



# **DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS À BASE DE QUITOSANO/FOSFATOS DE CÁLCIO PARA APLICAÇÕES ORTOPÉDICAS**



*Maria Inês Pedroso Martins*

Monte da Caparica, Almada  
Junho, 2012



*Por Maria Inês Martins*  
*Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL)*  
*Universidade Nova de Lisboa (UNL)*

# **DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS À BASE DE QUITOSANO/FOSFATOS DE CÁLCIO PARA APLICAÇÕES ORTOPÉDICAS**

## ***COPYRIGHT***

Autorizo os direitos de copyright da presente tese de mestrado, denominada “Desenvolvimento de hidrogéis à base de quitosano/fosfatos de cálcio para aplicações ortopédicas”.

*“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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.*



*“Não existe um caminho para a felicidade.  
A felicidade é o caminho.”*

*Gandhi*



# AGRADECIMENTOS

Apresento de uma forma reconhecida e carinhosa os meus agradecimentos a todos aqueles que tornaram possível a realização e concretização deste meu projecto.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e que com grande persuasão me foram apoiando.

A toda a minha família, mas em particular à minha avó Irene, que apesar de já me ter deixado há uns anos, sempre desejou este momento.

Aos meus amigos, que sempre estiveram do meu lado, nos bons e nos maus momentos, vivendo comigo todas as etapas mais importantes da minha vida.

Ao meu orientador Professor Doutor João Paulo Borges, por me ter aceite como sua aluna e me ter acompanhado neste trabalho.

Aos meus colegas em geral, mas de forma particular à Susana, Rita Carvalho, Ana Baptista e João Canejo que me acompanharam neste último ano, contribuindo com a sua ajuda não só científica como na companhia agradável dentro do laboratório.

A todos aqueles que contribuíram, de forma inequívoca, para a minha formação, não só intelectual, como humana.



# ÍNDICE

Objectivo.....	1
1. Introdução .....	1
2. Engenharia de Tecidos (ET).....	3
2.1. <i>Scaffolds</i> .....	3
2.2. Biomateriais.....	5
2.2.1. Quitosano .....	8
2.2.2. Hidroxiapatite (HAp) e $\beta$ -Trifosfato de Cálcio ( $\beta$ -TCP).....	12
3. Hidrogéis .....	15
3.1. Libertação Controlada de Fármacos.....	16
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1. Procedimento Experimental .....	19
<b>4.1.1. Síntese de pós de Hidroxiapatite (HAp)</b> .....	19
<b>4.1.2. Síntese de pós de <math>\beta</math>-fosfato tricálcico (<math>\beta</math>-TCP)</b> .....	20
<b>4.1.3. Produção de soluções de Quitosano (Qs)</b> .....	22
<b>4.1.4. Hidrogéis de Quitosano</b> .....	23
<b>4.1.5. Liofilização dos hidrogéis</b> .....	24
4.2. Técnicas de Caracterização.....	25
<b>4.2.1. Pós de HAp e <math>\beta</math>-TCP</b> .....	25
4.2.1.1. Difracção de Raios-X (DRX) .....	25
4.2.1.2. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformadas de Fourier (FTIR) .....	26
4.2.1.3. Microscopia Electrónica de Transmissão ( <i>TEM</i> ).....	27
<b>4.2.2. Soluções de Quitosano</b> .....	28
4.2.2.1. Reologia .....	28
<b>4.2.3. Hidrogéis</b> .....	30
4.2.3.1. Taxa de inchamento .....	30
4.2.3.2. Propriedades mecânicas.....	31
4.2.3.3. Testes de bioactividade.....	31
4.2.3.4. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) .....	33
4.3. Sistema de libertação de fármaco.....	34
<b>4.3.1. Modelo de Korsmeyer-Peppas</b> .....	34
<b>4.3.2. Estudo da libertação de fármaco</b> .....	35
4.3.2.1. Espectrofotometria UV-Visível .....	36
5. Resultados e Discussão.....	39
5.1. Pós Cerâmicos .....	39
<b>5.1.1. Hidroxiapatite</b> .....	39

5.1.1.1.	Difracção por raio-X (DRX) .....	39
5.1.1.2.	Espectroscopia no Infravermelho por transformada Fourier (FTIR) .....	40
5.1.1.3.	Microscopia por Transmissão (TEM) .....	41
<b>5.1.2.</b>	<b><math>\beta</math>-fosfato tricálcico</b> .....	<b>42</b>
5.1.2.1.	Difracção por raio-X (DRX) .....	42
5.1.2.2.	Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	43
5.1.2.3.	Microscopia por Transmissão (TEM) .....	44
5.2.	Quitosano .....	45
<b>5.2.1.</b>	<b>Viscosidade de corte das soluções de quitosano</b> .....	<b>45</b>
<b>5.2.2.</b>	<b>Hidrogéis de quitosano</b> .....	<b>46</b>
<b>5.2.3.</b>	<b>Hidrogéis de Quitosano/Fosfatos de cálcio</b> .....	<b>48</b>
5.2.3.1.	Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS) .....	48
5.2.3.2.	Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) .....	49
5.2.3.3.	Taxa de inchamento .....	51
5.2.3.4.	Ensaio de Compressão .....	52
5.2.3.5.	Teste de bioactividade .....	54
5.3.	Estudo da libertação controlada do AAS .....	56
6.	Conclusão .....	59

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Técnica da engenharia de tecido. (adaptada de Barbanti, Zavaglia, & Duek, 2005) ....	4
Figura 2. Estrutura química da quitina e do quitosano .....	10
Figura 3. Comparação dos níveis biológicos com administrações sucessivas de fármaco vs. libertação controlada de fármaco. (adaptada de Chien & Lin, 2006).....	17
Figura 4. Diagrama de fluxo da síntese de pós de HAp pelo método sol-gel (adaptada de Feng et al., 2005).....	19
Figura 5. Pós de HAp sintetizados pelo método sol-gel .....	20
Figura 6. Diagrama de fluxo da preparação sol-gel de pós de $\beta$ -TCP. (adaptado de Sanosh et al., 2010).....	21
Figura 7. Pós de $\beta$ -TCP sintetizados pelo método sol-gel.....	22
Figura 8. Câmara hermética (a) utilizada como Câmara de Amónia para formar os hidrogéis (b) .....	23
Figura 9. Hidrogel de Qs 3% à esquerda e QsHAp [80:30] à direita. ....	24
Figura 10. Liofilizador com amostras na prateleira mais alta.....	25
Figura 11. Relação geral entre a taxa de deformação e viscosidade de corte num dado fluido (adaptada de Santos, 2009).....	29
Figura 12. Estrutura química do ácido acetilsalicílico ( $C_9H_8O_4$ ).....	35
Figura 13. Recta de absorvâncias do ácido acetilsalicílico para concentrações diferentes .....	37
Figura 14. Difractograma dos pós de HAp sinterizados a 700°C. Os símbolos indicam os picos de difracção relacionados com HAp (•).....	39
Figura 15. Análise FTIR dos pós de HAp sinterizados a 700°C mostrando as bandas de absorção referentes aos grupos hidroxilo, fosfato e carbonat .....	40
Figura 16. Imagens obtidas por TEM de cristalitos de HAp esféricos (A) e elípticos (B); agregados (C) e aglomerados (D) de partículas.....	42
Figura 17. Difractograma dos pós de $\beta$ -TCP sinterizados a 800°C. Os símbolos indicam os picos de difracção relacionados com HAp (•) $\beta$ -TCP (●) e CaO (x). ....	43
Figura 18. Análise FTIR dos pós de $\beta$ -TCP sinterizados a 800°C mostrando as bandas de absorção referentes aos grupos hidroxilo e fosfato. ....	44
Figura 19. Imagens obtidas por TEM de cristalitos de $\beta$ -TCP esféricos (A), agregados (B e C) e aglomerados (D).....	45
Figura 20. Gráfico obtido por estudo reológico das soluções de 2; 2,5 e 3% de Qs.....	46
Figura 21. Estrutura liofilizada a partir de um hidrogel QsAAS.....	47
Figura 22. Imagens SEM da estrutura de corte transversal (A) e longitudinal (B e C) do Qs 3% .....	48
Figura 23. Espectros EDS da imagem SEM (A) contendo os pontos 1 e 2 (B1) e 3 (B2).....	49
Figura 24. Imagens SEM do interior de QsHAp [60:40] (A e C) e QsHAp [50:50] (B e D) .....	50
Figura 25. Imagens SEM do interior de QsB-TCP [60:40] (A e C) e QsB-TCP [50:50] (B e D) .	51
Figura 26. Taxa de absorção de água dos hidrogéis em função do tempo de imersão.....	51
Figura 27. Imagens SEM da superfície externa da amostra QsHAp [50:50] (A) e QsHAp [60:40] após teste de bioactividade.....	55
Figura 28. Espectros EDS da superfície de QsHA [50:50] (B) obtida no ponto 1 (A) após teste de bioactividade.....	55
Figura 29. Perfil de libertação de 10% de AAS em 3% de Qs.....	56
Figura 30. Regressão linear da $\lg [M_t/M_\infty]$ em função de $\ln [t]$ para cálculo do expoente cinético de difusão .....	57



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais fosfatos de cálcio existentes no corpo humano .....	12
Tabela 2. Proporções mássicas das soluções poliméricas de quitosano a 3% contendo pós cerâmicos .....	22
Tabela 3. Sequência de sais adicionados, quantidade, composição iónica e massa molar para preparar 1L de solução de SBF. ....	32
Tabela 4. Interpretação dos mecanismos de libertação por difusão a partir de matrizes poliméricas .....	35
Tabela 5. Valores dos pesos dos diferentes hidrogéis liofilizados e hidratados e a percentagem da quantidade de água absorvida. ....	51
Tabela 6. Módulo de Young (E) e tensão máxima à compressão obtidos para hidrogéis de Qs de diferentes concentrações .....	53
Tabela 7. Módulo de Young (E) e tensão máxima à compressão obtidos para hidrogéis de Qs com HAp e $\beta$ -TCP para diferentes proporções .....	53



# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AAS</b>	Ácido acetilsalicílico
<b>CaP</b>	Fosfato de cálcio
<b>CCD</b>	Charge coupled device
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>Da</b>	Daltons
<b>DD</b>	Grau de desacetilação
<b>DRX</b>	Difracção por raios-X
<b>E</b>	Módulo de elasticidade ou Módulo de Young
<b>EDS</b>	Microscopia de Energia Dispersiva
<b>ET</b>	Engenharia de Tecidos
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada Fourier
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicanos aniónicos
<b>GPC</b>	Cromatografia por exclusão de tamanho
<b>HAp</b>	Hidroxiapatite
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Símbolo químico da água
<b>MW</b>	Massa molar média ponderal
<b>OHAp</b>	Oxihidroxiapatite
<b>PAA</b>	poli(ácido acrílico)
<b>PEG</b>	poli(etilenoglicol)
<b>PHEMA</b>	poli(2-hidroxietil metacrilato)
<b>PLGA</b>	poli(ácido lactico-co-glicólico)
<b>PVA</b>	poli(álcool vinílico)
<b>Qs</b>	Quitosano
<b>QsB-TCP</b>	Quitosano/ $\beta$ -fosfato tricálcico
<b>QsHAp</b>	Quitosano/Hidroxiapatite
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética
<b>SBF</b>	Solução semelhante aos fluidos corporais
<b>SEM</b>	Microscopia Electrónica de Varrimento
<b>TCP</b>	Fosfato tricálcico
<b>TEM</b>	Microscopia Electrónica de Transmissão
<b>TTCO</b>	Fosfato tetracálcico
<b>UHMWPE</b>	Polietileno de elevado peso molecular
<b>UV</b>	Ultra-violeta
<b>UV-Vis</b>	Ultra-violeta visível
<b><math>\beta</math>-TCP</b>	$\beta$ - fosfato tricálcico
$\eta$	Coefficiente de difusão/libertação do fármaco
$\mu$	Viscosidade



# RESUMO

O Quitosano (Qs), um co-polímero de glucosamina e N-acetilglucosamina unidos por ligações  $\beta(1-4)$ , é um biomaterial que apresenta perspectivas promissoras nas aplicações biomédicas, principalmente na produção de matrizes para a Engenharia de Tecidos (ET). Este polissacarídeo linear apresenta características vantajosas, como por exemplo a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência mecânica. A sua actividade antimicrobiana e a proliferação celular estimulada por este biomaterial confirmam o sucesso que este biomaterial tem apresentado em diversas áreas.

Neste estudo, foram preparados e caracterizados hidrogéis de quitosano combinado com fosfatos de cálcio para aplicação em regeneração de tecido ósseo e libertação simultânea de fármacos. Os estudos de libertação de fármaco foram realizados com ácido acetilsalicílico – uma droga modelo muito usada nestes estudos. O perfil de libertação do fármaco foi avaliado por espectroscopia de ultra-violeta/visível (UV visível).

Os hidrogéis foram preparados, por reticulação física (em câmara de amónia) a partir de soluções aquosas de quitosano, de elevado peso molecular, em ácido acético a 2% (v/v). A influência da quantidade de hidroxiapatite (HAp) e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) existentes na matriz polimérica, na bioactividade, na microestrutura, na composição química e nas propriedades mecânicas do hidrogel foi estudada, tendo em vista a aplicação pretendida.

Os fosfatos de cálcio foram produzidos através do método de sol-gel através de uma via não catalisada, usando como precursores os reagentes  $P_2O_5$ ,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  e  $KH_2PO_4$  e quimicamente analisados por Difraccção de Raio-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelhos por Transformadas de Fourier (FTIR) e Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM). A HAp foi sinterizada a  $700^\circ C$ , e o  $\beta$ -TCP somente a  $800^\circ C$ , de modo a obter pós cerâmicos de elevada cristinidade.

**Palavras-chave :** Quitosano, hidrogel, fosfatos de cálcio, libertação de fármaco



# ABSTRACT

Chitosan (Qs), a copolymer composed of glucoamine and N-acetylglucosamine units connected by  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages is found to be a promising biomaterial in biomedical applications, particularly as scaffolds for tissue engineering. This functional linear polysaccharide is degraded into nontoxic products in vivo, and therefore known as its biocompatibility, biodegradability and mechanical strength properties. The antimicrobial activity and cell proliferation stimulated by this biomaterial also confirm the success of this biomaterial among many different research areas.

In this study, chitosan hydrogels combined with calcium phosphates were prepared and characterized for bone tissue and drug delivery system applications. The drug release studies were performed with aspirin - a model drug widely used in these studies. The drug release was evaluated by ultra-violet/visible spectroscopy (UV-visible).

The hydrogels were prepared by physical crosslinking (in chamber ammonia) from aqueous solutions of chitosan of high molecular weight dissolved in acetic acid at 2% (v/v). The influence of the amount of hydroxyapatite (HAp) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) in the polymer matrix was studied, concerning bioactivity, microstructure, chemical composition and mechanical properties of the hydrogel.

The calcium phosphate powders were produced by sol-gel method using  $P_2O_5$ ,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  and  $KH_2PO_4$  as precursors reagents, and chemically analyzed by X-ray Diffraction (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and Transmission electron microscopy (TEM). The HAp was sintered at 700 ° C and  $\beta$ -TCP ° at 800 C, to obtain high crystalline ceramic powders.

**Key-words** : Chitosan, hydrogel, calcium phosphate, drug delivery



## Objectivo

Este estudo visa a regeneração do tecido ósseo através da combinação de Quitosano (Qs) com fosfatos de cálcio, Hidroxiapatite (HAp) e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), para a produção de hidrogéis candidatos à regeneração do tecido ósseo. Pretende-se avaliar a influência dos fosfatos de cálcio na matriz polimérica de quitosano, quanto à resistência mecânica, capacidade de inchamento, microestrutura e bioactividade. Por fim, analisa-se o perfil de libertação de ácido acetilsalicílico dos hidrogéis desenvolvidos. Pretende-se concluir se este fármaco será um bom modelo de fármaco necessário num substituto ósseo.

## 1. Introdução

Durante várias décadas, a reparação e regeneração do tecido ósseo constituiu um problema clínico complicado e comum a diferentes gerações. A cirurgia ortopédica foi sempre sustentada pela terapia clínica tradicional de enxertos autólogos, alogénicos e, em casos mais raros, xenogénicos (Cai et al., 2011; Van Blitterswijk, 2008). Nestes casos, a reparação óssea utilizava enxertos ósseos, isto é, partes do tecido ósseo do próprio paciente (enxerto autólogo), de um dador humano (enxerto alogénico) ou animal (enxerto xenogénico), com o objectivo de estimular o crescimento ósseo no local do implante.

Os procedimentos que integram autoenxertos têm como principal vantagem a possibilidade da manutenção da viabilidade celular, que depende da rápida revascularização do enxerto. As desvantagens são as dificuldades em obter-se uma quantidade suficiente para o preenchimento total do defeito, o tempo prolongado do acto cirúrgico, possibilidades de danos ao local dador, necessidade de anestesia geral, maior risco de infecção, hematomas e maior custo. Os enxertos alogénicos e xenogénicos também constituem um possível transmissor de doenças e podem provocar reacções imunológicas no indivíduo receptor. (Van Blitterswijk, 2008)

Apesar destas técnicas terem sido muito utilizadas ao longo dos tempos, houve necessidade de encontrar alternativas promissoras para o tratamento de defeitos ósseos, recorrendo a substitutos ósseos. A investigação relativa a substitutos ósseos está cada vez mais focada na estratégia biomimética, baseada em materiais compósitos. Tendo em conta que o osso natural é um compósito hierárquico constituído por matrizes de colagénio e nanocristais de hidroxiapatite, a ideia mais exequível para obter biomateriais artificiais como substitutos ósseos mais próximos da realidade, é produzindo compósitos usando nanocristais de sais de fosfato de cálcio (CaP). Nanocristais tal como a hidroxiapatite (HAp) e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) dispersos em matrizes poliméricas, especialmente polímeros naturais, (por ex. quitosano, colagénio ou gelatina, etc.), que têm sido escolhidos ao invés de polímeros sintéticos, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. (Cai et al., 2011)

As matrizes poliméricas em forma de hidrogéis superabsorventes (Chung et al., 2009), são redes poliméricas tridimensionais, altamente hidrofílicas (Almeida, 2010), capazes de armazenar e perder grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (Chung et al., 2009). Esta capacidade de inchamento do hidrogel prevalece aos absorventes tradicionais, o que torna estes materiais um potencial uso em diversas áreas. Tem sido o principal candidato a nível de produtos cosméticos, agricultura e horticultura, tratamento de águas residuais, e no tratamento médico (Chung et al., 2009), como transportador de macromoléculas bioactivas (Yufeng Tang, Du, Li, Wang, & Hu, 2009), tratamento de feridas (Ribeiro et al., 2009) e em sistemas de libertação controlada de fármacos (Bhattarai, Gunn, & Zhang, 2010; Radhakumary, Antonty, & Sreenivasan, 2011; Teng et al., 2009).

O quitosano (Qs) é o segundo polímero natural mais abundante na natureza com grupos hidroxilo e amina muito reactivos. Pode ser facilmente modificado através de vários processos físico-químicos, tal como copolimerização de enxertos com monómeros hidrofílicos (Casimiro, Leal, & Gil, 2005), mistura de polímeros (Costa-Júnior, Barbosa-Stancioli, Mansur, Vasconcelos, & Mansur, 2009), e reforçado com outros componentes funcionais. Devido à sua não-toxicidade, excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade, o Qs, e os seus derivados têm sido aplicados extensivamente no transporte de fármacos, materiais biomédicos e absorventes (Teng et al., 2009).

A obtenção de hidrogéis de quitosano tem sido eficaz em aplicações médicas no tratamento de feridas (Ribeiro et al., 2009) que necessitem de ambiente húmido para a sua regeneração, ou na regeneração do tecido ósseo. No entanto, o ambiente *in vivo* na regeneração de defeitos ósseos é frequentemente exposto a compressões mecânicas, que o quitosano isoladamente tem-se demonstrado insuficiente, sendo necessário combiná-lo com estruturas que lhe confiram uma maior resistência mecânica.

Compostos inorgânicos como a HAp e o  $\beta$ -TCP já foram ensaiados em estruturas de quitosano, confirmando ser mais resistentes, com propriedades mais semelhantes à do osso (Cai et al., 2011; Kuo, Chang, Niu, Lan, & Cheng, 2009). A preparação e caracterização de compósitos de QS/HAp/ $\beta$ -TCP usado como implante rígido de tecido duro, já foi estudado na literatura por (Yildirim, O., 2004). Mas poucos ou nenhum estudo aponta para a utilização de ambos os cerâmicos em simultâneo, HAp com  $\beta$ -TCP, em hidrogéis de quitosano, no seu estado hidratado.

A produção de hidrogéis de Qs com HAp e  $\beta$ -TCP vem unir duas grandes conquistas na Engenharia de Tecidos (ET): a possibilidade de regenerar o tecido ósseo, utilizando um biomaterial como veículo de transporte de fármaco, para aliviar a dor e diminuir as respostas inflamatórias no paciente.

## 2. Engenharia de Tecidos (ET)

A Engenharia de Tecidos (ET) é uma ciência interdisciplinar que aplica os princípios e métodos da engenharia juntamente com a ciência médica no sentido da compreensão das relações estruturais e funcionais em tecidos normais e patológicos, para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou melhorar as suas funções. (Langer & Vacanti, 1993)

A ET é um novo paradigma que apresenta grandes transformações para a humanidade e para os profissionais da área da saúde, visto que modifica todos os conceitos tradicionais de tratamento. (Thein-Han, Kitiyanant, & Misra, 2008)

Foi formalmente identificado em 1988 durante um workshop especial da *National Science Foundation*. A primeira Sociedade de Engenharia de Tecidos foi formada em 1996, e os Institutos Nacionais de Saúde candidataram-se pela primeira vez ao financiamento da investigação em ET em 1997. A Engenharia de Tecidos é um tipo específico de investigação translacional<sup>1</sup> que integra o conhecimento da investigação biomédica tradicional e aplica-a na substituição clínica de tecidos. Partindo deste ponto de vista, técnicas com esta descrição, podem ser consideradas modificação de tecido, ao nível celular e molecular, no âmbito da cirurgia reconstrutiva (Langer & Vacanti, 1993; Olteanu & Enescu, 2007).

O desenvolvimento de biomateriais e a utilização de suportes ou *scaffolds* são partes cruciais da engenharia de tecidos, pois os suportes devem promover a estrutura e forma para o novo tecido, e são responsáveis pela organização do conjunto celular semeado, proporcionando o desenvolvimento do tecido ou órgão desejado que posteriormente será implantado (Stock & Vacanti, 2001).

### 2.1. Scaffolds

Na Engenharia de Tecidos, são utilizados *scaffolds* de diversos materiais e composições físico-químicas para a cultura de células, que promovem o crescimento de tecidos vivos. Hutmacher, et al., (2007) define *scaffold* como um suporte estrutural para acomodar e estimular o crescimento de um novo tecido.

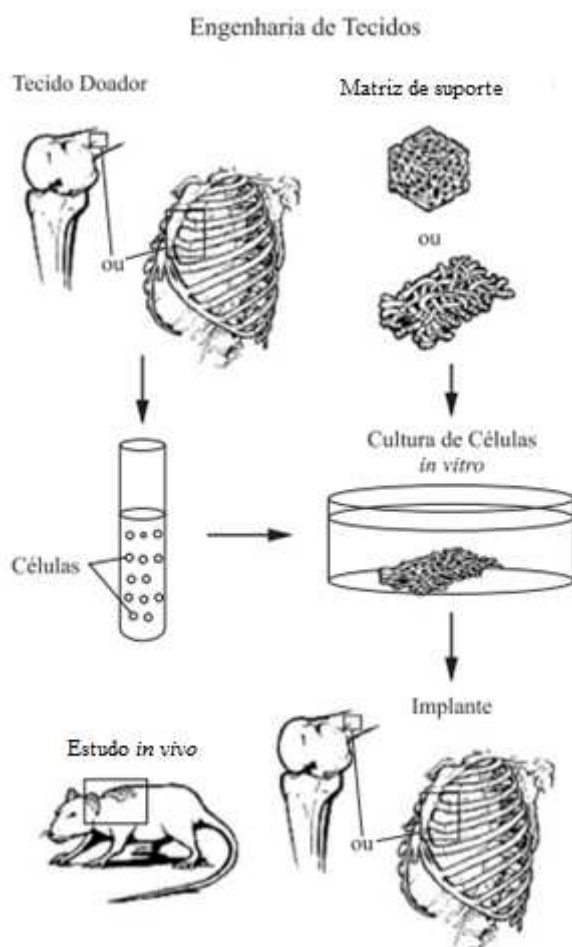
Basicamente, esta área promissora utiliza matrizes poliméricas, cerâmicas ou compósitos, com o intuito de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular. As matrizes servem como estruturas tridimensionais temporárias, que funcionam como suporte para o crescimento desejado de células estaminais ou das células recolhidas através de biopsias. (Thein-Han et al., 2008) Após a inserção da matriz no paciente, a matriz degrada-se enquanto um novo órgão ou tecido é formado, de preferência a uma taxa correspondente à taxa de formação de tecido

---

<sup>1</sup> **Investigação translacional** é a capacidade de conectar as pesquisas feitas em laboratório directamente com o tratamento dos pacientes.

novo. Os tecidos podem ser cultivadas *in vitro* sobre suportes antes da implantação no corpo ou *in situ* após a injeção de géis para o local do defeito (Norazril et al., 2004).

Barbanti e colaboradores (Barbanti, Zavaglia, & Duek, 2005) relacionam as principais etapas a serem seguidas para a obtenção de produtos na engenharia de tecidos, que são: (1) seleção e processamento do suporte; (2) inoculação da população celular sobre o suporte; (3) crescimento do tecido prematuro e crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico; (4) re-implante cirúrgico e, (5) período de assimilação do produto; como esquematizado na Figura 1.



**Figura 1. Técnica da engenharia de tecido. (adaptada de Barbanti, Zavaglia, & Duek, 2005)**

A Figura 1 ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica da engenharia de tecidos.

Vários requisitos foram identificados como cruciais para a produção de *scaffolds* na ET (Zhu, Chian, Chan-Park, & Lee, 2005). Para tal, a matriz deve:

- possuir poros interconectados para favorecer a integração no tecido e a sua vascularização;
- ser feita a partir de material com biodegradabilidade controlada ou ser reabsorvível pelo organismo;

- ter uma química de superfície adequada para favorecer a adesão, diferenciação e proliferação celular;
- possuir propriedades mecânicas adequadas, semelhantes à do local pretendido de implantação e resistir às forças impostas pelo meio;
- garantir que não induz nenhuma resposta adversa;
- ser facilmente fabricada em diversas formas e tamanhos.

## 2.2. Biomateriais

O desenvolvimento de biomateriais tem-se mostrado fundamentalmente importante para uma melhoria na qualidade de vida das pessoas, reflectindo um aumento na esperança média de vida, na saúde em geral e no bem-estar da população. Dessa forma, observa-se nos últimos anos um enorme esforço no intuito de se produzir novos biomateriais.

Um biomaterial, por definição clássica, é uma substância ou combinação de substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, para ser implantado ou para incorporar, por qualquer período de tempo, um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Monia, 1997; D F Williams, 1987).

De modo contínuo ou intermitente, estes materiais entram em contacto com fluidos biológicos, mesmo quando se localizam fora do corpo. São exemplo os materiais que substituem ou induzem o crescimento do tecido ósseo, cartilagens, pele, vasos, válvulas cardíacas e outros tecidos (Gibson, Puleo, & Bizios, 2009).

O critério de selecção de um biomaterial para produzir uma matriz para uma determinada aplicação é uma das etapas mais importantes na ET. A escolha pode ser feita de acordo com as características similares, químicas ou físicas, que o material apresenta em comparação com o tecido a ser substituído. Para tal análise, existe um conjunto de características que se tornam fundamentais para a utilização de biomateriais como implante em tecido vivo (David F Williams, 2008):

- Biocompatibilidade;
- Estrutura e morfologia;
- Porosidade;
- Composição química;
- Resistência mecânica;
- Topografia de superfície;
- Energia superficial;
- Resistência à corrosão;
- Ausência de toxicidade;
- Degradação.

Dentro das características anteriores, a mais importante é a biocompatibilidade, uma vez que um biomaterial só é adequado e biofuncional, se não causar danos locais ou sistémicos (tóxicos, cancerígenos ou radioactivos) nos tecidos circundantes, possuindo a habilidade para induzir no hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica. O entendimento da biocompatibilidade de um material só surge com a compreensão dos mecanismos químicos, bioquímicos, fisiológicos, físicos e outros que envolvem as interações do implante com os tecidos do corpo humano. Dependendo da aplicação do biomaterial, a biodegradabilidade é também uma característica importante, como por exemplo, em suporte de crescimento de tecidos e em sistemas de libertação de fármacos, nas quais as matrizes implantadas não são retiradas após o término de sua função e sim degradadas pelo organismo (D F Williams, 1987).

Os biomateriais podem ser classificados relativamente à reacção que provocam nos tecidos biológicos, dividindo-se em bioinertes, biotoleráveis, bioactivos e bioabsorvíveis/biodegradáveis.

Um material bioinerte, apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, (D F Williams, 1987) no entanto um material biotolerável, induz uma resposta mínima, sendo aceite pelo organismo receptor. A resposta típica do tecido ósseo comum a estes dois tipos de materiais, é o encapsulamento do implante por uma camada de tecido fibroso. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material (Hanawa, 1991). Nos materiais bioinertes, a espessura do invólucro fibroso é mínima, não libertando produtos químicos significativos (Cao & Hench, 1996; Hutmacher et al., 2007). Entre os biomateriais inertes mais utilizados, encontram-se os cerâmicos de alumina ( $Al_2O_3$ ) de alta densidade, o polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE), aços inoxidáveis ou ligas de Co-Cr-Mo e de Ti-Al-V (Hanawa, 1991).

Bioactivos são aqueles que favorecem a interacção no local de implante, por ocorrerem ligações químicas entre o material de implante e o tecido ósseo. A esse fenómeno dá-se o nome de osteointegração, que surge sem a presença de invólucros fibrosos, na substituição de tecido ósseo (Cao & Hench, 1996; David F Williams, 2008). Os tecidos ósseos vão-se ligando ao implante, consoante as semelhanças químicas entre os materiais e a parte mineral óssea, permitindo a osteocondução por meio do revestimento do material por células ósseas. Ocorrem uma séria de reacções bioquímicas e biofísicas entre o implante e os tecidos envolventes, resultando numa ligação interfacial de natureza química. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatite (HAp) e os compostos de fosfato de cálcio (Williams, 1987). Os materiais bioactivos podem ainda ser classificados por: osteoindutores e osteocondutores (Cao & Hench, 1996). Os primeiros promovem uma resposta intracelular e extracelular na interface biomaterial/tecido, enquanto os segundos favorecem o desenvolvimento de células ósseas, através da formação de uma superfície biocompatível, devido a uma resposta extracelular adequada na interface. A hidroxiapatite sintética é um exemplo de material bioactivo osteocondutor (Cao & Hench, 1996).

Os materiais reabsorvíveis ou biodegradáveis são aqueles que se degradam por influência da actividade celular, directamente por fagocitose, ou indirectamente por acção enzimática e/ou por dissolução devido a difusão iónica contínua do biomaterial, quando colocado em meio biológico (Jayakumar et al., 2011).

Para além das classificações mais importantes de um biomaterial quanto à interacção com os tecidos, este pode ser classificado pela sua natureza química em: natural ou sintético.

Entre os naturais encontra-se o colagénio, cartilagem, osso desmineralizado, quitosano, corais, etc. Os biomateriais sintéticos podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos.

Normalmente os compósitos são produzidos com o intuito de obter um biomaterial com melhores propriedades mecânicas do que aqueles que lhe deram origem (matriz ou reforço). Contudo podem ser propriedades de transporte, biocompatibilidade, bioactividade entre outras (Mathews & Rawling, 1994). Como principal desvantagem, apresenta-se a falta de reprodutibilidade na sua fabricação, uma vez que se trata de materiais heterogéneos que apresentam propriedades dependentes de muitas variáveis (Singla & Lee, 2001).

Uma grande vantagem do ponto de vista tecnológico é que grande maioria das classes de materiais pode ser utilizada para conceber um biomaterial. No entanto, metais e muitos dos materiais cerâmicos não são, por excelência, materiais biocompatíveis e biodegradáveis, deixando aos investigadores poucas escolhas uma vez que existe um número bastante reduzido de polímeros e materiais cerâmicos biodegradáveis (Rezwan, Chen, Blaker, & Boccaccini, 2006).

Os hidrogéis poliméricos constituem uma classe de biomateriais bastante adequados para a aplicação no cultivo de células e no processo de libertação de fármaco (Gupta, Vermani, & Garg, 2002).

Apesar da preferência por materiais poliméricos nesta área, a utilização de polímeros sintéticos é limitada por apresentarem problemas de biocompatibilidade e biodegradabilidade nos tecidos aplicados. Por isso materiais de origem natural, como os biopolímeros têm sido bastante estudados (Gupta et al., 2002; K. Y. Lee & Mooney, 2001; Lin-gibson, Walls, Kennedy, & Welsh, 2003).

Os polímeros naturais têm a vantagem de ser fáceis de obter, e já demonstraram serem biocompatíveis e biodegradáveis. Como classe de macromoléculas naturais, existem os polissacarídeos, que possuem uma propensão bioactiva muito elevada. Estes são compostos por macromoléculas com dezenas, centenas e até milhares de açúcares simples unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), e constituem um dos grupos mais abundantes da natureza. São geralmente encontrados em plantas, animais e microrganismos (fungos e bactérias) nos quais servem para armazenamento de energia ou como função estrutural (Van Blitterswijk, 2008).

Quanto à composição química, estes possuem muitos grupos funcionais (grupos amino, carboxilo e hidroxilo), disponíveis para modificações e combinações tanto a nível químico

(hidrólise, oxidação, redução, esterificação, eterificação, reacções de reticulação, etc), como enzimático (Van Blitterswijk, 2008).

É também possível controlar o peso molecular, padrões de ramificação, comprimento e reticulação das cadeias, e alterar a estrutura fina e propriedades funcionais dos polímeros naturais (Van Blitterswijk, 2008).

Celulose e goma xantana são exemplos de biopolímeros antigos, enquanto que a quitina e a quitosana apareceram recentemente com enorme destaque. A abundância na natureza da quitina e a celulose é bastante semelhante, estando disponíveis numa massa superior a 10 gigatoneladas anualmente. O potencial de aplicação do quitosano, o principal derivado da quitina, é multidimensional, passando desde aplicações na indústria alimentar como em nutrição, biotecnologia, ciência dos materiais, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental, e recentemente na terapia genética também (Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2004).

Actualmente, compósitos de polímeros com materiais cerâmicos bioactivos estão a ser desenvolvidos com o objectivo de aumentar a estabilidade mecânica da matriz polimérica e melhorar as interacções com o tecido (Rezwan et al., 2006).

A alfa alumina ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) foi das primeiras cerâmicas bioinertes aplicada a próteses ortopédicas onde se verifica uma boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica (Kawachy, Bertran, Reis, & Alves, 2000). Posteriormente, Albee em 1920, descreveu a utilização de fosfato de cálcio na reparação óssea, que somente se intensificou após cinquenta anos da sua descoberta. Os cerâmicos à base de apatites utilizadas nas aplicações médicas e dentárias, foram preparadas a partir do mineral fluorapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ . Desde então, novos métodos de preparação de cerâmicos de fosfatos de cálcio, a partir de reagentes químicos comerciais, têm sido descritos.

Hidroxiapatite (HAp) é hoje o cerâmico de eleição, por apresentar uma boa biocompatibilidade e elevada resistência à compressão. Tem sido bastante utilizado em reparações de ossos, articulações, dentes, etc., porém, é um material que apresenta um baixo limite de resistência mecânica, um elevado módulo de elasticidade e uma densidade elevada, quando comparada a polímeros (Kivrak & Tas, 1998; Zakharov, 2004). O  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) é ainda alvo de muitos estudos, uma vez que pouca aplicação médica se tem encontrado para este biocerâmico isoladamente.

### **2.2.1. Quitosano**

O quitosano é um copolímero natural semi-cristalino, que resulta da desacetilação parcial da quitina, o segundo polímero natural mais abundante na natureza, depois da celulose. O quitosano não pode ser considerado uma entidade química uniforme, mas sim um copolímero, uma vez que a sua cadeia é constituída tanto de monómeros acetilados como monómeros desacetilados. (Paterson & Kennedy, 1990; Pillai, Paul, & Sharma, 2009; Thein-Han et al., 2008) A quitina é uma poliamida acetilada, biodegradável e atóxica, presente no exoesqueleto

dos insectos, na cutícula dos anelídeos e moluscos e na carapaça dos crustáceos, como o camarão, lagosta e caranguejo.

As designações quitina e quitosano referem-se a copolímeros de unidades de glucosamine e N-acetilglucosamine ligados por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  (Fig. 2). Quando a fracção de unidades desacetiladas (glucosamine) é superior a 50%, o polímero designa-se quitosano e caso contrário quitina. O grau de desacetilação é um parâmetro que define a fracção de unidades desacetiladas na cadeia do polímero (E Khor, 2001; Eugene Khor, 2002; Mathur & Narang, 1990; Pillai et al., 2009).

A hidrólise da quitina, em condições alcalinas a temperaturas elevadas, origina a desacetilação de unidades de N-acetil glucosamina presentes na sua estrutura. Esta reacção remove parte dos grupos acetil, libertando os grupos amina que conferem a natureza catiónica ao quitosano (Mathur & Narang, 1990; Paterson & Kennedy, 1990; Ravi Kumar, 2000; Rinaudo, 2006; Thein-Han et al., 2008). DD refere-se ao grau de desacetilação enquanto que 1-DS é sinónimo de grau de acetilação.

Apesar das suas semelhanças com a celulose (possivelmente porque ambas desempenham a mesma função de sustentação nos organismos em que estão presentes), a quitina é insolúvel em solventes aquosos e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, sendo esta característica o principal factor limitante à sua utilização (Jayakumar et al., 2011; Eugene Khor, 2002; Paterson & Kennedy, 1990).

O quitosano pode ser caracterizado tanto em termos de qualidade, como relativamente às suas propriedades intrínsecas (pureza, peso molecular, viscosidade e grau de desacetilação), e também quanto a sua apresentação física, factores estes, que muito influenciam nas características finais do produto em que será utilizada (Rinaudo, 2006).

Pode-se diferenciar a quitina do quitosano pelo critério de solubilidade em solução aquosa de ácido (ácido acético 2%). A quitina é insolúvel em soluções aquosas de ácidos, enquanto que o quitosano é solúvel (Eugene Khor & Lim, 2003; Paterson & Kennedy, 1990).

A solubilidade do quitosano em soluções diluídas de ácidos deve-se à protonação dos grupos amina, presentes na cadeia polimérica. (Eugene Khor, 2002)

O grupo amina, possui um pKa em torno de 6,2 a 7,0, o que torna a molécula de quitosano um polieletrólito quando dissolvida em meios cujo pH seja menor do que 6. (Anthonsen, 1993) O resultado é uma carga positiva e a solubilidade do quitosano depende da quantidade de grupos N-acetil presentes na cadeia do polissacarídeo. (Anthonsen, 1993; Pillai et al., 2009; Rinaudo, 2006)

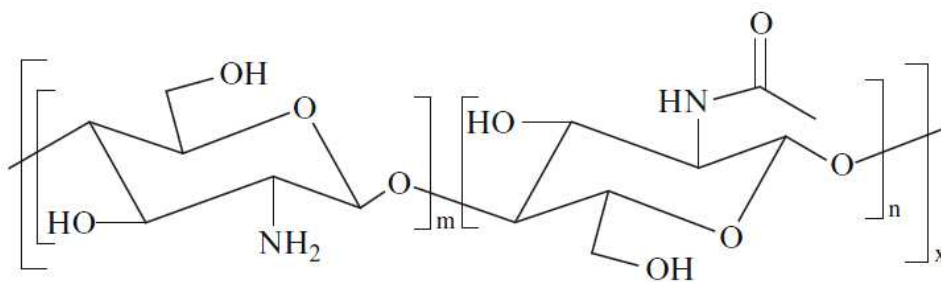


Figura 2. Estrutura química da quitina e do quitosano

O grau de desacetilação (DD) influencia também a viscosidade das soluções onde está presente. A densidade de carga neste polissacarídeo é elevada e depende do grau de desacetilação e do pH. Esta característica permite ao Qs formar complexos iónicos insolúveis ou complexos coacervados com uma grande variedade de polímeros aniónicos solúveis em água (Van Blitterswijk, 2008). A presença de cargas positivas no esqueleto do quitosano, aumenta a repulsa entre as diferentes cadeias, facilitando a sua solubilização (Mourya & Inamdar, 2008).

O grau de polimerização está relacionado com a distribuição do peso molecular e dependendo da fonte e do método de preparação do quitosano, o seu peso molecular pode variar entre 50 00 e 2 000 000 Daltons (Horn, 2008).

O quitosano é um polímero parcialmente cristalino, e o grau de cristalinidade depende do grau de desacetilação. A cristalinidade é mínima em graus intermédios de desacetilação. A degradação do quitosano é efectuada por lisossomas e a cinética da sua degradação é inversamente proporcional ao grau de cristalinidade (Paterson & Kennedy, 1990; Rinaudo, 2006).

A desacetilação feita normalmente no estado sólido promove o aparecimento de uma estrutura irregular, devido à natureza semicristalina da quitina (Azevedo, Chaves, Bezerra, Fook, & Costa, 2007).

Alguns autores propõem a classificação de quitina ou quitosano com base, não no grau de acetilação, mas na solubilidade numa solução aquosa de ácido acético, considerando que o quitosano é solúvel numa solução de ácido acético de 1% ou 0.1M e a quitina insolúvel nessa mesma solução (Mathur & Narang, 1990; Paterson & Kennedy, 1990; Rinaudo, 2006).

De facto, a solubilidade é um parâmetro difícil de ser controlado e está relacionada directamente com a desacetilação, a concentração iónica, pH, natureza do ácido usado para a protonação e a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, bem como, das condições de extração e secagem do polissacarídeo (Azevedo et al., 2007).

O grau de acetilação pode ser monitorizado através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), cromatografia por exclusão de tamanho (GPC) e ressonância magnética (RMN) entre outros, e a massa molar média ponderal (MW) e a distribuição de peso molecular podem ser determinadas por dispersões de luz a pequenos ângulos ou viscosimetria (Abreu, 2008).

A presença de grupos amino primários no quitosano oferece maiores possibilidades de modificações, tais como N-acilação e N-alquilação, (Zhao, Mitomo, Nagasawa, Yoshii, & Kume, 2003) e complexação com outros polieletrólitos como alginato, pectina, dextrana e outros (Gamzazade & Nasibov, 2002).

Derivados de quitosano e compósitos são também transformados em géis através de agentes de reticulação, como o Glutaraldeído entre outros agentes de reticulação, tais como a genipina, raios UV e variações térmicas (Van Blitterswijk, 2008). Além dos métodos de formação de géis referidos, a liofilização, é sem dúvida a tecnologia mais amplamente usada para processar o quitosano em diversas formas. A natureza catiónica do quitosano é a principal responsável por interações electrostáticas com glicosaminoglicanos aniônicos (GAG), proteoglicanos e outras moléculas de carga negativa existentes na matriz extracelular (Van Blitterswijk, 2008).

A propriedade catiónica confere a possibilidade do Qs se ligar fortemente a diversas células, levando ao uso potencial com hemostático e espermicida. Alguns autores relatam efeitos anti-inflamatórios e analgésicos (Okamoto et al., 2003).

Diversos pesquisadores examinaram a reacção do tecido hospedeiro a materiais à base de Quitosano. Em geral, esses materiais evocam uma reacção de corpo estranho mínima, com pouco ou nenhum encapsulamento fibroso, que o classifica como um material bioinerte (VandeVord et al., 2002).

Matrizes de quitosano para a regeneração óssea têm sido muito investigadas e demonstram promover o crescimento ósseo tanto *in vitro* como *in vivo*, principalmente na presença de outros polímeros, como a gelatina e alginato. Quando se considera a aplicação da engenharia de tecidos em cartilagens, em particular, o quitosano parece ser um óptimo candidato, realçando a importância dos GAG's em estimular a condrogénese (Van Blitterswijk, 2008).

Nesta última área de aplicação, o quitosano e os seus derivados têm sido processados na forma de hidrogéis, (nano e micro) partículas, filmes, e esponjas com os mais variados agentes terapêuticos incorporados (Ravi Kumar, 2000). Ao contrário do quitosano, a quitina é quimicamente inerte, limitando as sua utilização (Okamoto et al., 2003).

Estes veículos têm sido investigados, *in vitro* e *in vivo* enquanto sistemas de libertação de fármaco administrados por via oral, ocular, nasal, subcutânea e transdérmica (Bhattarai et al., 2010; Coimbra, 2010; Van Blitterswijk, 2008).

O quitosano é uma grande promessa para uma ampla variedade de usos. Propriedades únicas, tais como biodegradabilidade (Azevedo et al., 2007; Ehrlich et al., 2006; Rinaudo, 2006) biocompatibilidade (Ravi Kumar, 2000; Thein-Han et al., 2008), não-toxicidade (Eugene Khor & Lim, 2003; Mathur & Narang, 1990; Thein-Han et al., 2008) e actividade anti-bacteriana (Eugene Khor & Lim, 2003) são as principais forças motrizes que empurram os estudos em novas aplicações deste polímero. O quitosano já tem vindo a ser usado em muitas áreas, incluindo tratamento de águas residuais, medicina, alimentos e cosméticos (El-hefian & Yahaya, 2010; Eugene Khor & Lim, 2003).

As aplicações apresentadas nos parágrafos anteriores são apenas uma pequena e generalizada amostra das aplicações já existentes para estes polímeros. Todos os anos surgem novas e promissoras aplicações para os derivados do quitosano (E Khor, 2001).

## 2.2.2. Hidroxiapatite (HAp) e $\beta$ -Trifosfato de Cálcio ( $\beta$ -TCP)

Os biocerâmicos constituídos por fosfatos de cálcio têm sido alvo de grande atenção como aplicação na engenharia de tecido ósseo, devido à sua excelente bioatividade e composição semelhante ao osso, promovendo a osteocondução. Os fosfatos de cálcio constituem o maior grupo de biominerais presente nos animais vertebrados. Na tabela 1 são apresentados os principais fosfatos de cálcio presentes no corpo humano, a sua fórmula química e ocorrência.

**Tabela 1. Principais fosfatos de cálcio existentes no corpo humano**

Fosfatos de cálcio	Fórmula química	Ocorrência
“Apatite”	$(Ca,Z)_{10}(PO_4)_6(OH,X)_2^a$	Esmalte dentário <sup>b</sup> , dentina <sup>b</sup> , osso <sup>b</sup> , cálculos renais, cálculos dentários, cálculos urinários, calcificações de tecidos moles
Fosfato octocálcico, OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	Cálculos dentários e urinários
Brushite, hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado, DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Cálculos dentários, ossos em decomposição
Whitlockite, fosfato tricálcico, $\beta$ -TCP	$(Ca,Mg)_9(PO_4)_6$	Cálculos dentários e urinários, cáries dentárias, cartilagem com artrite, calcificações de tecidos moles
Fosfato decálcio amorfo, ACP	$(Ca, Mg)(PO_4, Y')$	Calcificações de tecidos moles
<sup>a</sup> Z= Na, Mg, K, Sr, etc;	Y = CO <sub>3</sub> , HPO <sub>4</sub> ; X = F, Cl;	Y' = P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , CO <sub>3</sub>

<sup>b</sup>Tecidos calcificados normais.

Entre vários fosfatos de cálcio, a hidroxiapatite (HAp,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ) e o  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP,  $Ca_3(PO_4)_2$ ) são os biocerâmicos mais utilizados, devido às suas propriedades osteogénicas e a capacidade de formar ligações fortes com tecidos ósseos hospedeiros (Kundu et al., 2010; Kwon, Jun, Hong, & Kim, 2003; Yildirim, O., 2004).

A HAp é o componente mineral mais abundante na composição do osso natural, correspondendo a 43% do seu peso (Shackelford, 2005). Este mineral no seu estado puro tem uma composição teórica de 39,68 wt% Ca, 18,45 wt% P, razão Ca/P de 2,151 e razão molar Ca/P de 1,67. O termo apatite descreve a família de grupo de fosfatos minerais com estrutura semelhante (Yildirim, O., 2004).

O  $\beta$ -TCP é também um cerâmico com uma composição muito semelhante à do osso natural. Quando utilizado em implantes cirúrgicos, a resistência mecânica do  $\beta$ -TCP é importante e recorrendo à densificação do material, consegue-se obter resultados mecânicos mais satisfatórios. A sinterização deste cerâmico tem de ser realizada a temperaturas mais baixas do que a transição de fase em  $\alpha$ -TCP, tornando difícil a produção de  $\beta$ -TCP de alta densidade (B. Chen, Zhang, Zhang, Lin, & Dongliang, 2008).

O osso está em constante estado de remodelação com a produção e mineralização de nova matriz óssea por parte dos osteoblastos e a reabsorção dessa matriz mediada por osteoclastos (Sanosh, Chu, Balakrishnan, Kim, & Cho, 2010). A dissolução dos fosfatos de cálcio, em meio fisiológico, aumenta a concentração de iões cálcio e potássio. A deposição destes iões na superfície do material favorece a formação de uma camada de apatite. Esta barreira de apatite promove a adesão de osteoblastos que segregam colagénio e permite a adesão de proteínas não-colagénias a superfície. A proliferação destas células especializadas gera células com a capacidade de sustentar minerais no sistema circulatório, principalmente cálcio e fósforo, resultando na formação de osso (Sanosh et al., 2010).

Na presença de fluidos corporais, a HAp é mais estável que o  $\beta$ -TCP, mas este último demonstra uma elevada solubilidade comparativamente com o primeiro. A dissolução *in vitro* e *in vivo* de cerâmicos de fosfato de cálcio, depende da composição, cristalinidade e pH da solução (Kwon et al., 2003). No entanto, muitos estudos indicam que a dissolução da HAp, após implantação no corpo humano, é demasiado reduzida para aplicações clínicas de longo termo. Por outro lado, a dissolução do  $\beta$ -TCP é demasiado rápida para se criarem ligações com o tecido ósseo. Para isso, é necessário atingir uma taxa de reabsorção ideal do material, levando à produção de cerâmicos bifásicos, resultando da combinação adequada de HAp e  $\beta$ -TCP. Os cerâmicos bifásicos (fosfato tricálcico + hidroxiapatite) reúnem duas fases importantes para um material de preenchimento: a fase mais solúvel dos biocerâmicos,  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), e a fase mais estável dos biocerâmicos, a Hidroxiapatite. Muitos resultados sugerem que a reabsorção de cerâmicos bifásicos é fortemente influenciada pela razão HAp/ $\beta$ -TCP (Kwon et al., 2003).

Neste sentido, é de fundamental importância o controle da relação atómica cálcio/fósforo durante as etapas de síntese e processamento, uma vez que este parâmetro reflete a solubilidade química destes materiais (LeGeros, Lin, Rohanizadeh, Mijares, & LeGeros, 2003). Neste caso, quanto menor esta relação, maior a solubilidade em meio fisiológico, pelo que os cerâmicos TCP (Ca/P = 1,5) apresentam maior biodegradabilidade que os de HAp (Ca/P = 1,67). Deve-se também realçar que a estabilidade química é função não apenas da composição, mas também das propriedades físicas dos pós e dos produtos sinterizados, tais como, tamanho e forma das partículas, área superficial, estrutura cristalina e densidade (Kwon et al., 2003).

Outras aplicações da HAp têm vindo a ser estudadas, como a sua combinação com biopolímeros para o desenvolvimento de sistemas farmacológicos locais capazes de promover a osteogénese no tecido ósseo em reparação (Krylova, Ivanov, Orlovski, El-Registan, &

Barinov, 2002). Este biocerâmico também já foi testado como revestimento de implantes metálicos de ligas de Ni-Ti, Co-Cr e Ti-6Al-4V (Shackelford, 2005), fazendo uso das suas propriedades bioactivas. Também poderá ser utilizado como biossensor ou em processos de separação cromatográficos, devido à sua excelente capacidade para adsorver biomoléculas funcionais, tais como proteínas (Schröder, Jönsson, & Poole, 2003).

Devido à sua crescente aplicação, um grande número de técnicas tem vindo a ser desenvolvido para a síntese de pós de HAp. Um dos métodos mais utilizados é a técnica de precipitação, que envolve reacções via húmida entre precursores cálcio e fósforo com controlo de temperatura e pH da solução (Kivrak & Tas, 1998). Outras técnicas, nomeadamente métodos mecânico-químicos, preparação por combustão, co-precipitação, deposição electroquímica, síntese hidrotérmica, mecanismos de emulsão ou microemulsão, também têm vindo a ser estudados (Nayak, 2010). Recentemente, a utilização do processo sol-gel para a síntese de HAp tornou-se objecto importante de pesquisa. Este processo é um método químico via húmida, o qual dispensa a utilização de vácuo e de temperaturas elevadas, sendo assim considerado uma das técnicas mais flexíveis e promissora (Yuan & Liu, 2002).

O método sol-gel, tal como o nome indica, inicia-se pela formação de um sol, seguindo-se da formação de um gel. O sol é uma suspensão coloidal cujas partículas em suspensão são as partículas dos agentes precursores, que por reacções de hidrólise e de condensação originarão uma rede tridimensional (gel) altamente reticulada de estrutura aberta, onde as unidades primárias estão unidas entre si, quer por ligações químicas, pontes de hidrogénio ou forças de Van der Waals (Nayak, 2010).

Neste trabalho, foi utilizado o método de sol-gel para produzir os fosfatos de cálcio, por este apresentar diversas vantagens face aos restantes processos: aumento da homogeneidade do produto final devido à escala molecular dos iões precursores presentes na mistura; a produção de partículas de menores dimensões (de alguns nanómetros) com elevadas áreas superficiais, o que possibilita o uso de temperaturas de sinterização mais baixas; alto índice de pureza; possibilidade de preparar filmes bioactivos através deste método. Após a formação do gel há um período de envelhecimento seguido de uma fase de remoção do solvente por secagem (ar livre ou secagem supercrítica). Depois de seco, o gel é submetido a um tratamento de sinterização onde ocorre a modificação, das propriedades do produto final, em particular da cristalinidade (Nayak, 2010; Yuan & Liu, 2002).

As maiores desvantagens da síntese de HAp através do método sol-gel, concentram-se na probabilidade de ocorrência de hidrólise dos grupos fosfato, no preço elevado das matérias-primas e na necessidade de monitorização de variáveis como o pH, velocidade de agitação e tempo de hidrólise (Nayak, 2010; Yuan & Liu, 2002).

Outro grande desafio é o controlo da temperatura de sinterização, tendo em conta que influencia as alterações de fase no produto final. Quanto à estabilidade térmica da fase gerada antes da sinterização, poder-se-ão formar fases cristalinas, fases cristalinas metaestáveis e fases não-cristalinas, tais como oxihidroxiapatite (OHAp),  $\alpha,\beta$ -fosfato de tricálcio ( $\alpha,\beta$ -TCP), fosfato de tetracálcio (TTCO), óxido de cálcio (CaO) e HAp amorfa (Liao, Lin, Chen, & Sun,

1999), segundo mecanismos de decomposição e/ou desidroxilação (Rapacz-Kmita, Paluszkiewicz, Ślósarczyk, & Paszkiewicz, 2005) da HAp. O estudo das fases presentes no produto final são essenciais para compreender a performance do material, pois a solubilidade, taxa de absorção e até a biocompatibilidade, são afectadas, e determinam a validação de um dado dispositivo médico (Feng, Mu-sen, Yu-peng, & Yong-xin, 2005).

### 3. Hidrogéis

Os hidrogéis são constituídos por redes poliméricas tridimensionais, formadas por cadeias macromoleculares hidrofílicas interligadas. As cadeias hidrofílicas formam estruturas com capacidade para armazenar grandes quantidades de água, sem se dissolverem (Bhattarai et al., 2010). Estas cadeias apresentam-se reticuladas a partir de ligações covalentes, interacções iónicas ou por interacções mais fracas como as pontes de hidrogénio (Rimmer, 2011). Assim, podem ser classificados em hidrogéis químicos ou físicos, conforme o tipo de ligações estabelecidas entre as cadeias poliméricas.

Os hidrogéis químicos, de carácter permanente, têm as suas cadeias poliméricas covalentemente ligadas, enquanto que os hidrogéis físicos são formados a partir de ligações físicas reversíveis, de intensidade variável, podendo ser através de ligações iónicas, pontes de hidrogénio ou interacções hidrofóbicas. Nos hidrogéis químicos, pode ser necessário converter polímeros hidrofóbicos em hidrofílicos, recorrendo a agentes de reticulação, levando a formação de uma rede tridimensional, onde as propriedades do material vão depender da densidade de reticulação (Berger et al., 2004).

Os hidrogéis também se agrupam em duas diferentes classes, consoante sejam produzidos através de polímeros sintéticos ou naturais. Os polímeros sintéticos mais utilizados em hidrogéis na engenharia de tecidos são poli(ácido acrílico) (PAA) e os seus derivados, poli(etilenoglicol) (PEG) e os seus copolímeros, poli(álcool vinílico) (PVA), polifosfazeno e poliacrilatos tais como poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA). Além de polímeros sintéticos, têm sido usados polímeros naturais, como colagénio, gelatina, hialuronato de sódio, fibrina, alginato, agarose e quitosano (K. Y. Lee & Mooney, 2001).

Em termos de carga, os hidrogéis apresentam-se como neutros, catiónicos, aniónicos ou anfotéricos, em função da natureza dos seus grupos funcionais (Berger et al., 2004).

Hidrogéis totalmente hidratados possuem propriedades físicas comuns aos tecidos vivos, incluindo uma consistência macia e viscosa, e baixa tensão interfacial com a água ou fluidos biológicos (Hamidi, Azadi, & Rafiei, 2008). A sua natureza elástica confere pouca irritação aos tecidos circundantes, após implantação. A tensão interfacial reduzida que se verifica entre a superfície de hidrogel e o fluido corporal minimiza a adsorção de proteínas e a adesão celular, o que reduz o aparecimento de reacções negativas imunológicas (Lin-gibson et al., 2003; Rimmer, 2011).

Embora os hidrogéis químicos possuam melhores propriedades mecânicas e menor risco de dissolução em meio aquoso, os hidrogéis formados por gelificação iónica não requerem a utilização de compostos químicos como reticulantes, iniciadores, catalisadores, ou outros compostos potencialmente nocivos em aplicações médicas (K. Y. Lee & Mooney, 2001).

O quitosano é um polímero natural estudado por vários autores, como matéria-prima para a produção de hidrogéis físicos, altamente biocompatíveis e biodegradáveis, e com baixo risco de toxicidade para o organismo. Montebault, et al., (2005) estudou um novo processo de formação de hidrogéis físicos de quitosano em solução aquosa, dispensando a utilização de solvente orgânico ou agente de reticulação. Com este estudo garante a eficácia de produção de hidrogéis com qualquer grau de desacetilação de quitosano.

Posteriormente, Boucard, et al. (Boucard, Viton, & Domard, 2005) também investigou melhor os mecanismos de formação de hidrogéis físicos de quitosano na presença de um meio hidroalcolico. Ambos afirmam que para a formação do hidrogel, é necessário garantir uma concentração de polímero acima de  $C^*$  e um valor crítico do equilíbrio entre as interações hidrofílicas e hidrofóbicas. (Boucard et al., 2005; Montebault, Viton, & Domard, 2005) A concentração  $C^*$ , refere-se à concentração crítica do cruzamento de cadeias, que corresponde à concentração mínima para o gel se formar, e eliminar a água e ácido utilizado na solubilização do polímero. Esta situação, em particular, contribui para diminuir a constante dielétrica do meio e a densidade de carga aparente das cadeias de quitosano, induzindo a formação de uma rede tridimensional através de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogénio. Montebault et al. (Montebault, Viton, & Domard, 2005) considerou 1,5% (m/m), o valor mínimo para ocorrer ligação física nas cadeias poliméricas.

Neste processo de gelificação, a presença de grupos amino na cadeia polimérica do quitosano, torna-o positivo em meios ácidos, o que facilita a reacção em meio aquoso, com um componente de carga oposta.

Este tipo de ligação atómica e molecular, permite a absorção de água e/ou compósitos bioactivos sem dissolução, o que torna estes hidrogéis bons libertadores de fármaco através de difusão. Hidrogéis de quitosano reticulados ionicamente exibem uma taxa de inchamento sensível a alterações de pH muito superior a outros hidrogéis covalentemente ligados. Esta característica estende ainda mais potencial da sua aplicação, uma vez que a dissolução pode ocorrer em condições extremas de pH ácido ou básico (Berger et al., 2004).

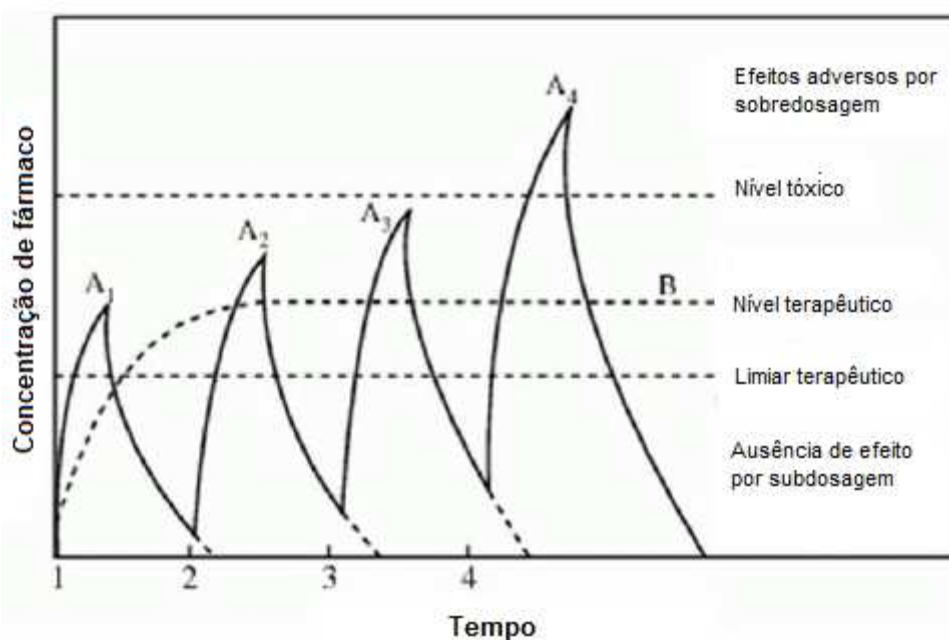
### **3.1. Libertação Controlada de Fármacos**

O tratamento de doenças ou lesões recorreu, durante várias décadas, à administração de fármacos sob a forma de cápsulas, comprimidos, supositórios, cremes ou colírios. Apesar desses suportes de administração de fármacos ainda serem vastamente utilizados, houve uma crescente necessidade em desenvolver outros métodos mais simples e eficazes,

nomeadamente, os sistemas de libertação controlada. Estes sistemas aparecem não só com o objectivo de administrar uma concentração de fármaco adequada às patologias em questão, como também minimizar os riscos de infecção e rejeição, no caso de se recorrer à substituição ou regeneração de um tecido (C.-C. Lin & Metters, 2006).

Os novos sistemas controlam a velocidade de libertação do fármaco, garantindo que a concentração de fármaco não sofre flutuações nem corre o risco de sobredosagem, pela toma repetida/diária de um certo medicamento. A libertação pode ser direccionada apenas para uma zona, evitando o contacto do fármaco em zonas que possam ser adversas ao organismo. Por exemplo, evitar-se a dissolução do ácido acetilsalicílico e outros medicamento no estômago, que possam provocar irritação na mucosa, levando ao desconforto do paciente. (Chien & Lin, 2006)

A figura 3 compara o perfil de concentração de um fármaco após administrações sucessivas com os níveis ideais para o tratamento de uma doença ou infecção.



**Figura 3. Comparação dos níveis biológicos com administrações sucessivas de fármaco vs. libertação controlada de fármaco. (adaptada de Chien & Lin, 2006)**

Pode obter-se uma libertação controlada de fármacos através de três métodos distintos: por difusão, por penetração de água ou por agentes químicos (C.-C. Lin & Metters, 2006).

Neste trabalho, utiliza-se o método de libertação de fármaco por penetração de água em hidrogéis de quitosano. Nos dispositivos controlados pela expansão do polímero, o agente é disperso uniformemente na matriz polimérica hidrofílica reticulada, no seu estado desidratado (Ratner et al., 2004). A capacidade que moléculas de diferentes tamanhos têm de se difundir para dentro de (absorção de fármaco) e para fora (libertação de fármaco) de hidrogéis, permite

o uso de redes poliméricas no estado seco ou desidratado, como sistemas de entrega de fármacos (Gupta et al., 2002).

A hidrofiliabilidade das cadeias poliméricas do hidrogel é responsável pela sua expansão, quando em contacto com um meio aquoso. A característica de insolubilidade da matriz polimérica é atribuída à presença de reticulação física ou química, que garante a integridade da estrutura tridimensional (Gupta et al., 2002). Devido à reduzida taxa de difusão dos fármacos nos polímeros secos, nenhuma libertação ocorre até que o polímero esteja em contacto com o meio aquoso (Ratner et al., 2004).

Para além da afinidade com a água, existem outras características adicionais que tornam os hidrogéis um excelente veículo de transporte de fármacos. Inicialmente utilizaram-se polímeros como o PAA, PHEMA, PEG e PVA que têm propriedades mucoadesivas e bioadesivas, aumentando o tempo de contacto do fármaco com os tecidos (Peppas, Bures, Leobandung, & Ichikawa, 2000; Peppas & Sahlin, 1996). Esta adesão ocorre devido às ligações existentes entre os grupos funcionais do polímero do hidrogel com as glicoproteínas da mucosa. Assim, é possível existir especificidade na ligação da matriz com regiões do corpo humano, como é o caso do colon, nariz e vagina (Peppas & Sahlin, 1996).

Actualmente, alguns autores já comprovaram o sucesso de hidrogéis de quitosano como um excelente biomaterial na libertação controlada de fármacos (Bhattarai et al., 2010; Liu & Lin, 2010; Radhakumary et al., 2011; Teng et al., 2009). Este polímero distingue-se dos restantes polissacarídeos disponíveis, devido à presença atómica do azoto (N) na sua estrutura molecular, à sua natureza catiónica e capacidade de formar complexos polielectrolíticos.

Hidrogéis de quitosano de diversos tipos, tamanhos e geometrias já foram preparados, incluindo géis, pós, filmes, pastilhas, cápsulas, microesferas, micropartículas, esponjas, nanofibras, fibras e compósitos inorgânicos (Denkbas, 2006).

Teng et al., (2009), estudaram o potencial de compósitos de Qs/HAp, como libertadores controlados de fármacos, e concluíram que apesar de ainda não terem sido muito utilizados nesta área, são bastante promissores. Matrizes como esta reduzem a libertação rápida inicial, podendo ser úteis em aplicações a longo termo. Relataram também que a HAp diminui a taxa de degradação *in vitro* do hidrogel, o que se torna um factor positivo pois prolonga a presença e efeito do implante em tecidos vivos.

Foram realizados estudos utilizando hidrogéis fisicamente reticulados com ácidos para aplicação tópica (Cerchiara, Luppi, Bigucci, Orienti, & Zecchi, 2002). Apesar dos hidrogéis de quitosano já serem um biomaterial com muito sucesso na área da ET, não se conhece ainda nenhum estudo que utilize hidrogéis de quitosano fisicamente reticulados, combinados com fosfatos de cálcio, como sistemas de libertação de fármaco. Os fosfatos de cálcio têm uma dupla função: promoverem a regeneração óssea e retardarem a libertação do fármaco.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Procedimento Experimental

Este trabalho iniciou-se com a produção e análise de pós cerâmicos de HAp e  $\beta$ -TCP, que foram introduzidos, de forma homogênea, nos hidrogéis de quitosano, antes de sofrerem o processo de reticulação. As soluções de quitosano formaram hidrogéis físicos, uma vez que dispensam a presença de agente reticulante.

#### 4.1.1. Síntese de pós de Hidroxipatite (HAp)

A HAp foi sintetizada segundo o método sol-gel baseado em (Feng et al., 2005), mas otimizando os tempos de envelhecimento e de sinterização com base noutros estudos no grupo de investigação.

Os pós de HAp foram produzidos através de uma via não catalisada, usando como precursores, os reagentes Pentóxido de Fósforo ( $P_2O_5$ , grau de pureza:  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich), Nitrato de Cálcio tetra-hidratado ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , grau de pureza: 99%, Panreac) e Etanol (EtOH) ( $C_2H_6OH$ , grau de pureza: 99.5%, Panreac). A figura 4 mostra um fluxograma da preparação sol-gel da HAp.

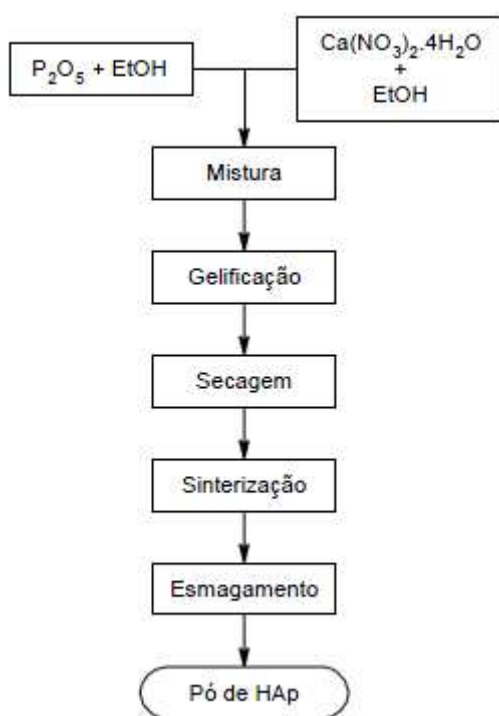


Figura 4. Diagrama de fluxo da síntese de pós de HAp pelo método sol-gel (adaptada de Feng et al., 2005)

Dissolveram-se 2,828 g de  $P_2O_5$  em 40ml de EtOH de modo a preparar uma solução de concentração 1M. Numa solução de EtOH de igual volume, dissolveram-se 15,776 g de

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  de modo a preparar uma solução de concentração 3,34 M. Posteriormente misturaram-se as duas soluções de modo a obter um rácio molar Ca/P de 1,67. A mistura foi continuamente agitada durante 10 min à temperatura ambiente. De seguida colocou-se a mistura num banho de glicerina a 70 °C – 80 °C durante aproximadamente 3 horas, até ocorrer a formação de um gel branco. O gel formado foi deixado em repouso e tapado durante 48h e, posteriormente, colocado à temperatura de 80 °C numa estufa eléctrica (*Memmert*). De modo a ser sinterizado, a amostra foi colocada num forno eléctrico (*Nabertherm*) e aquecida até 700°C, à velocidade de 10 °C/min, e quando atingida a temperatura de 700°C manteve-se o seu valor durante 30 minutos. A velocidade de arrefecimento até à temperatura ambiente foi de 10 °C/min.

O produto de sinterização foi esmagado com um pilão num almofariz, até se obterem pós de dimensão reduzida. (Fig. 5)



**Figura 5. Pós de HAp sintetizados pelo método sol-gel**

#### **4.1.2. Síntese de pós de $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)**

O método de sol-gel utilizado para produzir  $\beta$ -TCP foi baseado num método já descrito por Sanosh e colaboradores (Sanosh et al., 2010). Este método foi modificado no sentido de garantir um rácio Ca/P de 1,5, característico deste fosfato de cálcio.

Nitrato de Cálcio Tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Pancreac) e Fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich) foram utilizados como precursores de cálcio e fósforo, respectivamente.

A figura 6 mostra o fluxograma da preparação sol-gel do  $\beta$ -TCP.

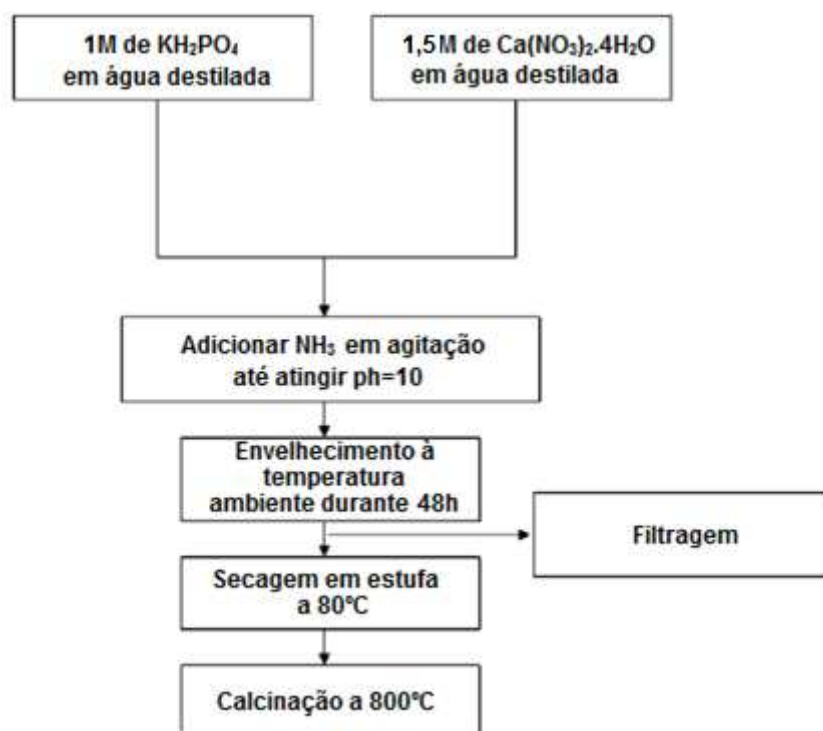


Figura 6. Diagrama de fluxo da preparação sol-gel de pós de  $\beta$ -TCP. (adaptado de Sanosh et al., 2010)

Foram preparadas soluções de 1 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 0.67 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dissolvendo os cristais em água destilada. A solução de nitrato de cálcio foi adicionada lentamente à solução de dihidrogenofosfato de potássio, sob agitação. Recorrendo a um conta-gotas, foi adicionado amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) cuidadosamente à solução anterior, resultando numa precipitação de cor branca. O  $\text{NH}_3$  foi adicionado até ser atingido um pH 10, que representa o final da precipitação. O precipitado obtido anteriormente esteve uma hora em agitação e foi deixado em repouso à temperatura ambiente durante 48h. Foi filtrado e lavado repetidamente com água morna e destilada, recorrendo à centrífugadora, de modo a remover os íões  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ . A amostra resultante do precipitado anterior, foi posta a secar numa estufa (*Memmert*) a  $80^\circ\text{C}$  durante 48h. O pó seco foi sinterizado a  $800^\circ\text{C}$  durante 30 minutos utilizando um forno eléctrico (*Nabertherm*) com um incremento de temperatura a uma taxa de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , até atingir os  $800^\circ\text{C}$ . Após este período, permaneceu 30 minutos a esta temperatura seguindo-se de um arrefecimento a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  até atingir a temperatura ambiente.

Na figura 7, apresentam-se os pós de  $\beta$ -TCP sintetizados a partir do método de sol-gel.

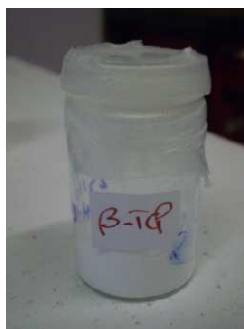


Figura 7. Pós de  $\beta$ -TCP sintetizados pelo método sol-gel

#### 4.1.3. Produção de soluções de Quitosano (Qs)

Quitosano de elevado peso molecular ( $M_n = 471\ 000$  Da, obtido por) e 85% de grau de desacetilação (Lisboa, 2012) foi obtida através Sigma Aldrich Co. Ltd. (Gillingham UK). Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) foi adquirido através de Fisher Scientific (UK). Amónio ( $\text{NH}_3$ , a 25%) foi obtido através de Pronolab (Lisboa, Portugal). Soluções de quitosano de 2; 2,5 e 3% (m/v) foram preparadas através da dissolução do polímero em ácido acético 2% (v/v) de modo a atingir uma protonação estequiométrica dos grupos  $-\text{NH}_2$ , (produzindo-se  $\text{NH}_3^+$ ) seguido de agitação durante 24h para que existisse uma dissolução completa. As soluções foram deixadas em repouso até todas as bolhas de ar terem colapsado.

Após a produção dos hidrogéis, verificou-se que a concentração de 3% de Qs seria a mais apropriada, principalmente por formar estruturas mais resistentes e visivelmente melhor reticuladas, devido à concentração de polímero ser superior às restantes.

Preparou-se nova solução de Qs 3% e adicionaram-se os pós de HAp e  $\beta$ -TCP à solução de Qs 3% conforme as proporções indicadas na tabela 1. O  $\beta$ -TCP não homogeneizou com a mesma facilidade que a HAp, logo foi necessário introduzi-lo antes de adicionar o polímero, recorrendo a ultrassons.

Tabela 2. Proporções mássicas das soluções poliméricas de quitosano a 3% contendo pós cerâmicos

Concentração Quitosano (m/v)	Quitosano (%)	Cerâmico (%)	Massa Quitosano (g)	Massa Cerâmico (g)
3%	90	10	1,5	0,167
	70	30		0,6429
	60	40		1
	50	50		1,5

#### 4.1.4. Hidrogéis de Quitosano

Os hidrogéis de quitosano (Qs) foram produzidos adaptando o método já descrito na literatura por Montembault e colaboradores (Montembault et al., 2005). As soluções preparadas, descritas anteriormente, foram utilizadas para a produção de hidrogéis de quitosano. Inicialmente foram colocadas em caixas de Petri (m = 30 g) e mais tarde, houve a necessidade de produzir hidrogéis mais pequenos, por isso utilizaram-se placas de 24 poços, usadas em culturas de células. As amostras foram introduzidas numa câmara hermeticamente fechada (Fig. 5), na presença de 500ml de Hidróxido de Amónia a 2,5% (v/v), de forma a manter uma atmosfera saturada em amónia. Após algumas tentativas com o objectivo de obter hidrogéis bem reticulados e consistentes, confirmou-se que 3 dias seria o período de tempo necessário e ideal para formar hidrogéis de 2; 2,5 e 3% de quitosano. Ao fim desse período de tempo, os hidrogéis foram removidos do molde, lavados em água destilada, e colocados numa caixa de Petri maior durante 5 horas ao ar, até que o excesso de amónia evaporasse, tornando o odor menos detectável.

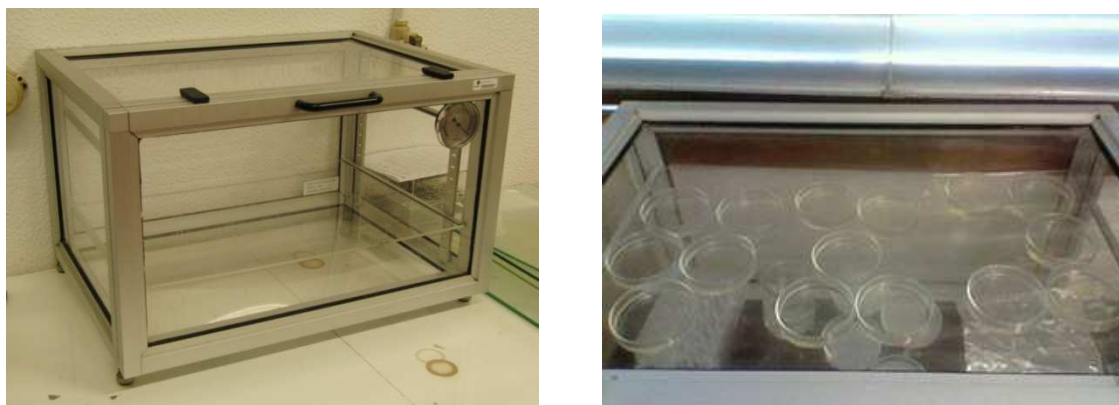


Figura 8. Câmara hermética (a) utilizada como Câmara de Amónia para formar os hidrogéis (b)

Os hidrogéis obtidos apresentaram características mecânicas que permitem a sua manipulação, podendo ser cortados para moldagem em diversas formas geométricas, caso necessário.

Os hidrogéis produzidos unicamente por soluções de Qs, formaram redes de cadeias poliméricas que se distinguem pela concentração de polímero. Os hidrogéis de 2 e 2,5% apresentaram macroscopicamente uma fraca reticulação do polímero, devido à difusão insuficiente, quando sujeitos a um ambiente saturado de hidróxido de amónia (na câmara de amónia). Com concentrações abaixo de 3% a quantidade de quitosano poderá não ser suficiente para formar estruturas reticuladas.

Assim, para produzir hidrogéis contendo partículas cerâmicas, foi escolhida a concentração de 3% de Qs, que demonstrou visivelmente possuir boas propriedades físicas. QSHAp

(contendo Qs e HAp) e Qs $\beta$ -TCP (contendo Qs e  $\beta$ -TCP) com percentagens diferentes de fase orgânica/inorgânica foram produzidos seguindo a mesma metodologia utilizada para os hidrogéis de Qs.

Todos os hidrogéis foram mantidos no frigorífico a 5°C para manter a estrutura hidratada, sem existir evaporação de água. Na figura 6 apresenta-se a fotografia de um hidrogel de Qs 3% (à esquerda) e um de QsHAp [80:30] (à direita), em forma de discos, devido à reticulação ter ocorrido em caixas de Petri.

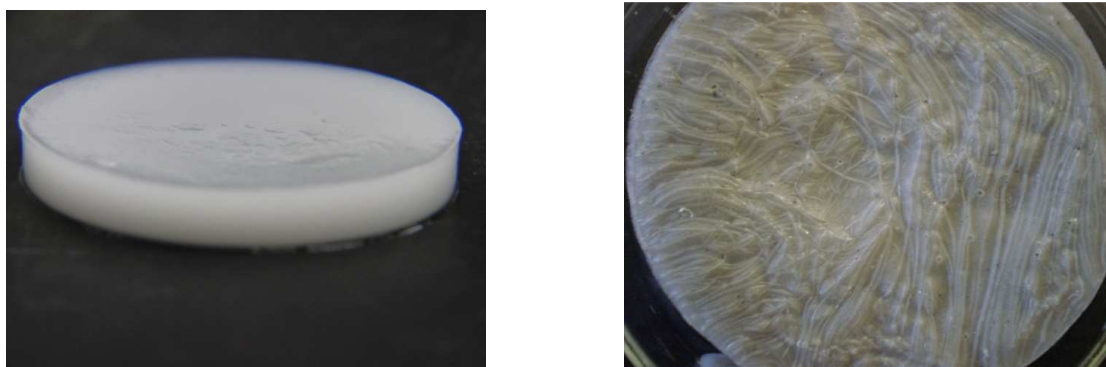


Figura 9. Hidrogel de Qs 3% à esquerda e QsHAp [80:30] à direita.

#### 4.1.5. Liofilização dos hidrogéis

A liofilização é um processo, segundo o qual, a água ou outro solvente é removido no seu estado congelado, convertendo-se directamente em vapor – ou seja, existe sublimação. Este processo envolve a absorção de calor pela amostra congelada de forma a vaporizar o gelo. Utiliza-se uma bomba vácuo para aumentar a remoção do vapor de água da superfície da amostra (aumenta a taxa de sublimação). O colectador deve estar mais frio que a superfície do material que está a ser seco, caso contrário, o vapor de água não migrará para o colectador. As soluções liofilizadas deixam poros microscópicos na estrutura resultante. Os poros são criados pelos cristais de gelo que sublimam, deixando aberturas (ou poros) no seu lugar (Ma & Zhang, 2001).

O processo de liofilização depende da área de superfície da amostra, da espessura da mesma, da temperatura do colectador, do vácuo parcial, do ponto triplo e da concentração de soluto (Ma & Zhang, 2001).

A área de superfície e a espessura da amostra podem ser ignoradas, quando a amostra tem dimensões reduzidas (milímetros). Mas para grandes volumes, esses factores não podem ser ignorados, uma vez que, quanto maior a área de superfície da amostra mais rápida é a taxa de liofilização. Mas, para uma determinada área de superfície, quanto maior a espessura da amostra mais lenta é a taxa de liofilização (Ma & Zhang, 2001).

Neste trabalho, todos os hidrogéis foram submetidos a liofilização, de forma a poderem ser estudados quando à taxa de inchamento, porosidade, microestrutura, bioactividade e ainda, para realizar os testes de libertação de fármaco. Foi necessário obter estruturas porosas desidratadas do molde inicial do hidrogel, para serem observados por Microscopia Electrónica

de Varrimento (*Scanning Electron Microscopy*) (*SEM*) e para realizar os testes de inchamento de água e libertação controlada de fármaco.

Assim, os hidrogéis Qs, QsHAp e Qs $\beta$ -TCP foram previamente congelados em azoto líquido e colocados no liofilizador (*VaCo 2, Zirbus technology*), como se pode ver pela figura 7, durante ciclos de 24h à temperatura de -54,1 °C e pressão de 0,042 mbar. Inicialmente experimentaram-se períodos de 6 e 10h, mas não foram suficientes para deixar as amostras bem secas.



Figura 10. Liofilizador com amostras na prateleira mais alta

## 4.2. Técnicas de Caracterização

### 4.2.1. Pós de HAp e $\beta$ -TCP

Os pós de HAp e  $\beta$ -TCP foram caracterizados por Difracção de Raio-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelhos por Transformadas de Fourier (FTIR) e Microscopia Electrónica de Transmissão (*TEM*), de modo a ser possível investigar a mudança de fases cristalinas, os grupos funcionais e o tamanho das partículas, em função das diferentes temperaturas de sinterização usadas.

Um resumo dos procedimentos aplicados para cada técnica é apresentado nas seções abaixo.

#### 4.2.1.1. Difracção de Raios-X (DRX)

O DRX é a uma das principais técnicas de caracterização de materiais. É a mais indicada na determinação das fases cristalinas presentes em materiais orgânicos ou inorgânicos, permitindo a identificação da composição mineralógica dos mesmos (Cullity & Stock, 2001).

Os raios-X são ondas electromagnéticas de comprimento de onda da ordem do 1Å, que ao atingirem os electrões de um átomo de determinado material, podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia (dispersão). Assim cada electrão funciona como um centro de emissão de raios X, mantendo a mesma fase e energia do fotão incidente. Este fotão muda a sua trajectória, após a colisão com o electrão. Como o seu comprimento de onda incidente é próximo da distância interatómica numa rede cristalina, pode-se verificar que as relações de fase entre as dispersões se tornam periódicas e observa-se o fenómeno da difracção em vários ângulos. Os planos de difracção e as suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos (electrões) ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância, permitindo a sua identificação (Cullity & Stock, 2001).

As condições para que ocorra difracção de raios X (interferência construtiva ou numa mesma fase) vão depender do caminho percorrido pelos raios-X e do comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg (radiação monocromática) (Cullity & Stock, 2001):

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

$n$  é a ordem de difracção,  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação incidente,  $d$  a distância interplanar e  $\theta$  o ângulo de difracção (entre o feixe incidente e os planos cristalinos). A intensidade depende do número de electrões no átomo e do plano cristalino.

O estudo das fases presentes nos pós de HAp e  $\beta$ -TCP foi efectuado segundo o DRX num difractómetro disponibilizado pelo CENIMAT/I3N (*X-ray diffraction PANalytic XPert PRO*). Como fonte emissora, foi utilizada uma ampola de cobre ( $Cu K\alpha - 1,5406 \text{ \AA}$ ) sob um potencial de aceleração de 40 kV e um feixe de corrente de 30 mA. O varrimento foi feito com foco nos picos mais relevantes dos fosfatos de cálcio, de 20° a 60°. A taxa de varrimento foi de 1 segundo por cada passo de 0,033°.

As substâncias foram identificadas por comparação com as informações cristalográficas dos bancos de dados de CaO (ICSD 98-001-1978), HAp (ICSD 98-000-6286) e  $\beta$ -TCP (ICSD 98-007-6561) apresentados em anexo.

#### 4.2.1.2. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformadas de Fourier (FTIR)

A espectroscopia estuda a interacção da radiação electromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objectivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. A radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro electromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas (Duygu et al., 2009).

O funcionamento dos espectrómetros de FTIR baseia-se no interferómetro de Michelson. Este aparelho produz um interferograma que contém toda a informação fornecido pelo interferómetro, mas que necessita de ser convertida em espectro para ser compreendida.

O facto de cada grupo funcional absorver uma dada frequência característica permite que por meio da transformada de Fourier, seja possível traçar um gráfico de intensidade de radiação versus frequência. Assim, torna-se possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido (Duygu et al., 2009).

A espectroscopia no infravermelho permite identificar algumas substituições ou alterações importantes na composição da HAp e  $\beta$ -TCP, particularmente nos grupos fosfatos e hidroxilo. Essas informações são obtidas pela excitação dos modos de energia vibracionais destes grupos moleculares dentro da estrutura dos sólidos. Pode-se diferenciar a substituição dos grupos  $\text{OH}^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  pelos grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  através da presença de bandas em  $873, 1465, 1534\text{cm}^{-1}$  e  $874, 1420, 1455\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Elliott, 1994).

A técnica de FTIR foi utilizada para identificar os compostos químicos presentes nos pós de HAp e  $\beta$ -TCP, recorrendo a um espectrómetro *FT-IR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation* (CENIMAT/I3N).

Foi preparada uma pastilha de brometo de potássio (KBr), utilizada como referência ou “branco”. As restantes duas contiveram os pós cerâmicos previamente secos e KBr, numa proporção de 1:200, respectivamente. Cada pastilha foi formada por prensagem da mistura dos pós num molde, durante 15 minutos a uma pressão de 200 bar. As pastilhas formadas foram colocadas num suporte e o registo da variação da radiação transmitida em função do número de onda da radiação incidente foi obtido.

Os espectros de FTIR foram colectados na região entre  $4000$  e  $400\text{cm}^{-1}$ , com varrimento de 50 e resolução de  $2\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.1.3. Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)

A importância do conhecimento e das análises quantitativas da microestrutura tem levado a um contínuo desenvolvimento das técnicas experimentais, particularmente da microscopia, que tem melhorado continuamente as resoluções de imagem.

A microscopia electrónica de transmissão (*Transmission Electron Microscopy*) (TEM) é uma técnica de alto poder resolutivo para a observação directa de estruturas, formando imagens em níveis atómicos (Ayache, Beaunier, Boumendil, Ehret, & Laub, 2010).

Um microscópio electrónico de transmissão produz um feixe de electrões que incide sobre a amostra, com uma distribuição de intensidade e direcção controladas pelas leis de difracção impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Este aparelho possui lentes electromagnéticas que permitem a produção de uma imagem ampliada e focada que é detectada por um sensor com uma câmara CCD (*charge coupled device*) (Ayache et al., 2010).

O contraste nas imagens formadas em *SEM* tem diversas origens, tais como diferença de espessura, diferença de densidade ou de coeficiente de absorção de electrões (contraste de massa), difracção e campos elásticos de tensão (Ayache et al., 2010).

Os pós cerâmicos foram observados no aparelho *Hitachi H-8100 Electron Microscope* com a acoplação de um detector - Espectómetro de Energia Dispersiva (*EDS*) - para elementos leves da *ThermNoran* nas instalações do Instituto Superior Técnico. Para obter as imagens foi utilizada uma câmara CCD.

Os pós foram mergulhados em etanol e utilizou-se uma agulha para realizar a sua deposição sob o porta-amostras. Foi utilizada uma tensão de aceleração de 200kV e o filamento utilizado foi  $\text{LaB}_6^2$ .

## 4.2.2. Soluções de Quitosano

As soluções poliméricas de Qs de diferentes concentrações foram avaliadas reologicamente.

### 4.2.2.1. Reologia

A viscosidade pode ser considerada a principal propriedade reológica de um fluido, pois indica a facilidade deste escoar continuamente sob a acção de uma tensão de corte externa e, do ponto de vista físico, é um indicativo da coesão entre as moléculas que constituem as lâminas adjacentes do fluido (Piotrowski & Cierniewski, 2005). Também na formação de hidrogéis, esta propriedade se torna muito importante, na distinção entre as diferentes concentrações de polímero utilizadas.

O comportamento reológico pode, geralmente, ser dividido em dois tipos (Chi H Lee, Moturi, & Lee, 2009):

- Comportamento elástico, sempre que o material recupera a sua forma original após remoção da força externa (segue a Lei de Hooke, apresentada na equação (2))

$$\sigma = E\varepsilon \quad (2)$$

em que  $\sigma$  é a tensão,  $E$  o módulo de Young e  $\varepsilon$  a deformação.

- Comportamento viscoso ou plástico (como nos líquidos Newtonianos ideais), onde a deformação cessa e o material não volta à sua forma original quando a força aplicada é removida. (segue a Lei de Newton representada pela expressão (3))

$$\sigma = \gamma\dot{\varepsilon} \quad (3)$$

Em que a viscosidade é dada por  $\gamma$  e a taxa de deformação é dada por  $\dot{\varepsilon}$

---

<sup>2</sup> Pode recorrer-se a um filamento de  $\text{LaB}_6$ , que fornece uma maior densidade de corrente, numa temperatura inferior à do tungsténio (1800°K). Além de um brilho de 5 a 10 vezes superior, o filamento de  $\text{LaB}_6$ , apresenta vida útil substancialmente superior, cerca de 700 a 1000 horas, contra 20 a 50 horas para o de tungsténio.

Dois dos factores que mais afectam a viscosidade da solução são o peso molecular do polímero e o grau de desacetilação. O peso molecular representa o comprimento das cadeias poliméricas. Esta característica está directamente relacionado com a viscosidade da solução, uma vez que o comprimento polimérico vai determinar o enovelamento das cadeias do polímero no solvente. Quanto maior o peso molecular, mais elevada é a viscosidade da solução comparada com outra de igual concentração do mesmo polímero, mas de menor peso molecular. Wang & Xu (1994) referem que o comportamento não-Newtoniano e elástico das soluções de quitosano, aumenta com o aumento do grau de desacetilação. Quanto maior o grau de desacetilação, maior a expansão das cadeias poliméricas.

Conhecem-se vários modelos para descrever os comportamentos dos fluidos. Geralmente utiliza-se o modelo de Cross em reologia, que é descrito pela seguinte lei constitutiva (Barnes, 2000):

$$\frac{\mu - \mu_{\infty}}{\mu_0 - \mu_{\infty}} = \frac{1}{1 + (K\dot{\gamma})^m} \quad (4)$$

Em que K é apresentada em unidades de tempo e m uma constante adimensional.

A figura 11 descreve o comportamento de um fluido pseudoplástico, que se distingue em dois patamares de viscosidade constante: um para a taxa de deformação de corte próxima de zero (viscosidade de corte nula,  $\mu_0$ ), e outro para uma taxa de deformação de corte elevada (viscosidade de corte infinita,  $\mu_{\infty}$ ) (Barnes, 2000).

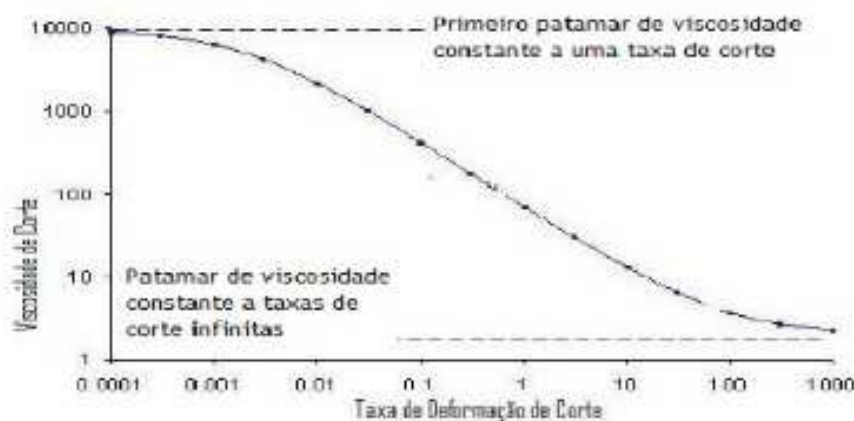


Figura 11. Relação geral entre a taxa de deformação e viscosidade de corte num dado fluido (adaptada de Santos, 2009)

Quando a viscosidade dos polímeros diminui com o aumento da taxa de corte dá-se o nome de comportamento reo-fluidificante ou pseudoplástico. Ao contrário, quando esta viscosidade aumenta com a taxa de corte o comportamento típico designa-se por comportamento reo-espessante (Barnes, 2000; Santos, 2009).

Kienzle-Sterzer et al. (1985) estudaram a viscosidade de soluções concentradas de quitosano, e concluíram que esta aumenta com o aumento da concentração, e que o comportamento pseudoplástico existe acima 0.50 g/dL. Se a solução for muito diluída, o hidrogel irá partir-se ou não ser capaz de se formar devido à fraca reticulação do polímero.

Para que ocorra a gelificação do polímero, é necessário que o peso molecular e a concentração do polímero sejam suficientes (Kienzle-Sterzer, 1985).

Para a caracterização reológica das soluções utilizou-se o reómetro *Bohlin Gemini HR Nano* (*Malvern Instruments Ltd*). Neste trabalho, as determinações da viscosidade das soluções ocorreram à temperatura de 25°C, em estado estacionário. Todas as medições foram medidas em modo contínuo para taxas de corte entre 0,1s<sup>-1</sup> e 1000s<sup>-1</sup>.

### 4.2.3. Hidrogéis

Para melhor entender as propriedades dos hidrogéis em estudo, estes foram sujeitos a testes de inchamento em água e testes de resistência à compressão. Os fosfatos de cálcio que integraram as matrizes poliméricas, foram analisados quanto à sua bioactividade (análise química) e influência na estrutura do hidrogel (análise física). Por fim, a microestrutura, porosidade e resultados do teste de bioactividade foram observados por microscopia de varrimento (*SEM*).

#### 4.2.3.1. Taxa de inchamento

Hidrogéis de porosidade elevada são capazes de absorver uma grande quantidade de água tornando-se mais volumosos. A capacidade de um hidrogel absorver água, pode estar relacionado com a cinética de libertação de fármaco. A velocidade de penetração da água no sistema matricial condiciona o modo de libertação do fármaco. (Rohindra, Nand, & Khurma, n.d.) Se a absorção de água for mais lenta, a dissolução do fármaco e conseqüente libertação, tornar-se-á mais prolongada, o que será vantajoso para aplicações biomédicas de longo termo.

Para a determinação da capacidade de absorção de água de cada gel sintetizado, foram liofilizadas cinco amostras, tendo sido registado a sua massa de amostra desidratada ( $W_0$ ). Seguidamente, cada amostra foi colocada num recipiente fechado, contendo água ultra pura ( $H_2O$ ) no seu interior. A evolução do peso da amostra foi avaliada, tendo para tal sido determinado em intervalos de tempo regulares o peso de cada hidrogel até este apresentar um valor constante.

Para caracterizar a capacidade de absorção de água dos hidrogéis de Qs, QsHAp e Qsβ-TCP, foi utilizado o índice de inchamento ( $S$ ), o qual relaciona a massa do hidrogel inchado ( $W_i$ ) e a massa do hidrogel liofilizado ( $W_0$ ). Para calcular o grau de inchamento, recorreu-se à seguinte equação (Rohindra et al., n.d.):

$$S = \frac{W_i - W_0}{W_0} \times 100 \quad (5)$$

#### 4.2.3.2. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas de um material estão relacionadas com a capacidade de resistência do material a determinadas forças mecânicas (Barnes, 2000).

De forma a se compreenderem melhor as propriedades mecânicas de um determinado material, é necessário perceber melhor o que se entende por tensão e deformação.

A extensão ( $\varepsilon$ ) é entendida como a relação entre a variação do comprimento,  $\Delta L$  (após o material ter sido sujeito à carga) e o comprimento inicial,  $L_0$ , apresentado na equação (6) (Gutowska, Bae, Jacobs, Feijen, & Kim, 1994).

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \text{ (mm/mm)} \quad (6)$$

A rigidez de um determinado material pode ser definida como a capacidade de um material (ou composto) resistir à deformação quando submetido a uma dada tensão. A rigidez é medida pelo módulo de elasticidade (E), que é a relação entre a tensão aplicada no material e a deformação resultante desta tensão. O módulo de elasticidade é obtido a partir do gráfico de tensão vs. deformação, sendo E o declive da recta na região elástica (pequenas deformações), dado pela Lei de Hooke apresentada na pag. 29 – equação (2) (Van Vlack, 1970).

A resistência à compressão é uma das mais importantes características dos materiais restauradores. Esta propriedade consiste em avaliar o comportamento do material quando submetido a uma força de compressão uniaxial. Para a realização desta propriedade foi utilizado um equipamento apropriado com uma célula de carga de 20 N. Esta foi programada para trabalhar a uma velocidade de compressão de 5 mm min<sup>-1</sup>. Foram utilizados corpos de prova cúbicos de 10 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento, os corpos de prova foram inseridos de maneira a garantir superfícies paralelas e uniformes. Foram ensaiados cinco corpos de prova para cada tipo de hidrogel e o valor médio da tensão máxima de compressão ( $\sigma_{\text{máx}}$ ) e módulo de elasticidade (E) foram reportados.

#### 4.2.3.3. Testes de bioactividade

Os hidrogéis de QsHAp e QsBTCP, de diferentes composições de material orgânico/inorgânico, foram imersos em solução de SBF, liofilizados e posteriormente avaliados por SEM. Os testes de bioactividade têm o intuito de verificar se existe ou não formação *in vitro* de HA e  $\beta$ -TCP, enquanto as amostras se encontram numa solução semelhante aos fluidos corporais (SBF).

Foi preparado 1L de solução com base no procedimento descrito na proposição de norma internacional ISO (ISSO FDIS 23317, 2005) citada por Abe et al. (1990). Na tabela 3, encontram-se listados os reagentes segundo a ordem de adição, quantidade, composição iônica e massa molar de cada um deles. A solução de SBF é supersaturada em relação ao equilíbrio.

**Tabela 3. Sequência de sais adicionados, quantidade, composição iônica e massa molar para preparar 1L de solução de SBF.**

Ordem	Reagente	Quantidade [gpl]	Ião	SBF [mM]
1	NaCl	6.547	Cl <sup>-</sup> ; Na <sup>+</sup>	142
2	NaHCO <sub>3</sub>	2.268	Na <sup>+</sup> ; HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	125
3	KCl	0.373	K <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	27
4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.178	Na <sup>+</sup> ; HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5
5	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.305	Mg <sup>2+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	1.5
6	1M HCl	15 ml	H <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	2.5
7	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.368	Ca <sup>2+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	1
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.071	Na <sup>+</sup> ; SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5
9	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH 2	6.057		
10	1M HCl	até pH 7.4 a 37°C		

Para produzir uma solução de SBF adequada, foi necessário respeitar o seguinte procedimento:

1. Os reagentes foram adicionados um a um, após dissolução total, em 700ml de água destilada.
2. Após a adição do 9º reagente (Tris), aqueceu-se a solução desde a temperatura ambiente até 37°C.
3. Foi-se adicionando HCl até a solução ficar translúcida e com pH de 7,26. No total utilizaram-se 37ml de HCl.
4. Adicionou-se água destilada até perfazer 1L de solução e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.
5. A solução de SBF foi guardada a 5°C no frigorífico, onde pode ser conservada, no máximo, durante um mês.

Após lavagem dos hidrogéis em água destilada, estes foram colocados em frascos de vidro imersos em 10 ml de solução SBF. Os frascos foram hermeticamente fechados e colocados em estufa a 37°C durante 7 dias. Os ensaios foram realizados em condições fisiológicas. Após o tempo determinado, as amostras foram retiradas da estufa e lavadas com água destilada e

liofilizadas como descritos anteriormente (pág. 25). A liofilização é feita após o teste de bioactividade para ser possível a visualização das estruturas por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM). Assim não é necessário proceder a duas liofilizações da mesma estrutura.

#### 4.2.3.4. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A utilização da microscopia electrónica de varrimento (SEM) permite a obtenção de informações químicas de vários tipos de amostras, permitindo avaliar a microestrutura dos materiais (Carrassi & Abati, 1978; Hayat, 1974).

O princípio de funcionamento do SEM consiste na emissão de um feixe de electrões através de um filamento capilar de tungsténio (eléctrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial (ddp). O eléctrodo positivo atrai fortemente os electrões gerados, resultando numa aceleração em direcção ao electrodo positivo. A correcção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direcção à abertura da objectiva. A objectiva ajusta o foco do feixe de electrões antes destes atingirem a amostra (Hayat, 1974; C. P. Lin, Douglas, & Erlandsen, 2004).

A interacção do feixe de electrões com a superfície da amostra, produz electrões secundários, electrões retro-espalhados, raios-X, fótões, etc. Estas emissões são captadas e fornecem informações sobre a amostra, tais como, topografia da superfície, composição, cristalografia, etc. Os electrões secundários são os responsáveis pela formação e obtenção das imagens de alta resolução da topografia da superfície enquanto que os electrões retro-espalhados fornecem imagens características de variação da composição de um material (Carrassi & Abati, 1978; Hayat, 1974).

Amostras de metal não exigem nenhuma preparação, a não ser cortes para dimensionar as amostras de acordo com o suporte. Amostras sólidas não condutivas devem ser cobertas com uma camada de material condutor. Uma cobertura fina de material electricamente condutor é depositada para prevenir a formação de campos eléctricos estáticos na amostra devido a irradiação eléctrica durante a produção da imagem. Tais coberturas podem ser de ouro, platina, tungsténio, grafite, etc (Carrassi & Abati, 1978).

Foi necessário liofilizar todos os hidrogéis para serem observados morfologicamente por SEM. Neste trabalho, utilizou-se esta técnica para observar o interior e exterior das amostras dos hidrogéis secos. No caso dos testes de bioactividade, interessou observar a superfície externa, no entanto para observar a microestrutura e porosidade, foi necessário visualizar o interior da amostra. Os hidrogéis liofilizados foram congelados em azoto líquido e partidos transversal e longitudinalmente, de forma a observar-se o seu interior em diferentes planos.

As amostras foram colocadas no suporte próprio e cobertas com uma camada de 8 nm de ouro, e analisadas com um microscópio electrónico *ZEISS DSM 962 (Alemanha)* e tensão de aceleração de 5kV.

### 4.3. Sistema de libertação de fármaco

Nos sistemas de entrega de fármacos controlados pela absorção de água, a taxa de inchamento está relacionada com a libertação de droga no meio aquoso. Inicialmente, neste tipo de sistemas as amostras encontram-se secas, mas quando colocadas no corpo humano, absorvem grandes quantidades de água ou outros fluidos corporais, inchando. A capacidade que o material tem de inchar, aumenta a quantidade de solvente aquoso no seu interior, tal como o tamanho da matriz polimérica, permitindo saída do fármaco por difusão (Denkbas, 2006; Gupta et al., 2002; Peppas et al., 2000).

A modelação matemática destes sistemas assume um papel central na compreensão da cinética da libertação e na simulação do comportamento do fármaco nos tecidos. A identificação dos factores que influenciam a cinética e a quantificação desta influência permitem construir mecanismos de controlo dos perfis de libertação.

Os modelos matemáticos mais conhecidos no estudo da cinética de libertação de fármaco são:

1. Cinética de ordem zero
2. Cinética de primeira ordem
3. Higuchi
4. Hixson-Crowell
5. Baker -Lonsdale
6. Korsmeyer-Peppas

#### 4.3.1. Modelo de Korsmeyer-Peppas

O modelo genericamente utilizado para analisar a libertação de fármacos em materiais hidrofílicos, inicialmente matrizes poliméricas desidratadas, baseia-se na equação semi-empírica proposta por Korsmeyer e Peppas (Equação 7) (Brazel & Peppas, 1999; Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri, & Peppas, 1983; Siegel, 1989).

$$F = \frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (7)$$

onde  $F$  é a fracção de fármaco libertado segundo o tempo  $t$  em horas,  $M_t$  a quantidade de fármaco libertado no tempo  $t$  em horas,  $M_\infty$  a quantidade total do fármaco inserido na amostra,  $K$  a constante de cinética,  $n$  o expoente de difusão ou libertação

Este modelo é o que melhor se adequa para os casos em que o mecanismo de libertação é pouco conhecido ou estão envolvidos mais do que um tipo de mecanismo, aparentemente independentes: o transporte do fármaco que obedece às leis de Fick (difusão) e outro relacionado com os fenómenos de inchamento/relaxamento do hidrogel, que envolve a transição de um estado rígido a outro mais flexível, denominado transporte caso II. (Brazel & Peppas, 1999; Korsmeyer et al., 1983; Korsmeyer & Peppas, 1981)

A equação de Korsmeyer-Peppas permite a classificação em modelo fickiano (caso I) e modelos não-fickianos (caso anómalo, caso II e super-caso II), dependendo do valor de  $n$  (expoente de libertação) de melhor ajuste ao perfil de difusão/libertação de um fármaco contido num sistema matricial. (Brazel & Peppas, 1999; Korsmeyer et al., 1983) (Tabela 4)

**Tabela 4. Interpretação dos mecanismos de libertação por difusão a partir de matrizes poliméricas**

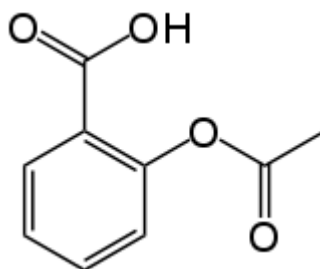
Expoente de libertação ( $n$ )	Mecanismo de transporte do fármaco
0,5	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 1,0$	Transporte anómalo
1,0	Transporte caso II
$> 1,0$	Transporte super-caso II

O comportamento de difusão fickiana caracteriza-se por uma elevada velocidade de difusão do solvente para o interior da matriz e uma baixa velocidade de relaxamento polimérico, que induz a formação de um gradiente de penetração do solvente. Em difusões não-fickianas as cadeias poliméricas não apresentam mobilidade suficiente para permitir uma rápida absorção de solvente por parte da matriz. (Brazel & Peppas, 1999; Korsmeyer et al., 1983)

As três classes de difusão não-fickiana distinguem-se quanto a velocidade de difusão do solvente. No transporte anómalo a velocidade de difusão do solvente e do relaxamento do polímero são da mesma ordem de grandeza, no transporte caso II a velocidade de difusão do solvente é maior que o processo de relaxamento do polímero e no transporte super-caso II, a velocidade de difusão do solvente é muito superior (aceleração na penetração do solvente), sendo o factor determinante da difusão. (Brazel & Peppas, 1999; Korsmeyer et al., 1983)

#### 4.3.2. Estudo da libertação de fármaco

Para se poder avaliar o comportamento dos hidrogéis preparados como sistema de libertação de fármacos, procedeu-se à imobilização do ácido acetilsalicílico (AAS) como fármaco modelo, tendo a sua cinética de libertação sido seguida por método espectrofotométrico na região do UV.



**Figura 12. Estrutura química do ácido acetilsalicílico ( $C_9H_8O_4$ )**

O ácido acetilsalicílico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) (Aspirina®) é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não-esteróides (AINE) e antitérmicos. Inibe a agregação das plaquetas e prolonga o tempo de sangramento. É amplamente utilizado para o alívio da dor. É um inibidor da ciclooxigenase (COX) e anti-inflamatório tendo uma meia-vida de 15-20 minutos. A aspirina tem um efeito irritante directo na mucosa gástrica, devido à inibição das prostaglandinas e prostaciclina e causar assim ulceração, dor epigástrica e/ou hemorragia. Formulação de libertação sustentada de aspirina iria reduzir os efeitos colaterais indesejáveis, reduzir a frequência de administração e melhorar o tratamento do paciente.

Neste tipo de estudos, a Aspirina® é uma droga modelo muito utilizada. O AAS pode sofrer hidrólise em ambiente aquoso de ácido acético e ácido salicílico. O ácido salicílico não demonstra actividade anti-plaquetária, o que garante que se mantém quimicamente estável num sistema de libertação de fármaco. Já foram estudadas muitas matrizes poliméricas, que controlam a libertação da Aspirina® durante 5-10 dias (Yu Tang & Singh, 2008).

#### 4.3.2.1. Espectrofotometria UV-Visível

A espectrofotometria de ultravioleta (UV) e visível é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinar compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio activo de fármacos.

A região UV do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, e a região do visível entre 400 a 800 nm. As energias correspondentes a essas regiões estão entre 150 a 72 k.cal.mol<sup>-1</sup> na região ultravioleta, e 72 a 36 k.cal.mol<sup>-1</sup> na região visível. Energias dessa magnitude correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados electrónicos de muitas moléculas.

A absorção da região UV e visível depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos electrões nas moléculas ou iões absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada.

De um ponto de vista prático, o aspecto mais importante do cálculo quântico é a determinação de quanta luz é absorvida pela amostra. Isto é descrito pela *lei de Beer-Lambert*, que dá a relação entre a intensidade da luz incidente na solução ( $I_0$ ), e a intensidade da luz após atravessar a solução ( $I$ ).

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon cl \quad (8)$$

A= absorvância

$\epsilon$ = coeficiente de absorção

c= concentração de substância absorvente no meio

l= distância que a luz atravessa pelo corpo

Determinar a concentração de um soluto numa solução, por espectrofotometria, envolve a comparação da absorvância da solução-problema à solução de referência, na qual já se conhece a concentração do soluto. Neste estudo, foi utilizada uma solução-padrão com diferentes concentrações de AAS dissolvido em SBF, tendo esta a sua absorvância determinada. Estas soluções foram preparadas por diluição da concentração mais elevada (25 µg/ml), até obter 5 concentrações conhecidas. Com os valores de absorvância e de concentração conhecidos, pode-se traçar um gráfico (Fig. 13) cujo perfil é conhecido como “recta de calibração”. Nesse gráfico, a recta permite correlacionar os valores de absorvância com a concentração desejada, através da equação de linearidade obtida ( $y=0,0018x$ ).

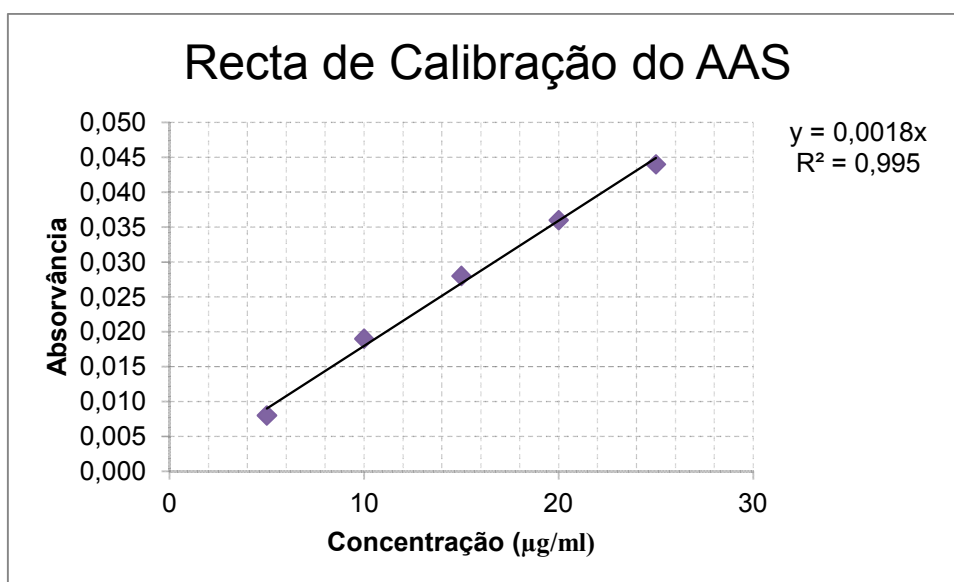


Figura 13. Recta de absorvâncias do ácido acetilsalicílico para concentrações diferentes

De seguida procedeu-se à produção do hidrogel de quitosano com ácido acetilsalicílico incorporado na sua rede polimérica. Dissolveu-se 0,30 g de AAS em 100 ml de Aac 2% e deixou-se a agitar durante 24h. Juntaram-se 3 g de Qs, para formar uma solução de 3% de concentração polimérica, contendo 10 % (m/m) de fármaco.

Repetiu-se o processo explicado anteriormente para a formação de hidrogéis, utilizando uma placa de 24 poços, de forma a produzir hidrogéis mais pequenos. Após a sua reticulação e posterior evaporação do solvente, procedeu-se à liofilização dos hidrogéis produzidos.

Seguidamente, o hidrogel seco foi mergulhado numa solução, contendo 150 mL de SBF, previamente aquecida a 37°C. Amostras de 3 ml foram retiradas em intervalos definidos (crescentes) para leitura no espectrofotómetro no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorvância previamente determinado. O volume de solução retirada para a análise foi então novamente introduzido no sistema para não alterar as condições de difusão do

fármaco, nem a concentração do meio. Estes ensaios foram realizados em condições fisiológicas, mantendo o hidrogel a pH=7,4 (solução SBF) numa estufa a 37°C.

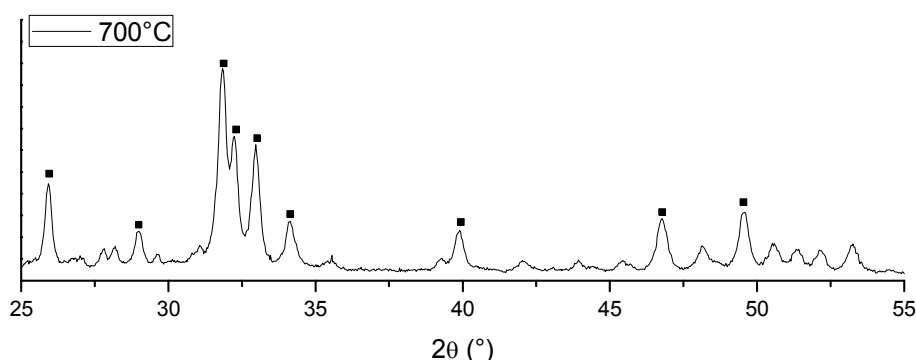
## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Pós Cerâmicos

#### 5.1.1. Hidroxiapatite

##### 5.1.1.1. Difracção por raio-X (DRX)

Na figura 14, é apresentada a análise de difracção por raio-X dos pós de HAp sinterizados a 700°C, sendo esta a técnica que analisa o grau de cristalinidade do cerâmico.

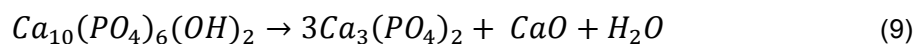


**Figura 14.** Difractograma dos pós de HAp sinterizados a 700°C. Os símbolos indicam os picos de difracção relacionados com HAp (+)

Pela observação do espectro obtido e comparação com o banco de dados cristalográfico (HAp JCPDS – em anexo), é possível identificar os picos mais intensos da fase cristalina da HAp. Foram assinalados os picos que correspondem a mais de 15% de intensidade. Esses picos indicam as difracções em 25,875° (002), 28,896° (120), 31,741° (211), 32,179° (112), 32,868° (030), 34,045° (022), 39,755° (130), 46,661° (222), 49,464° (123) (2 $\theta$ ), típicas da hidroxiapatite. Não foi possível identificar mais nenhuma fase cristalina nesta amostra.

Raynaud e colaboradores (Raynaud et al., 2002) estudaram a decomposição parcial da HAp em  $\beta$ -TCP e consideraram a temperatura de sinterização a principal influência na pureza da HAp. Verificaram que com o aumento da temperatura de sinterização de 600° para 900°C, muitos picos se acentuaram, não só em termos de intensidade, mas também a sua amplitude diminuiu. Numa análise de DRX, estas alterações sugerem um aumento do grau de cristalinidade.

Também é de salientar que fases cristalinas adicionais ( $\beta$ -TCP e CaO) aparecem a temperaturas de sinterização de 800 e 900°C, e que nenhuma outra fase cristalina, excepto a HAp, está presente a 600° e 700°C. Feng e os seus colegas (Feng et al., 2005) concluíram que a HAp se pode decompor em  $\beta$ -TCP e CaO, a temperaturas de sinterização iguais ou superiores a 800°C. A equação proposta para esta reacção é dada por:

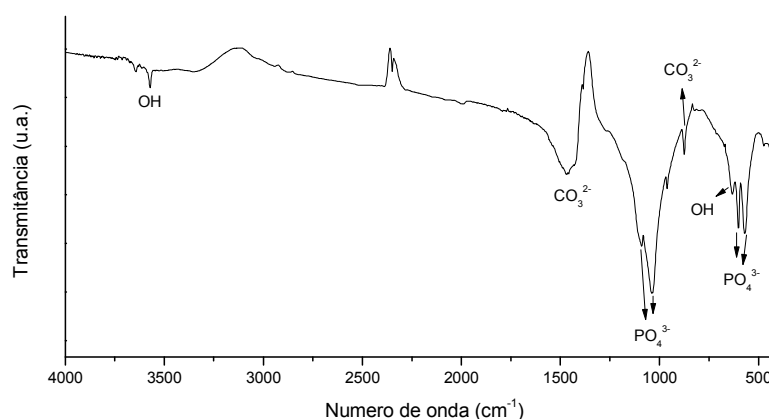


Estas conclusões sugerem que a temperatura de sinterização ideal para produzir HAp pura e cristalina é 700°C, que foi a temperatura utilizada neste trabalho.

A intensidade observada nos picos 25,875° (002) e 31,741° (211) indicam uma natureza de cristalitos de pequena dimensão, sujeitos a grandes oscilações atômicas. Tais cristalitos com essas dimensões foram reportados por van der Houwen et al no estudo da avaliação orgânica do crescimento dos ligamentos de fosfato de cálcio.

### 5.1.1.2. Espectroscopia no Infravermelho por transformada Fourier (FTIR)

A análise de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) identificou os grupos funcionais fosfato e hidroxilo característicos da hidroxiapatite. O espectro FTIR do pó de HAp obtido pelo método de sol-gel, sinterizado a 700°C e incorporado nos hidrogéis de quitosano, é apresentado na figura 15.



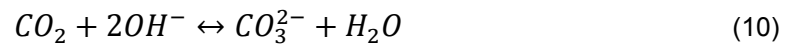
**Figura 15. Análise FTIR dos pós de HAp sinterizados a 700°C mostrando as bandas de absorção referentes aos grupos hidroxilo, fosfato e carbonat**

As reflexões características das vibrações  $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$  (a 563, 600 e 942  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$  (a 1040  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$  (a 1100  $\text{cm}^{-1}$ ) foram observadas para este cerâmico. Estas reflexões indicam um rearranjo dos poliedros de  $\text{PO}_4^{3-}$  na estrutura do cristal e esta tripla degeneração indica a presença de fase apatítica. (Franco, Silva, & Borges, 2010) A banda presente em 631  $\text{cm}^{-1}$  e a banda acentuada em 3570  $\text{cm}^{-1}$  são características da estrutura de apatite, e aparecem devido às vibrações de grupos  $\text{OH}^-$ . O grupo de estiramento entre 3300 e 3600  $\text{cm}^{-1}$  pode ser explicado pelo modo de vibração do grupo O-H devido à água absorvida. O grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  é detectado pela presença de bandas em 870  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ ), 1422 e 1460  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ ).

O ião fosfato  $PO_4^{3-}$  é a principal espécie molecular a conduzir à absorvância da HAp no intervalo de frequências da região 900-1200  $cm^{-1}$ . (Fowler, Moreno, & Brown, 1966) caracterizaram bandas características da HAp no infravermelho. A absorvância  $\nu_1$  ocorre a 962  $cm^{-1}$ , enquanto que os dois componentes de  $\nu_3$ , foram identificados a 1,040 e 1,092  $cm^{-1}$ .

Já foi estudado que o ião carbonato pode ser identificado no espectro da HAp em dois picos diferentes, conhecidas por tipo A (substituição do grupo hidroxilo) e tipo B (substituição do grupo fosfato). (Elliott, 1994)

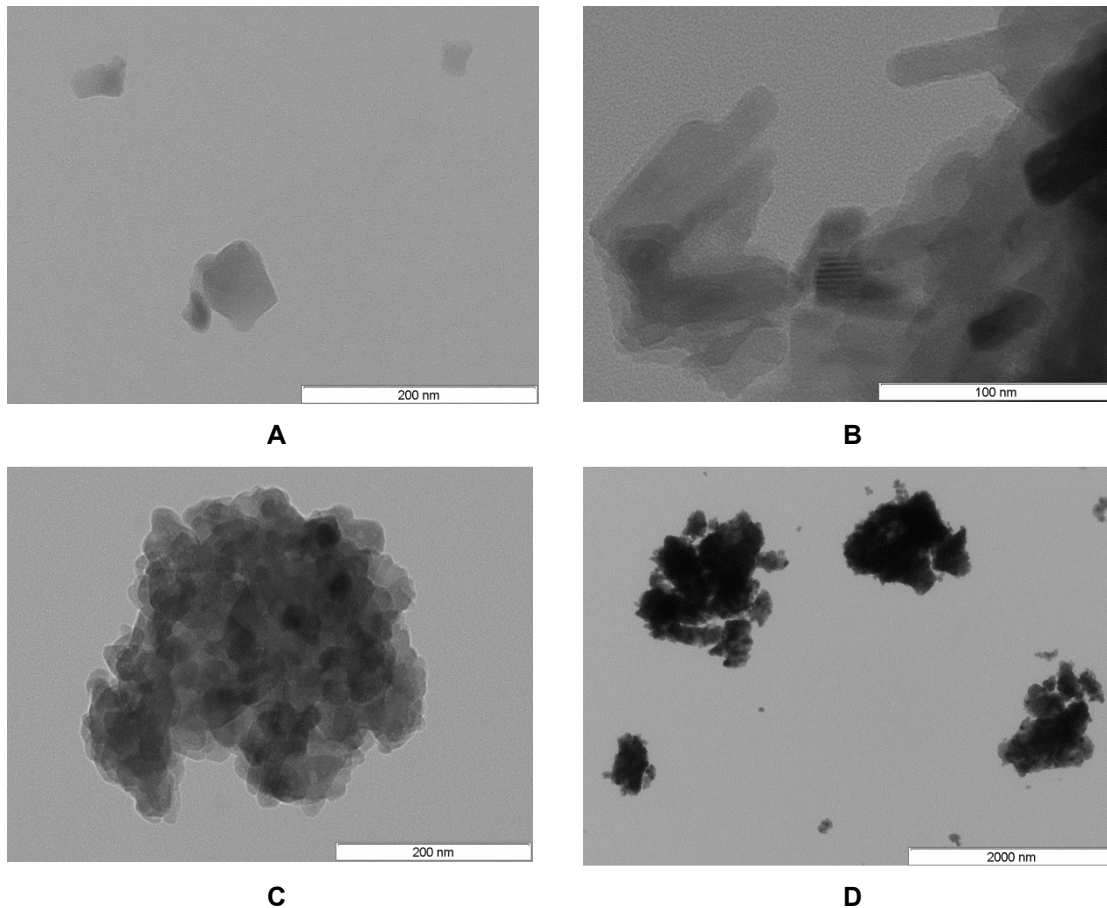
Apesar do grupo  $CO_3^{2-}$  não ter sido detectado no padrão de DRX, ele aparece bem visível no espectro FTIR. Leeuwenburgh, et al (2006) acreditam que a presença do grupo carbonato na síntese de hidroxiapatite é proveniente das matérias-primas ou da atmosfera durante o processo de preparação e indica a presença de impureza nas amostras. O carbonato seria originado a partir do  $CO_2$  presente no ambiente das deposições, de acordo com a reação de formação/ decomposição do carbonato, dada por (10)



### 5.1.1.3. Microscopia por Transmissão (TEM)

A análise por microscopia electrónica electrónica de transmissão dos cristais de hidroxiapatite sintetizadas em laboratório pelo método sol-gel, mostram que as formas dos cristais variam de esferas a formas elípticas (*needle-like*), como se pode ver nas figuras X (A) e (B), respectivamente. Os resultados experimentais de microscopia electrónica de transmissão corroboram a estrutura elíptica da hidroxiapatite estudada por Araújo e colaboradores (Araújo, et al., 2007).

Na figura 16(A) observam-se os cristalitos esféricos de tamanhos entre os 20 e os 60 nm. Para a temperatura de sinterização (700°C) e o tempo de envelhecimento (48h) a que as partículas de HAp foram sujeitas, este tamanho está próximo dos resultados já reportados por alguns autores. (Feng et al., 2005; Yuan & Liu, 2002)



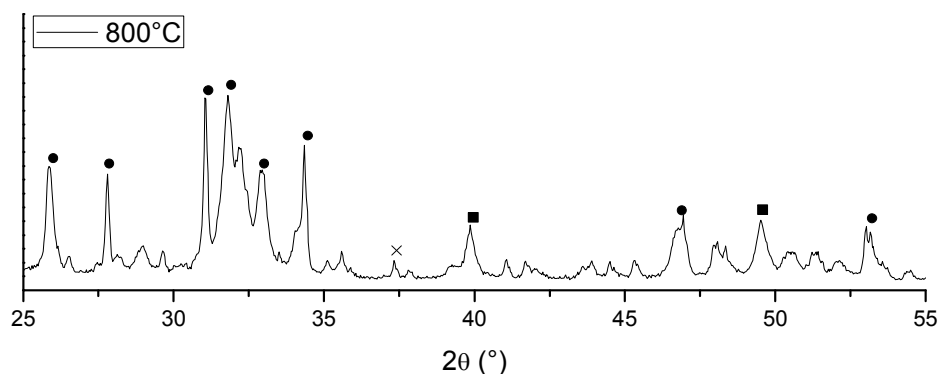
**Figura 16.** Imagens obtidas por TEM de cristalitos de HAp esféricos (A) e elípticos (B); agregados (C) e aglomerados (D) de partículas.

Estes cristalitos de tamanho nano, têm tendência a juntarem-se para formar agregados (Fig. 16(C)), que através de forças de ligação fracas, como forças de van der Waals, forças electrostáticas ou devido a tensões superficiais, se ligam a outros agregados, formando os aglomerados. Estes aglomerados, como se podem ver na figura 16(D), são da ordem dos 1 $\mu$ m.

### 5.1.2. $\beta$ -fosfato tricálcico

#### 5.1.2.1. Difracção por raio-X (DRX)

Na figura 17, é apresentada a análise de difracção por raio-X dos pós de  $\beta$ -TCP obtidos a 800°C, onde se podem identificar as diferentes fases cristalinas do cerâmico.



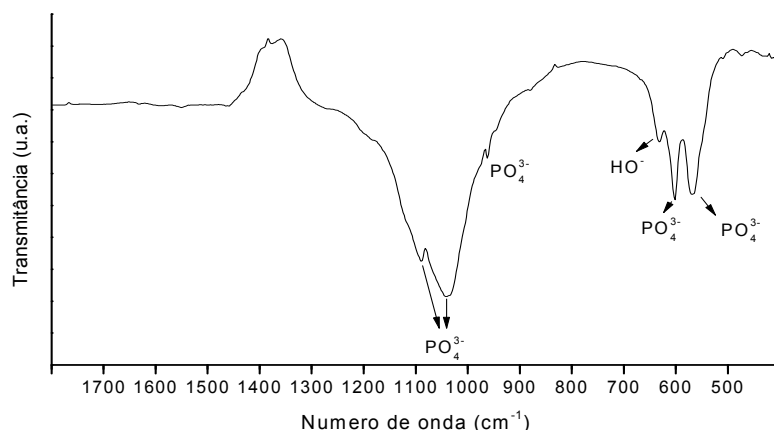
**Figura 17. Difratograma dos pós de  $\beta$ -TCP sinterizados a 800°C. Os símbolos indicam os picos de difração relacionados com HAp (x)  $\beta$ -TCP (●) e CaO (■).**

Compararam-se os picos obtidos neste espectro com a ficha cristalográfica do  $\beta$ -TCP (JCPDS – em anexo) e foram assinaladas as difracções correspondentes à fase cristalina característica deste fosfato de cálcio. Os ângulos que apontam para a fase cristalina do  $\beta$ -TCP são: 25,758° (1010), 27,784° (214), 31,013° (0210), 31,050° (217), 32,436° (128), 34,348° (220), 46,947° (4010), 52,946° (2020).

Identificam-se os picos das fases cristalinas CaO (37,621° (002)) e HAp (39,755° (130) e 49,464° (123)), que indicam a presença de iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  nos cristais de  $\beta$ -TCP. A presença de iões fosfato, provenientes da HAp, também podem ser identificados pela análise FTIR explicada mais detalhadamente no ponto seguinte.

#### 5.1.2.2. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A figura 18 ilustra o espectro de absorção FTIR do pó de  $\beta$ -TCP obtido pelo método de sol-gel, sinterizado a 800°C, o qual foi posteriormente introduzido nos hidrogéis de quitosano. A análise dos grupos vibracionais identificou os grupos funcionais fosfato e hidroxilo característicos da hidroxiapatite.



**Figura 18. Análise FTIR dos pós de  $\beta$ -TCP sinterizados a 800°C mostrando as bandas de absorção referentes aos grupos hidroxilo e fosfato.**

As bandas a 1092 e 1040  $\text{cm}^{-1}$  correspondem aos componentes  $\nu_3$  do modo vibracional *degenerado* do estiramento assimétrico P-O. O componente vibracional  $\nu_1$  do  $\text{PO}_4^{3-}$  é identificado na frequência de 962  $\text{cm}^{-1}$ , e corresponde a um modo vibracional não degenerado da deformação simétrica de P-O. As bandas de 601 e 571  $\text{cm}^{-1}$  estão associadas aos componentes de degeneração tripla  $\nu_4$  da deformação antissimétrica de O-P-O. Esta região de 500-700  $\text{cm}^{-1}$  está principalmente associada à vibração de grupos fosfato. Pode-se ainda constatar que existe uma concentração significativa de grupos hidroxilo na estrutura, observado pela intensidade da vibração a 635  $\text{cm}^{-1}$ .

Sanosh e colegas (Sanosh, et al., 2010) estudaram o método de sol-gel para produzir pós nano de  $\beta$ -TCP e obtiveram resultados muito semelhantes através da análise FTIR.

### 5.1.2.3. Microscopia por Transmissão (TEM)

Após observação dos pós de  $\beta$ -TCP por microscopia eletrônica de transmissão, conclui-se que os cristalitos sintetizados possuem tamanhos na ordem dos nanômetros tal como reportado na literatura por Sanosh et al., (2010). Na figura 19 (A) podem distinguir-se dois cristalitos sobrepostos com cerca de 80 nm cada. A morfologia dos cristalitos de  $\beta$ -TCP é tendencialmente esférica. Outros autores já estudaram hidroxiapatites deficientes em cálcio (como o  $\beta$ -TCP) e reportaram que este fenómeno pode estar relacionado com a diminuição do rácio Ca/P. A diminuição de Ca na reacção, aumenta a presença do ião  $\text{HPO}_4^{2-}$  na estrutura do  $\beta$ -TCP, sendo este o principal responsável por dar às partículas uma forma mais esférica (Aizawa, Ueno, Itatani, & Okada, 2006).

Tal como acontece na HAp, as partículas primárias aqui observadas, têm tendência a aglomerar, por serem nano partículas com uma extensa área de contacto e muita energia associada (Sanosh et al., 2010). A nucleação e crescimento de partículas de  $\beta$ -TCP, com o

efeito da temperatura, pode ser explicado pelo mecanismo teórico de nucleação, agregação e posterior aglomeração tal como explicado para o cerâmico anterior. Este processo é visível pelas figuras 19 (B), (C) e (D) que ilustram os diferentes estados de ligação das partículas.

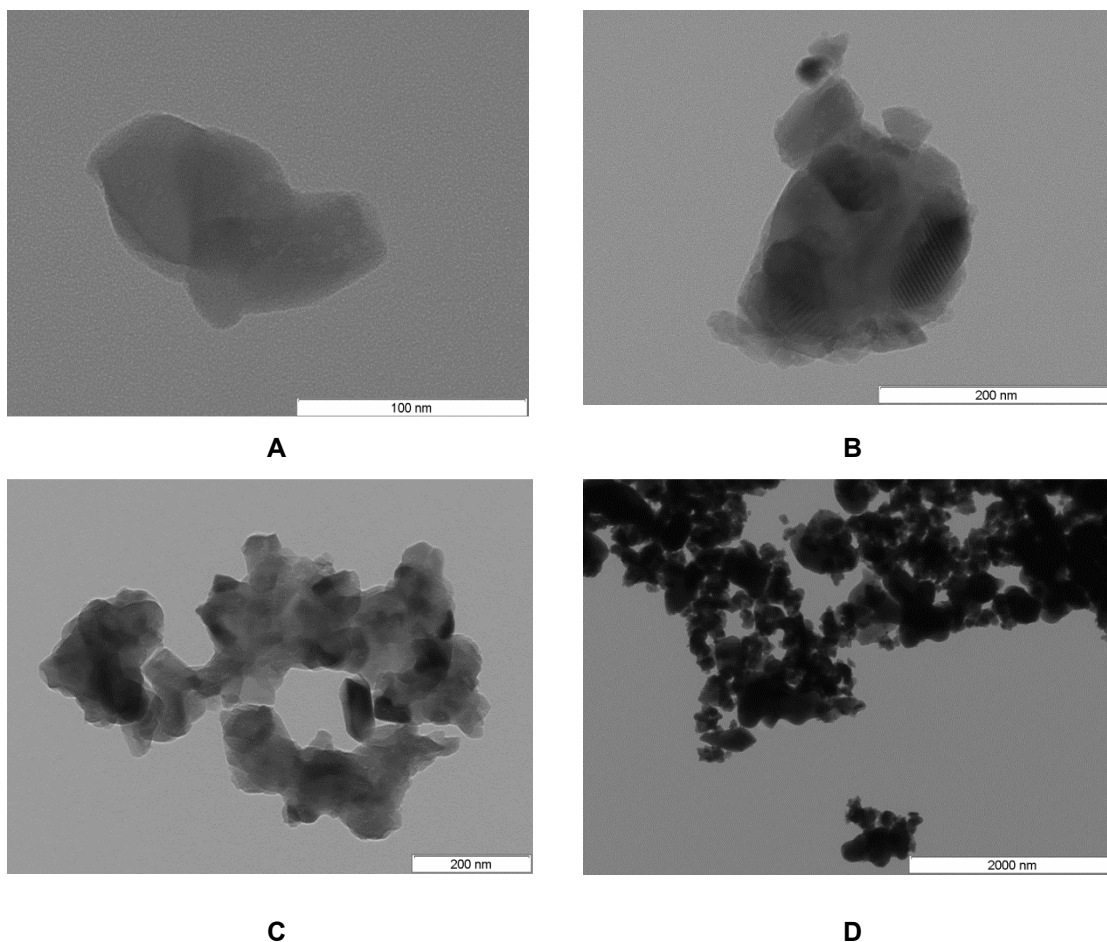


Figura 19. Imagens obtidas por TEM de cristalitos de  $\beta$ -TCP esféricos (A), agregados (B e C) e aglomerados (D).

## 5.2. Quitosano

### 5.2.1. Viscosidade de corte das soluções de quitosano

A figura 20 apresenta a curva de fluxo para as três soluções de concentrações diferentes de quitosano à temperatura ambiente de 25°C. Consultando esta figura podemos verificar que para maiores concentrações de polímero em solução, há maior interação entre as cadeias poliméricas, sendo esta a responsável pela viscosidade da solução polimérica. Por este motivo, se verifica um aumento proporcional da viscosidade, à medida que a concentração do polímero também aumenta. Isto acontece, uma vez que o maior número de entrelaçamentos existentes

para maiores concentrações de polímero é responsável pelo aumento da viscosidade das soluções.

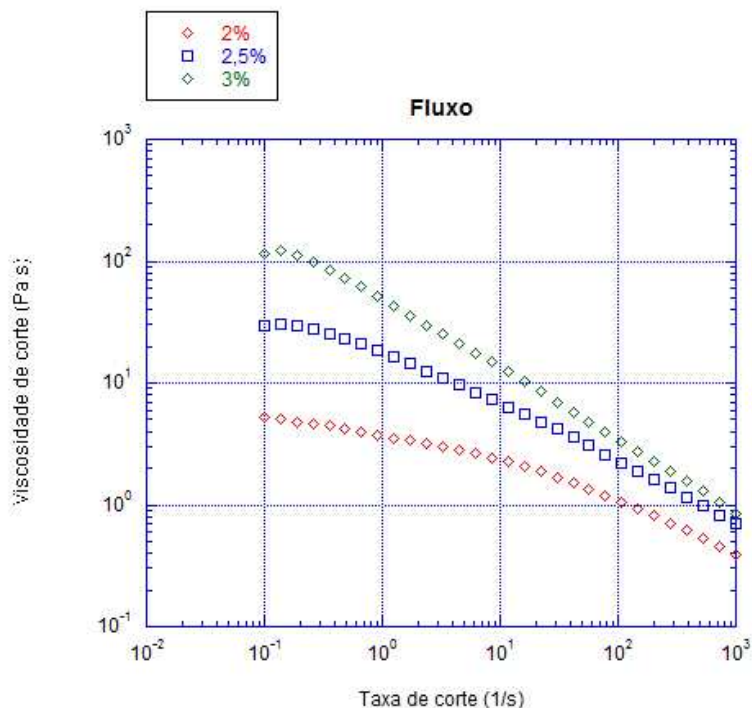


Figura 20. Gráfico obtido por estudo reológico das soluções de 2; 2,5 e 3% de Qs

Para as três concentrações, a viscosidade dos polímeros diminui com o aumento da taxa de corte, o que confirma a existência de um comportamento reo-fluidificante ou pseudoplástico. Este comportamento de fluxo das soluções de quitosano, pode ser explicado como resultado de um aumento de entrelaçamento molecular com o aumento de concentração de quitosano e a redução do entrelaçamento das cadeias com o aumento da taxa de corte. (Barnes, 2000; Santos, 2009)

Para concentrações de quitosano acima de 0,50 g/dl, as curvas de fluxo mostram uma região Newtoniana a baixas taxas de corte e um comportamento Não-Newtoniano a taxas de corte elevadas. (Piotrowski & Cierniewski, 2005; Santos, 2009)

### 5.2.2. Hidrogéis de quitosano

Para realizar alguns dos testes de caracterização e o estudo de libertação de fármaco, foi necessário secar os hidrogéis, de forma a obter a sua estrutura desidratada.

Após tentativas de secagem dos hidrogéis ao ar, observou-se uma redução muito grande do seu volume, tornando-os compactos pela remoção de água, derivada da contração das cadeias poliméricas, durante a desidratação do material. Para garantir uma secagem adequada, sem interferir na estrutura inicial do hidrogel, recorreu-se à liofilização de todas as amostras. Esta secagem promovida pelo liofilizador permitiu uma menor diminuição do volume

dos hidrogéis, pela sublimação de cristais de gelo existente na estrutura, após contacto indirecto com azoto líquido. A eliminação rápida da água dificultou a coalescência dos poros, dando assim origem a matrizes porosas, que as torna adequadas, tanto para realizar o estudo pretendido, como para o uso promissor como *scaffolds*. Na figura X apresenta-se um hidrogel liofilizado de Qs com AAS, produzido numa placa de 24 poços.



**Figura 21. Estrutura liofilizada a partir de um hidrogel QsAAS**

Os hidrogéis de Qs (Fig. 21) são morfologicamente muito porosos, sendo os poros ligeiramente alongados, devido à ocorrência de difusão gradual, durante a gelificação das soluções iniciais. Apresentam poros interconectados de largura entre 300 e 500  $\mu\text{m}$  e comprimento médio 1mm.

A capacidade de absorção de água revelada por estas amostras é explicada pela alta porosidade confirmada pelas imagens SEM obtidas. É uma grande vantagem obter amostras com este tipo de estrutura, uma vez que apresenta características vantajosas para a libertação de fármacos, devido à fácil difusão de água para dentro da rede polimérica. Como material regenerador de tecido ósseo, também é necessário que possua uma porosidade elevada, com tamanhos de poros superiores a  $\sim 100 \mu\text{m}$ , para facilitar a adesão e proliferação de osteoblastos. (J. Chen & Park, 2000)

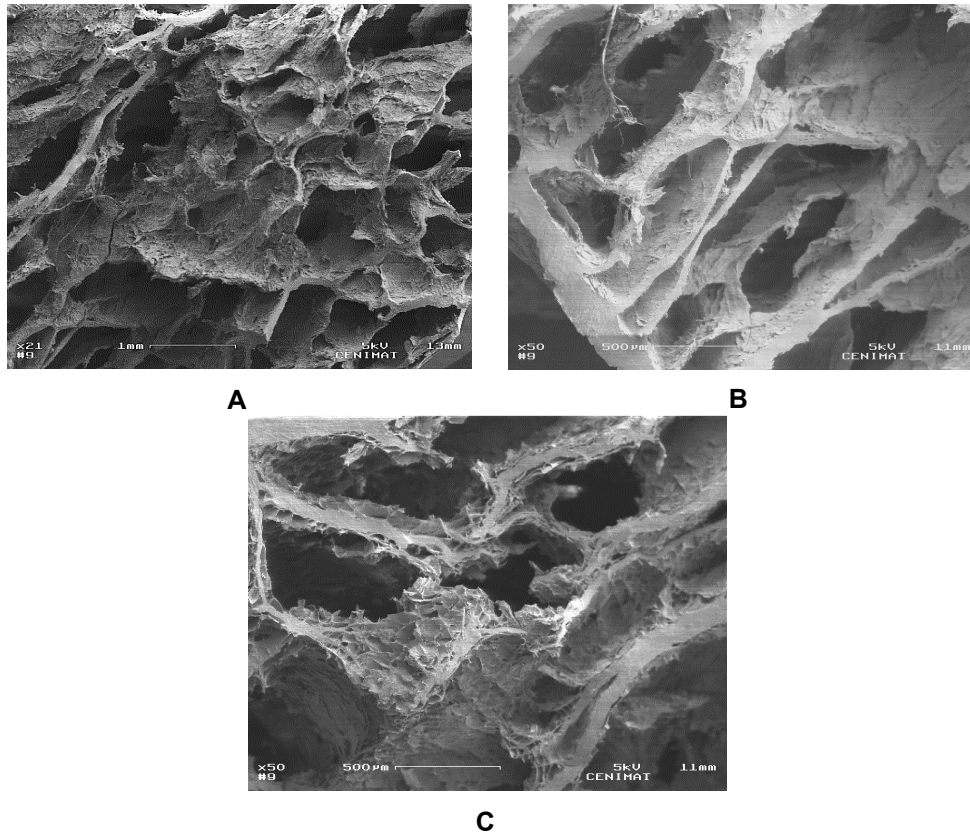


Figura 22. Imagens SEM da estrutura de corte transversal (A) e longitudinal (B e C) do Qs 3%

### 5.2.3. Hidrogéis de Quitosano/Fosfatos de cálcio

Dos hidrogéis sujeitos à liofilização, apenas alguns mantiveram a sua estrutura intacta sem existir redução aparente do volume inicial da amostra. As amostras QsHAp [90:10], QsHAp [70:30], QsB-TCP [90:10] e QsB-TCP [70:30] demonstraram uma redução significativa do volume, após terem sido sujeitas à liofilização, logo não foram sujeitas aos testes de inchamento de água nem da observação morfológica pelo SEM.

#### 5.2.3.1. Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS)

A análise por EDS da superfície de uma amostra de QsHAp [50:50] indica a presença de fosfatos de cálcio. Na figura 23 Foram localizados em duas regiões (1 e 2) à superfície da amostra e um terceiro em profundidade. O espectro relativo ao primeiro e segundo pontos apresenta uma intensidade de fósforo superior à do gráfico obtido pelo terceiro ponto. Isto indica que à superfície existe um rácio de Ca/P mais baixo do que aquele apresentado. O pico relativo ao fosfato diminui no espectro obtido na região 3, indicando uma proporção de fósforo e cálcio tipicamente da HAp.

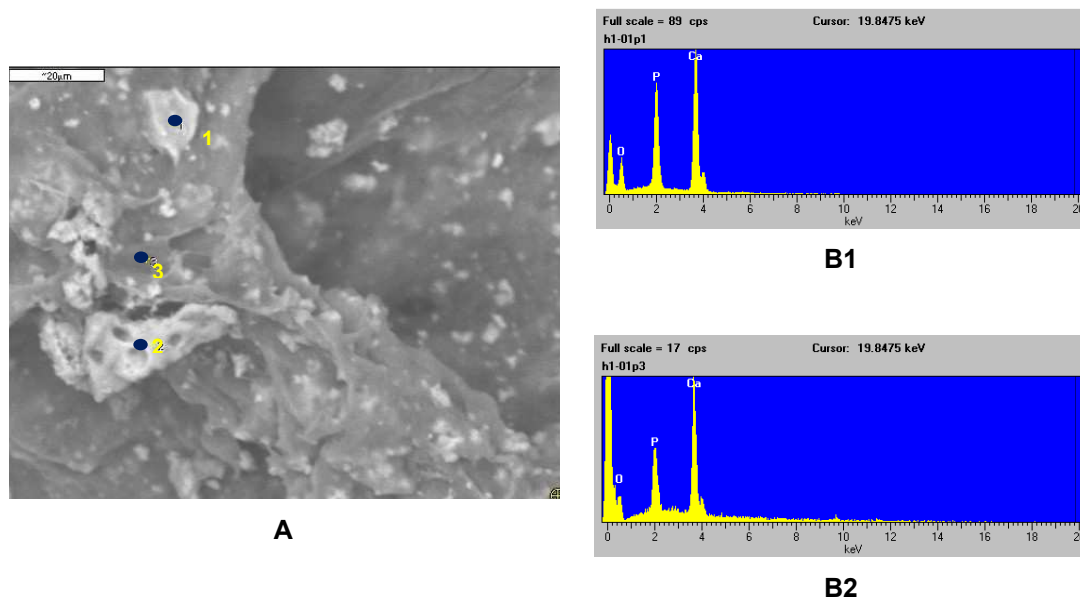


Figura 23. Espectros EDS da imagem SEM (A) contendo os pontos 1 e 2 (B1) e 3 (B2)

### 5.2.3.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

#### Hidroxiapatite (HAp)

A avaliação das superfícies de corte obtida longitudinal e transversalmente por SEM não indica diferenças estruturais, uma vez que os poros apresentam uma configuração esférica. A porosidade da amostra QsHAp [60:40] (Fig. 24 (A e C)) é ligeiramente superior à QsHAp [50:50] (Fig. 24 (B e D)) que possui alguns poros fechados, tornando a estrutura mais densa. O tamanho dos poros observados para ambas as estruturas é de aproximadamente 200 μm. Assim, pode concluir-se que o aumento de HAp influencia apenas na porosidade (número de poros abertos), mantendo constante o tamanho médio dos poros.

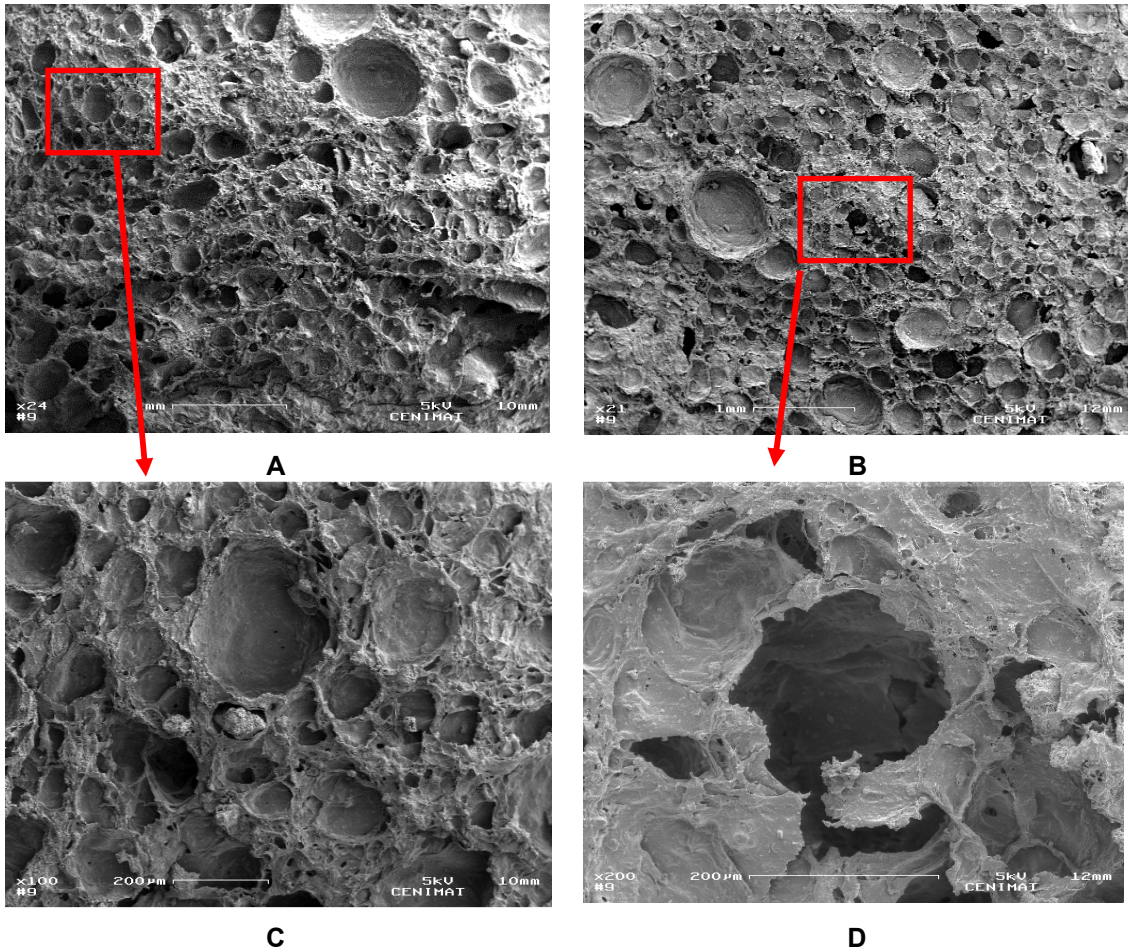


Figura 24. Imagens SEM do interior de QsHap [60:40] (A e C) e QsHap [50:50] (B e D)

### $\beta$ - fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP)

Nas amostras contendo  $\beta$ -TCP observam-se superfícies de corte heterogêneas quanto ao tamanho dos poros. A porosidade é visivelmente menor que nas amostras contendo HAp. A estrutura é praticamente toda ela uma rede densificada, com alguns poros de  $\sim 1$  mm, provavelmente devido a bolhas de ar, formando canais profundos (Fig 25. (A)) e outros obstruídos (Fig 25. (B)).

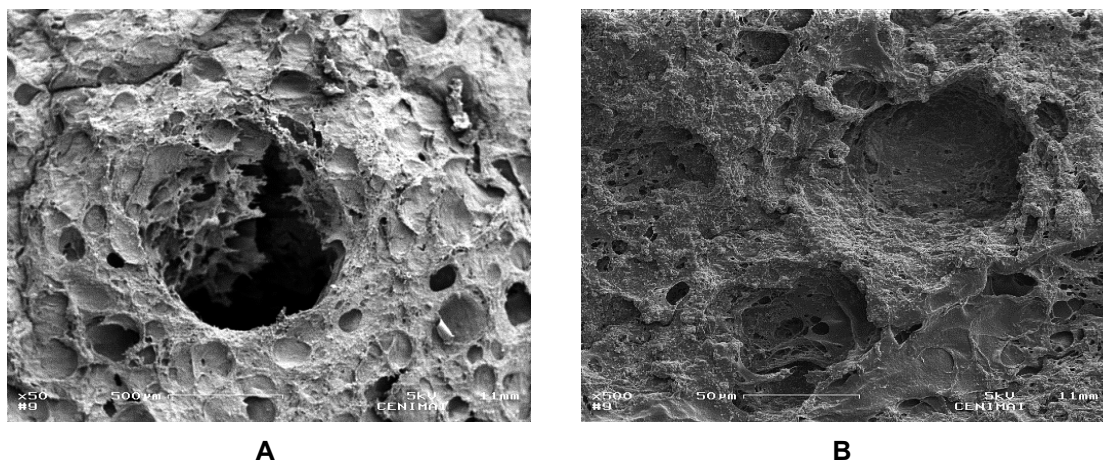


Figura 25. Imagens SEM do interior de QsB-TCP [60:40] (A e C) e QsB-TCP [50:50] (B e D)

### 5.2.3.3. Taxa de inchamento

Hidrogéis de porosidade elevada não apresentam uma resistência mecânica muito elevada, mas são capazes de absorver uma grande quantidade de água. Neste trabalho, os ensaios relativos à taxa de inchamento foram realizados, com o intuito de avaliar a influência da variação da quantidade de cerâmico dos hidrogéis estudados.

A evolução da quantidade de água absorvida em função do tempo é apresentada pelo gráfico da figura 26.

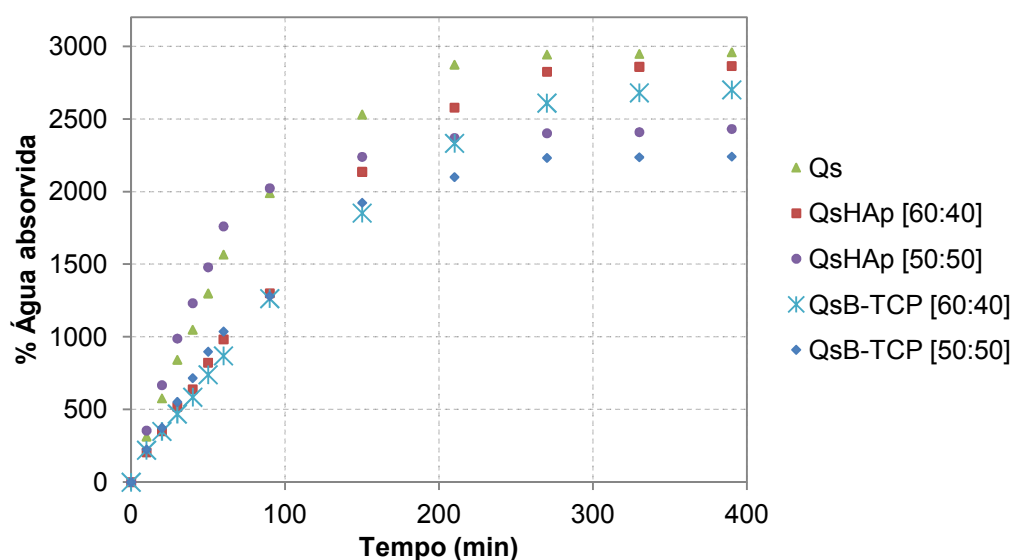


Figura 26. Taxa de absorção de água dos hidrogéis em função do tempo de imersão

A absorção de água foi obtida através da equação 5, utilizando-se a massa do hidrogel liofilizado e reidratado. Os valores de percentagem de água absorvida pelos hidrogéis estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores dos pesos dos diferentes hidrogéis liofilizados e hidratados e a percentagem da quantidade de água absorvida.

Hidrogel	Peso liofilizado (mg)	Peso hidratado	Água absorvida (%)
Qs	59,2 ± 0,04	1811 ± 3,87	2959,122 ± 0,01
QsHAp [60:40]	76,9 ± 0,03	2280 ± 3,31	2864,889 ± 0,02
QsHAp [50:50]	69,9 ± 0,04	1958 ± 2,98	2701,144 ± 0,01
QsB-TCP [60:40]	102,0 ± 0,06	2532 ± 3,05	2432,752 ± 0,01
QsB-TCP [50:50]	67,7 ± 0,04	1585 ± 1,87	2241,211 ± 0,01

Os resultados confirmaram que os hidrogéis possuem a capacidade de reter uma grande quantidade de água na sua estrutura após a liofilização. Analisando a tabela X, pode verificar-se que o hidrogel de Qs foi aquele que absorveu mais água e pelo gráfico presente na figura X, pode notar-se que teve uma absorção inicial mais rápida comparada com os restantes hidrogéis. O hidrogel QsHAp [60:40] também absorveu uma quantidade de água muito próxima do Qs, mas de forma mais lenta, enquanto o QsHAp [50:50] absorveu uma quantidade de água inferior, com uma velocidade ideal semelhante ao Qs. Os hidrogéis contendo  $\beta$ -TCP apresentaram uma quantidade total de água absorvida mais baixa que os restantes, sendo diferenciados pela quantidade de cerâmico presente na estrutura. O QsB-TCP [60:40] apresentou uma percentagem de água absorvida superior ao QsB-TCP [50:50]. Dois factores podem influenciar os hidrogéis de  $\beta$ -TCP de forma a torna-lo menos capaz de absorver água: hidrogéis menos porosos e dissolver-se facilmente em meio aquoso, podendo perder massa durante este estudo.

Com isto, pode-se perceber que a quantidade de água absorvida pelos hidrogéis é influenciada pela quantidade e o tipo de cerâmico presente nas diferentes proporções. Hidrogéis de quitosano têm propriedades superabsorventes, devido à porosidade e hidrofilicidade presente nas suas cadeias poliméricas. A adição de partículas cerâmicas torna a estrutura mais densa e, não só retarda a absorção de água, como diminui a sua taxa de absorção total.

#### 5.2.3.4. Ensaio de Compressão

Os ensaios mecânicos foram realizados nos hidrogéis hidratados de forma a entender melhor a influência da concentração de polímero e cerâmico na resistência mecânica do material em estudo.

A presença de água na rede também determina o comportamento mecânico da amostra. Para amostras secas, não existe uma relação linear entre a tensão e a deformação, no entanto, é necessário testar o seu comportamento mecânico no estado em que se prevê a sua aplicação, isto é, hidratado. (Borges, n.d.)

O comportamento não linear das amostras, deve-se à reorganização das cadeias devido à água presente nos interstícios. Os módulos de elasticidade E dos hidrogéis, foram calculados a partir da inclinação das curvas de tensão-deformação entre 0% e 10% de deformação. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6. Módulo de Young (E) e tensão máxima à compressão obtidos para hidrogéis de Qs de diferentes concentrações**

Hidrogel	E (kPa)	$\sigma_{(máx)}$ (kPa)
Qs 2%	13,33	-
Qs 2,5%	33,72	26,77
Qs 3%	54,20	39,88

Analisando os valores obtidos do módulo de Young (E) para os hidrogéis de Qs, verifica-se que quanto maior a concentração de polímero, maior o valor de E - é necessária uma tensão compressiva mais elevada para a mesma deformação do material. O aumento da concentração de polímero induz a um aumento da reticulação do hidrogel, oferecendo uma rigidez mais elevada às cadeias poliméricas do Qs. Deve-se isto a um aumento do número de ligações formadas durante a gelificação do quitosano, portanto, conduz a uma maior densidade de reticulação.

Beragnoli e colaboradores (Beragnoli et al., 2005) obtiveram hidrogéis com um comportamento mecânico semelhante aos obtidos neste estudo, e constataram que a absorção de água está relacionada com o enfraquecimento das cadeias de polímero. Portanto, as propriedades mecânicas das amostras hidratadas são influenciadas pelo comportamento de inchamento do hidrogel.

Para obter hidrogéis mais resistentes, introduziram-se os cerâmicos HAp e  $\beta$ -TCP na estrutura do quitosano. Concluiu-se anteriormente que a presença destes fosfatos de cálcio diminuiu a taxa de absorção de água, o que tornará o hidrogel mais rígido, com melhor resistência à compressão.

Na tabela 7, apresenta-se o valor de E e de tensão máxima obtida para todos os hidrogéis híbridos.

**Tabela 7. Módulo de Young (E) e tensão máxima à compressão obtidos para hidrogéis de Qs com HAp e  $\beta$ -TCP para diferentes proporções**

Hidrogel	Proporção	E (kPa)	$\sigma_{(máx)}$ (kPa)
QsHAp	[90:10]	53,33	34,82
	[70:30]	45,00	22,83
	[60:40]	73,33	36,42
	[50:50]	91,67	35,20
QsB-TCP	[90:10]	62,76	38,58
	[70:30]	67,02	39,64
	[60:40]	71,60	37,95
	[50:50]	95,65	40,04

Uma quantidade de 10% de  $\beta$ -TCP é suficiente para provar que existe melhoria nas propriedades mecânicas, contudo a HAp tem de ser adicionada numa proporção superior a [90:10], pois os resultados para o módulo de Young são inferiores ao valor de E para Qs 3%.

Pela análise dos valores, constata-se a forte influência dos fosfatos de cálcio na estrutura polimérica de quitosano, ao nível da resistência à compressão. Isto pode estar relacionado com a densificação existente nos hidrogéis, com o aumento de HAp e  $\beta$ -TCP., Tal como o estudo de SEM e do cálculo da água absorvida revelaram, as amostras contendo  $\beta$ -TCP são menos porosas, o que dificulta a difusão de água para a sua estrutura, comparado com as amostras de HAp.

Pode concluir-se que ambos os cerâmicos contribuem para o aumento da rigidez do material em estudo.

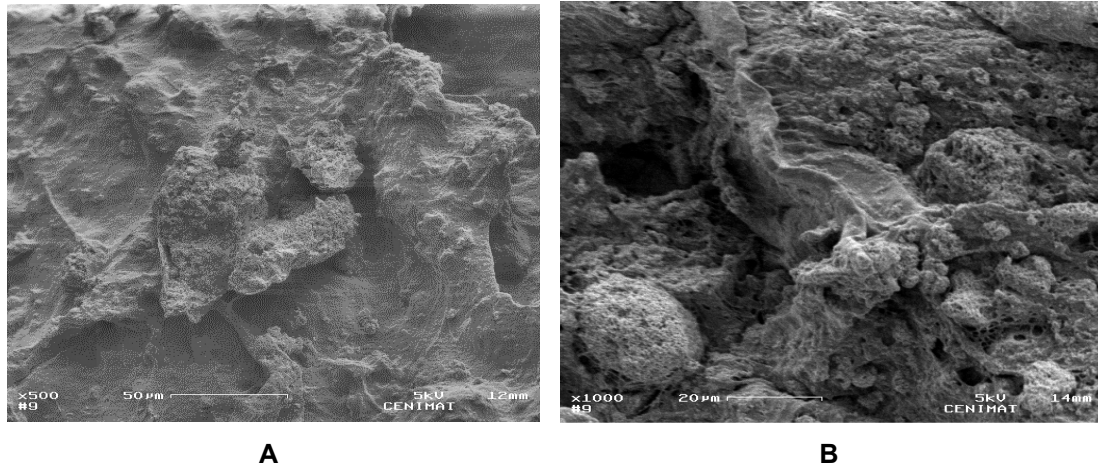
Para aplicações ósseas, exige-se uma resistência mecânica elevada para manter estes hidrogéis superporosos intactos. Essa melhoria na resistência mecânica é conseguida através do aparecimento de compósitos. (J. Chen & Park, 2000)

#### 5.2.3.5. Teste de bioactividade

O teste *in vitro* representado pela imersão do material a ser estudado em SBF por períodos variados, seguida da observação da formação de cerâmico na superfície imersa, tem sido considerado um teste muito eficiente e preliminar na avaliação da bioactividade de um material com potencial para regeneração óssea.

Vários investigadores têm descrito o teste de bioactividade utilizando SBF. Por exemplo, (Araújo et al., 2007) confirmaram a nucleação de HAp por toda a superfície de um material constituído de quitosano/poli(ácido láctico)/HAp, em pequenos períodos de tempo de imersão em SBF. Kong et al., (2006) também descreveram a influência da imersão em SBF na nucleação da HÁp, materiais com nanopartículas de HAp uniformemente distribuídas.

Todas as amostras observadas por SEM após imersão de 7 dias em SBF, mostraram bioactividade, devido ao aparecimento de cristais de apatite na sua superfície. Os resultados indicam que houve uma intensa nucleação de fosfatos de cálcio na superfície dos materiais imersos, principalmente no QsHAp [50:50] e QsB-TCP [50:50] (Fig. 27). Estes cristais são bastante visíveis, principalmente por se tratar das amostras com maior percentagem de cerâmico na sua composição. Assim, pode concluir-se que quanto mais alta é a proporção de fosfato de cálcio presente na estrutura de quitosano, mais bioactivo este material se torna.

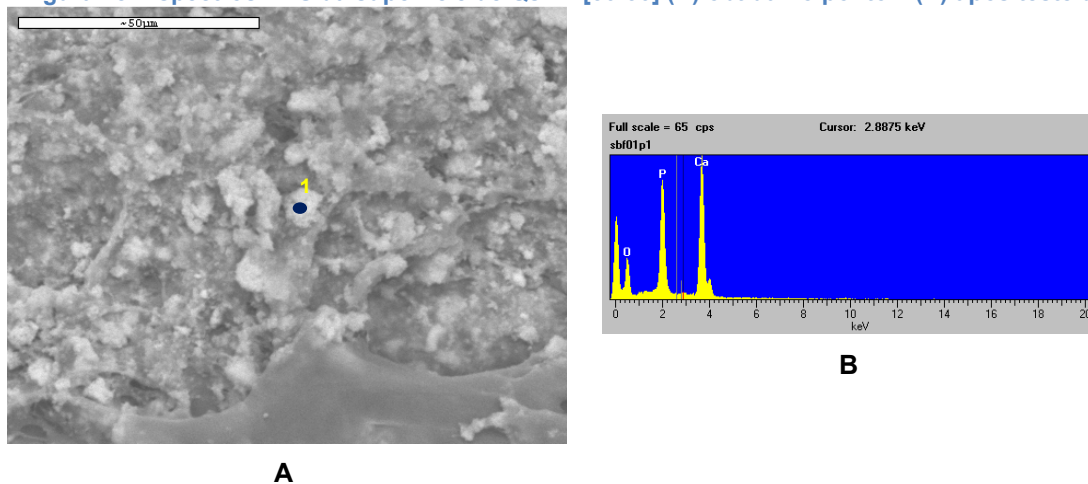


**Figura 27. Imagens SEM da superfície externa da amostra QsHAp [50:50] (A) e QsHAp [60:40] após teste de bioatividade**

A análise por EDS da superfície de uma amostra de QsHAp [50:50] após imersão em SBF, indica a presença de fosfatos de cálcio. (Fig. 28) Na análise da superfície da amostra, encontra-se um rácio de Ca/P característico da HAp, confirmando que as apatites visíveis são derivadas da nucleação do cerâmico em estudo.

A bioatividade presente nas amostras preparadas neste trabalho é um forte indício de biocompatibilidade dos materiais. Essa biocompatibilidade é requisito essencial para a utilização de materiais em aplicações biomédicas. A bioatividade ajuda a promover a regeneração do tecido, principalmente ósseo, devido ao crescimento e nucleação de fosfatos de cálcio como a HAp e  $\beta$ -TCP.

**Figura 28. Espectros EDS da superfície de QsHA [50:50] (B) obtida no ponto 1 (A) após teste de**



**bioatividade**

### 5.3. Estudo da liberação controlada do AAS

Após a medição dos valores de absorvância, por espectrometria UV-Vis, para cada intervalo de tempo, e sabendo que a concentração total do fármaco inserida no hidrogel corresponde a 10% da concentração de Qs, traçou-se o perfil de liberação controlada do ácido acetilsalicílico num hidrogel contendo 3% de quitosano. (Fig. 29)

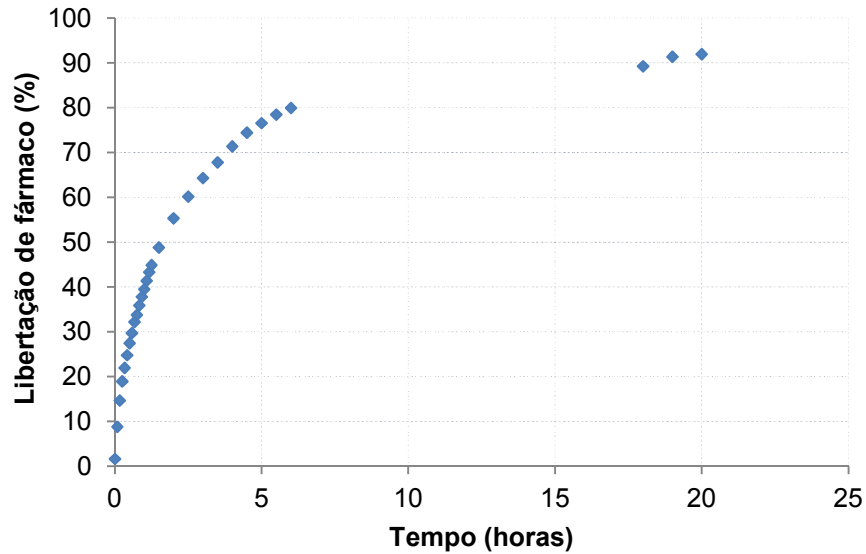


Figura 29. Perfil de liberação de 10% de AAS em 3% de Qs

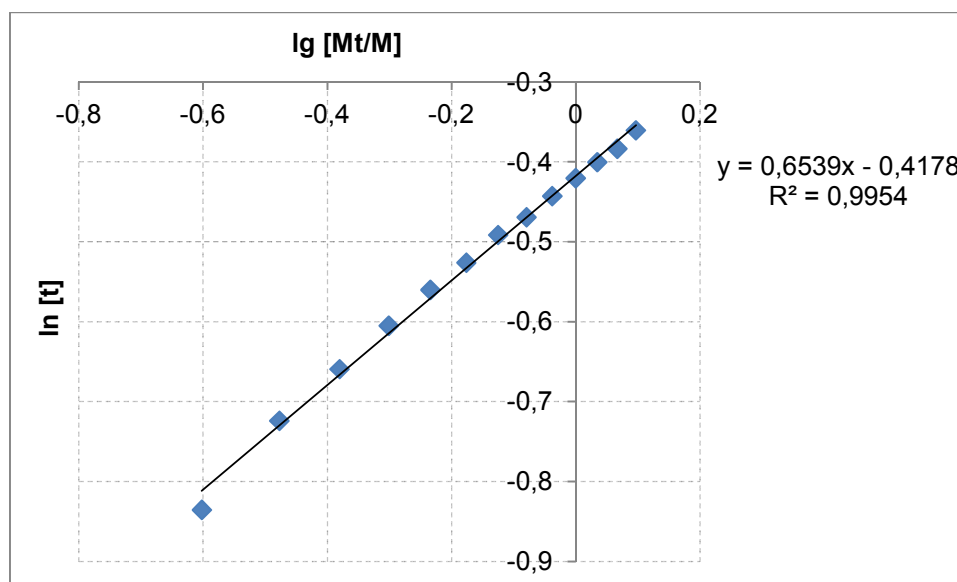
Na primeira hora, a liberação ocorreu muito depressa, atingindo cerca de 50% do fármaco inicial presente no hidrogel. Após esta liberação inicial, ao fim de 18h, observa-se a formação de um patamar onde a liberação do fármaco é mínima. Apesar da tendência do gráfico indicar para uma estabilização da liberação nos 91% de fármaco libertado, não foi possível continuar a medir os valores de absorvância, uma vez que o polímero se começou a degradar (desfazendo a sua estrutura) e existiu uma redução considerável do volume inicial da solução de SBF.

De seguida foi determinado, matematicamente, qual o tipo de difusão ocorre na liberação de fármaco apresentada neste estudo. Para tal, recorreu-se à equação (7) da pág. 36:

Para se poder representar graficamente e mais facilmente encontrar o expoente cinético de difusão  $n$ , é necessário reorganizar a expressão anterior, logaritmando-a, obtendo a seguinte expressão:

$$\ln \left[ \frac{M_t}{M_\infty} \right] = \ln(k) + n \ln[t] \quad (11)$$

Deste modo, representando-se graficamente  $\ln \left[ \frac{M_t}{M_\infty} \right]$  em função de  $\ln[t]$  e calculando a respectiva regressão linear do gráfico obtido anteriormente, podemos facilmente encontrar os valores de  $n$ . Esta equação é válida no entanto apenas para os primeiros 60% do total libertado absorvido (Brazel & Peppas, 1999; Peppas & Sahlin, 1996).



**Figura 30. Regressão linear da  $\lg [M_t/M_\infty]$  em função de  $\ln [t]$  para cálculo do expoente cinético de difusão**

Na figura anterior (Fig. 30) observa-se que os valores obtidos apresentam um padrão predominantemente linear, obtendo-se um valor para o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) próximo da unidade, permitindo concluir que a aproximação linear efectuada foi a correcta. Em relação ao valor de  $n$ , este apresenta um valor de 0,6538, revelando uma difusão de água para o interior do sistema predominantemente não-Fickiana. (Brazel & Peppas, 1999)

Assim, este sistema de libertação de fármaco é controlado por dois processos em simultâneo: a degradação da matriz polimérica de quitosano e por difusão da água, devido ao gradiente de concentrações entre o exterior e interior do hidrogel.

Este resultado era em parte esperado dado que, tal como já foi referido, ao fim de 24 horas, era notória uma alteração significativa ao nível da estrutura da amostra (degradação).

Tang e Singh (2008) estudaram matrizes de poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) e afirmam que a hidrofiliabilidade e o pH ácido característicos do AAS são responsáveis pela aceleração da absorção de água e degradação do polímero, respectivamente.

A avaliação do padrão de libertação do fármaco é de vital importância para a caracterização de um sistema de libertação controlada, uma vez que permite verificar qual a quantidade de fármaco libertada por cada sistema e a forma como essa libertação ocorre ao longo do tempo.



## 6. Conclusão

Com base nos métodos que foram utilizados para identificar e caracterizar os pós cerâmicos (HAp e  $\beta$ -TCP) quimicamente sintetizados, pode considerar-se que o método sol-gel é eficaz na produção destes fosfatos de cálcio. Após análise morfológica, verificou-se que apresentam tamanhos reduzidos (nanométricos), ideais para incorporar a estrutura polimérica dos hidrogéis que foram desenvolvidos neste estudo. O aspecto mais negativo encontrado deve-se ao fenómeno de aglomeração das partículas, que pode dificultar a homogeneização da componente inorgânica (cerâmico) e orgânica (polímero).

Após introdução dos cerâmicos em soluções de polímero, foi possível formar hidrogéis híbridos, por reticulação física, com melhores propriedades mecânicas, e menor taxa de absorção de água. Esta diminuição na quantidade de água absorvida, aliada à diminuição da velocidade de absorção, deve-se à redução da porosidade, confirmada por SEM, principalmente nas amostras contendo  $\beta$ -TCP.

Para além da resistência mecânica, os testes de bioactividade realizados comprovaram o aparecimento de cristais de apatite na superfície de amostras, após contacto com meios que simulam fluidos corporais (SBF).

O sistema de libertação de AAS em hidrogéis de quitosano é do tipo não-Fickiano, ou seja, é controlado por dois processos em simultâneo: a degradação da matriz polimérica de quitosano e por difusão da água, devido ao gradiente de concentrações entre o exterior e interior do hidrogel. Por um lado, era um resultado já esperado devido a hidrofiliabilidade e o pH ácido característicos da droga-modelo escolhida, que acelera a absorção de água e degradação do polímero. Apesar de 50% do fármaco ter sido libertado nas primeiras 24h, foi possível atingir uma libertação de aproximadamente 91%. É um valor bastante positivo, pois significa que as cadeias poliméricas de quitosano não colapsaram, densificando na estrutura tridimensional e dificultando a difusão da água, e conseqüente libertação.

Relacionando as conclusões retiradas por este trabalho, considero que seria interessante estudar sistemas de libertação de fármaco contendo diferentes percentagens de HAp e  $\beta$ -TCP ou os dois em simultâneo. Esta combinação seria importante, principalmente para retardar a libertação inicial do fármaco, sendo útil para tratamentos prolongados.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, Y., Kokubo, T., & Yamamuro, T. (1990). Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 1(4), 233-238. Chapman Hall Ltd.
- Abreu, F. O. (2008). *Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos*. Universidade federal do Rio Grande do Sul.
- Aizawa, M., Ueno, H., Itatani, K., & Okada, I. (2006). Syntheses of calcium-deficient apatite fibres by a homogeneous precipitation method and their characterizations. *Journal of the European Ceramic Society*, 26(4-5), 501-507.
- Albee, F. H. (1920). STUDIES IN BONE GROWTH: TRIPLE calcium PHOSPHATE AS A STIMULUS TO OSTEOGENESIS. *Annals of Surgery*, 71(1), 32-39. Lippincott, Williams, and Wilkins.
- Almeida, J. F. da S. (2010). *Preparação e Caracterização de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas. Tese submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra*. Universidade de Coimbra.
- Anthonsen, M. (1993). Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 22(3), 193-201. ELSEVIER SCI LTD.
- Araújo, J. C. D., Dulce, G., & Soares, D. A. (2007). Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x. *Química Nova*, 30(8), 1853-1859.
- Ayache, J., Beaunier, L., Boumendil, J., Ehret, G., & Laub, D. (2010). *Sample Preparation Handbook for Transmission Electron Microscopy*. (J. Ayache, L. Beaunier, J. Boumendil, G. Ehret, & D. Laub, Eds.) *Média* (p. 670). Springer New York.
- Azevedo, V. V. C., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Fook, M. V. L., & Costa, A. C. F. M. (2007). Quitina e Quitosana : aplicações como biomateriais, 3, 27-34.
- Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., & Duek, E. A. R. (2005). Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, 15(1), 13-21. scielo.
- Barnes, H. A. (2000). *A Handbook of Elementary Rheology. Rheology*.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*, 57(1), 19-34.
- Bertagnoli, R., Sabatino, C. T., Edwards, J. T., Gontarz, G. a., Prewett, A., & Parsons, J. R. (2005). Mechanical testing of a novel hydrogel nucleus replacement implant. *The Spine Journal*, 5(6), 672-681.
- Bhattacharai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 83-99.
- Borges, A. C. (n.d.). A COMPOSITE HYDROGEL FOR THE REPLACEMENT OF THE NUCLEUS PULPOSUS.
- Boucard, N., Viton, C., & Domard, A. (2005). New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomacromolecules*, 6(6), 3227-3237. American Chemical Society.
- Brazel, C. S., & Peppas, N. A. (1999). Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer*, 40(12), 3383-3398.
- Cai, X., Chen, L., Jiang, T., Shen, X., Hu, J., & Tong, H. (2011). Facile synthesis of anisotropic porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*, 21(32), 12015.
- Cao, W., & Hench, L. L. (1996). Bioactive materials. *Ceramics International*, 22(6), 493 - 507.
- Carrassi, A., & Abati, S. (1978). Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy. *Mondo odontostomatologico*, 127(2), 29-36. New York : Plenum Press, c1979.
- Casimiro, M. H., Leal, J. P., & Gil, M. H. (2005). Characterisation of gamma irradiated chitosan/pHEMA membranes for biomedical purposes. *Nuclear Instruments Methods in Physics Research Section B Beam Interactions with Materials and Atoms*, 236(1-4), 482-487.

- Cerchiara, T., Luppi, B., Bigucci, F., Orienti, I., & Zecchi, V. (2002). Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 54(11), 1453-1459.
- Chen, B., Zhang, Z., Zhang, J., Lin, Q., & Dongliang, J. (2008). Fabrication and mechanical properties of  $\beta$ -TCP pieces by gel-casting method.pdf. *MATERIALS Science and Engineering*, 1052 - 1056. Shanghai.
- Chen, J., & Park, K. (2000). Synthesis and characterization of superporous hydrogel composites. *Journal of Controlled Release*, 65, 73-82.
- Chien, Y. W., & Lin, S. (2006). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Third.).
- Chung, P. S., Holloway, P. H., Otsuka, E., Suzuki, A., Elnashar, M. M. M., Yassin, M. A., Jin, D.-woo, et al. (2009). *Journal of Applied Polymer Science*. October, 114(01), 643 - 652.
- Coimbra, P. (2010). *Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*. Universidade de Coimbra.
- Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A. P., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 472-481.
- Cullity, B. D., & Stock, S. R. (2001). *Elements of X-Ray Diffraction*. (M. Cohen, Ed.) *Elements* (p. 664). Prentice Hall.
- Dalapícua, S. S. (n.d.). Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas . Uma revisão crítica.
- Denkbas, E. B. (2006). Perspectives on: Chitosan Drug Delivery Systems Based on their Geometries. *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers*, 21(4), 351-368.
- Duygu, D. Y., Baykal, T., Açikgöz, İ., & Yildiz, K. (2009). REVIEW Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. *Gazi University Journal of Science*, 22(3), 117-121.
- Ehrlich, H., Krajewska, B., Hanke, T., Born, R., Heinemann, S., Knieb, C., & Worch, H. (2006). Chitosan membrane as a template for hydroxyapatite crystal growth in a model dual membrane diffusion system. *Journal of Membrane Science*, 273(1-2), 124-128.
- El-hefian, E. A., & Yahaya, A. H. (2010). Rheological study of chitosan and its blends : An overview. *Journal of Science and Technology*, 4(02), 210-220.
- Elliott, J. C. (1994). *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Studies in Organic Chemistry* (pp. 94008066-94008066).
- Feng, W., Mu-sen, L., Yu-peng, L., & Yong-xin, Q. (2005). A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. *Materials Letters*, 59(8-9), 916-919.
- Fowler, B. O., Moreno, E. C., & Brown, W. E. (1966). Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate. *Archives of Oral Biology*, 11(5), 477-492.
- Franco, P. Q., Silva, J., & Borges, J. P. (2010). Produção de fibras de hidroxiaPatite Por electrofição, 22, 57-64.
- Gamzazade, A. I., & Nasibov, S. M. (2002). Formation and properties of polyelectrolyte complexes of chitosan hydrochloride and sodium dextran sulfate. *Carbohydrate Polymers*, 50(3), 339-343.
- Gibson, C. C., Puleo, D. A., & Bizios, R. (2009). Biological Interactions on Materials Surfaces. (D. A. Puleo & R. Bizios, Eds.) *Biological Interactions on Materials Surfaces*, 133-156. Springer New York.
- Gupta, P., Vermani, K., & Garg, S. (2002). Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug discovery today*, 7(10), 569-79.
- Gutowska, A., Bae, Y., Jacobs, H., Feijen, J., & Kim, S. (1994). Thermosensitive interpenetrating polymer network: synthesis, characterization and macromolecular release. *Macromolecules*, 27, 4167-4175.
- Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638-1649.
- Hanawa, T. (1991). Titanium and its oxide film substrate for formation of apatite. *The Bone-Material Interface, Chapter 4*, 49 - 61.
- Hayat, M. A. (1974). *Principles and techniques of scanning electron microscopy. Biological applications* (Vol. 6, pp. 216-231). Cambridge university press.

- Horn, M. M. (2008). *Obtenção e Caracterização de Hidrogéis de Quitosana, Xantana e Colagénio aniônico*. Universidade de São Paulo.
- Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Xu, C., Lam, F., Tan, K. C., & Lim, T. C. (2007). State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Tissue Engineering*, 1(June), 245-260. m
- Jayakumar, R., Chennazhi, K. P., Srinivasan, S., Nair, S. V., Furuike, T., & Tamura, H. (2011). Chitin Scaffolds in Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(3), 1876-1887. Molecular Diversity Preservation International (MDPI).
- Kawachy, E. Y., Bertran, C. A., Reis, R. R., & Alves, O. L. (2000). Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Instituto de Química, UNICAMP*, 23(4), 518-522.
- Khor, E. (2001). *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*. Elsevier Science The Netherlands (pp. 73-80).
- Khor, Eugene. (2002). Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 313-317.
- Khor, Eugene, & Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13), 2339-2349.
- Kienzle-Sterzer, C. A. (1985). Flow Behavior of a Cation Polymer: Chitosan. *Polymer Bulletin*, 13, 1-6.
- Kivrak, N., & Tas, A. C. (1998). Synthesis of Calcium Hydroxyapatite – Tricalcium Phosphate ( HA – TCP ) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior. *Solutions*, 52(190968), 2245-2252.
- Kong, L., Gao, Y., Lu, G., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2006). A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 42(12), 3171-3179.
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), 25-35.
- Korsmeyer, R. W., & Peppas, N. A. (1981). Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of Membrane Science*, 9(3), 211-227.
- Krylova, E., Ivanov, A., Orlovski, V., El-Registan, G., & Barinov, S. (2002). Hydroxyapatite-polysaccharide granules for drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(1), 87-90.
- Kundu, B., Lemos, a, Soundrapandian, C., Sen, P. S., Datta, S., Ferreira, J. M. F., & Basu, D. (2010). Development of porous HAp and  $\beta$ -TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold based drug delivery system. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 21(11), 2955-69.
- Kuo, S. M., Chang, S. J., Niu, G. C.-chie, Lan, C.-wen, & Cheng, W. T. (2009). Guided Tissue Regeneration with Use of  $\beta$ -TCP / Chitosan Composite Membrane. *Polymer*.
- Kwon, S.-H., Jun, Y.-K., Hong, S.-H., & Kim, H.-E. (2003). Synthesis and dissolution behavior of  $\beta$ -TCP and HA/ $\beta$ -TCP composite powders. *Journal of the European Ceramic Society*, 23(7), 1039-1045.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. (N. Pallua & C. V. Suscheck, Eds.) *Science*, 260(5110), 920-926.
- LeGeros, R. Z., Lin, S., Rohanizadeh, R., Mijares, D., & LeGeros, J. P. (2003). Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(3), 201-9.
- Lee, C H, Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1-2), 1-22.
- Lee, Chi H, Moturi, V., & Lee, Y. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, 136(2), 88-98.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for Tissue Engineering. *Surgery*, 101(7).
- Leeuwenburgh, S. C. G., Wolke, J. G. C., Siebers, M. C., Schoonman, J., & Jansen, J. A. (2006). In vitro and in vivo reactivity of porous, electrosprayed calcium phosphate coatings. *Biomaterials*, 27(18), 3368-3378.
- Liao, C. J., Lin, F. H., Chen, K. S., & Sun, J. S. (1999). Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*, 20(19), 1807-1813.

- Lin, C. P., Douglas, W. H., & Erlandsen, S. L. (2004). Scanning Electron Microscopy (SEM). *Electron Microscopy of Polymers, 2010270115(3)*, 381-8. Springer Berlin Heidelberg.
- Lin, C.-C., & Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews, 58(12-13)*, 1379-1408.
- Lin-gibson, S., Walls, H. J., Kennedy, S. B., & Welsh, R. (2003). Chitosan Hydrogels : Crosslink Kinetics and Gel Properties. *Engineering, 199-200*.
- Lisboa, H. (2012). *Produção de Quitosano e desenvolvimento de novos materiais a partir de resíduos alimentares*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL.
- Liu, T.-Y., & Lin, Y.-L. (2010). Novel pH-sensitive chitosan-based hydrogel for encapsulating poorly water-soluble drugs. *Acta biomaterialia, 6(4)*, 1423-9. Acta Materialia Inc.
- Ma, P. X., & Zhang, R. (2001). Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research, 56(4)*, 469-477.
- Mathews, F. L., & Rawling, R. D. (1994). Composite Materials: Engineering and Science. *Chapman & Hall, London*.
- Mathur, N. K., & Narang, C. K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education, 67(11)*, 938. American Chemical Society.
- Monia, Z. (1997). Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering D.L. Wise, D. Trantolo, D.E. Altobelli, M.J. Yaszemski, J.D. Gresser, E.R. Schwartz (Editors), Marcel Dekker, New York; 1995. 3600 pages, ISBN 0-8247-9594-6.3800. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 44(3)*, 334.
- Montebault, A., Viton, C., & Domard, A. (2005a). Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials, 26(8)*, 933-943.
- Montebault, A., Viton, C., & Domard, A. (2005b). Rheometric study of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials, 26(14)*, 1633-1643.
- Mourya, V., & Inamdar, N. (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers, 68(6)*, 1013-1051.
- Nayak, A. K. (2010). Hydroxyapatite Synthesis Methodologies : An Overview. *International Journal of ChemTech Research, 2(2)*, 903-907.
- Norazril, S. A. H., Aminuddin, B. S., Norhayati, M. M., Mazlyzam, A. L., Fauziah, O., & Ruszymah, B. H. I. (2004). Comparison of chitosan scaffold and chitosan-collagen scaffold: a preliminary study. *The Medical journal of Malaysia, 59 Suppl B*, 186-187.
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2003). Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers, 53(3)*, 337-342.
- Olteanu, C. E., & Enescu, D. (2007). Chitosan involved Tissue Engineering and Regenerative Medicine.
- Paterson, M., & Kennedy, J. (1990). Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications Edited by G. Skjåk-Bræk, T. Anthonsen and P. Sandford, Elsevier Applied Science, London, 1989, xxii + 835 pp. *Carbohydrate Polymers, 13(1)*, 116-117.
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV, 50(1)*, 27-46.
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. J. (1996). Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials, 17(16)*, 1553-1561.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science, 34*, 641-678.
- Piotrowski, D., & Cierniewski, C. (2005). Introduction to rheology. (R. Lambourne, Ed.) *Acta Haematologica Polonica, 13(3-4)*, 177-186.
- Radhakumary, C., Antonty, M., & Sreenivasan, K. (2011). Drug loaded thermoresponsive and cytocompatible chitosan based hydrogel as a potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers, 83*, 705-713.
- Rapacz-Kmita, A., Paluszkiwicz, C., Ślósarczyk, A., & Paszkiewicz, Z. (2005). FTIR and XRD investigations on the thermal stability of hydroxyapatite during hot pressing and pressureless sintering processes. *Journal of Molecular Structure, 744-747*, 653-656.

- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. (B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. Lemons, Eds.) Elsevier San Diego California (Vol. 22, p. 851). Academic Press.
- Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- Raynaud, S., Champion, E., & Bernache-Assollant, D. (2002). Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering. *Biomaterials*, 23(4), 1073-1080.
- Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413-31.
- Ribeiro, M. P., Espiga, A., Silva, D., Pires, E., Ferreira, C., Silva, J. C., & Chaves, P. (2009). Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Society*, 817-824.
- Rimmer, S. (2011). *Biomedical hydrogels - biochemistry, manufacture and medical applications*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Rohindra, D. R., Nand, A. V., & Khurma, J. R. (n.d.). Swelling properties of chitosan hydrogels. Suva, Fiji.
- Sanosh, K. P., Chu, M.-C., Balakrishnan, a., Kim, T. N., & Cho, S.-J. (2010). Sol-gel synthesis of pure nano sized  $\beta$ -tricalcium phosphate crystalline powders. *Current Applied Physics*, 10(1), 68-71.
- Santos, N. (2009). *Estudo da Reologia de Fluidos Análogos ao Sangue*. Universidade do Porto.
- Schröder, E., Jönsson, T., & Poole, L. (2003). Hydroxyapatite chromatography: altering the phosphate-dependent elution profile of protein as a function of pH. *Analytical Biochemistry*, 313(1), 176-178.
- Shackelford, J. (2005). *Advanced Ceramics. Volume 1: Biomaterials* (1<sup>a</sup> ed.). Gordon and Breach Science.
- Siegel, R. A. (1989). Modeling of drug release from porous polymers. In M. Rosoff (Ed.), *Controlled release of drugs polymers and aggregate systems* (pp. 1-51). VCH Publishers.
- Stock, U. A., & Vacanti, J. P. (2001). Tissue engineering: current state and prospects. *Annual Review of Medicine*, 52(1), 443-451.
- Tang, Yufeng, Du, Y., Li, Y., Wang, X., & Hu, X. (2009). A thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel containing hydroxyapatite for protein delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91(4), 953-963.
- Tang, Yu, & Singh, J. (2008). Controlled delivery of aspirin: effect of aspirin on polymer degradation and in vitro release from PLGA based phase sensitive systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 357(1-2), 119-125. Retrieved from
- Teng, S.-H., Lee, E.-J., Wang, P., Jun, S.-H., Han, C.-M., & Kim, H.-E. (2009). Functionally gradient chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for controlled drug release. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 90(1), 275-82.
- Thein-Han, W. W., Kitiyanant, Y., & Misra, R. D. K. (2008). Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering. *Materials Science and Technology*, 24(9), 1062-1075. Maney Publishing.
- Van Blitterswijk, C. (2008). Tissue Engineering. In C Van Blitterswijk (Ed.), *Ed Academic Press Series in Biomedical Engineering* (pp. 559 - 610). Amsterdão, Holanda.
- Van Vlack, L. H. (1970). *Princípios de Ciência dos Materiais*. (Edgard Blucher, Ed.). São Paulo.
- VandeVord, P. J., Matthew, H. W. T., DeSilva, S. P., Mayton, L., Wu, B., & Wooley, P. H. (2002). Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(3), 585-590.
- Wang, W., & Xu, D. (1994). Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(3), 149-152.
- Williams, D F. (1987). *Definitions in Biomaterials*. (D. F. D. F. Williams, Ed.) *proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials* (Vol. 4, p. 72). Elsevier.
- Williams, David F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.

- Yildirim, B. O., Submitted, D., Fulfillment, P., Science, M., & Major, E. (2004a). Preparation and Characterization of Chitosan / Calcium Phosphate Based Composite Biomaterials A Dissertation Submitted to the Department : Materials Science and Engineering.
- Yildirim, B. O., Submitted, D., Fulfillment, P., Science, M., & Major, E. (2004b). *Preparation and Characterization of Chitosan / Calcium Phosphate Based Composite Biomaterials*. Izmir Institute of Technology, Turkey.
- Yuan, Y., & Liu, C.-sheng. (2002). Synthesis of nanometer hydroxyapatite by sol-gel method. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 24(2), 129-133.
- Zakharov, N. (2004). Calcium Hydroxyapatite for Medical Applications. *Inorganic Materials* 40 (p. 641).
- Zhao, L., Mitomo, H., Nagasawa, N., Yoshii, F., & Kume, T. (2003). Radiation synthesis and characteristic of the hydrogels based on carboxymethylated chitin derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 51, 169-175.
- Zhu, X., Chian, K. S., Chan-Park, M. B. E., & Lee, S. T. (2005). Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 73(3), 264-274.

# APÊNDICES

# FICHA JCPDS DA HIDROXIAPATITE

## Name and formula

Reference code:	98-000-6286
Mineral name:	Hydroxylapatite
Chemical name:	Decacalcium Hexakis(phosphate(V)) Dihydroxide
Common name:	Hydroxylapatite
ICSD name:	Decacalcium Hexakis(phosphate(V)) Dihydroxide
Chemical formula:	$H_2Ca_{10}O_{26}P_6$
Second chemical formula:	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

## Crystallographic parameters

Crystal system:	Hexagonal
Space group:	P 63/m
Space group number:	176

a (Å):	9.4320
b (Å):	9.4320
c (Å):	6.8810
Alpha (°):	90.0000
Beta (°):	90.0000
Gamma (°):	120.0000

Calculated density (g/cm <sup>3</sup> ):	3.15
Measured density (g/cm <sup>3</sup> ):	3.14
Volume of cell (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> ):	530.14
Z:	1.00

RIR:	1.57
------	------

## Subfiles and Quality

Subfiles:	Inorganic Mineral ICSD Pattern
Quality:	Calculated (C)

## Comments

Structure:  $Ca_5(PO_4)_3F$   
ICSD collection code: 16742  
Original ICSD space group: P63/M  
At least one temperature factor is implausible or meaningless but agrees with the value given in the paper.  
X-ray diffraction from single crystal  
Structure type :  $Ca_5(PO_4)_3F$   
New refinement based on previously measured intensities  
The structure has been assigned a PDF number (experimental powder diffraction data): 9-432  
The structure has been assigned a PDF number (calculated powder

diffraction data): 01-072-1243  
 Compound with mineral name: Hydroxylapatite  
 Structure type: Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>F  
 Recording date: 1/1/1980  
 Modification date: 4/1/2007  
 Mineral origin: Hydroxylapatite - synthetic  
 ANX formula: A3B5X13  
 Z: 1  
 Authors density: 3.14  
 Calculated density: 3.15  
 R value: 0.112  
 Pearson code: hP44  
 Wyckoff code: i h4 f a  
 PDF code: 00-009-0432  
 TRANS y,x,-z  
 Publ. title: Refinement of the hydroxylapatite structure

## References

Primary reference: Diorio, A.F. Perloff, A. Posner, A.S., *Acta Crystallographica* (1,1948-23,1967), **11**, 308, (1958)

## Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	0	1	0	8.16835	10.822	16.2
2	0	1	1	5.26260	16.834	4.8
3	1	1	0	4.71600	18.801	2.3
4	0	2	0	4.08418	21.743	5.9
5	1	1	1	3.89005	22.842	5.9
6	0	2	1	3.51212	25.339	2.3
7	0	0	2	3.44050	25.875	36.8
8	0	1	2	3.17072	28.120	10.6
9	1	2	0	3.08735	28.896	15.3
10	1	2	1	2.81681	31.741	100.0
11	1	1	2	2.77946	32.179	44.8
12	0	3	0	2.72278	32.868	56.9
13	0	2	2	2.63130	34.045	22.5
14	0	3	1	2.53178	35.426	3.4
15	2	2	0	2.35800	38.134	0.2
16	1	2	2	2.29783	39.173	5.0
17	1	3	0	2.26549	39.755	20.9
18	2	2	1	2.23066	40.403	1.8
19	0	1	3	2.20826	40.831	0.3
20	1	3	1	2.15186	41.951	6.4
21	0	3	2	2.13507	42.297	0.7
22	1	1	3	2.06265	43.857	4.7
23	0	4	0	2.04209	44.322	0.8
24	0	2	3	1.99987	45.309	4.0
25	0	4	1	1.95770	46.342	0.3
26	2	2	2	1.94503	46.661	30.7
27	1	3	2	1.89212	48.047	14.4
28	2	3	0	1.87395	48.543	4.6
29	1	2	3	1.84117	49.464	32.4
30	2	3	1	1.80810	50.432	18.8
31	1	4	0	1.78248	51.208	12.5
32	0	4	2	1.75606	52.036	14.0
33	0	3	3	1.75420	52.095	7.2
34	1	4	1	1.72553	53.028	0.6
35	0	0	4	1.72025	53.203	16.2

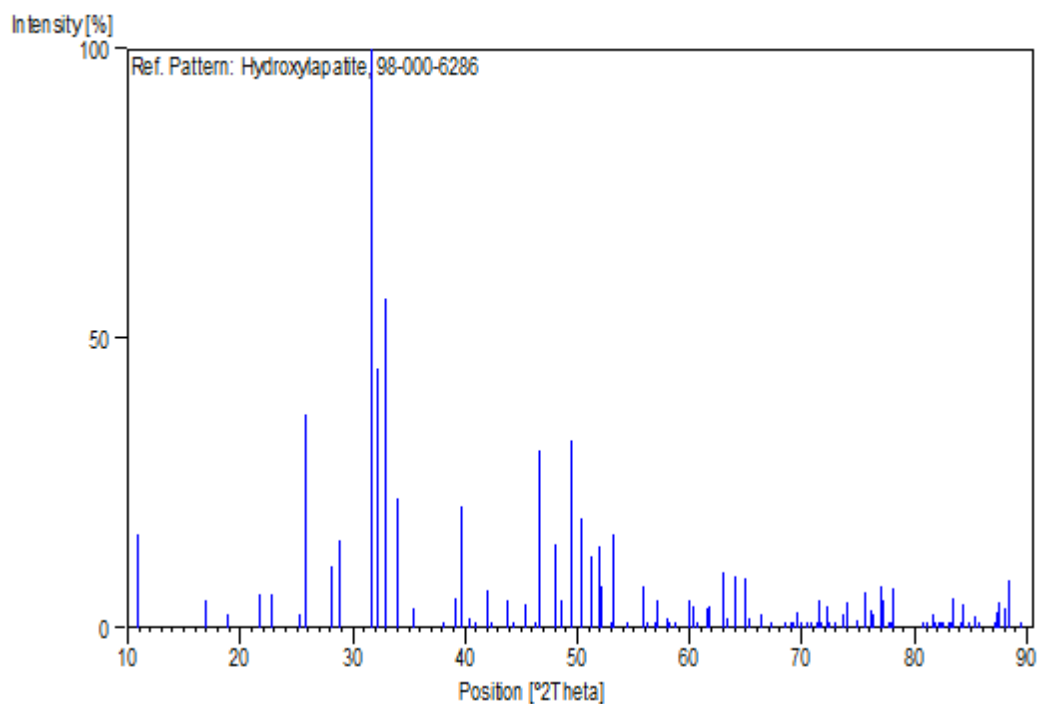
36	0	1	4	1.68333	54.465	0.6
37	2	3	2	1.64567	55.819	7.2
38	2	2	3	1.64414	55.876	3.4
39	0	5	0	1.63367	56.265	0.1
40	1	1	4	1.61609	56.933	0.3
41	1	3	3	1.61181	57.098	4.7
42	0	5	1	1.58949	57.975	1.7
43	0	2	4	1.58536	58.141	0.1
44	1	4	2	1.58268	58.248	0.7
45	3	3	0	1.57200	58.683	0.7
46	2	4	0	1.54367	59.868	4.9
47	3	3	1	1.53252	60.349	3.8
48	0	4	3	1.52519	60.669	0.0
49	2	4	1	1.50624	61.515	3.4
50	1	2	4	1.50272	61.675	3.8
51	0	5	2	1.47575	62.929	9.6
52	1	5	0	1.46708	63.344	1.5
53	0	3	4	1.45431	63.966	8.9
54	2	3	3	1.45119	64.120	6.4
55	1	5	1	1.43483	64.940	8.5
56	3	3	2	1.42982	65.196	1.6
57	2	4	2	1.40841	66.313	2.3
58	1	4	3	1.40745	66.364	2.4
59	2	2	4	1.38973	67.322	0.0
60	1	3	4	1.37004	68.422	0.4
61	0	6	0	1.36139	68.918	0.3
62	0	1	5	1.35707	69.169	0.1
63	1	5	2	1.34951	69.612	2.8
64	3	4	0	1.34287	70.006	0.6
65	0	6	1	1.33550	70.450	0.0
66	0	5	3	1.33065	70.745	0.2
67	1	1	5	1.32110	71.334	0.3
68	3	4	1	1.31800	71.527	4.6
69	0	4	4	1.31565	71.675	0.6
70	2	5	0	1.30798	72.161	3.6
71	0	2	5	1.30415	72.407	0.2
72	3	3	3	1.29668	72.890	0.2
73	2	5	1	1.28497	73.664	2.3
74	2	4	3	1.28065	73.954	4.3
75	2	3	4	1.26726	74.868	1.3
76	0	6	2	1.26589	74.963	1.4
77	1	2	5	1.25698	75.587	6.0
78	3	4	2	1.25096	76.016	3.1
79	1	6	0	1.24566	76.397	2.3
80	1	4	4	1.23782	76.969	7.1
81	1	5	3	1.23589	77.111	4.7
82	0	3	5	1.22823	77.682	0.1
83	1	6	1	1.22574	77.870	0.9
84	2	5	2	1.22261	78.107	7.0
85	2	2	5	1.18858	80.795	0.3
86	0	5	4	1.18461	81.122	0.9
87	4	4	0	1.17900	81.589	2.3
88	1	3	5	1.17619	81.826	0.8
89	1	6	2	1.17126	82.245	0.7
90	0	6	3	1.17071	82.292	0.5
91	0	7	0	1.16691	82.618	0.7
92	4	4	1	1.16207	83.038	1.1
93	3	3	4	1.16045	83.180	0.9
94	3	4	3	1.15886	83.319	5.0
95	3	5	1	1.15048	84.064	0.2
96	2	4	4	1.14891	84.205	4.2

97	0	0	6	1.14683	84.393	2.1
98	0	4	5	1.14123	84.904	0.1
99	2	5	3	1.13622	85.367	2.1
100	0	1	6	1.13569	85.416	1.5
101	2	6	0	1.13275	85.692	0.4
102	2	6	1	1.11770	87.131	0.2
103	1	5	4	1.11627	87.271	2.8
104	4	4	2	1.11533	87.363	1.6
105	1	1	6	1.11436	87.458	4.4
106	2	3	5	1.10922	87.967	3.5
107	0	7	2	1.10508	88.383	8.2
108	0	2	6	1.10413	88.478	1.6
109	1	6	3	1.09465	89.449	0.5

## Structure

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	O1	O	0.00000	0.00000	0.25000	0.8750	1.0000	2a
2	O2	O	0.34800	0.08900	0.07300	0.6320	1.0000	12i
3	O3	O	0.58900	0.12300	0.25000	0.4960	1.0000	6h
4	O4	O	0.15500	0.48400	0.25000	0.2950	1.0000	6h
5	P1	P	0.40000	0.03100	0.25000	0.1920	1.0000	6h
6	CA1	Ca	0.24600	0.25300	0.25000	0.3280	1.0000	6h
7	CA2	Ca	0.33333	0.66667	0.00100	0.6660	1.0000	4f

## Stick Pattern





# FICHA JCPDS DO ÓXIDO DE CÁLCIO

## Name and formula

Reference code:	98-001-1978
Mineral name:	Lime
Chemical name:	Calcium Oxide
Common name:	Lime
ICSD name:	Calcium Oxide
Chemical formula:	Ca <sub>1</sub> O <sub>1</sub>
Second chemical formula:	CaO

## Crystallographic parameters

Crystal system:	Cubic
Space group:	F m -3 m
Space group number:	225
a (Å):	4,7780
b (Å):	4,7780
c (Å):	4,7780
Alpha (°):	90,0000
Beta (°):	90,0000
Gamma (°):	90,0000
Calculated density (g/cm <sup>3</sup> ):	3,41
Measured density (g/cm <sup>3</sup> ):	3,30
Volume of cell (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> ):	109,08
Z:	4,00
RIR:	4,54

## Subfiles and Quality

Subfiles:	Inorganic Mineral ICSD Pattern
Quality:	Calculated (C)

## Comments

Structure: NaCl  
ICSD collection code: 26959  
Original ICSD space group: FM3-M  
Cell from 4th ref. (Goldschmidt): 4.802, also stable at 2273 K  
Cell from 2nd reference: 4.84, from 3rd ref.: 4.81  
Given sp. gr. was F23  
At least one temperature factor missing in the paper.  
No R value given in the paper.  
Unusual difference between calculated and measured density  
X-ray diffraction (powder)  
Structure type : NaCl  
The structure has been assigned a PDF number (experimental powder)

diffraction data): 43-1001  
 Compound with mineral name: Lime  
 Structure type: NaCl  
 Recording date: 9/23/1986  
 Modification date: 2/1/2008  
 ANX formula: AX  
 Z: 4  
 Authors density: 3.3  
 Calculated density: 3.41  
 Pearson code: cF8  
 Wyckoff code: b a  
 PDF code: 00-043-1001  
 Publ. title: Die Gitterstruktur der Erdalkalioxyde.

## References

Primary reference: Gerlach, W., *Skrifter utgitt av det Norske Videnskaps-Akademi i Oslo 1: Matematisk-Naturvidenskapelig Klasse*, **1927**, 1, (1927)

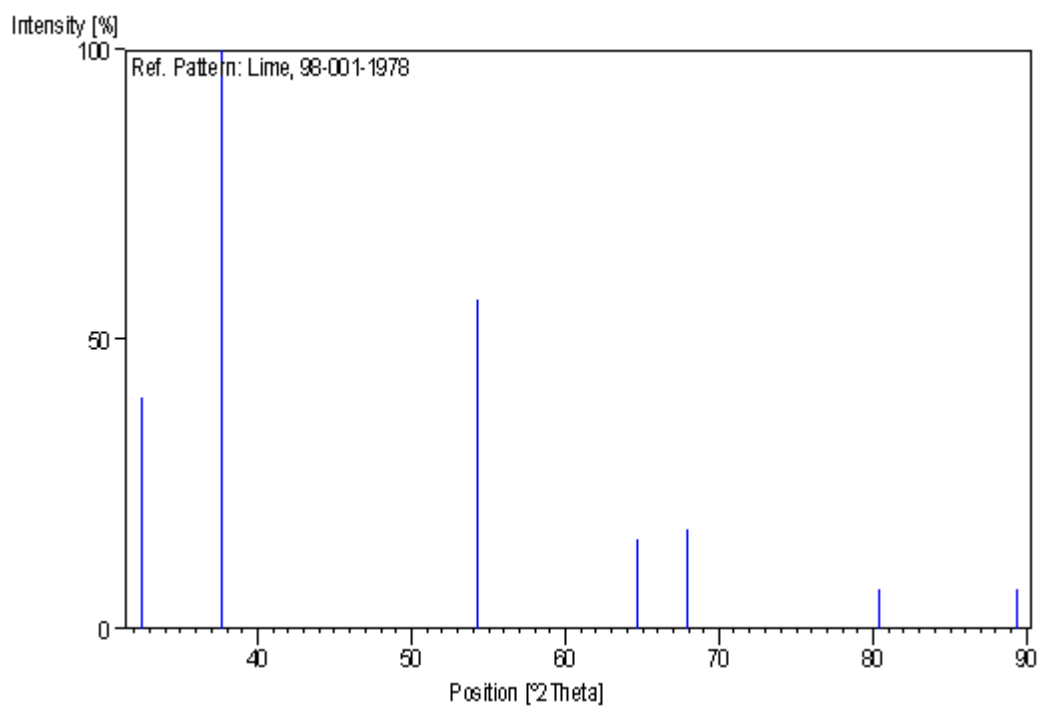
## Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	1	1	2,75858	32,429	40,0
2	0	0	2	2,38900	37,621	100,0
3	0	2	2	1,68928	54,258	57,1
4	1	1	3	1,44062	64,647	15,5
5	2	2	2	1,37929	67,901	17,3
6	0	0	4	1,19450	80,312	7,0
7	1	3	3	1,09615	89,293	6,7

## Structure

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	O1	O	0,50000	0,50000	0,50000	0,5000	1,0000	4b
2	CA1	Ca	0,00000	0,00000	0,00000	0,5000	1,0000	4a

## Stick Pattern





# FICHA JCPDS DO B-FOSFATO TRICÁLCICO

## Name and formula

Reference code:	98-007-6561
Chemical name:	Tricalcium Bis(phosphate(V)) - Beta
Common name:	Tricalcium Bis(phosphate(V)) - Beta
ICSD name:	Tricalcium Bis(phosphate(V)) - Beta
Chemical formula:	$\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$
Second chemical formula:	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

## Crystallographic parameters

Crystal system:	Hexagonal
Space group:	R 3 c
Space group number:	161
a (Å):	10.4350
b (Å):	10.4350
c (Å):	37.4030
Alpha (°):	90.0000
Beta (°):	90.0000
Gamma (°):	120.0000
Calculated density (g/cm <sup>3</sup> ):	3.07
Volume of cell (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> ):	3527.13
Z:	21.00
RIR:	1.26

## Subfiles and Quality

Subfiles:	Inorganic ICSD Pattern
Quality:	Calculated (C)

## Comments

Structure: Whitlockite  
ICSD collection code: 97500  
Original ICSD space group: R3CH  
Stable from 193 to 1408 K (2nd ref., Tomaszewski), above P21/a  
At least one temperature factor is implausible or meaningless but agrees with the value given in the paper.  
Structure type : Whitlockite  
Rietveld profile refinement applied  
The structure has been assigned a PDF number (experimental powder diffraction data): 70-2065  
The structure has been assigned a PDF number (calculated powder diffraction data): 01-072-7587  
Neutron diffraction (powder)  
Structure type: Whitlockite  
Recording date: 10/1/2004  
Modification date: 4/1/2006

ANX formula: A2B3X8  
 Z: 21  
 Calculated density: 3.07  
 R value: 0.018  
 Pearson code: hR91  
 Wyckoff code: b14 a4  
 PDF code: 01-070-2065  
 TRANS -x,-y,-z origin 0 0 .95790  
 Publ. title: Crystal structure analysis of beta-tricalcium phosphate  
 Ca3 (P O4)2 by neutron powder diffraction

## References

Primary reference: Hoshikawa, A. Kamiyama, T. Sakai, A. Yashima, M., *Golden Book of Phase Transitions, Wroclaw*, 1, 1, (2002)

## Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	0	1	2	8.13679	10.865	14.5
2	1	0	4	6.49820	13.616	16.7
3	0	0	6	6.23383	14.196	3.7
4	1	1	0	5.21750	16.980	22.2
5	1	1	3	4.81305	18.419	1.4
6	2	0	2	4.39211	20.202	5.2
7	0	1	8	4.15255	21.381	1.4
8	0	2	4	4.06839	21.828	11.6
9	1	1	6	4.00104	22.200	1.9
10	1	0	10	3.45598	25.758	25.5
11	2	1	1	3.40150	26.177	3.1
12	1	2	2	3.36007	26.506	7.6
13	1	1	9	3.25070	27.415	4.8
14	2	0	8	3.24910	27.429	5.0
15	2	1	4	3.20831	27.784	52.5
16	0	0	12	3.11692	28.616	0.6
17	1	2	5	3.10709	28.709	1.0
18	0	3	0	3.01233	29.632	13.5
19	0	2	10	2.88124	31.013	100.0
20	2	1	7	2.87790	31.050	71.3
21	1	2	8	2.75804	32.436	21.4
22	0	3	6	2.71226	32.999	7.0
23	1	1	12	2.67580	33.462	6.5
24	2	2	0	2.60875	34.348	73.0
25	0	1	14	2.56203	34.995	4.0
26	2	2	3	2.55345	35.116	5.8
27	2	1	10	2.52221	35.565	12.5
28	1	3	1	2.50080	35.880	3.4
29	3	1	2	2.48419	36.128	0.4
30	1	3	4	2.42095	37.106	0.9
31	1	2	11	2.40978	37.284	5.4
32	2	2	6	2.40652	37.337	9.1
33	3	1	5	2.37656	37.825	5.6
34	2	0	14	2.29973	39.139	0.8
35	1	3	7	2.26916	39.688	1.0
36	1	0	16	2.26319	39.798	10.2
37	1	1	15	2.24980	40.045	2.3
38	0	4	2	2.24294	40.172	0.8
39	2	2	9	2.20951	40.807	0.7
40	3	1	8	2.20900	40.817	0.7
41	2	1	13	2.20051	40.981	2.7

42	4	0	4	2.19605	41.068	9.7
43	0	3	12	2.16607	41.663	9.8
44	1	2	14	2.10437	42.944	1.0
45	1	3	10	2.08214	43.426	3.7
46	0	0	18	2.07794	43.518	4.6
47	0	2	16	2.07627	43.555	3.9
48	3	2	1	2.07005	43.692	1.7
49	2	3	2	2.06060	43.903	5.8
50	0	4	8	2.03420	44.503	8.1
51	3	2	4	2.02407	44.738	3.9
52	3	1	11	2.01753	44.891	1.3
53	2	2	12	2.00052	45.294	7.0
54	2	3	5	1.99791	45.356	3.3
55	1	4	0	1.97203	45.985	1.0
56	1	4	3	1.94781	46.590	1.8
57	4	0	10	1.93384	46.947	24.7
58	3	2	7	1.93283	46.973	21.0
59	1	1	18	1.93048	47.034	5.6
60	2	1	16	1.92914	47.069	1.4
61	2	3	8	1.89525	47.963	14.2
62	1	3	13	1.88987	48.108	0.3
63	1	4	6	1.88019	48.371	13.9
64	1	2	17	1.84966	49.222	0.0
65	0	1	20	1.83135	49.747	4.4
66	3	1	14	1.82792	49.847	1.8
67	3	2	10	1.81329	50.277	5.4
68	2	2	15	1.80255	50.598	0.7
69	5	0	2	1.79901	50.704	4.4
70	1	4	9	1.78163	51.235	4.0
71	0	5	4	1.77455	51.454	7.6
72	2	3	11	1.77014	51.591	0.7
73	3	3	0	1.73917	52.580	2.5
74	2	0	20	1.72799	52.946	29.5
75	0	4	14	1.72511	53.041	5.6
76	3	3	3	1.72249	53.129	0.2
77	0	3	18	1.71046	53.532	9.5
78	1	3	16	1.70953	53.563	7.9
79	2	4	1	1.70605	53.681	1.2
80	2	1	19	1.70559	53.697	1.2
81	4	2	2	1.70075	53.862	0.2
82	5	0	8	1.68581	54.378	6.7
83	1	1	21	1.68559	54.386	6.5
84	3	2	13	1.68203	54.511	1.2
85	2	4	4	1.68004	54.581	1.9
86	3	3	6	1.67519	54.752	0.6
87	1	0	22	1.67083	54.907	0.2
88	1	4	12	1.66650	55.062	3.9
89	4	2	5	1.66499	55.116	2.0
90	3	1	17	1.65349	55.532	0.1
91	1	2	20	1.64037	56.015	2.7
92	2	3	14	1.63791	56.107	3.8
93	0	5	10	1.62736	56.503	2.9
94	2	4	7	1.62676	56.526	2.9
95	2	2	18	1.62535	56.579	2.8
96	4	0	16	1.62455	56.610	2.5
97	5	1	1	1.62156	56.723	0.4
98	1	5	2	1.61701	56.898	0.3
99	3	3	9	1.60435	57.388	4.8
100	4	2	8	1.60416	57.396	5.0
101	5	1	4	1.59918	57.591	3.2
102	0	2	22	1.59123	57.906	1.7

103	1	5	5	1.58618	58.108	0.5
104	0	0	24	1.55846	59.243	0.3
105	2	4	10	1.55354	59.450	9.3
106	5	1	7	1.55302	59.472	9.6
107	3	2	16	1.55110	59.553	9.2
108	1	3	19	1.54815	59.678	0.8
109	1	4	15	1.54677	59.736	1.4
110	1	5	8	1.53332	60.314	3.3
111	4	2	11	1.52614	60.628	0.1
112	2	1	22	1.52202	60.809	3.3
113	3	3	12	1.51874	60.955	1.6
114	2	3	17	1.50888	61.396	0.1
115	0	6	0	1.50616	61.519	4.3
116	3	1	20	1.49889	61.850	0.8
117	5	0	14	1.49701	61.936	0.4
118	1	1	24	1.49327	62.108	0.7
119	5	1	10	1.48894	62.309	0.9
120	4	3	1	1.48450	62.516	0.8
121	3	4	2	1.48100	62.681	0.2
122	2	2	21	1.47096	63.158	0.0
123	2	4	13	1.46859	63.271	2.1
124	1	2	23	1.46830	63.286	2.8
125	4	3	4	1.46727	63.335	5.3
126	1	5	11	1.46477	63.456	0.8
127	0	6	6	1.46404	63.491	0.6
128	3	4	5	1.45721	63.824	0.9
129	2	5	0	1.44707	64.324	1.9
130	0	4	20	1.44062	64.647	2.7
131	4	2	14	1.43895	64.731	0.8
132	2	5	3	1.43742	64.808	0.3
133	4	3	7	1.43137	65.116	1.4
134	1	4	18	1.43041	65.165	2.4
135	0	5	16	1.42987	65.193	2.0
136	3	2	19	1.42756	65.312	0.7
137	3	3	15	1.42647	65.368	0.5
138	0	1	26	1.42069	65.667	0.2
139	3	4	8	1.41590	65.917	3.3
140	5	1	13	1.41366	66.035	0.2
141	2	5	6	1.40959	66.250	6.9
142	1	3	22	1.40699	66.389	0.1
143	2	3	20	1.38866	67.381	5.0
144	1	5	14	1.38716	67.464	1.2
145	0	3	24	1.38418	67.628	1.0
146	4	3	10	1.38074	67.820	1.5
147	2	4	16	1.37902	67.916	0.5
148	1	6	1	1.37719	68.019	1.6
149	6	1	2	1.37440	68.176	0.2
150	2	0	26	1.37078	68.381	0.3
151	2	1	25	1.37042	68.401	0.2
152	2	5	9	1.36660	68.619	0.5
153	3	1	23	1.36422	68.755	0.6
154	1	6	4	1.36340	68.803	0.8
155	3	4	11	1.36139	68.918	0.9
156	4	0	22	1.35846	69.088	0.5
157	0	6	12	1.35613	69.224	0.5
158	6	1	5	1.35532	69.271	0.5
159	4	2	17	1.34909	69.637	0.2
160	1	1	27	1.33891	70.244	0.4
161	2	2	24	1.33790	70.305	0.7
162	1	6	7	1.33446	70.513	1.4
163	3	3	18	1.33368	70.560	1.9

164	5	1	16	1.33324	70.587	1.6
165	1	2	26	1.32579	71.044	2.0
166	6	1	8	1.32190	71.285	2.1
167	1	4	21	1.32179	71.291	2.2
168	1	0	28	1.32146	71.312	2.1
169	4	3	13	1.32007	71.398	0.5
170	3	2	22	1.31463	71.739	0.6
171	2	5	12	1.31252	71.873	2.1
172	1	5	17	1.30614	72.279	0.4
173	4	4	0	1.30437	72.392	3.5
174	5	0	20	1.29964	72.698	1.1
175	3	4	14	1.29842	72.778	1.1
176	4	4	3	1.29729	72.851	0.6
177	1	6	10	1.29314	73.122	0.0
178	3	5	1	1.29023	73.314	2.9
179	2	4	19	1.29003	73.328	2.9
180	5	3	2	1.28793	73.467	3.1
181	1	3	25	1.28466	73.685	0.6
182	0	2	28	1.28101	73.929	0.3
183	2	3	23	1.27955	74.028	0.7
184	7	0	4	1.27887	74.074	0.9
185	6	1	11	1.27721	74.186	0.3
186	4	4	6	1.27673	74.219	0.3
187	5	3	5	1.27219	74.528	0.2
188	4	2	20	1.26111	75.297	5.0
189	3	5	7	1.25489	75.735	0.3
190	4	3	16	1.25388	75.807	1.1
191	6	2	1	1.25250	75.905	2.0
192	5	1	19	1.25232	75.918	2.0
193	2	5	15	1.25158	75.971	1.6
194	2	6	2	1.25040	76.056	3.0
195	3	1	26	1.24767	76.252	1.0
196	0	0	30	1.24677	76.317	1.9
197	4	4	9	1.24452	76.480	3.1
198	0	7	8	1.24443	76.486	3.1
199	3	3	21	1.24434	76.493	3.0
200	2	1	28	1.24407	76.513	2.8
201	1	6	13	1.24290	76.597	1.3
202	6	2	4	1.24210	76.656	1.7
203	0	5	22	1.23836	76.929	0.5

## Structure

No.	Name	Elem.	X	Y	Z	Biso	sof	Wyck.
1	O1	O	0.23260	0.21670	0.18730	1.6600	1.0000	18b
2	CA1	Ca	0.15883	0.28547	0.24197	0.2700	1.0000	18b
3	CA2	Ca	0.18473	0.39327	0.14767	0.7600	1.0000	18b
4	CA3	Ca	0.00000	0.00000	0.12720	2.0000	0.4300	6a
5	CA4	Ca	0.00000	0.00000	0.30850	0.7600	1.0000	6a
6	P1	P	0.00000	0.00000	0.04210	0.4100	1.0000	6a
7	P2	P	0.31280	0.13940	0.17360	0.2900	1.0000	18b
8	CA5	Ca	0.19513	0.39257	0.04247	0.3800	1.0000	18b
9	O2	O	0.27440	0.09440	0.13380	1.7900	1.0000	18b
10	O3	O	0.00000	0.00000	0.00000	1.0600	1.0000	6a
11	O4	O	0.00880	0.27900	0.19350	0.7700	1.0000	18b
12	O5	O	0.09413	0.18877	0.34607	1.2500	1.0000	18b
13	O6	O	0.40130	0.04880	0.26270	0.4400	1.0000	18b
14	O7	O	0.09287	0.45253	0.09043	1.3200	1.0000	18b
15	O8	O	0.18130	0.08030	0.26500	0.2700	1.0000	18b
16	O9	O	0.36800	0.17420	0.31530	0.8400	1.0000	18b

17	O10	O	0.14330	0.00570	0.05360	1.3600	1.0000	18b
18	P3	P	0.34700	0.15360	0.27530	0.1400	1.0000	18b

### Stick Pattern

