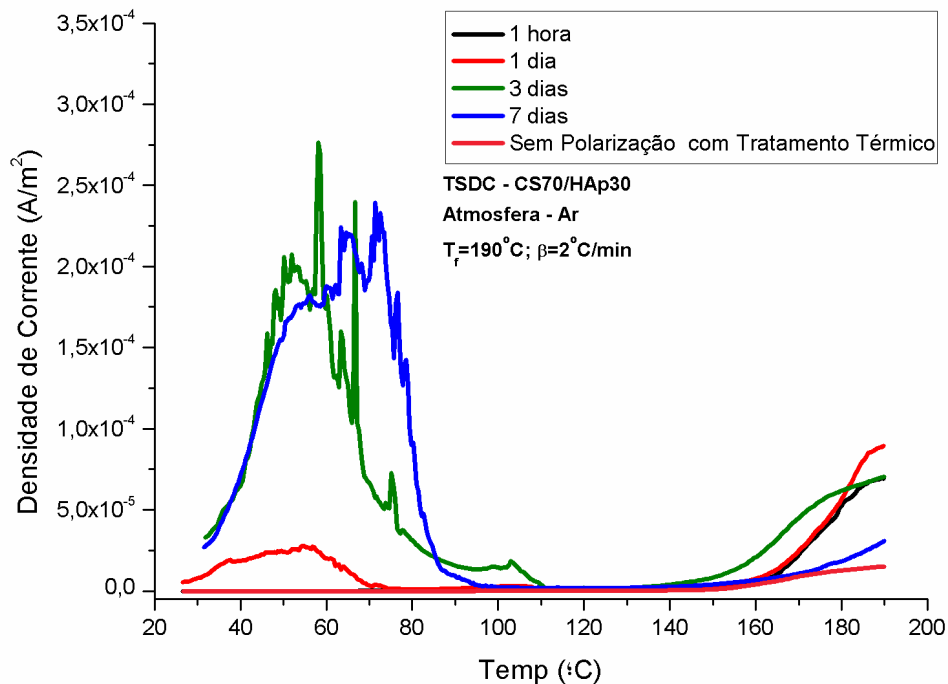
**Figura 4.17** Média dos espectros de TSDC das amostras de CS70/HAp30 com tratamento térmico, com polarização positiva e polarização negativa.

Os resultados obtidos no estudo de decaimento da polarização positiva nas amostras com adição de HAp, sugerem uma maior reprodutibilidade. Observando a **Figura 4.18**, as densidades de corrente diminuem, gradualmente, de 1 hora para 3 dias, estando concordantes com o esperado. No entanto, a curva referente ao comportamento da amostra no final de 7 dias apresenta dois picos, um que se inicia por volta dos 50°C e outro por volta dos 130°C. Estes valores são atribuídos à presença de ácido acético e água, na amostra, que evaporam por volta das temperaturas a que se encontram os máximos dos picos. Observa-se também um aumento da densidade de corrente na totalidade do gráfico e, com mais relevância nas temperaturas mais elevadas, de modo semelhante ao observado na **Figura 4.16**. Ao contrário do que acontece nas amostras compostas somente por CS, que no final do primeiro dia já é detetado um pico relativo ao ácido acético, nas amostras constituídas por CS/HAp apenas é notado no final de 7 dias. Isto sugere que, a HAp dificulta a difusão do ácido acético até à superfície da amostra.



**Figura 4.18** Estudo de decaimento de carga através das médias dos espectros de TSDC das amostras de CS70/HAp30 polarizadas positivamente.

Na **Figura 4.19**, são apresentados os resultados do estudo de decaimento da polarização negativa de amostras de CS/HAp. Seria esperada uma diminuição das densidades de carga com o aumento da variação de tempo entre o fim da polarização e a aquisição das correntes de despolarização. No entanto, o que acontece é que há um aumento desses valores de 1 hora para 1 e 3 dias e há, posteriormente, uma descida, para 7 dias. Tal como no estudo de decaimento da polarização positiva de amostra de CS, como referido, a pouca bibliografia encontrada não apresentava informação que pudesse ajudar a interpretar estes dados e a impossibilidade de terem sido feitos mais testes, com variação de diferentes parâmetros, não permitiu concluir acerca do que poderá estar a provocar este comportamento.



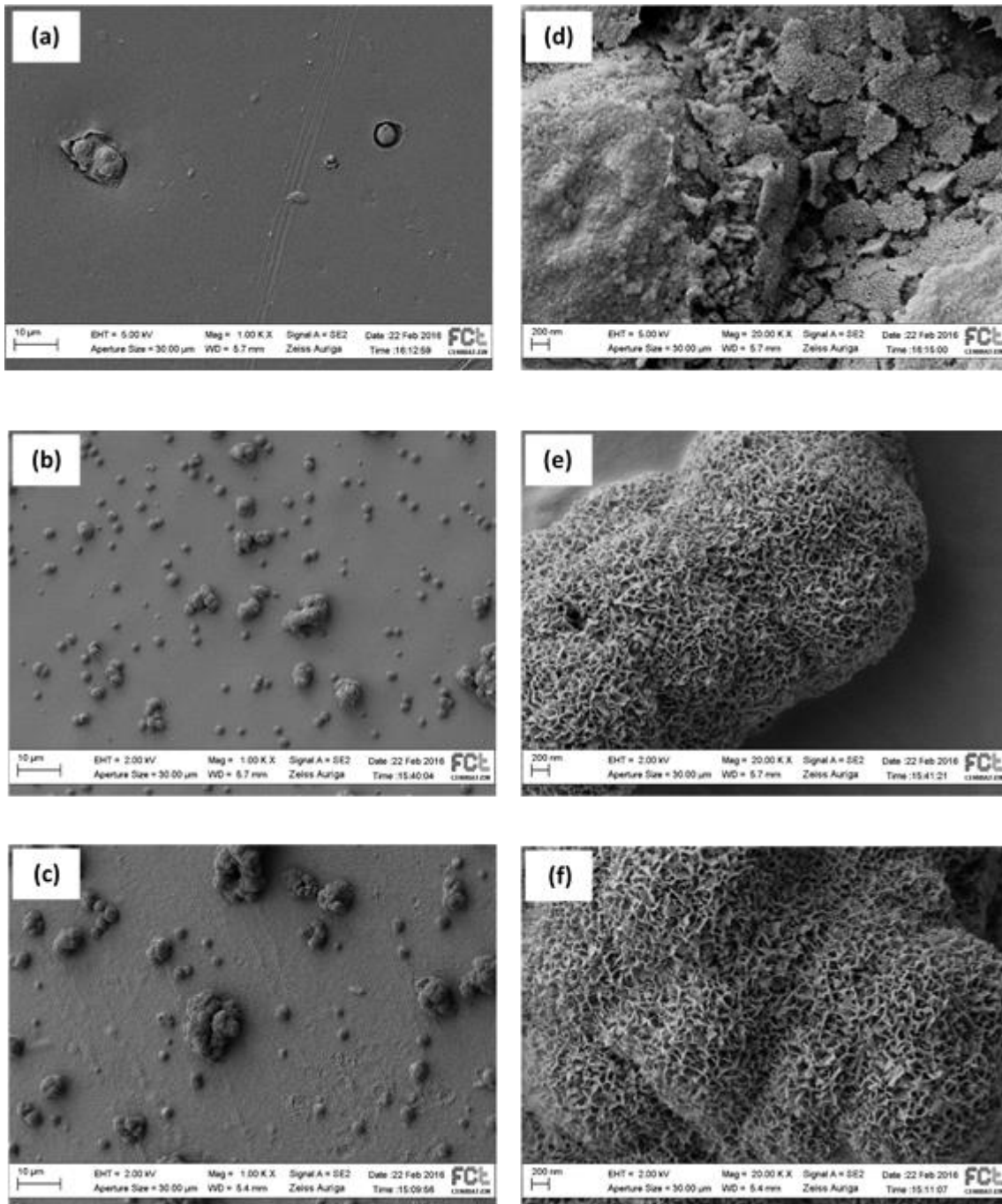
**Figura 4.19** Estudo de decaimento de carga através das médias dos espectros de TSDC das amostras de CS70/HAp30 polarizadas negativamente.

## 4.7. Ensaio de Bioatividade

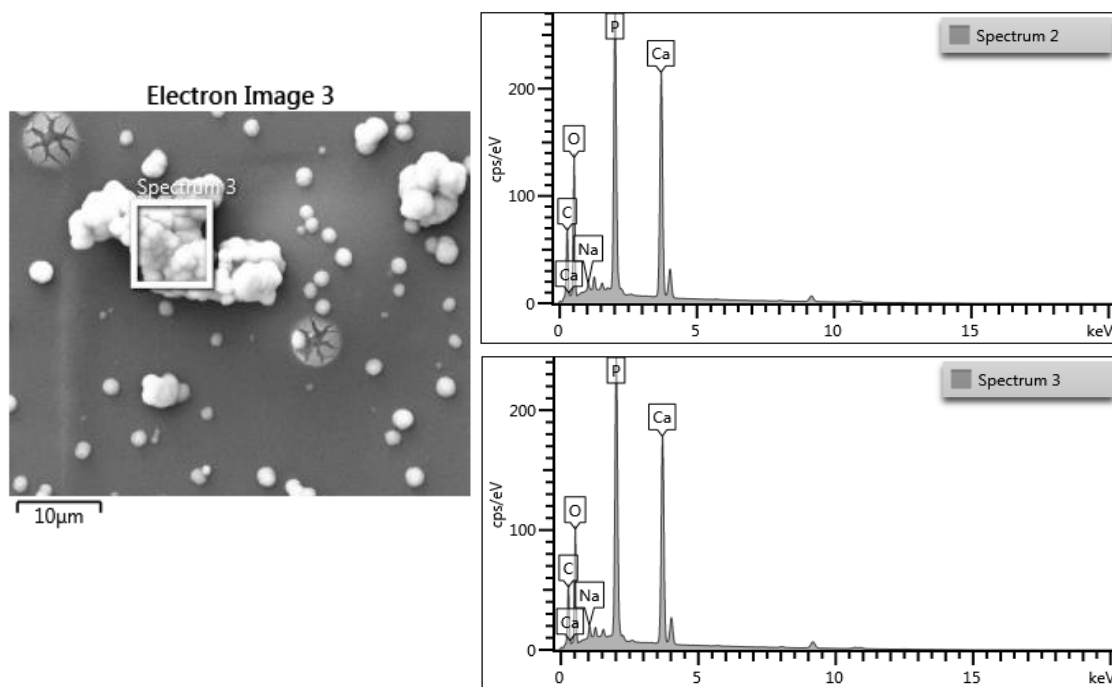
Como referido em 3.3.3.6., nos ensaios de bioatividade as amostras foram imersas numa solução simuladora do fluido corporal, SBF, com uma concentração 1,5x a do plasma sanguíneo, por diferentes períodos de tempo. Decorridos esses períodos de tempo estipulados, as amostras foram retiradas do SBF, lavadas e secas numa estufa a  $37^\circ\text{C}$ . Para caracterizar as suas superfícies recorreu-se à técnica de SEM-EDS. Estes ensaios permitiram verificar a deposição de fosfatos de cálcio à superfície dos filmes.

Relativamente às imagens apresentadas na **Figura 4.20**, com duas ampliações diferentes, estas são referentes à superfície de amostras de CS imersas durante 7 dias em SBF, com três tipos de tratamento, sem polarização e com tratamento térmico, com polarização positiva e com polarização negativa. Observando as imagens verifica-se que houve deposição de fosfatos de cálcio em todas as amostras, sendo que a maior deposição é visível na amostra com polarização negativa, seguida da polarizada positivamente e, por fim, na amostra com tratamento térmico. Entre a polarização negativa e a positiva, nota-se uma maior densidade de cristais na superfície polarizada negativamente. A presença de estruturas constituídas maioritariamente por Ca e P foi confirmada com os espectros obtidos através da técnica de EDS, **Figura 4.21**. Durante

a realização das técnicas de SEM-EDS algumas amostras destruíram-se não havendo, por isso, registo desses espectros.

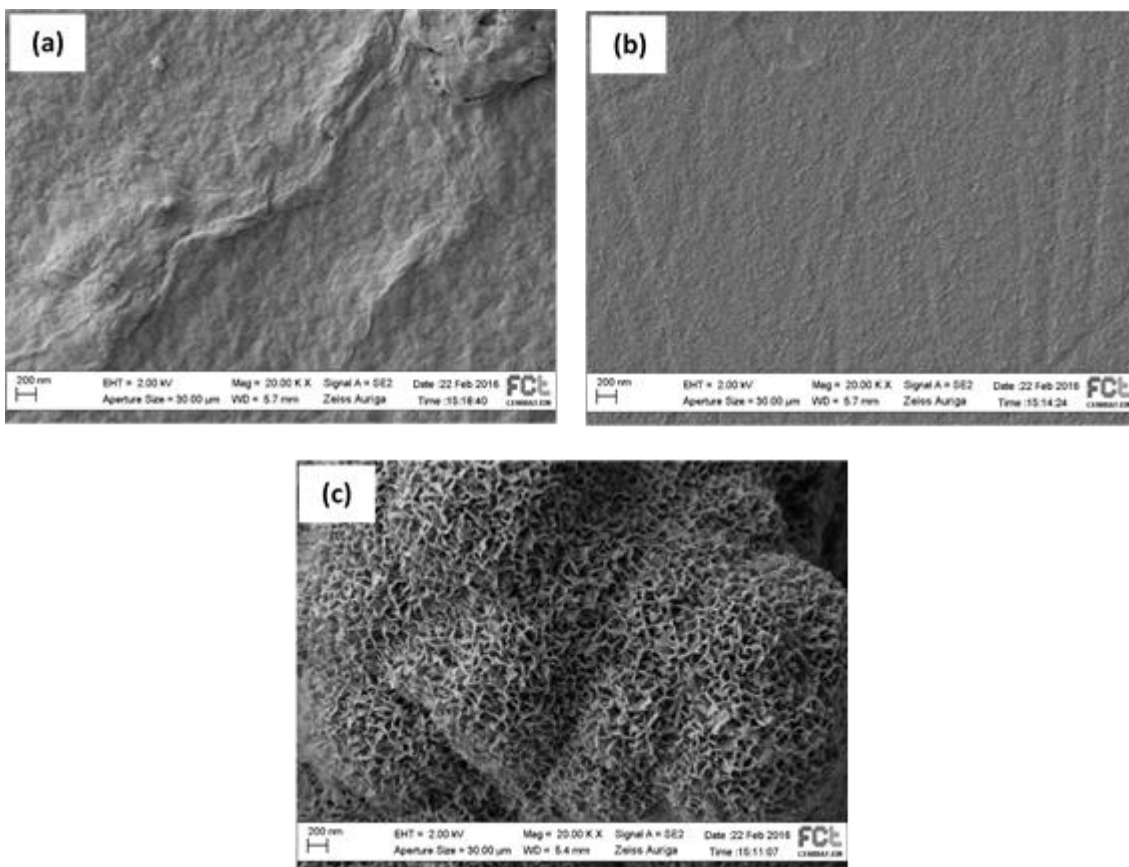


**Figura 4.20** Imagens de SEM das amostras de CS imersas 7 dias em SBF à temperatura de 37°C: (a) e (d) sem polarização e com tratamento térmico, com ampliações de 10 µm e 200nm, respetivamente; (b) e (e) com polarização positiva, com ampliações de 10 µm e 200nm, respetivamente; (c) e (f) com polarização negativa, com ampliações de 10 µm e 200nm, respetivamente.



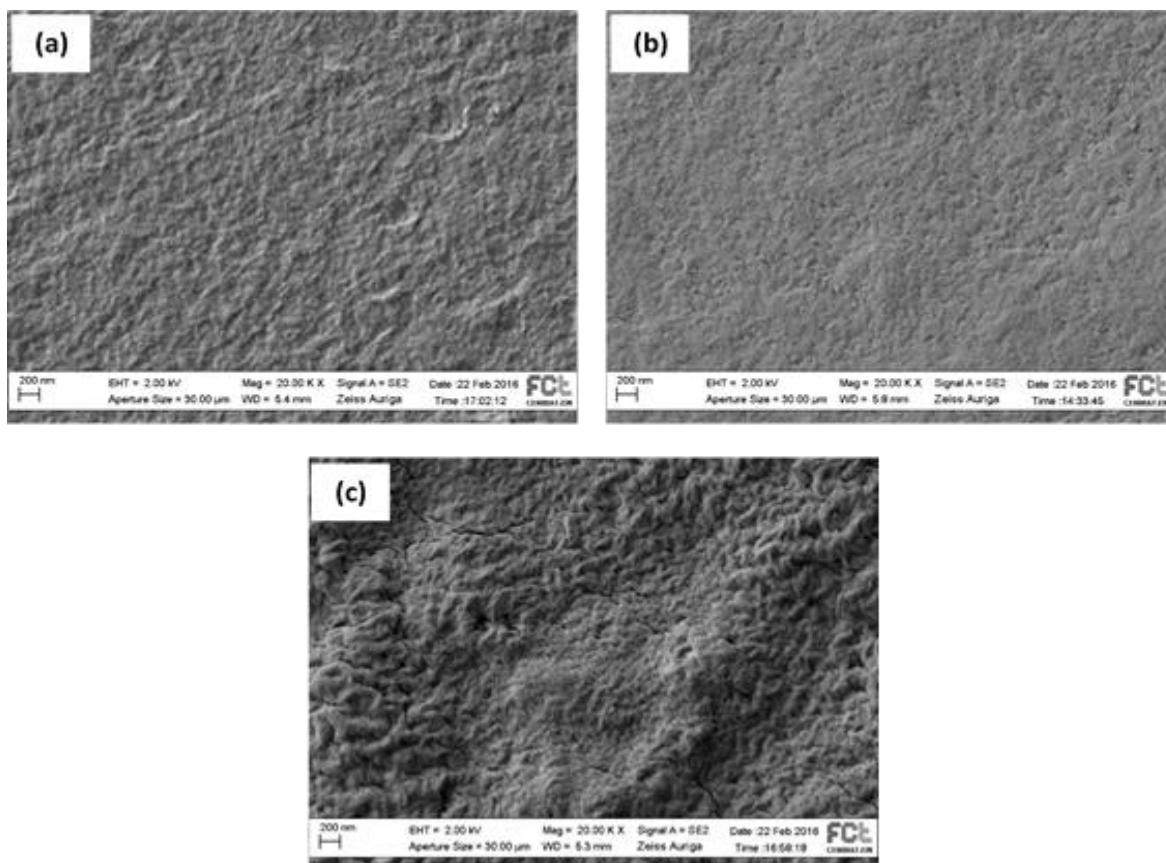
**Figura 4.21** Imagem de SEM de uma amostra de CS , imersa 7 dias em SBF à temperatura de 37°C e respectivos espectros de EDS.

Em termos de evolução da camada apatítica, optou-se por analisar as superfícies polarizadas negativamente, uma vez que foi com este procedimento que se apresentou uma deposição de fosfatos de cálcio maior. Na **Figura 4.22**, é visível que, no final de 1 hora, há uma certa rugosidade na amostra sugerindo um início da formação de uma camada apatítica. Ao terceiro dia a camada parece estar completamente formada e homogénea, aparentando não existir qualquer deposição, apenas uma superfície aparentemente lisa. Passados 7 dias, além da camada apatítica há, também, a presença de cristais de CaP, que se apresentam esféricos, densos e em forma de couve-flor.



**Figura 4.22** Imagens de SEM de amostras de CS, polarizadas negativamente, e imersas em SBF à temperatura de 37°C, com ampliação de 200 nm: (a) 1 hora; (b) 3 dias; (c) 7 dias.

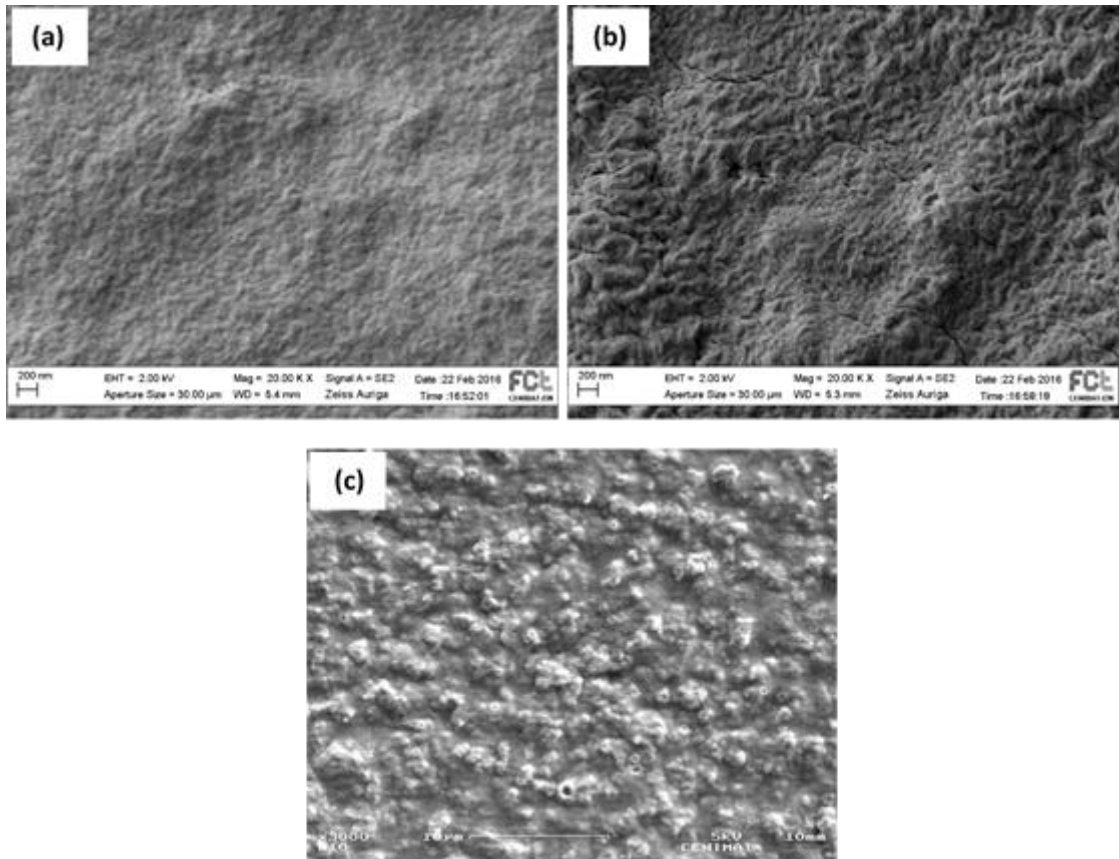
A **Figura 4.23** permitiu comparar as várias superfícies das amostras de CS70/HAp30. Usaram-se as imagens relativas aos resultados obtidos ao final de 3 dias de imersão em SBF devido ao facto de ter surgido um imprevisto que impossibilitou a utilização do mesmo equipamento de SEM para a caracterização da superfície das amostras ao final de 7 dias. Analisando as imagens (a), (b) e (c), da **Figura 4.23**, observa-se que ao terceiro dia é visível a formação de uma camada apatítica, quer nas amostras sem polarização, quer nas de polarização positiva e negativa. Em termos de densidade da camada formada, a polarização negativa sugere uma maior densidade, tal como já descrito nas amostras constituídas somente por CS. Não foi possível obter os espectros de EDS, uma vez que as amostras se destruíram quando se realizou a técnica.



**Figura 4.23** Imagens de SEM, com ampliação de 200 nm, das amostras de CS/HAp imersas 3 dias em SBF à temperatura de 37°C: (a) sem polarização e com tratamento térmico; (b) com polarização positiva; (c) com polarização negativa.

Analisando a **Figura 4.24**, referente à evolução da formação da camada apatítica nas amostras de CS70/HAp30, observa-se que, ao final de 1 hora, é visível o aumento da rugosidade na superfície da amostra, o que sugere a formação de uma camada de fosfatos de cálcio. Ao terceiro dia, essa camada apresenta-se com uma maior densidade. Na imagem referente a 7 dias de imersão em SBF, apesar da ampliação ser menor é possível ver a presença de cristais esféricos de CaP que cobrem toda a superfície da amostra.

Esta análise evolutiva permite então concluir que, quanto maior o tempo de imersão das amostras em SBF, mais densa se torna a camada apatítica. Mais uma vez, não foi possível obter os espectros de EDS, uma vez que as amostras se destruíram durante a realização da técnica.



**Figura 4.24** Imagens de SEM, de amostras de CS/HAp, polarizadas negativamente, e imersas em SBF à temperatura de 37°C: (a) 1 hora, com ampliação de 200nm; (b) 3 dias, com ampliação de 200nm; (c) 7 dias, com ampliação de 10 µm.



## Conclusões e Perspetivas Futuras

Tendo presente vários estudos que referem que o processo de osteointegração é influenciado pela presença de cargas elétricas à superfície cerâmica do implante, desenvolveu-se o presente trabalho tendo como objetivo central o estudo da bioatividade de filmes de CS e CS/HAp, sem polarização e com polarização positiva e negativa, para possível aplicabilidade em implantes ósseos.

Produziram-se, inicialmente, filmes de CS e CS/HAp através da preparação de soluções que, após homogeneização, foram vertidas para caixas de Petri e secas, durante 24h, numa estufa a 37°C. Apesar de não terem sido produzidos durante a realização deste trabalho, foram feitas análises de DRX e FTIR aos pós de HAp utilizados, que haviam sido produzidos pelo método de sol gel. Da análise de DRX aos pós de HAp, sinterizados a 700°C, observou-se a presença de HAp cristalina com uma ligeira presença de CaO e  $\beta$ -TCP, que ocorre por decomposição da HAp, quando esta se encontra na presença de água. Pela análise do espectro de FTIR é possível constatar a formação de estruturas apatíticas com a presença de bandas características dos grupos fosfatos entre os 1100cm<sup>-1</sup> e os 900cm<sup>-1</sup>. Além disso foi possível detetar substituições dos iões carbonato nos iões fosfato, indicando que a HAp produzida é carbonatada do tipo B.

Com a técnica de DRX feita aos filmes de CS sem tratamento térmico, com tratamento térmico e com polarização foi possível perceber que sem tratamento térmico o material é semi-cristalina; com o tratamento térmico há uma diminuição da cristalinidade; e, com a polarização o efeito do tratamento térmico (de diminuir a cristalinidade) é atenuado, pressupondo que a polarização é importante no processo de cristalização do quitosano, provavelmente ajudando na orientação preferencial média das moléculas.

As técnicas de DRX e FTIR realizadas aos filmes de CS/HAp não sofreram alterações significativas em relação às dos filmes de CS o que faz pressupor que, provavelmente, houve um encapsulamento da HAp por parte do quitosano que impediu a sua deteção através destas duas técnicas de caracterização. Pela técnica de DSC-TGA verifica-se que os filmes de CS não se encontram totalmente secos devendo-se isto ou ao processo de secagem, durante a produção

de amostras, ou ao tempo e condições de armazenamento. Estes resultados obtidos com esta última técnica foram também evidenciados com a realização da caracterização elétrica.

O uso da técnica de TSDC permitiu observar, tanto nos filmes de CS, como nos de CS/HAp, a influência da presença de ácido acético nas amostras e o efeito da água incorporada pelas mesmas. Deste modo, obtiveram-se picos por volta dos 50°C, para o ácido acético, e dos 100°C, para a água. Estes picos parecem influenciar o comportamento das amostras para temperaturas mais elevadas, tendo, por isso, sido difícil visualizar os picos de polarização. No entanto, apesar desta dificuldade, há, no caso das amostras de CS e CS/HAp polarizadas negativamente, uma subida dos valores da densidade de corrente em relação às amostras sem polarização. Para a polarização positiva verifica-se uma descida desses valores para as amostras de CS, e valores bastante semelhantes para as de CS/HAp, quando comparados com as amostras sem polarização. Os resultados evidenciam uma maior deposição de carga para a polarização negativa nos dois tipos de amostras. Há ainda a referir que os gráficos de CS/HAp apresentam uma descida nos valores de densidade de corrente em relação aos das amostras de CS, como seria de esperar pela incorporação de um material cerâmico que é um melhor dielétrico.

Por último, recorreu-se à técnica de SEM para avaliar os resultados obtidos nos ensaios de bioatividade. Das imagens obtidas, foi possível concluir que ao final de 7 dias de imersão em SBF, com concentração 1.5x o plasma sanguíneo, a 37°C, as amostras de CS e CS/HAp, polarizadas negativamente, apresentam uma maior formação de camada apatítica, sendo esta formada mais rapidamente nos filmes de CS70/HAp30. Não foi possível comparar todos os resultados de EDS para os 7 dias, uma vez que, várias amostras se destruíram durante a realização desta técnica.

Com este trabalho foi possível demonstrar que a polarização de filmes de CS e CS/HAp permitiu melhorar a sua bioatividade. Estes resultados sugerem, portanto, que o uso destes biomateriais tem potencial em futuras aplicações biomédicas. Neste sentido, será importante proceder-se a otimizações e mais estudos posteriores, pelo que seria interessante:

- Melhorar o processo de produção das amostras de CS e CS70/HAp30 através da reticulação dos filmes de modo a torna-los insolúveis em água.
- Outro melhoramento ao processo de produção seria a neutralização dos filmes com NaOH, caracterizando e comparando, posteriormente, com a técnica TSDC as diferenças obtidas com amostras sem ácido acético.
- Produzir filmes com quitosano de diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação e proceder, posteriormente, à caracterização elétrica, comparando os resultados.

- Tentar melhorar a produção de filmes de CS50/HAp50, procedendo a algum tratamento que permita um aumento da coesão entre o CS e a HAp.
- Estudar as propriedades mecânicas dos filmes de CS e CS/HAp.
- Perceber, através da variação da intensidade do campo elétrico aplicado, nas amostras de CS/HAp, quais as alterações ocorridas nos resultados de TSDC.
- Realizar estudos em culturas celulares *in vitro* de modo a perceber a biocompatibilidade das amostras produzidas e a influência da polarização no metabolismo das células.
- Tentar otimizar o equipamento onde é realizada a polarização das amostras permitindo não só a polarização de mais do que uma amostra ao mesmo tempo como, a comparação de amostras polarizadas ao mesmo tempo (importante no estudo de decaimento de carga).



## Referências Bibliográficas

---

- [1] "What is Osteoporosis? | International Osteoporosis Foundation." [Online]. Available: <http://www.iofbonehealth.org/what-is-osteoporosis>. [Accessed: 04-Jan-2016].
- [2] D. Pei, J. Xu, Q. Zhuang, H.-F. Tse, and M. a Esteban, "Induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine and biology.," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 123, pp. 127–141, 2010.
- [3] D. Mohamad Yunos, O. Bretcanu, and A. R. Boccaccini, "Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds," *J. Mater. Sci.*, vol. 43, no. 13, pp. 4433–4442, 2008.
- [4] E. Fukada and I. Yasuda, "On the piezoelectric effect of bone," *J. Phys. Soc. Japan*, vol. 12, no. 10, pp. 1158–1162, 1957.
- [5] F. R. Baxter, C. R. Bowen, I. G. Turner, and A. C. E. Dent, "Electrically active bioceramics: A review of interfacial responses," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 6, pp. 2079–2092, 2010.
- [6] J. H. Jang, O. Castano, and H. W. Kim, "Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 12, pp. 1065–1083, 2009.
- [7] D. R. Nisbet, J. S. Forsythe, W. Shen, D. I. Finkelstein, and M. K. Horne, "Review paper: a review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering.," *J. Biomater. Appl.*, vol. 24, no. 1, pp. 7–29, 2009.
- [8] J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, and G. A. Rodan, *Principles of Bone Biology*, 2<sup>a</sup> ed. 2002.
- [9] F. Judas, P. Palma, and H. Figueiredo, "Estrutura e dinâmica do tecido ósseo.," Coimbra, pp. 1–51, 2012.
- [10] I. A. Fonseca, "Modificação superficial de ossos para aplicações em ortopedia," Tese de Mestrado, FCTUC, Coimbra, 2011.
- [11] A. D. S. Afonso, "Interação entre Biomateriais e Tecido Ósseo," Tese de Mestrado, FMDUP, Porto, 1998.
- [12] M. VALLETREGI, "Calcium phosphates as substitution of bone tissues," *Prog. Solid State Chem.*, vol. 32, no. 1–2, pp. 1–31, 2004.
- [13] W. Callister and D. Rethwisch, *Materials science and engineering: an introduction*, vol. 94. 2007.
- [14] R. Osório, "Estudo da influência na bioatividade da adição de materiais piezoelétricos ( BaTiO<sub>3</sub> ) a hidroxiapatite para implantes ósseos," Tese de Mestrado, FCT-UNL, Lisboa, 2012.
- [15] A. Pedrosa, "Influência da Polarização elétrica no crescimento de hidroxiapatite para Implantes Ósseos," Tese de Mestrado, FCT-UNL, Lisboa, 2011.
- [16] R. S. Park, Joon; Lakes, *Biomaterials: An Introduction*, 3th ed., pp.1-16, 2007.
- [17] M. I. P. Martins, "Desenvolvimento de hidrogéis à base de quitosano / fosfatos de cálcio para aplicações ortopédicas," Tese de Mestrado, FCT-UNL, Lisboa, 2012.
- [18] P. C. Salgado, P. C. Sathler, H. C. Castro, G. G. Alves, A. M. de Oliveira, R. C. de Oliveira, M. D. C. Maia, C. R. Rodrigues, P. G. Coelh, A. Fuly, L. M. Cabral, and J. M. Granjeiro, "Bone Remodeling, Biomaterials And Technological Applications: Revisiting Basic Concepts," *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 02, no. 03, pp. 318–328, 2011.

- [19] T. Albrektsson and C. Johansson, "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *Eur. Spine J.*, vol. 10, no. SUPPL. 2, pp. 96–101, 2001.
- [20] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 2<sup>a</sup> ed. 2004.
- [21] K. R. Mohamed, "Biocomposite Materials," in *Composites and Their Applications*, pp.115–146, 2012.
- [22] A. Francesko and T. Tzanov, "Chitin, Chitosan and Derivatives for Wound Healing and Tissue Engineering," *Chitin, Chitosan Deriv. Wound Heal. Tissue Eng.*, vol. 123, pp. 127–141, 2010.
- [23] J. Venkatesan, P. A. Vinodhini, P. N. Sudha, and S.-K. Kim, *Chitin and Chitosan Composites for Bone Tissue Regeneration*, 1st ed., vol. 73. Elsevier Inc., 2014.
- [24] E. Khor and L. Y. Lim, "Implantable applications of chitin and chitosan," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2339–2349, 2003.
- [25] A. Anitha, S. Sowmya, P. T. S. Kumar, S. Deepthi, K. P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, and R. Jayakumar, "Chitin and chitosan in selected biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, pp. 1644–1667, 2014.
- [26] J. Venkatesan and S.-K. Kim, "Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview," *Mar. Drugs*, vol. 8, pp. 2252–2266, 2010.
- [27] C. Chatelet, O. Damour, and A. Domard, "Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films," *Biomaterials*, vol. 22, pp. 261–268, 2001.
- [28] S. L. Gaspar, "Produção e Caracterização de Microesferas Compósitas de Quitosano / Fosfatos de Cálcio para Aplicações Terapêuticas no Tecido Ósseo," Tese de Mestrado, FCT-UNL, Lisboa, 2011.
- [29] A. E. Machado, "Produção de Matrizes à Base de Quitosano para o Tratamento de Feridas," Tese de Doutoramento, FCT-UNL, Lisboa, 2014.
- [30] P. K. Dutta, J. Duta, and V. S. Tripathi, "Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications," *J. Sci. Ind. Res. (India)*, vol. 63, pp. 20–31, 2004.
- [31] O. Assis, "Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS," *Quim. Nova*, vol. 33, pp. 603–606, 2010.
- [32] A. Gonsalves, C. Araújo, N. Soares, M. Goulart, and F. Abreu, "Diferentes estratégias para a reticulação de quitosano," *Quim. Nova*, vol. 34, no. 7, pp. 1215–1223, 2011.
- [33] S. Samavedi, A. R. Whittington, and A. S. Goldstein, "Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior," *Acta Biomater.*, vol. 9, pp. 8037–8045, 2013.
- [34] M. H. Fathi, A. Hanifi, and V. Mortazavi, "Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder," *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 202, pp. 536–542, 2008.
- [35] Y. Zhang, A. A. Gandhi, J. Zeglinski, M. Gregor, and S. A. M. Tofail, "A complementary contribution to piezoelectricity from bone constituents," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, vol. 19, pp. 1151–1157, 2012.
- [36] M. L. Santos, A. O. Florentino, M. J. Saeki, A. H. Aparecida, M. V. Lia Fook, and A. C. Guastaldi, "Síntese de hidroxiapatite pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: Nitrato de cálcio e ácido fosfórico," *Eclét. Quim.*, vol. 30, pp. 29–35, 2005.
- [37] L. Kong, Y. Gao, G. Lu, Y. Gong, N. Zhao, and X. Zhang, "A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *Eur. Polym. J.*, vol. 42, pp. 3171–3179, 2006.
- [38] W. W. Thein-Han and R. D. K. Misra, "Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 5, pp. 1182–1197, 2009.

- [39] F. Chen, Z. C. Wang, and C. J. Lin, "Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials," *Mater. Lett.*, vol. 57, pp. 858–861, 2002.
- [40] X. M. Pu, Q. Q. Yao, Y. Yang, Z. Z. Sun, and Q. Q. Zhang, "In vitro degradation of three-dimensional chitosan/apatite composite rods prepared via in situ precipitation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, pp. 868–873, 2012.
- [41] S. H. Kim, B. K. Lim, F. Sun, K. Koh, S. C. Ryu, H. S. Kim, and J. Lee, "Preparation of high flexible composite film of hydroxyapatite and chitosan," *Polym. Bull.*, vol. 62, pp. 111–118, 2009.
- [42] G. B. Regeneration, "Preparation and In Vitro Evaluation of Chitosan Bioelectret Membranes for Guided Bone Regeneration," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 25, pp. 622–633, 2010.
- [43] P. Q. Franco, J. Silva, and J. P. Borges, "Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofição," *Ciência Tecnol. dos Mater.*, vol. 22, pp. 57–64, 2010.
- [44] C. Henriques, R. Vidinha, D. Botequim, J. P. Borges, and J. a M. C. Silva, "A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 9, pp. 3535–3545, 2009.
- [45] J. L. McNaughton and C. T. Mortimer, *Differential Scanning Calorimetry.*, 2<sup>a</sup> ed, 1975.
- [46] M. E. Brown, "Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications," *Mineralogical Magazine*, vol. 53, pp. 1–207, 1989.
- [47] P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, "Differential Scanning Calorimetry Techniques : Applications in Biology and Nanoscience.", pp. 167–193, 2010.
- [48] P. El-Ghannam, A; Ducheyne, "Bioactive Ceramics," in *Comprehensive Biomaterials*, 1<sup>a</sup> ed., C. J. Ducheyne, Paul, Healy, Kevin Hutmacher, Dietmar E., Grainger, David W. , Kirkpatrick, Ed. Amsterdam, Netherlands: Newnes, 2015, pp. 157–179.
- [49] A. Cüneyt Tas, "Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 1429–1438, Jul. 2000.
- [50] J. Nunthanid, S. Puttipipatkachorn, K. Yamamoto, and G. E. Peck, "Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films," vol. 27, pp. 143–157, 2001.
- [51] L. Balau, G. Lisa, M. I. Popa, V. Tura, and V. Melnig, "Physico-chemical properties of Chitosan films," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 2, pp. 638–647, 2004.
- [52] M. H. Fathi and A. Hanifi, "Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method," *Mater. Lett.*, vol. 61, pp. 3978–3983, 2007.
- [53] W. Feng, L. Mu-Sen, L. Yu-Peng, and Q. Yong-Xin, "A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders," *Mater. Lett.*, vol. 59, pp. 916–919, 2005.
- [54] A. Costescu, I. Pasuk, F. Ungureanu, A. Dinischiotu, F. Huneau, S. Galaup, P. L. E. Coustumer, D. Predoi, and C. Ftir, "Physico-Chemical Properties of Nano-Sized Hexagonal Hydroxyapatite Powder Synthesized By Sol-Gel," *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 5, pp. 989–1000, 2010.
- [55] B. W. S. Souza, M. A. Cerqueira, J. T. Martins, A. Casariego, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente, "Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings," *Food Hydrocoll.*, vol. 24, pp. 330–335, 2010.
- [56] B. E. Uygun, T. Bou-Akl, M. Albanna, and H. W. T. Matthew, "Membrane thickness is an important variable in membrane scaffolds: Influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells," *Acta Biomater.*, vol. 6, pp. 2126–2131, 2010.

- [57] E. A. El-Hefian, E. S. Elgannoudi, A. Mainal, and A. H. Yahaya, "Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies," *Turkish J. Chem.*, vol. 34, pp. 47–56, 2010.
- [58] L. S. Guinesi and E. T. G. Cavalheiro, "The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples," *Thermochim. Acta*, vol. 444, pp. 128–133, 2006.
- [59] F. a. a. Tirkistani, "Thermal analysis of some chitosan Schiff bases," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 60, pp. 67–70, 1998.
- [60] J. E. Dos Santos, J. D. P. Soares, E. R. Dockal, S. P. Campana Filho, and É. T. G. Cavalheiro, "Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens," *Polímeros*, vol. 13, pp. 242–249, 2003.
- [61] A. Nogales, T. Ezquerro, D. Rueda, F. Martinez, and J. Retuert, "Influence of water on the dielectric behaviour of chitosan films," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 275, pp. 419–425, 1997.
- [62] E. I. Bobritskaya, R. A. Castro, and D. E. Temnov, "Thermoactivation and dielectric spectroscopy of chitosan films," *Phys. Solid State*, vol. 55, pp. 225–228, 2013.

# Anexo I - Procedimento Experimental

---

## Procedimento Experimental para a Produção de Nanopós de HAp

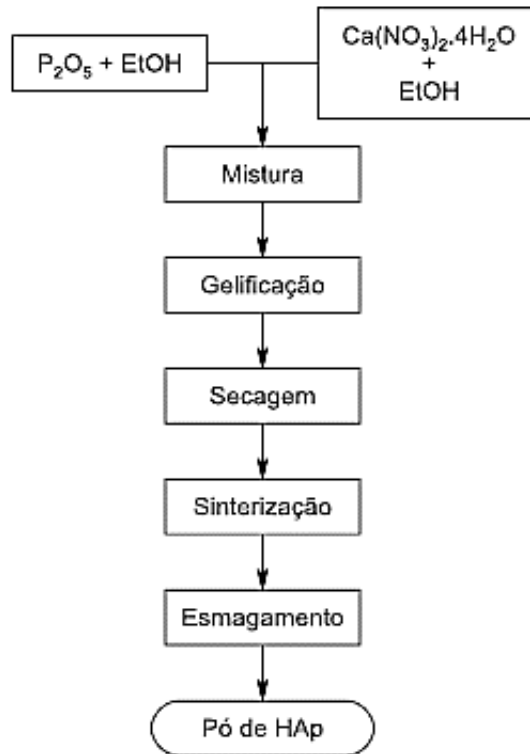
Os reagentes utilizados foram:

$P_2O_5$  – pentóxido de fósforo;

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  – nitrato de cálcio tetra hidratado

$C_2H_5OH$  – etanol (EtOH)

Esquematicamente:



1. Preparar 5 mL de uma solução de  $P_2O_5$  em EtOH.
2. Preparar 5 mL uma solução de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  em EtOH.
3. Misturar as duas soluções.

**Nota: Verificar que quantidades de  $P_2O_5$  e de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  devem adicionar às soluções preparadas em 1 e 2, de forma a que na mistura a razão Ca/P seja 1,67.**

4. Agitar bem a mistura, durante 10 min à temperatura ambiente, de forma a que todos os sólidos se dissolvam.
5. Colocar a mistura num banho, a  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , durante 1 hora (ou até que um gel branco se forme).
6. Secar o gel a  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , durante 24h.
7. Sinterizar o gel à temperatura de  $700^\circ\text{C}$ . Para tal deve proceder-se ao aquecimento do gel, a uma taxa de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , até  $700^\circ\text{C}$  e deixar a essa temperatura durante 30 min. Após este período descer até à temperatura ambiente, à taxa de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .
8. Esmague os pós sinterizados num almofariz.