



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Departamento de Física

# **Produção de Microfibras Compósitas de Quitosano e Hidroxiapatite pela Técnica de Fiação Húmida**

**Carlos Filipe Cidre João**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica.

## **Orientação Científica:**

Professor Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges  
Professor Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho e Silva

Monte de Caparica 2010

*“Um gênio é composto por 2% de talento e 98% de perseverante aplicação”*

Ludwig Van Beethoven

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professor Doutor João Paulo Borges e Professor Doutor Jorge Carvalho e Silva, pelo apoio e dedicação incansável, pelo incentivo e disponibilidade de partilha de conhecimentos.

Ao grupo de Polímeros do Departamento de Ciências dos Materiais, pela disponibilidade e ajuda que sempre me prestaram nomeadamente pelos Engenheiros Hugo Lisboa, Ana Espiga, João Canejo, e pela D<sup>a</sup> Augusta. À Biotecnóloga Ana Baptista, uma palavra de profundo apreço por tudo aquilo que fez por mim.

Aos meus pais, por tudo o que me deram na vida, pelo espírito de trabalho e sacrifício, pelos bons valores comportamentais, pelos valores familiares, pelo apoio nas fases mais negativas da vida e por me permitirem realizar todos os meus sonhos.

À minha família e em especial ao Ricardo Martins pelo apoio, compreensão, carinho e hospitalidade proporcionada nestes anos passados na Caparica.

Aos cavaleiros, João Miranda, Nuno Fernandes, Francisco Venes, Cláudio Santos e André Coelho, e às navegantes, Ana Arruda e Catarina Barros. A amizade travada durante cinco anos permitiu-me chegar ao fim desta etapa com um inúmero de vitórias conseguidas em conjunto. A vossa presença diminui todos os sofrimentos e angústias e ampliou toda a alegria e diversão.

Às minhas companheiras da luta, Ana Sofia Pedrosa e Joana Neto. Estes últimos tempos de constante convívio revelaram ser fulcrais para a concretização deste objectivo. O vosso apoio, carinho, compreensão, amizade, alegria e preocupação fizeram com que esta recta final se tornasse mais curta e mais leve.

Aos meus amigos “Vimiosenses”, Tiago Belarmino, João Vicente, Ricardo Dias, Alexandre Dias, Joaquim Godinho, Jorge Sá, Catarina Rodrigues, Eva Domingos, Analisa Martins e Tânia Morais, pela amizade de uma vida.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à minha namorada Sandra Gonçalves. Obrigado por tudo aquilo que me proporcionaste, pelo apoio e carinho incansável, pela paciência e compreensão e por todo o amor que me transmitiste durante este percurso. A distância não foi nada em comparação com tudo aquilo que me ofereceste.

## SUMÁRIO

A hidroxiapatite é um biocerâmico biocompatível e bioactivo e, dentro dos biomateriais, aquele que mais se assemelha à composição química de fase mineral do osso humano. Por ser osteocondutor tem sido largamente aplicado em áreas como a Ortopedia e a Medicina Dentária.

O quitosano é um biopolímero resultante da desacetilação da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza. Revela propriedades como biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade e acelerador do processo regenerativo, o que o torna um excelente material para aplicações médicas sob a forma de hidrogéis, filmes, fibras e esponjas.

No presente trabalho foram produzidas e caracterizadas microfibras compósitas de quitosano e hidroxiapatite, com o objectivo de construir um material compósito com as propriedades combinadas de dois elementos biocompatíveis e biodegradáveis.

Através da técnica de Fiação Húmida (*wet spinning*) foram produzidos 5 tipos de fibras contendo diferentes proporções de hidroxiapatite ( 0%, 5%, 10%, 15% e 20% (p/p) usando como base do compósito o quitosano. Foram usados diferentes banhos de coagulação e secagem (diferentes percentagens de NaOH e de etanol ou metanol), obtendo-se várias fibras que foram posteriormente caracterizadas mecanicamente através de ensaios de tracção. A análise morfológica, resultante da medição de diâmetros e observação de imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento (SEM), juntamente com a análise mecânica, revelaram que as fibras de quitosano com hidroxiapatite resultantes de banhos de coagulação com 70% NaOH e 30% metanol e de banhos de secagem de 100% metanol possuem melhores propriedades para a construção de matrizes para a engenharia de tecido ósseo.

Foram construídas matrizes de fibras compósitas (0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de HAp (p/p)) com o recurso a um molde, tendo sido usadas posteriormente para análise citotóxica e como suporte para a realização de culturas celulares. A observação de imagens obtidas por SEM, após 24 horas de cultura, assim como os resultados da análise citotóxica, revelaram crescimento celular e viabilidade para a aplicação dos materiais elaborados como suporte de um substituinte ósseo.

**Palavras chave:** Hidroxiapatite; Quitosano; Sol-Gel; Fiação Húmida; Compósito; Osteoblastos; Osso; Engenharia de Tecidos;

## ABSTRACT

Hydroxyapatite is a biocompatible and bioactive bioceramic that, within the biomaterials, is the one that resembles the most the composition of the mineral phase of human bone. Because of its osteoconductivity, it has been widely applied in areas such as Orthopaedics and Dentistry.

Chitosan is a biopolymer that results from the deacetylation of chitin and the second most abundant polymer in nature. It demonstrates interesting properties such as biocompatibility, low toxicity and biodegradability, which make it an excellent material for medical applications in the form of hydrogels, films, fibers and sponges.

This paper reports the production and characterization of composite microfibers of chitosan and hydroxyapatite in an attempt to build a composite material that combines the properties of its two biocompatible and biodegradable elements.

Using the Wet Spinning technique, five types of fibers containing different amounts of hydroxyapatite (0%, 5%, 10%, 15% and 20%) using chitosan as its basis were produced. Different baths were used for coagulation and drying (different percentage of NaOH and ethanol or methanol) yielding fibers that were mechanically characterized by tensile tests. The morphological analysis (observation of images obtained by scanning electron microscopy – SEM – and diameter measurement), together with the mechanical analysis, revealed that composite fibers of chitosan with hydroxyapatite as a result of a coagulation bath with 70% NaOH and 30% methanol and a drying bath of 100% methanol, have better properties for the construction of scaffolds for bone tissue engineering.

With the use of a template, scaffolds were constructed with the composite fibers (0%, 10%, 20%, 30%, 40% and 50% HAp) used later for cytotoxicity analysis and for a support in order to carry out cell culture. The observation of images obtained by SEM, twenty-four hours after the cell seeding was carried out, combined with the cytotoxicity test results, showed cell growth and viability for the application of the materials produced in a support of a bone substitute.

**Key words:** Hydroxyapatite; Chitosan; Sol-Gel; Wet Spinning; Composite; Osteoblasts; Bone; Tissue Engineering;

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ALCAP – Alumínio-fosfato de cálcio	PS – Poliestireno
BMP – <i>Bone morphogenetic protein</i> proteína morfogénica do osso	PTFE – Politetrafluoretileno ou Teflon
CaP – Fosfatos de cálcio	PU – Poliuretano
CENIMAT/I3N – Centro de Investigação de Materiais da FCT	PVC – Policloreto de vinilo
CPP – Pirofosfato de cálcio	SEM – <i>Scanning Electron Microscope</i> – Microscopia Electrónica de Varrimento
CS – <i>Chitosan</i> - quitosano	TEM – <i>Transmission Electron Microscope</i> – Microscopia Electrónica de Transmissão
FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia	TCP – Fosfato Tricálcico
HAp – Hidroxiapatite	TGF- $\beta$ – Factor de crescimento de transformação beta
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana	TTCP – Tetrafosfato de cálcio
IGF – Factor de crescimento de insulina	UTPM – Unidade de Tecnologia de Proteínas e Anticorpos Monoclonais
IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical	UNL – Universidade Nova de Lisboa
ISO – <i>International Organization for Standardization</i>	ZCAP – Zinco-fosfato de cálcio
OCP – Fosfato Octacálcico	ZSCAP – Sulfato de zinco-fosfato de cálcio
PE – Polietileno	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ - Hidroxiapatite
PEO – poli(óxido de etileno)	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$ - Quitosano
PET – Politereftalato de etileno	p/p – Fracção massa/massa
PDGF – Factor de crescimento derivado de plaquetas	v/v – Fracção volume/volume
PDMS – Polidimetilsiloxano	$\alpha$ - Parâmetro angular de rede cristalina
PMMA – Polimetacrilato de metilo	$\beta$ - Parâmetro angular de rede cristalina
PP – Polipropileno	

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>OBJECTIVOS</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>1</b>
1.1. BIOMATERIAIS .....	1
1.1.1. Classificação dos Biomateriais .....	1
1.1.2. Materiais Osteogénicos .....	3
1.1.3. Materiais Osteocondutores .....	4
1.1.4. Materiais Osteoindutores .....	5
1.2. BIOCERÂMICOS .....	6
1.2.1. Classes de Biocerâmicos .....	7
1.2.2. Fosfatos de Cálcio .....	8
1.3. HIDROXIAPATITE .....	11
1.3.1. Estrutura Tridimensional e Composição Química .....	11
1.3.2. Propriedades Físicas, Mecânicas, Químicas e Cristalográficas .....	12
1.3.3. Propriedades da Hidroxiapatite como Biomaterial .....	14
1.3.4. Resumo dos Métodos de Produção de Hidroxiapatite .....	15
1.4. BIOPOLÍMEROS .....	18
1.4.1. Classes de Biopolímeros .....	18
1.4.2. Biodegradação e Bioabsorção .....	19
1.5. QUITINA e QUITOSANO .....	20
1.5.1. Estrutura e Composição Química .....	20
1.5.2. Propriedades Físicas, Mecânicas e Químicas .....	21
1.5.3. Propriedades do Quitosano como Biomaterial .....	21
1.6. COMPÓSITOS DE POLÍMERO/HIDROXIAPATITE .....	23
1.6.1. Caracterização dos Compósitos de Polímero e Hidroxiapatite .....	23
1.6.2. O Compósito Quitosano/Hidroxiapatite .....	24
1.7. TÉCNICAS DE PRODUÇÃO .....	25
1.7.1. SCAFFOLDS .....	25

1.7.2 O PROCEDIMENTO SOL-GEL.....	27
1.7.3 FIAÇÃO HÚMIDA .....	31
<b>2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>33</b>
2.1. PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITE PELO MÉTODO SOL-GEL .....	33
2.2. PRODUÇÃO DAS FIBRAS DE CS E HAP POR FIAÇÃO HÚMIDA.....	35
2.2.1. Preparação das Soluções de CS e HAp .....	35
2.2.2. Constituição dos Banhos: .....	36
2.2.3. Montagem Experimental .....	37
2.2.4. Técnica Experimental .....	38
2.3. PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS DE FIBRAS DE CS E HAP .....	42
2.4. ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO .....	44
2.4.1. Medição de Diâmetros e Ensaio de Tracção.....	44
2.4.2. Culturas Celulares e Testes Citotóxicos.....	45
2.4.3. Análise Morfológica (SEM) .....	47
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
3.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	49
3.1.1. Pós de Hidroxiapatite .....	49
3.1.2. Fibras Compósitas de Quitosano e Hidroxiapatite.....	50
3.1.3. Diâmetros das Fibras.....	54
3.2. CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA .....	57
3.2.1. Ensaio de Tracção .....	57
3.3. ANÁLISE BIOLÓGICA .....	65
3.3.1. Testes Citotóxicos .....	65
3.3.2. Culturas Celulares .....	66
<b>4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>68</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>A.1</b>
ANEXO A – DIÂMETROS DAS FIBRAS .....	A.2
ANEXO B – ENSAIOS DE TRACÇÃO .....	A.3
Módulo de Young.....	A.3
Ensaio .....	A.4
Gráficos .....	A.5
ANEXO C – VELOCIDADE DE ROTAÇÃO DO ROLO .....	A.13

# ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIG 1 – ÁRVORE DOS BIOCERÂMICOS E SUAS APLICAÇÕES (DUBOK 2000). .....	6
FIG. 2 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DE VARRIMENTO, DE UM CIMENTO DE FOSFATO DE TETRACÁLCIO COM FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE NANOHIPOXIAPATITE À SUPERFÍCIE (XU ET AL. 2006). .....	7
FIG. 3 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DE UM CRISTAL DE UM CERÂMICO DE FOSFATO DE CÁLCIO (GSCHMEISSNER).....	9
FIG. 4 - IMAGEM GERADA POR COMPUTADOR DA ACTIVIDADE DOS OSTEOCLASTOS NO OSSO HUMANO (CARLSON). .....	10
FIG. 5 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA HIDROXIAPATITE, VISTA LATERAL(FUNG 2001). NA UNIDADE ESTRUTURAL ENCONTRAM-SE ÁTOMOS DE CA (CINZENTO), P (VERMELHO) E O (AZUL). .....	11
FIG. 6 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA HIDROXIAPATITE, PERSPECTIVA CAVALEIRA (FUNG 2001). .....	12
FIG. 7 – MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO COM COLORAÇÃO DE CRISTAIS DE FLUORAPATITE (GSCHMEISSNER). .....	13
FIG. 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA QUITINA E DO QUITOSANO. QUANDO O COMPLEXO X (UNIDADE N-ACETIL-GLUCOSAMINA) É SUPERIOR A 50% ESTAMOS NA PRESENÇA DE QUITINA. QUANDO O COMPLEXO Y (UNIDADE N-GLUCOSAMINA) É SUPERIOR A 50% ENTÃO ESTAMOS NA PRESENÇA DE QUITOSANO (KHOR AND LIM 2003). .....	20
FIG. 9 – SCAFFOLD PARA ENGENHARIA DE TECIDO DA CARTILAGEM (BRONZINO 2008). .....	25
FIG. 10 – REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM POR MIGRAÇÃO DE CONDROCITOS. A, SCAFFOLD DE PEG/PBT PRODUZIDO POR <i>POROGEN</i> <i>LEACHING</i> . B, SCAFFOLD DE PEG/PBT PRODUZIDO POR <i>BIOPLOTTER</i> (HOLLISTER 2005). .....	26
FIG. 11 – ESQUEMAS DE FUNCIONAMENTO DE ALGUMAS TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS (BRONZINO 2008). .....	26
FIG. 12 – MÉTODO SOL-GEL (CENTEXBEL). .....	27
FIG. 13 – ESQUEMA USUAL DO PROCESSO DE FIAÇÃO HÚMIDA (KNAUL ET AL. 1998). .....	31
FIG. 14 – SOLUÇÕES DE CS E HAP (5%, 10%, 15% E 20% DE HAP EM P/P). .....	35
FIG. 15 – ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DA MONTAGEM EXPERIMENTAL. ....	37
FIG. 16 – FOTOGRAFIA DA MONTAGEM EXPERIMENTAL. ....	38
FIG. 17 – FIBRAS DE CS + 15% HAP NO BANHO DE SECAGEM APÓS TEREM SIDO RETIRADAS DO ROLO DE TEFLON. ....	39
FIG. 18 – IMAGENS DOS MOLDES USADOS PARA PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS DE FIBRAS DE CS/HAP. ....	42
FIG. 19 – IMAGENS DO SCAFFOLD DE FIBRAS DE QUITOSANO COM 30% DE HIDROXIAPATITE. ....	43
FIG. 20– IMAGENS DA SECAGEM DAS FIBRAS AO AR SOB TENSÃO. ....	44
FIG. 21 – MÁQUINA DE TRACÇÃO UTILIZADA NOS ENSAIOS. ....	45
FIG. 22 – POÇO DE CULTURA COM UMA AMOSTRA DE SCAFFOLD DE FIBRAS DE CS COM 30% DE HAP, E COM MEIO DE CULTURA. ....	46
FIG. 23 - IMAGENS DOS GRÃOS DE HAP OBTIDAS POR TEM. ....	49
FIG. 24 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ1E (A) E CJ1M (B). ....	50
FIG. 25 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ2E (A) E CJ2M (B). ....	50
FIG. 26 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ3E (A) E CJ3M (B). ....	51
FIG. 27 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ4E (A) E CJ4M (B). ....	51
FIG. 28 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ5E (A) E CJ5M (B). ....	51
FIG. 29 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ6E (A) E CJ6M (B). ....	52
FIG. 30 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ7E (A) E CJ7M (B). ....	52
FIG. 31 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ8E (A) E CJ8M (B). ....	52
FIG. 32 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ9E (A) E CJ9M (B). ....	53
FIG. 33 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ10E (A) E CJ10M (B). ....	53
GRÁFICO 1 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS APÓS 30 MIN E APÓS 72H NO BANHO DE SECAGEM. ....	54
GRÁFICO 2 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS + 20% HAP APÓS 30 MIN E APÓS 72H NO BANHO DE SECAGEM. ....	54

GRÁFICO 3 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS E DE FIBRAS DE CS +20%HAP , APÓS 30 MIN NO BANHO DE SECAGEM. ....	55
GRÁFICO 4 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS E DE FIBRAS DE CS + 20% HAP, APÓS 72H NO BANHO DE SECAGEM. ....	55
GRÁFICO 5 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NO BANHO DE SECAGEM.....	57
GRÁFICO 6 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS , APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM. ....	58
GRÁFICO 7 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.....	58
GRÁFICO 8 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM. ....	58
GRÁFICO 9 – TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM. ....	61
GRÁFICO 10 – TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM. ....	61
GRÁFICO 11– TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.....	61
GRÁFICO 12– TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.....	62
GRÁFICO 13– MÓDULO DE YOUNG DAS FIBRAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D. ....	62
GRÁFICO 14– TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D. ....	63
GRÁFICO 15– A LONGAMENTO DE RUPTURA DAS FIBRAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D. ....	63
FIG. 34 – IMAGENS SEM DOS CONTROLOS CELULARES. ....	66
FIG. 35 – IMAGENS SEM DAS CULTURAS CELULARES REALIZADAS EM MATRIZES DE FIBRAS DE QUITOSANO.....	66
FIG. 36 – IMAGENS SEM DAS CULTURAS CELULARES REALIZADAS EM MATRIZES DE FIBRAS DE QUITOSANO COM 30% DE HIDROXIAPATITE (P/P). ....	67
FIG. 37 – IMAGEM SEM DAS CULTURAS CELULARES REALIZADAS EM MATRIZES DE FIBRAS DE QUITOSANO COM 50% DE HIDROXIAPATITE (P/P). ....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – CERÂMICOS DE FOSFATO DE CÁLCIO (BARBUCCI 2002).....	8
TABELA 2 – PROPRIEDADES FÍSICAS, MECÂNICAS E ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA HIDROXIAPATITE ( ADAPTADO DE (FARIA 2008)). .....	14
TABELA 3 – MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITE.....	16
TABELA 4 – ALGUNS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS E AS SUAS APLICAÇÕES (BRONZINO AND PARK 2003).....	19
TABELA 5 – CLASSIFICAÇÃO DAS FIBRAS DE CS E HAP PRODUZIDAS. ....	40
TABELA 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE CS E HA PRODUZIDOS.....	41
TABELA 7 – DIÂMETROS DAS FIBRAS COMPÓSITAS DE QUITOSANO E HIDROXIAPATITE. ....	56
TABELA 8 – MÓDULO DE YOUNG DAS FIBRAS COMPÓSITAS DE QUITOSANO E HIDROXIAPATITE. ....	59
TABELA 9 – TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS COMPÓSITAS DE QUITOSANO E HIDROXIAPATITE. ....	60
TABELA 10 – DENSIDADE ÓPTICA DAS AMOSTRAS DE SCAFFOLDS APÓS OS TESTES DE CITOTOXICIDADE. ....	65

## OBJECTIVOS

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação surge da necessidade de desenvolvimento de novas técnicas, materiais e produtos no campo da engenharia de tecidos. A contínua investigação das propriedades dos fosfatos de cálcio - mormente da hidroxiapatite - e do quitosano, tem permitido uma enorme progressão no que diz respeito às aplicações médicas.

As microfibras desenvolvidas no presente trabalho tiveram por objectivo a junção destes dois biomateriais, combinando as suas propriedades para a obtenção de um produto de elevada compatibilidade com o corpo humano. Pretende-se uma perfeita integração do cerâmico no polímero com consequente produção de um compósito estruturalmente viável *in vitro* e *in vivo*.

As técnicas de produção aplicadas foram escolhidas tendo em conta princípios tais como rapidez, facilidade de processos, segurança e alta qualidade do produto final.

Desta forma, os objectivos desta dissertação são os seguintes:

1. Obtenção de pós de nano-hidroxiapatite pelo método sol-gel.
2. Produção de fibras compósitas de quitosano e hidroxiapatite, com recurso à técnica de fiação húmida.
3. Caracterização mecânica e morfológica das fibras compósitas através de ensaios de tracção e microscopia electrónica de varrimento.
4. Produção de uma matriz tridimensional de fibras compósitas.
5. Caracterização das matrizes tridimensionais de fibras compósitas como implante a introduzir no organismo (estrutura física, comportamento biológico e viabilidade celular através de testes *in vitro*).

Este trabalho foi produzido nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, nomeadamente no Grupo de Engenharia de Tecidos do Departamento de Física e no Grupo de Polímeros e Materiais Mesomorfos do Departamento de Ciências dos Materiais.

# 1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

## 1.1. BIOMATERIAIS

O desenvolvimento de novos métodos e abordagens na resolução de problemas clínicos tem levado à procura de novos materiais para aplicações biomédicas. Nesse sentido, surge a definição de “biomaterial” que encontra um vasto número de interpretações nas áreas da ciência dos materiais e da medicina clínica. Pode-se definir biomaterial como um material sintético que é implantado no corpo com o intuito de substituir e/ou estabelecer um contacto íntimo com o tecido vivo e/ou satisfazer funcionalidades do organismo (Shi 2006, Vallet-Regi 2010, Bronzino and Park 2003) . Este tipo de material, que requer conhecimentos de diferentes áreas científicas, é diferente de um composto biológico, mas tem que reunir as características de bioactividade e composição que o tornem um substituto satisfatório. O que se pretende é uma interacção biológica adequada entre o material e o hospedeiro (Vallet-Regi 2010). Estes materiais têm que ser não tóxicos e compatíveis com os tecidos do corpo, isto é, não provocarem reacções biológicas adversas (Callister Jr. 2005).

### 1.1.1. Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais englobam um conjunto diverso de materiais que se podem classificar consoante a sua *composição química* e o seu *comportamento biológico*.

Atendendo à composição química podemos classificar os biomateriais como *metais*, *cerâmicos*, *polímeros* ou *compósitos*. Pelo comportamento biológico os biomateriais classificam-se de *bioinertes*, *biotolerados*, *bioactivos* ou *reabsorvíveis*.

#### Composição Química

I. Metais – Resultam de combinações de elementos metálicos. Possuem um largo número de electrões deslocalizados e apresentam uma estrutura cristalina ordenada. Exibem problemas de corrosão e toxicidade mas têm um óptimo comportamento mecânico, condutividade térmica e eléctrica. Não são transparentes à luz visível e são utilizados geralmente para aplicações estruturais (Dubok 2000, Callister Jr. 2005). Exemplos de aplicações: próteses, placas e parafusos ósseos, implantes dentários e agrafos (Bronzino and Park 2003).

- II. Cerâmicos – Podem ser obtidos com elevado grau de bioestabilidade, bioactividade e bioabsorbilidade. Materiais inorgânicos, constituídos por elementos metálicos e não metálicos (óxidos, nitrídeos, carbonídeos), revelam elevada dureza, grande resistência a altas temperaturas e elevada fragilidade. Engloba materiais como cimentos e vidros (Dubok 2000, Callister Jr. 2005). Podem apresentar alguns defeitos como porosidade excessiva, micro-rupturas, inclusões, variação da densidade e distribuição não homogénea de diferentes fases cristalinas (Barbucci 2002). Exemplos de aplicações: cabeça femural da prótese de anca e revestimentos de implantes dentários (Bronzino and Park 2003).
  
- III. Polímeros – Macromoléculas resultantes da junção repetida de unidades básicas – meros. Oferecem um inúmero conjunto de possibilidades dependendo da sua composição química e estrutura, biodegradabilidade, rácio hidrofílico/hidrofóbico. Baseados em carbono, hidrogénio e outros elementos não metálicos. Tipicamente possuem baixa densidade e elevada flexibilidade (Dubok 2000, Callister Jr. 2005). Exemplos de aplicações: Suturas, vasos sanguíneos, tecidos moles (Bronzino and Park 2003).
  
- IV. Compósitos – Materiais constituídos por mistura de biomateriais de diversos tipos em que normalmente um funciona como base – matriz – e os outros como reforços. Concebidos para possuírem as melhores características de cada um dos tipos de materiais envolvidos, oferecem uma enorme variedade de vantagens em comparação com os materiais homogéneos. Dependendo das combinações efectuadas conseguem-se diferentes propriedades. (Callister Jr. 2005, Bronzino and Park 2003). Exemplos de aplicações: Válvulas do coração, vasta gama de implantes dentários (Bronzino and Park 2003).

### **Comportamento Biológico**

- I. Bioinertes – materiais que não provocam reacção do organismo à presença de corpo estranho, portanto inertes, estabelecendo-se uma ligação directa ao tecido receptor (Gutierrez 2006, Williams 1999). Materiais: Tântalo, titânio, alumínio e óxidos de zircónio (Dubok 2000).
  
- II. Biotolerados – Moderadamente aceites pelo tecido receptor, implicam a produção de uma cápsula fibrosa pelo organismo, que envolve o material (Gutierrez 2006).
  
- III. Bioactivos – Materiais que estabelecem uma actividade biológica dinâmica com o tecido. Ligação bioquímica directa aos tecidos vivos, como por exemplo através de pontes químicas utilizando os iões cálcio e/ou fósforo, no caso dos fosfatos de cálcio (Gutierrez 2006, Williams 1999). Materiais: hidroxiapatite, fosfato tricálcico, quitosano (Dubok 2000).

- IV. Reabsorvíveis – Materiais que apresentam uma taxa de degradação gradual, através de mecanismos hidrolíticos ou por acção enzimática, com substituição posterior de tecido natural no local onde são implantados. Capazes de serem degradáveis, dissolvidos e metabolizados pelo organismo, sem toxicidade e rejeição (Gutierrez 2006, Bronzino and Park 2003, Williams 1999). Materiais: Fosfato tricálcico, hidroxiapatite porosa, sais de fosfato de cálcio, poliuretanos, quitosano (Dubok 2000).

Os biomateriais englobam um conjunto heterogéneo de compostos naturais ou sintéticos, inorgânicos e orgânicos. Dependendo da área de intervenção, vários materiais podem ser construídos e sintetizados com propriedades específicas para cada zona de aplicação (Wise 2000). Neste trabalho procurar-se-á especificar a importância da aplicação dos biomateriais no osso.

### 1.1.2. Materiais Osteogénicos

São biomateriais que contêm células a partir das quais se dá formação óssea, isto é, são células com capacidade de diferenciação em tecido ósseo (Williams 1999). Este tipo de células encontra-se no perióstio, na medula óssea e tecidos moles peritrabeculares, e derivam da diferenciação de células estaminais do tecido conjuntivo.

Dentro destes materiais podem-se destacar o *osso esponjoso autólogo*, *aspirado de medula óssea*, *osso cortical autólogo* e o *osso autólogo vascularizado*.

- I. Osso esponjoso autólogo – Revela um alto grau de compatibilidade com o hospedeiro visto ser recolhido usualmente do osso ilíaco ou da tíbia proximal do próprio indivíduo. Constituído por uma matriz osteocondutora de minerais, cartilagem e proteínas, com inclusão de proteínas osteoindutoras e células osteogénicas. Sem problemas de rejeição do implante ou transmissão de doenças. Apresenta uma taxa de morbilidade relacionada que ronda os 10%. São conhecidas complicações como hérnias, perdas hemáticas, lesões nervosas, hematomas e infecção pós-operatória.
- II. Aspirado de medula óssea – Colhido por punção da crista ilíaca e centrifugado para concentrar as células estaminais (existem na medula na proporção 1 por 50000 células nucleadas) aumentando a sua eficácia. Inicialmente utilizado no tratamento de atrasos de consolidação, injectado no foco da fractura. Revela capacidade osteogénica que lhe permite alargar a sua aplicação a tratamento de quistos ósseos. Integra fibrina, formando uma matriz biológica degradável.

- III. Osso cortical autólogo – Possui elevada resistência mecânica que permite a sua utilização em locais de grande suporte de carga, como por exemplo a coluna vertebral. Apresenta porosidade reduzida, o que se traduz numa revascularização demorada, e contém progenitores osteoblásticos e células hematopoiéticas em número reduzido. As suas qualidades são biologicamente inferiores às do osso esponjoso.
- IV. Osso autólogo vascularizado - Obriga ao recurso à microcirurgia pois este tipo de enxertos é colhido com o seu pedículo vascular para ser reanostomosado na zona de aplicação. O suprimento vascular não é praticamente interrompido permitindo uma maior viabilidade das células ósseas, necrose do enxerto praticamente nula e uma rápida incorporação. Aplica-se maioritariamente em zonas ósseas com defeitos superiores a 12cm, ou em zonas irradiadas ou a ser submetidas a quimioterapia pós operatória (Gutierrez 2006).

### 1.1.3. Materiais Osteocondutores

São materiais que passivamente permitem o contínuo crescimento do osso, e o revestimento de uma superfície, utilizando células progenitoras de osso pré-existente (Williams 1999). Pertencem a este grupo materiais como os *cerâmicos* e o *colagénio*.

- I. Materiais Cerâmicos – Para além das propriedades destacadas anteriormente na secção “Biomateriais / Composição Química”, salientam-se ainda a inexistência de qualquer actividade osteogénica ou osteoindutiva, sendo possível produzir materiais com uma composição muito semelhante à matriz óssea inorgânica. Os materiais cerâmicos podem-se ainda classificar em materiais à base de *sulfatos de cálcio*, *vidros*, ou à *base de fosfato de cálcio*. Estes tipo de materiais será aprofundado no capítulo “Biocerâmicos”.
- II. Colagénio – É a proteína dominante na matriz óssea extracelular. Tem uma estrutura adequada à regeneração óssea, constituindo-se um bom meio de transporte para outros enxertos sintéticos assim como proteínas morfogénicas do osso (*BMP*) e células osteogénicas. Apresenta resistência estrutural mínima e possui risco potencial de imunogenicidade.

#### 1.1.4. Materiais Osteoindutores

Tipo de materiais que induzem a osteogénese (Williams 1999). Este grupo de materiais é composto pelos *aloenxertos*, *matrizes ósseas desmineralizadas*, *xenoenxertos* e *factores de crescimento ósseo*.

- I. Aloenxerto – Material proveniente de um dador da mesma espécie. Desencadeia resposta inflamatória e possui alguns riscos de transmissão de doenças assim como inexistência de capacidade osteogénica.
- II. Matriz óssea desmineralizada – Obtem-se pela colocação de um osso em meio ácido, retirando-lhe a maior parte da componente mineral, retendo o colagénio e outras proteínas tais como os factores de crescimento. Elimina-se o risco de transmissão de doenças infecciosas, diminuindo-se contudo a resistência estrutural. O potencial de osteoindução depende de factores como o tipo de solução, tempo de desmineralização, tamanho das partículas, temperaturas e métodos de esterilização utilizados.
- III. Xenoenxerto – Enxertos provenientes de outras espécies animais, pelo que é necessário tratamento antigénico de deslipidização e desproteínização, reduzindo-se assim as capacidades osteoindutoras. Geralmente impregna-se este tipo de enxerto com células da medula óssea humana.
- IV. Factores de crescimento ósseo - Polipeptídeos específicos para determinados tecidos, que se ligam a receptores de superfície, estimulando a actividade celular. Actuam no crescimento do esqueleto, consolidação de fracturas, reparação de cartilagem articular e osteoporose. Na matriz óssea encontram-se diversos factores de crescimento como: BMP, TGF-Beta, PDGF, IGF-I e II, FGCT, entre outros.

## 1.2. BIOCERÂMICOS

Como referido no capítulo “Biomateriais”, os cerâmicos são materiais não metálicos, policristalinos consolidados através de um processo de sinterização (Barbucci 2002). São refractários e incluem os silicatos, óxidos metálicos, carbonetos e vários hidretos refractários, sulfídeos e selenetos. O uso de cerâmicos tem sido limitado muito devido à fragilidade inerente, susceptibilidade para micro-rupturas, baixa resistência à tracção e baixa tensão de ruptura (Dubok 2000, Bronzino and Park 2003).

Os materiais cerâmicos que encaram o organismo como campo de aplicação são, então, designados de *biocerâmicos*. Estes materiais biocompatíveis são usados principalmente com fins ortopédicos e dentários, mas também em aplicações vasculares, nomeadamente em válvulas auriculares e ventriculares, assim como componentes de reforço em implantes compósitos (Bronzino and Park 2003). Na figura 1 poderão ser encontrados vários biocerâmicos com as respectivas aplicações.

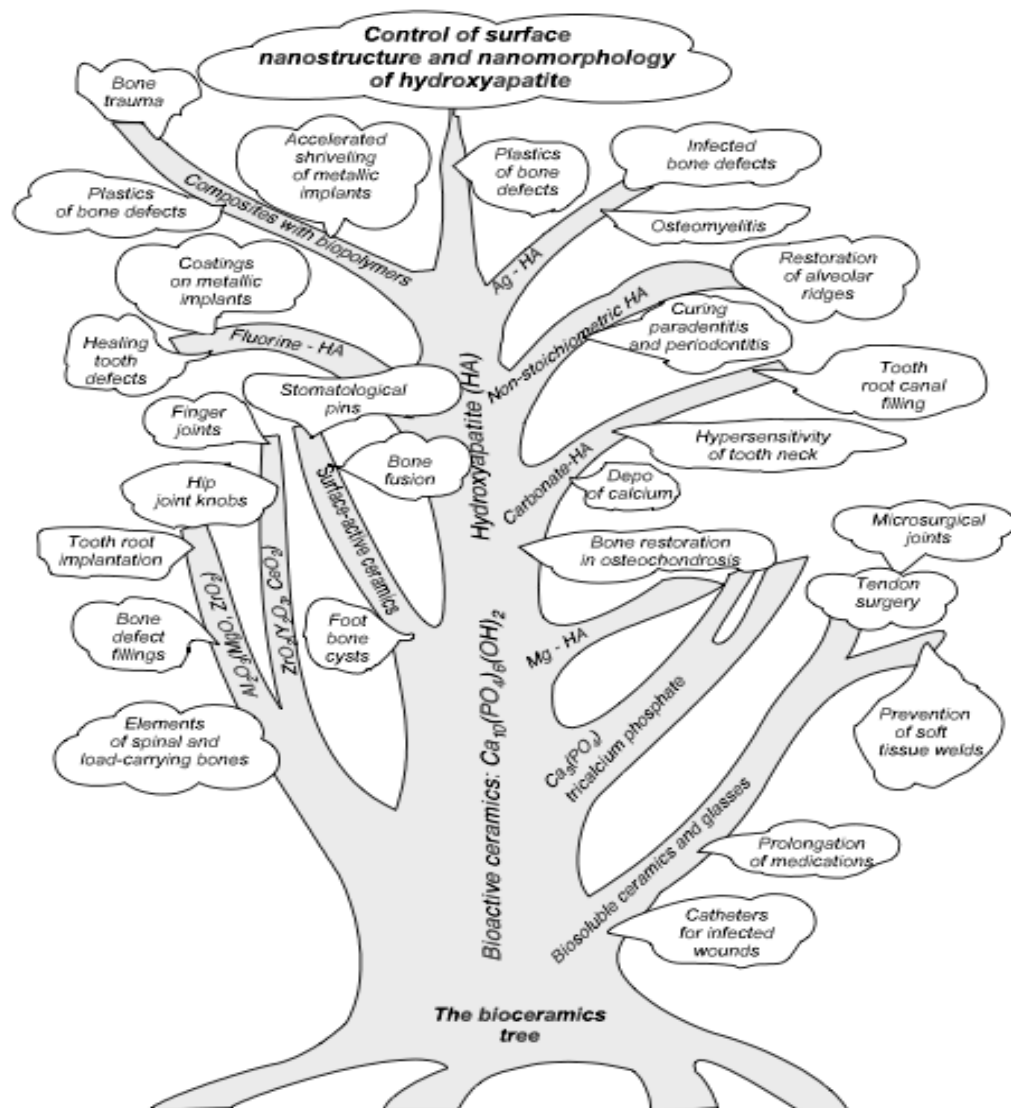


FIG 1 – ÁRVORE DOS BIOCERÂMICOS E SUAS APLICAÇÕES (DUBOK 2000).

### 1.2.1. Classes de Biocerâmicos

Podemos dividir os biocerâmicos em três grandes grupos: bioinertes ou não absorvíveis, biodegradáveis ou reabsorvíveis e bioativos ou de superfície reactiva.

- I. Bioinertes ou não absorvíveis – Mantêm as propriedades mecânicas e físicas no interior do hospedeiro, exibindo as propriedades dos biocerâmicos supra citadas. Fazem parte deste grupo os cerâmicos de óxidos de alumínio ( $Al_2O_3$ ) porosos e não porosos (densos), de zircónio ( $ZrO_2$ ), de aluminatos de cálcio, de carbono pirolítico. Tipicamente usados para implantes de suporte como parafusos ósseos ou cabeças femurais. Podem também ser usados para produção de tubos de ventilação, aparelhos de esterilização e sistemas de libertação de drogas.
- II. Biodegradáveis ou reabsorvíveis – Materiais que se degradam após a implantação no hospedeiro, e que são substituídos por tecido endogénico. A degradação é variável dependendo da composição do cerâmico. Deste grupo fazem parte o biocoral e os fosfatos de cálcio, como por exemplo a HAp, TCP (figura 2), ALCAP, ZCAP, ZSCAP.

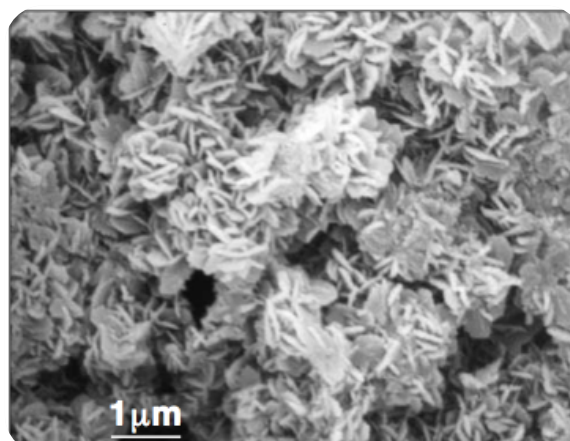


FIG. 2 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DE VARRIMENTO, DE UM CIMENTO DE FOSFATO DE TETRACÁLCIO COM FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE NANOHIĐROXIAPATITE À SUPERFÍCIE (XU ET AL. 2006).

- III. Bioativos ou de superfície reactiva – Cerâmicos que formam um forte ligação com o tecido do hospedeiro. São exemplos os vidros não porosos, o biovidro e a hidroxiapatite. São usados normalmente como revestimentos de próteses metálicas, que promove um fortalecimento da ligação entre a prótese e os tecidos adjacentes (Bronzino and Park 2003).

### 1.2.2. Fosfatos de Cálcio

O osso natural, cuja fase inorgânica é reconhecida como apatite natural, é formado no corpo através de um processo de biomineralização onde estão presentes células e proteínas. Esta mineralização, que envolve íons de fosfato e de cálcio, confere à apatite do osso natural o estatuto de fosfato de cálcio básico.

Os fosfatos de cálcio têm vindo a ser utilizados como osso artificial sob diversas formas de implantes e revestimentos sólidos e porosos. Como visto anteriormente, a biocompatibilidade que este tipo de compostos oferece, faz com que tenham grande interesse em aplicações de âmbito biológico, ortopédico e dentário.

TABELA 1 – CERÂMICOS DE FOSFATO DE CÁLCIO (BARBUCCI 2002).

Fosfatos de Cálcio		
Nome – Sigla	Fórmula Química	Razão Molar Ca/P
Metafosfato de Cálcio – MCPM	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5
Fosfato Monocálcico Monohidratado – MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
Fosfato Heptacálcico – HCP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Pirofosfato de Cálcio Dihidratado – CPPD	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Pirofosfato de Cálcio – CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Fosfato Dicálcico – DCP	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Fosfato Octacálcico – OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato Tricálcico - TCP	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2$	1,50
Hidroxiapatite – HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato Tetracálcico – TTCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0

Dependendo da concentração dos íons de cálcio e fosfato, podem ser obtidos diferentes tipos de fosfatos de cálcio, tal como apresentado na tabela 1. Estes cerâmicos são distinguidos pelo valor da razão molar Ca/P que se encontra na sua composição. Este tipo de cerâmico, envolve principalmente o carbonato de cálcio e o ácido fosfórico na sua síntese (Bronzino and Park 2003).

Os fosfatos de cálcio podem ser formados em ambientes aquosos e/ou biológicos e em ambientes secos. As reacções que promovem a formação de fosfatos de cálcio dependem directamente da natureza química e estrutura dos compostos precursores assim como das condições circundantes. O meio onde o fosfato de cálcio (figura 3) é formado intervém de tal forma na sua síntese que, um mesmo fosfato de cálcio pode ser criado por diferentes reacções e diferentes precursores. Enquanto em ambientes aquosos, os compostos são influenciados pelo equilíbrio simultâneo entre ácido e base, relativamente ao ácido fosfórico, em ambientes secos e aquecidos as transformações ocorrem devido à perda de água resultante da condensação molecular, o que leva a formação de CPP e de polifosfatos.

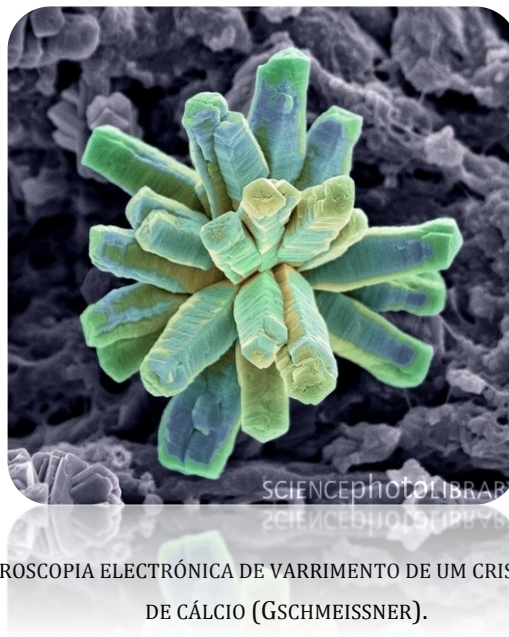


FIG. 3 – IMAGEM OBTIDA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO DE UM CRISTAL DE UM CERÂMICO DE FOSFATO DE CÁLCIO (GSCHMEISSNER).

À temperatura corporal só existem duas fases estáveis em contacto com os fluidos do organismo. A um  $\text{pH} < 4.2$ , a fase estável é o  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , e a um  $\text{pH} > 4.2$ , a fase estável é a HAp. A altas temperaturas formam-se outras fases como por exemplo o TCP e o TTCP (Barbucci 2002).

Tendo em conta que na interacção com o corpo humano, os fosfatos de cálcio encontram condições como temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e fluidos com  $\text{pH}$  próximo dos 7,0, estudar-se-á neste trabalho a fase dominante nestas condições, a hidroxiapatite.

### Biodegradação dos fosfatos de cálcio

A biodegradação de um material está condicionada pela sua composição química e pelo local onde é implantado. A degradação de biomateriais de enxerto ósseo, nomeadamente com base em cerâmicos de fosfato de cálcio, pode realizar-se através de um processo químico de dissolução ou ocorrer como consequência da actividade celular.

Factores como a capacidade de adsorver proteínas à sua superfície, o tamanho e a forma dos cristais, a rugosidade, o método e a temperatura de sinterização, assim como os mecanismos de esterilização a que os materiais estiverem sujeitos influenciam os processos de interacção com o organismo.

O ambiente ácido causado, ou não, pela actividade celular, provoca a dissolução parcial do fosfato de cálcio. Os iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , que são libertados para o meio devido à dissolução da HAp, aumentam a saturação dos fluidos biológicos (proteínas e electrólitos), o que leva à precipitação de uma apatite carbonatada, semelhante à do tecido ósseo (Abe, Dusek and Kobayashi 2010). A apatite carbonatada, que se forma na superfície dos biocerâmicos à base de CaP, facilita a adesão de proteínas do meio ao implante, proporcionando a proliferação e diferenciação das células osteogénicas e conduzindo à produção de uma matriz extracelular biomineralizada.

Num outro processo, a biodegradação verificada pela actividade celular pode envolver monócitos, macrófagos e células multinucleadas, que eliminam partículas que se libertam da superfície dos cerâmicos, através do processo de fagocitose. Os osteoclastos surgem também como um interveniente importante visto que desempenham um papel activo na fagocitose de cerâmicos de CaP para além de possuírem capacidade e actividade de reabsorção (figura 4).

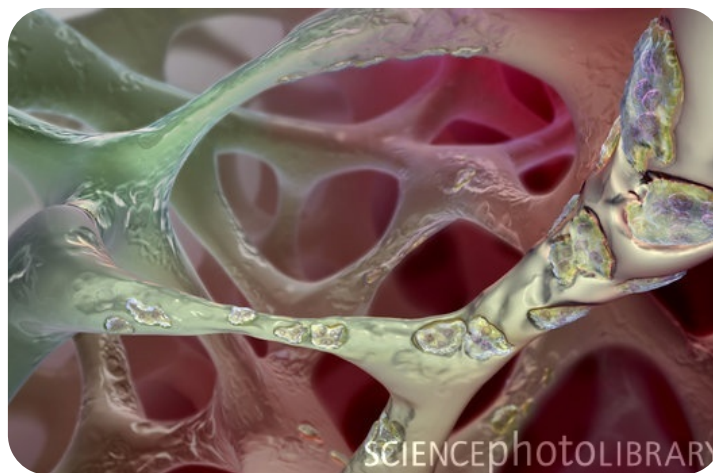


FIG. 4 - IMAGEM GERADA POR COMPUTADOR DA ACTIVIDADE DOS OSTEOCLASTOS NO OSSO HUMANO (CARLSON).

A capacidade de reabsorção destes materiais é também grandemente afectada pela sua solubilidade. Biocerâmicos como o TCP e HAp revelam solubilidades diferentes que se traduzem em processos de degradação diferentes. O TCP é degradado através de uma dissolução química e não uma actividade osteoclástica como no caso da HAp. A alta solubilidade do TCP provoca a libertação de iões de cálcio para o meio extracelular, inibindo a reabsorção osteoclástica. Por outro lado, a menor solubilidade da HAp traduz-se numa maior actividade dos osteoclastos, facultando a adesão entre o implante e o organismo (Bronzino 2008).

### 1.3. HIDROXIAPATITE

Dentro dos biomateriais, os cerâmicos de fosfato de cálcio evidenciam-se como aqueles que mais se assemelham à composição do osso humano. Dentro deste tipo de cerâmicos encontra-se a hidroxiapatite, que na sua vertente natural, representa 65% da fase mineral do osso, encontrando-se na forma de um cristal plano com 20 a 80 nm de largura e 2 a 5 nm de espessura (Faria 2008). A HAp presente nos ossos e dentes constitui 90% do cálcio e 80% do fósforo total existente no corpo humano. Este cerâmico de fosfato de cálcio cristalino pode ser produzido sinteticamente.

A HAp caracteriza-se pelo seu perfil de biocerâmico biocompatível e bioactivo, estando intimamente ligado à reparação de tecido humano calcificado que tenha algum tipo de lesão (Vital et al. 2006).

#### 1.3.1. Estrutura Tridimensional e Composição Química

A hidroxiapatite faz parte do grupo das apatites, juntamente com a fluorapatite, a clorapatite, entre outros, sendo que o prefixo evidencia a presença de concentrações elevadas de, por exemplo, flúor, cloro ou grupos hidróxilo. As apatites são minerais isomórficos hexagonais, ou seja, o seu arranjo molecular é semelhante embora sejam constituídos por diferentes elementos, e cuja unidade básica estrutural é definido como rede. O cristal é formado pelas repetições tridimensionais da rede.

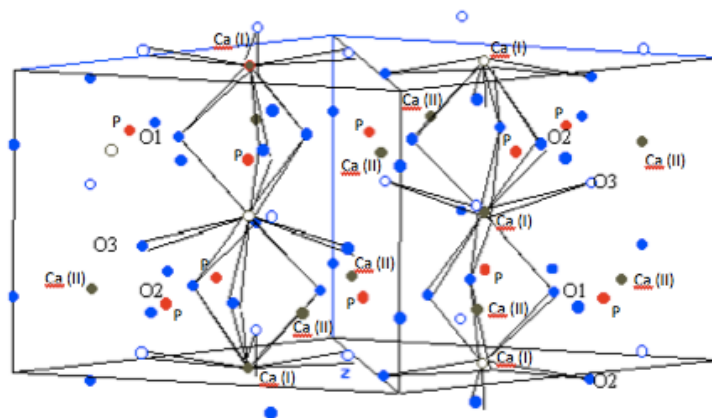


FIG. 5 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA HIDROXIAPATITE, VISTA LATERAL (FUNG 2001). NA UNIDADE ESTRUTURAL ENCONTRAM-SE ÁTOMOS DE CA (CINZENTO), P (VERMELHO) E O (AZUL).

A HAp é constituída por átomos de cálcio, fósforo, oxigénio e hidrogénio, seguindo a fórmula química das apatites  $A_{10}(BO_4)_6C_2$ , em que  $A = Ca$  (cálcio),  $B = P$  (fósforo) e  $C = OH$  (grupo hidróxilo), resultando na fórmula final  $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ . Quando sinteticamente produzida, a HAp tem uma estrutura hexagonal (no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria), pertencendo ao grupo espacial  $P6_3/m$ , com dimensões  $a=9,432 \text{ \AA}$ ,  $c=6,875 \text{ \AA}$ . É composta por duas células unitárias

prismáticas triangulares, como descrito na figura 5 e figura 6, e possui dois íões de *Ca* cristalograficamente independentes em cada célula unitária, num total de dez íões de cálcio em que quatro são do tipo I e seis do tipo II.

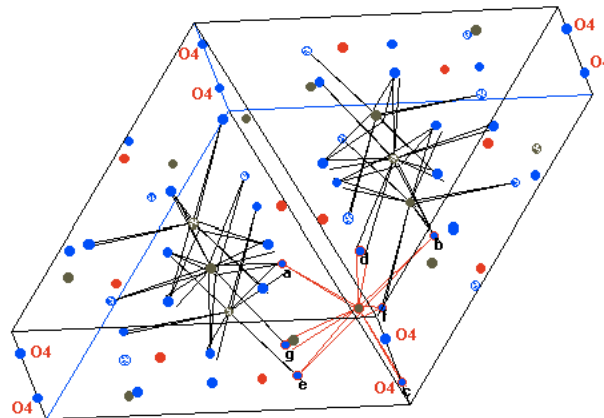


FIG. 6 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA HIDROXIAPATITE, PERSPECTIVA CAVALEIRA (FUNG 2001).

O íão Ca(I), alinhado em coluna com os restantes do mesmo tipo, é rodeado de seis átomos de oxigénio (*O*) que pertencem ao grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ) e ao grupo hidróxilo, formando com estes um octaedro.

O íão Ca(II) forma um triângulo normal ao eixo, que no seu conjunto podem rodar mutuamente  $60^\circ$  entre si. No grupo fosfato, quatro átomos de *O* rodeiam o átomo de *P*, formando um tetraedro com uma ligeira distorção.

Os íões de Ca(I) possuem 6 oxigénios distanciados de 2,4 Å enquanto o íão Ca(II) possui três oxigénios distanciados de 2,3 Å, dois distanciados de 2,5 Å e um de 2,2 Å.

Os átomos de oxigénio dos grupos hidróxilo estão situados 0,9 Å abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H (Araujo 2008).

Em suma, pode afirmar-se que a hidroxiapatite é uma matriz de aniões  $\text{PO}_4^{3-}$  com seis íões  $\text{Ca}^{2+}$  que formam dois triângulos equiláteros centrados no eixo de rotação helicoidal. Os grupos  $\text{OH}^-$  apresentam-se no centro dos triângulos equiláteros (Faria 2008).

### 1.3.2. Propriedades Físicas, Mecânicas, Químicas e Cristalográficas

A estrutura cristalográfica da HAp define-se por dois grupos de fosfato compactados que formam dois tipos de túnel paralelos ao eixo central no qual se encontram os íões  $\text{Ca}^{2+}$ . No interior destes canais ocorre a distinção entre a forma hexagonal e monoclinica (provocada por deformações na rede). Estes túneis conferem às apatites a capacidade de trocas de íões e possibilitam a captação

de certos iões como  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  que conferem às apatites propriedades idênticas às dos zeólitos. Esta característica de grande número de substituições, que se revela nas apatites, não provoca contudo alterações na estequiometria, traduzindo-se numa estrutura cristalográfica praticamente inalterada.

A HAp segue o mesmo tipo de comportamento e consegue alojar um grande número de substituições e defeitos, não sendo conhecidas consequências a nível biológico. No entanto, substituições como chumbo ( $\text{Pb}^{2+}$ ), cádmio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ), cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da hidroxiapatite (Araujo 2008).

No corpo humano a hidroxiapatite presente não respeita a estequiometria, composição, propriedades físicas e mecânicas da hidroxiapatite pura. A HAp do corpo tem a particularidade de ter grande afinidade para a substituição de iões, o que se traduz geralmente numa deficiência em cálcio, não respeitando o coeficiente  $\text{Ca/P}=1,67$  da HAp pura, e apresentando-se frequentemente carbonatada.



FIG. 7 – MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO COM COLORAÇÃO DE CRISTAIS DE FLUORAPATITE (GSCHMEISSNER).

A substituição do ião Flúor ( $\text{F}^-$ ) pelo grupo  $\text{OH}^-$  melhora as propriedades físicas, químicas e biológicas da HAp como por exemplo o aumento da cristalinidade, aumento do tamanho do cristal com diminuição da tensão e reforço da estabilidade estrutural. Na figura 7 podem-se observar cristais de fluorapatite pura.

A substituição do ião carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) em dois locais, no grupo hidróxilo ou no grupo fosfato, provoca normalmente um decréscimo na cristalinidade e um aumento da solubilidade da apatite (Shi 2006).

O facto deste biocerâmico ter na sua constituição química a presença maioritária de iões de cálcio e fosfato torna a afinidade entre a HAp e o corpo maior, uma vez que estes iões participam activamente no equilíbrio iónico entre o fluido biológico e o cerâmico (Araujo 2008).

Na tabela 2 encontram-se resumidamente as propriedades físicas, mecânicas, bem como a estrutura cristalográfica da HAp.

TABELA 2 – PROPRIEDADES FÍSICAS, MECÂNICAS E ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DA HIDROXIAPATITE ( ADAPTADO DE (FARIA 2008)).

Propriedades Físicas e Mecânicas			
Densidade	3,16 g/cm <sup>3</sup>		
Dureza	3450 MPa		
Ponto de fusão	1660 °C		
Coeficiente de expansão térmica	(11-15) x 10 <sup>-6</sup> K		
Módulo de Young	70-90 GPa		
Tensão de Ruptura	50-110 MPa		
Resistência à Tração	120 MPa		
Resistência à compressão	430 MPa		
Estrutura Cristalográfica			
Massa Molecular (M)	1004,8		
Estrutura do cristal	Hexagonal		
Grupo Espacial	P6 <sub>3</sub> /m		
Célula unitária	a (Å): 9,4180	b (Å): 9,4180	c (Å): 6,8840
	α (°): 90	β (°): 90	γ (°): 120
Volume da célula (10 <sup>6</sup> pm <sup>3</sup> )	528,80		

### 1.3.3. Propriedades da Hidroxiapatite como Biomaterial

A hidroxiapatite revela-se um biomaterial de muito interesse para aplicações ósseas. A semelhança química com a fase mineral do osso, a alta taxa de osteointegração e as propriedades mecânicas semelhantes às de tecidos como a dentina e o esmalte, tornam este biocerâmico apropriado para aplicações de natureza biomédica (Kim and Kumta 2004, Faria 2008, Araujo 2008).

Para além disto, a HAp é segura do ponto de vista citotóxico, não revelando ser alergénica, cancerígena ou, local ou sistemicamente tóxica. A sua utilização não implica resposta a corpos estranhos ou inflamatória, mostrando ainda uma aparente habilidade em ligar-se ao tecido hospedeiro. A alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas tornam-na num grande suporte

para a acção prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos (Araujo 2008).

O mecanismo de formação de uma ligação química directa entre a HAp densa e o osso pode descrever-se pelas seguintes etapas:

1. Aparecimento da matriz óssea, composta por osteoblastos diferenciados, na superfície deste cerâmico, formando uma zona amorfa de 3-5  $\mu\text{m}$  de espessura, com alta concentração de iões fosfato e cálcio;
2. Aparecimento de feixes de colagénio que ligam a zona amorfa às células ósseas;
3. Formação de cristais da forma mineral óssea na região amorfa.
4. Maturação celular e diminuição da área de ligação para uma espessura entre 0,05-0,2  $\mu\text{m}$ .
5. O osso vivo une-se ao implante através de uma fina camada celular epitelial (Dubok 2000).

A possibilidade de se produzirem blocos porosos de HAp, com controlo do tamanho de poro, permite obter biomateriais que funcionem como suporte à formação vascular e que levem à migração e proliferação de osteoblastos (Vital et al. 2006).

As características supra referidas tornam viável a utilização da hidroxiapatite do ponto de vista clínico, em aplicações de reparação de defeitos ósseos, regeneração de tecidos, equipamentos percutâneos como *stents* revestidos de HAp, na reconstrução maxilofacial e revestimentos de implantes ortopédicos e dentários (Kim and Kumta 2004).

#### 1.3.4. Resumo dos Métodos de Produção de Hidroxiapatite

Com a crescente utilização da hidroxiapatite no campo clínico surgiu também a necessidade de novas formas de produção deste biocerâmico.

Actualmente existem diversas técnicas de produção da HAp, distinguindo-se métodos por “via seca” e métodos por “via aquosa/húmida”. De entre os métodos por “via seca” destacam-se reacções de estado sólido, síntese mecanoquímica e preparação por combustão, enquanto as técnicas por “via aquosa/húmida” englobam a precipitação de soluções coloidais aquosas, a deposição electroquímica, os procedimentos de sol-gel, a síntese hidrotérmica, a hidrólise e a emulsão ou micro-emulsão.

Os métodos por “via seca” caracterizam-se pela mistura dos compostos no estado sólido, altas temperaturas de sinterização, tempos de envelhecimento e longos tempos de tratamento a altas temperaturas. Os métodos por “via aquosa/húmida”, por sua vez, caracterizam-se pela mistura de soluções aquosas, uso de técnicas de precipitação química e hidrólise de fosfatos de cálcio. Utilizando esta via produz-se HAp mais reactiva quimicamente, com área superficial superior e menor tamanho de partículas. Por outro lado podem-se obter pós não estequiométricos,

contaminados com outro tipo de iões como carbonetos, fosfatos de hidrogénio, potássio, sódio e nitratos que levam à produção de hidroxiapatites defeituosas (Shi 2006). Os métodos por “via aquosa” são usados para produção de pós cristalinos de HAp e outros pós de cálcio e fosfato não cristalinos.

O grande interesse neste biomaterial levou também a uma grande exploração de técnicas de deposição dentro das quais se podem destacar o dip-coating, imersão, deposição electroforética, deposição electrolítica, pressão isostática a quente, bombardeamento de feixe iónico, laser pulsado, biomimética e a projecção térmica (Faria 2008).

Na tabela 3 caracterizam-se, sucintamente, algumas técnicas de produção de hidroxiapatite.

TABELA 3 – MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITE.

Métodos de Produção da Hidroxiapatite		
Método	Características	Referências
<b>Reacções de estado sólido</b>	<p>Enquadra-se nos métodos de produção por “via-seca”</p> <p>Os compostos são moídos, misturados, comprimidos e sinterizados a temperaturas superiores a 950°C.</p> <p>Elevado tempo de tratamento a altas temperaturas.</p> <p>É sintetizada HAp cristalina respeitando a estequiometria exacta.</p>	(Shi 2006)
<b>Reacções hidrotérmicas</b>	<p>Reacção heterogénea com solventes aquosos ou mineralizados.</p> <p>Elevadas temperaturas e pressões para dissolver e recristalizar os materiais.</p> <p>Elevado grau de cristalinidade.</p> <p>Razão cálcio/fosfato aproximada do valor estequiométrico.</p> <p>Frequentemente obtêm-se precursores intermediários como o <math>\beta</math>-TCP e o <math>\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{O}</math>.</p>	(Shi 2006)
<b>Precipitação</b>	<p>Reacções entre ácidos, como o <math>\text{H}_3\text{PO}_4</math>, e soluções alcalinas, como o <math>\text{Ca}(\text{OH})_2</math>.</p> <p>Temperaturas de processamento baixas (entre a temperatura ambiente de 24°C e a temperatura de ebulição de 95°C-100°C).</p> <p>Cristais à escala micro/nanométrica e com diferentes formas ( laminada, agulha, cilíndrica...)</p> <p>Formação de apatites com deficiência em cálcio, com concentrações de cálcio ajustáveis e com substituições controláveis nos produtos.</p> <p>Cristalinidade dependente das condições de processamento como a</p>	(Shi 2006)

	<p>concentração dos reagentes e pH envolvido.</p> <p>Pós de HAp usualmente não estequiométricos e com baixo grau de cristalinidade.</p>	
<b>Mecanoquímica</b>	<p>Os reagentes são misturados num recipiente nas proporções estequiométricas. Partículas dos pós dos reagentes são periodicamente encapsuladas durante a mistura. Quando colidem causam fractura, soldadura a frio e geram uma grande densidade de defeitos. Cria-se uma interacção química entre os sólidos com interacções a nível atómico.</p> <p>Com o aumento do tempo de mistura cria-se um maior número de interacções moleculares entre os reagentes. Isto provoca uma diminuição do tamanho das partículas.</p> <p>Ocorre à temperatura ambiente embora possam ser atingidas temperaturas elevadas nas zonas de colisão entre pós e com as paredes do recipiente.</p> <p>Pode ser obtido uma grande variedade de produtos dependendo da técnica, materiais usados, tempo e velocidade de mistura.</p>	(Salas 2006)
<b>Emulsão</b>	<p>Método que permite obter partículas de tamanho nanométrico, com aglomeração mínima.</p> <p>Solução transparente termodinamicamente estável resultante da adição de duas soluções imiscíveis estabilizadas com um surfactante.</p> <p>Necessária dispersão sob agitação e adição de um surfactante para controlo da tensão interfacial. Formação de micelas com a dispersão da solução aquosa, envolta pelo surfactante que a estabiliza na fase não aquosa. O surfactante actua como um microreactor no qual as reacções são conduzidas.</p> <p>Necessário ajuste de pH, controlo do tempo de envelhecimento e temperatura para obtenção de HAp pura.</p>	(Bose 2003)
<b>Sol-Gel</b>	<p>Método de reacção química que se baseia na gelificação de uma suspensão coloidal.</p> <p>Existem várias formas de utilização desta técnica sendo que as mais recentes não necessitam de valores elevados de pH ou de temperatura de sinterização.</p> <p>Elevada homogenização das misturas moleculares envolvidas.</p> <p>Elevado grau de cristalinidade da HAp.</p>	(Wang et al. 2005, Eshtiagh-Hosseini, Housaindokht and Chahkandi 2007, Liu et al. 2002)

## 1.4. BIOPOLÍMEROS

Os polímeros têm vindo a ser largamente utilizados em material médico descartável, materiais protéticos e dentários, implantes, aparelhos extra corporais, encapsulantes, sistemas poliméricos de libertação de drogas e produtos de engenharia de tecidos. Em comparação com os cerâmicos e metais, os biomateriais poliméricos são de mais fácil manufactura em vários formatos, mais fáceis num segundo processamento, com um custo razoável e com grande variabilidade das propriedades físicas e mecânicas (Bronzino and Park 2003).

### 1.4.1. Classes de Biopolímeros

Tal como nos restantes biomateriais, a biocompatibilidade e o desempenho em contacto com os fluidos biológicos são duas características importantes para a aplicação de polímeros na área médica. Assim, os biopolímeros podem classificar-se como *não degradáveis* ou *biodegradáveis*.

- I. Não degradáveis – Polímeros em que é requerida a manutenção das suas propriedades durante o seu período de aplicação, em ambientes agressivos como o corpo humano. Apresentam ligações químicas estáveis na sua estrutura constituída por ligações carbono-carbono ou silício-oxigénio. Encontram-se neste agrupamento polímeros como o polietileno de ultra elevado peso molecular (UHMWPE), usado em ortopedia principalmente em articulações, o polimetacrilato de metilo (PMMA), polimerizado no local para formar cimento ósseo, o politetrafluoretileno (PTFE) ou vulgarmente conhecido como Teflon, aplicado em enxertos vasculares, e o polidimetilsiloxano (PDMS), usado para implantes de tecidos moles.
- II. Biodegradáveis – Polímeros que pela sua degradação oferecem dois tipos de vantagens: a eliminação da necessidade de uma intervenção cirúrgica para retirar o implante depois de terminada a sua acção; possibilidade de direccionar a regeneração dos tecidos através da degradação do implante. Neste grupo de polímeros encontram-se a maioria dos poliésteres como os ácidos poliláctico e poliglicólico e seus copolímeros (Barbucci 2002).

Outra classificação possível para os polímeros diz respeito à sua origem, sendo possível classificá-los como sendo de *origem natural* ou *sintética*.

Os polímeros naturais ocorrem na natureza durante os ciclos de crescimento dos organismos. A sua síntese envolve normalmente a catálise enzimática e o crescimento de cadeias poliméricas através de reacções de polimerização de monómeros. Alguns exemplos deste tipo de polímeros são os polissacarídeos (como por exemplo a celulose e a quitina/quitosano) e o colagénio.

Os polímeros sintéticos são produzidos artificialmente através de reacções de polimerização em cadeia ou por passos. Incluem-se neste grupo os poliésteres alifáticos, os polianidridos, as poliamidas e os poliuretanos.

TABELA 4 – ALGUNS BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS E AS SUAS APLICAÇÕES (BRONZINO AND PARK 2003).

Polímeros	Aplicações
PVC	Bolsas de solução e sangue, embalagens cirúrgicas, aparelhos de diálise, cateteres.
PE	Garrafas farmacêuticas, cateteres, bolsas, recipientes flexíveis, implantes ortopédicos.
PP	Seringas descartáveis, membranas oxigenadoras do sangue, suturas, enxertos vasculares artificiais.
PMMA	Bombas e reservatórios sanguíneos, membranas para diálise sanguínea, lentes oculares implantáveis.
PS	Balões para cultura de tecidos e filtros
PET	Suturas, enxertos vasculares artificiais, válvulas para o coração.
Poliamida	Cateteres, suturas e peças de molde.

#### 1.4.2. Biodegradação e Bioabsorção

A degradação polimérica ocorre em quatro etapas: absorção de água, redução das propriedades mecânicas, redução da massa molar e perda do peso final. Inicialmente, a água e os fluidos biológicos difundem-se para dentro do material. Seguidamente, as propriedades mecânicas começam a alterar-se. Usualmente, o módulo de Young diminui no início devido ao efeito de plastificante dos fluidos, que reduzem a temperatura de transição vítrea, e diminui no final do processo devido à redução da massa molar.

A biodegradação polimérica ocorre no organismo também em quatro processos: solubilização, ionização seguida de solubilização, hidrólise catalisada enzimaticamente ou por pH. Durante a primeira e segunda etapa, a degradação envolve a dissolução das cadeias poliméricas, directamente ou depois da ionização, em meio aquoso (através da quebra de ligações de hidrogénio, e da protonização ou desprotonização no caso de ocorrer ionização), mantendo a estrutura básica intacta. Na terceira etapa a hidrólise causa fragmentação da estrutura polimérica.

Outros factores que ocorrem em ambientes biológicos, como a biodegradação oxidativa e a degradação bacteriana, podem actuar sobre os polímeros e contribuir para a sua degradação (Barbucci 2002).

## 1.5. QUITINA e QUITOSANO

O quitosano e a quitina são amino-polissacarídeos naturais cujas características os tornam de grande utilidade num vasto conjunto de aplicações na área biomédica. O seu grande desenvolvimento deve-se maioritariamente às suas características como a excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, segurança ecológica, baixa toxicidade, actividade antibacteriana e baixa imunogenicidade.

A quitina e o quitosano são copolímeros de unidades N-glucosamina e N-acetil-glucosamina ligadas entre si (por ligações beta(1-4)). Quando o número de unidades glucose amina é superior a 50% o polímero é designado por quitosano, CS, tornando-se solúvel em meios ácidos. O CS é um polímero catiónico que possui inúmeras aplicações na forma de soluções, géis, filmes ou fibras (Pillai, Paul and Sharma 2009, Rinaudo 2006).

### 1.5.1. Estrutura e Composição Química

O CS é um polímero semi-cristalino cuja morfologia tem sido mencionada de diferentes formas na literatura. Conseguem-se obter cristais individuais de quitosano com deacetilação total, a partir de quitina de baixo peso molecular. Na figura 8 pode-se encontrar a representação esquemática dos copolímeros quitina e quitosano.

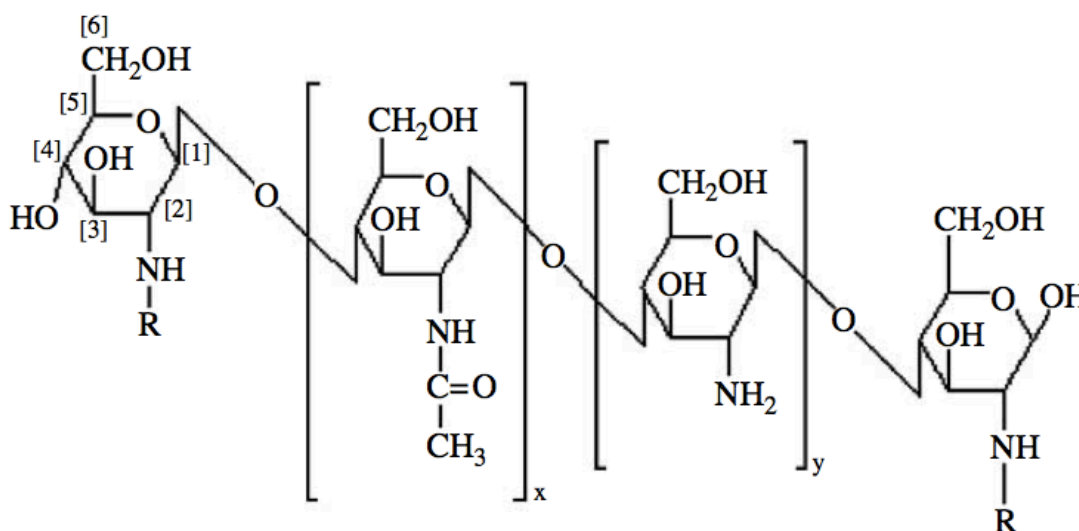


FIG. 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA QUITINA E DO QUITOSANO. QUANDO O COMPLEXO X (UNIDADE N-ACETIL-GLUCOSAMINA) É SUPERIOR A 50% ESTAMOS NA PRESENÇA DE QUITINA. QUANDO O COMPLEXO Y (UNIDADE N-GLUCOSAMINA) É SUPERIOR A 50% ENTÃO ESTAMOS NA PRESENÇA DE QUITOSANO (KHOR AND LIM 2003).

A unidade celular respeita geometria ortorrômbica ( $P2_1P2_12_1$ ) com  $a=0,807$  nm,  $b=0,844$  nm e  $c=1,034$  nm, e contém duas cadeias antiparalelas de quitosano, sem presença de moléculas de água (Rinaudo 2006).

A quitina encontra-se na natureza sob a forma de microfibrilas cristalinas ordenadas que formam a componente estrutural do exoesqueleto dos artrópodes e da parede celular dos fungos e leveduras. As suas diversas formas morfológicas diferem no empacotamento e polaridade das cadeias adjacentes em sucessivos planos. Na  $\beta$ -quitina todas as cadeias estão alinhadas paralelamente, o que não acontece na  $\alpha$ -quitina, estando a ordem molecular dependente das características e função física do tecido que a integra. Existem, contudo, tecidos onde estas duas estruturas coexistem através de ligações de hidrogénio entre os diferentes planos, distribuindo-os em arranjos antiparalelos (Pillai, Paul and Sharma 2009).

### 1.5.2. Propriedades Físicas, Mecânicas e Químicas

A estrutura semi-cristalina da quitina, com ligações de hidrogénio extensas, conferem a este polímero insolubilidade e alta densidade. Parâmetros como a concentração de polímero, pH da solução, concentração iónica, temperatura, grau de acetilação e peso molecular influenciam o processo de dissolução e a viscosidade.

Tanto o quitosano como a quitina podem ser modificados quimicamente para introduzir propriedades e funções biológicas desejadas. A presença de dois grupos hidróxilo permite alcançar diferentes solubilidades e proporcionar reacções como eterificação, esterificação, copolimerização e de reticulação (*cross-linking*). Os grupos amina possibilitam reacções como a acetilação, quaternização, reacções com aldeídos e cetonas, alquilação e a complexação de metais. Estes tipos de alterações químicas permitem atingir propriedades anti-bacterianas, anti-fúngicas, anti-virais, anti-ácidas, anti-ulcerosas, ou ainda propriedades de não toxicidade, não alergénicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade totais.

Como a quitina revela problemas de tratamento e solubilidade, o CS tem conhecido maior desenvolvimento. Consequentemente, têm sido produzidos um maior número de derivados do quitosano com novas propriedades e funções.

### 1.5.3. Propriedades do Quitosano como Biomaterial

O quitosano é usado para preparar hidrogéis, filmes, espumas e fibras, que são usadas na área biomédica, devido à biocompatibilidade que este polímero revela. Como descrito anteriormente, o quitosano é mais facilmente processado do que a quitina mas, por outro lado, a

estabilidade dos materiais à base de CS é menor, sobretudo devido ao seu carácter hidrofílico e à sua sensibilidade ao pH.

O CS possui um grande número de propriedades que o tornam propício para aplicações médicas como por exemplo suturas cirúrgicas, sistemas de libertação de drogas, scaffolds para engenharia de tecidos de cartilagem articular, implantes dentários, assim como implantes de pele artificial. O seu possível uso como filme torna-o apto para reconstruções ósseas, sendo o seu papel de agente hidratante de vital importância para aplicações em lentes de contacto corneais. Este polímero conhece ainda áreas de intervenção na engenharia de tecidos, nomeadamente a nível do sistema nervoso, vasos sanguíneos e órgãos como o fígado.

O comportamento hidrofílico, com a presença de grupos polares (  $-OH$  e  $-NH_2$  ), permite a formação de ligações secundárias com outros polímeros, tendo daí surgido o interesse da investigação de outros sistemas como, por exemplo, o quitosano/poliamida, quitosano/celulose e quitosano/PVP, que poderão acrescentar outras capacidades aos produtos já existentes (Pillai et al. 2009, Rinaudo 2006, Kim et al. 2004).

## 1.6. COMPÓSITOS DE POLÍMERO/HIDROXIAPATITE

Actualmente, os materiais compósitos de polímeros e hidroxiapatite são extensamente estudados como materiais para a regeneração e/ou reconstrução do tecido ósseo. Este tipo de compósitos, constituídos por uma matriz polimérica que integra nano/micro cerâmicos, consistem em biomateriais específicos para implantes ósseos, com propriedades mecânicas e biológicas apropriadas para cada tipo de aplicação médica. Estes materiais conjugam as vantagens dos polímeros, como a estabilidade estrutural, a biocompatibilidade e a maleabilidade com as vantagens dos cerâmicos que se assemelham à composição natural do osso.

Dentro do grupo dos materiais compósitos de polímero e cerâmico, a combinação polímero com a HAp tem registado os melhores resultados no que se refere à regeneração óssea, muito devido à semelhança química que patenteia com a apatite natural do tecido ósseo. Com as propriedades já descritas no capítulo “Hidroxiapatite”, os compósitos com incorporação de HAp consentem uma ligação intrínseca com o osso, devido à bioactividade deste cerâmico.

### 1.6.1. Caracterização dos Compósitos de Polímero e Hidroxiapatite

Na produção deste tipo de compósitos existem dois factores a ter em conta: a adesão interfacial entre polímeros orgânicos e a HAp inorgânica, e a dispersão da HAp na matriz polimérica. A falta de adesão entre as partículas de hidroxiapatite e a matriz do polímero resulta na falha da interface entre as duas fases e, por outro lado, uma dispersão não uniforme na matriz pode resultar em aglomerados cerâmicos entre o polímero, traduzindo-se na perda de propriedades mecânicas.

Na procura de caracterização destes materiais compósitos, é usual fazer-se uma distinção, usando a classificação dos biopolímeros, ou seja, *compósitos de polímeros não degradáveis e HAp* e *compósitos de polímeros biodegradáveis e HAp*.

Os sistemas de polímeros não degradáveis e HAp são usados em tecidos que não são capazes de se regenerar devido a uma grande perda da sua extensão ou em pacientes mais idosos cuja taxa de recuperação é mais demorada. Por outro lado, os sistemas de polímeros degradáveis e HAp têm vindo a substituir os sistemas anteriores. São encarados como suporte à auto-reparação de tecidos lesados servindo apenas de ajuda temporária à regeneração. Actualmente existe já um grande conjunto de polímeros sintéticos e naturais degradáveis que podem ser utilizados na regeneração de tecidos ósseos (Abe et al. 2010).

### 1.6.2. O Compósito Quitosano/Hidroxiapatite

A combinação do cerâmico hidroxiapatite e do polímero quitosano tem demonstrado ser um dos compósitos com melhores resultados no contacto com os sistemas biológicos.

O quitosano, um polissacarídeo que possui propriedades biológicas únicas, combinado com a hidroxiapatite, proporcionam um compósito com capacidade osteogénica activa, apropriado para implantes ósseos e para reparação/regeneração do tecido ósseo.

Existem na literatura descrições de vários trabalhos envolvendo estes dois biomateriais na construção de *scaffolds*.

Wan, Khor e Hastings (Wan, Khor and Hastings 1997) investigaram as interacções entre a quitina e espécies de cálcio. A HAp era primeiramente dispersa na quitina produzindo-se um material completamente integrado. Testes mecânicos patentearam a redução da resistência à tracção em compósitos com mais alto teor em cerâmico. Por outro lado, a ductilidade do polímero manteve-se, o que torna este material favorável para a interacção com o tecido ósseo, dada a sua maior correspondência com as propriedades mecânicas do osso natural, que promovem uma maior estabilidade ao implante.

Kong e colaboradores (Kong et al. 2006) estudaram a bioactividade de matrizes compósitas porosas de CS e nano-HAp, examinando a apatite que se forma à superfície das estruturas e a actividade da cultura de pré-osteoblastos realizada nestas. Verificaram que houve formação de HAp carbonatada e aumento da quantidade de apatite nas matrizes. Concluíram que existe uma maior proliferação celular em matrizes compósitas de CS e HAp do que em matrizes de CS.

Ge e colaboradores (Ge et al. 2004) desenvolveram compósitos de quitina e hidroxiapatite utilizando proporções de 25, 50 e 75 % (p/p) de HAp incorporada em soluções de quitina. Estes materiais, quando expostos a culturas celulares e implantados em cobaias (ratos) provaram ser não tóxicos e degradáveis. A HAp presente potenciou a calcificação e acelerou a degradação da matriz de quitina.

Zhao e colaboradores (Zhao et al. 2006) construíram matrizes biomiméticas tridimensionais de quitosano, gelatina e HAp, e obtiveram composições similares ao osso humano, com controlo da porosidade e densidade da matriz. Observações realizadas em SEM e por coloração imuno-histoquímica indicaram a agregação e proliferação dos osteoblastos nas estruturas tridimensionais, funcionando a HAp mais uma vez como promotor da adesão celular.

Hu e colaboradores (Hu et al. 2004) estudaram o problema da resistência mecânica dos compósitos de CS com HAp. A construção de matrizes compósitas com múltiplas camadas, levando a uma estrutura de elevada resistência e módulo de elasticidade, é sugerida como uma possível aplicação para a fixação interna de extensas fracturas de ossos.

Murugan e Ramakrishna (Murugan and Ramakrishna 2004) demonstraram a possibilidade de elaboração deste tipo de compósito através de um método químico por via húmida a baixa temperatura. Produziram uma pasta compósita de quitosano e nano hidroxiapatite capaz de evitar a acumulação de aglomerados de cerâmico e a rápida bioreabsorção das partículas de HAp.

## 1.7. TÉCNICAS DE PRODUÇÃO

### 1.7.1. SCAFFOLDS

Um “*scaffold*” consiste numa estrutura tridimensional artificial, construída com recurso aos biomateriais, e que se assemelha a uma matriz extracelular, promovendo a adesão, migração e proliferação celular e a regeneração tridimensional de tecidos (figura 9). Esta estrutura têm que possuir certas propriedades que proporcionem a migração celular e a diferenciação celular, e guiem o desenvolvimento e organização do tecido para um estado maduro e saudável (Shi 2006).

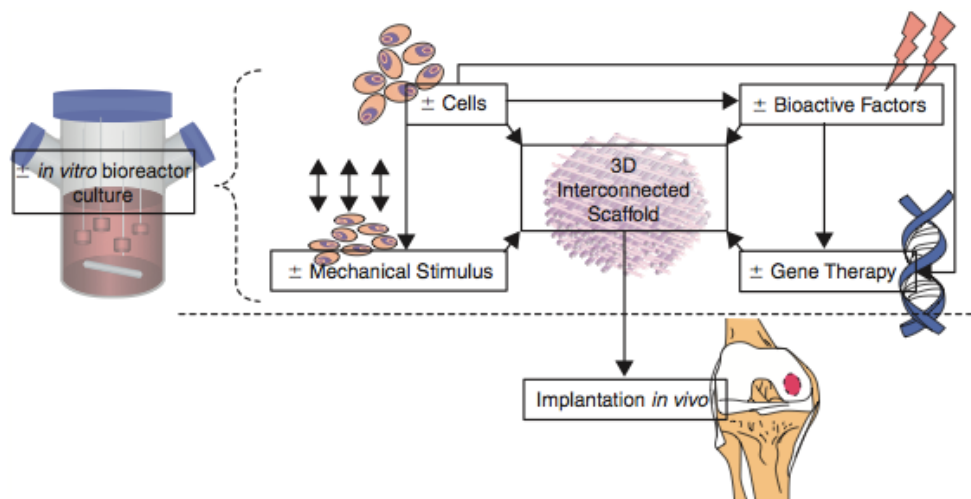


FIG. 9 – SCAFFOLD PARA ENGENHARIA DE TECIDO DA CARTILAGEM (BRONZINO 2008).

Para isso é necessário desenvolver estas estruturas tendo em considerações factores como o comportamento mecânico, arquitectura, degradação, propriedades superficiais, componentes biológicas e, sobretudo, o tipo e o local do tecido a reparar/substituir.

As considerações de design para um *scaffold* são complexas, incluindo composição, arquitectura dos poros, estrutura e propriedades mecânicas, propriedades superficiais, biodegradabilidade, adição de factores de crescimento ou outros componentes biológicos. A estrutura não necessita imperativamente de possuir todas as propriedades mecânicas idênticas ao tecido lesado, sendo importante que apresente pelo menos rigidez e resistência mecânica inicial suficiente, para funcionar como suporte de crescimento ósseo.

Os *scaffolds* podem ter diversas arquitecturas, desde estruturas porosas a estruturas mais densas, estando a rigidez e módulo de Young intimamente ligados com essas características. A interconectividade das estruturas porosas, bem como a orientação e tamanho dos poros são factores importantes na construção do *scaffold*, tendo em conta a migração celular, o fornecimento de nutrientes, a vascularização e o desenvolvimento do tecido. A macro e micro estrutura são de grande importância uma vez que os *scaffolds* requerem uma forma externa definida e uma estrutura interna porosa interconectada que proporcione a migração e proliferação celular. A matriz deve ter a função

de agir como local de adesão para as células transplantadas, agir como espaço protector para prevenir crescimento de tecido não desejado, agir como mediador de migração e crescimento celular no interior e à superfície da estrutura, libertando moléculas solúveis como as hormonas e os factores de crescimento. Na figura 10 podem observar-se dois exemplos de *scaffolds* utilizados para a regeneração da cartilagem.

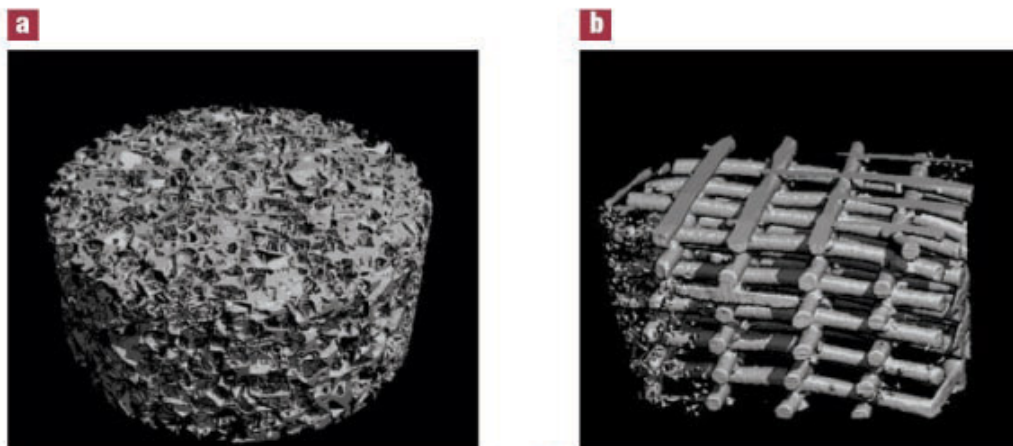


FIG. 10 – REGENERAÇÃO DA CARTILAGEM POR MIGRAÇÃO DE CONDROCITOS. A, SCAFFOLD DE PEG/PBT PRODUZIDO POR POROGEN LEACHING. B, SCAFFOLD DE PEG/PBT PRODUZIDO POR BIOPLOTTER (HOLLISTER 2005).

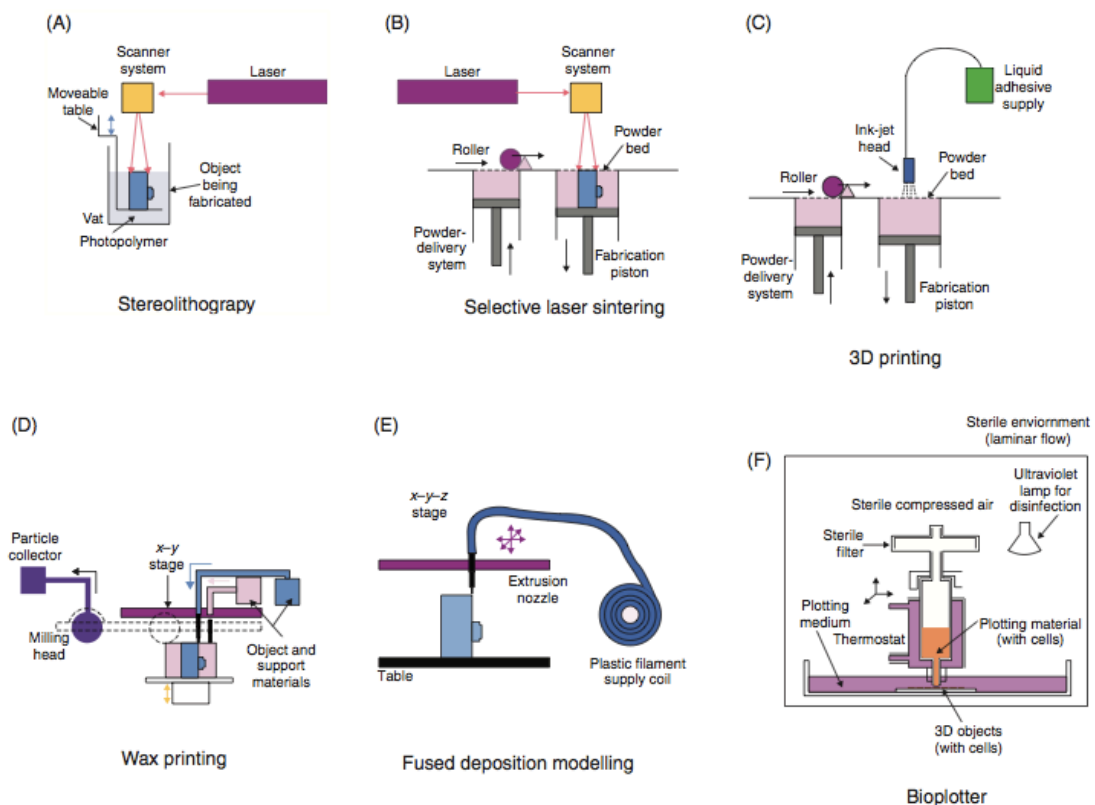


FIG. 11 – ESQUEMAS DE FUNCIONAMENTO DE ALGUMAS TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS (BRONZINO 2008).

As matrizes tridimensionais formadas à base de fibras, que permitam o crescimento celular no seu interior, podem ser produzidas através de métodos desenvolvidos pela indústria têxtil e modificados/especializados para aplicações em engenharia de tecidos. Dentro destes métodos encontram-se a fição assistida por campo eléctrico ou electrofição (*electrospinning*), a fição húmida (*wet spinning*) e a fição de polímeros termoplásticos (*melt spinning*).

Existem já um grande número de técnicas para a produção de *scaffolds* tridimensionais, a partir de materiais biodegradáveis e bioabsorvíveis (figura 11). Podem-se destacar técnicas como lixiviação porogénica, *gas foaming* e a separação de fase induzida termicamente (*TIPS - thermal induced phase separation*).

O futuro passa por desenvolver técnicas que melhorem sobretudo a rapidez, a facilidade de produção e a garantia de que os produtos obtidos são inequivocamente eficientes para o fim estabelecido (Bronzino 2008).

### 1.7.2 O PROCEDIMENTO SOL-GEL

#### Introdução à técnica

O método sol-gel, figura 12, tem-se destacado dentro dos processos de produção de cerâmicos, nomeadamente da hidroxiapatite.

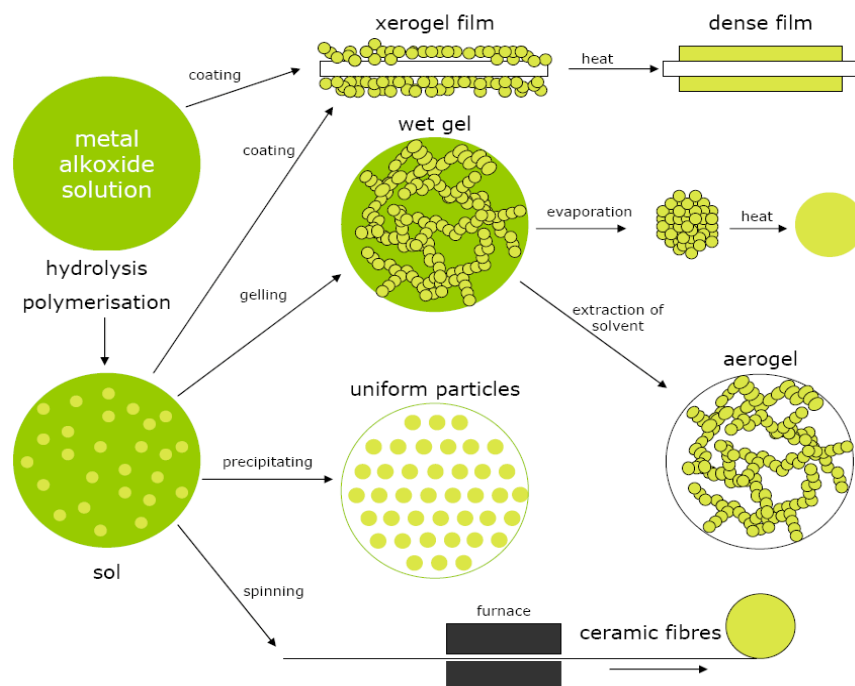


FIG. 12 – MÉTODO SOL-GEL (CENTEXBEL).

Este método refere-se a um processo de obtenção de materiais inorgânicos ou híbridos orgânico-inorgânico com ocorrência de reacções de hidrólise e condensação do precursor para a formação de partículas coloidais (sol) com conseqüente formação de uma rede tridimensional (gel) resultante da agregação dessas mesmas partículas (Luz 2007).

O grande interesse nesta técnica centra-se na capacidade de desenvolver novos materiais com grande controlo das diversas etapas do processo (Eshtiagh-Hosseini et al. 2007), resultando em produtos de elevada homogeneidade, pureza e cristalinidade (Fathi and Hanifi 2007).

Existem diversos processos dentro do método sol-gel, desde os mais complicados que requerem um controlo rigoroso e pH e temperaturas elevadas, a outros mais simples, rápidos, seguros e facilmente controláveis (Wang et al. 2005, Bezzi et al. 2003).

### **Etapas do sistema sol-gel**

O método Sol-Gel de produção de cerâmicos pode ser descrito por cinco grandes etapas: formação da solução inicial (sol), formação do gel, envelhecimento, secagem e densificação.

### **Formação da solução inicial/sol**

A solução inicial pode ser preparada como uma composição variada de compostos metalo-orgânicos, polímeros e soluções iónicas. Para a obtenção de materiais cerâmicos podem ser utilizados óxidos, nitretos, carbonetos ou sulfetos de metais. Apesar da diversidade de soluções precursoras, o sol consiste numa suspensão coloidal cuja fase dispersa é constituída por partículas entre 1 nm e 1000 nm, que possuem forças gravitacionais desprezáveis (Franco 2009).

### **Formação do gel**

O gel consiste numa rede porosa sólida tridimensional. Resulta de uma agregação com origem no sol, com base em partículas coloidais (gel coloidal) ou em cadeias poliméricas (gel polimérico), em que se forma uma rede rígida que integra solvente nos seus interstícios (Luz 2007). Quando o sol perde a sua homogeneidade e se torna instável, por reacções químicas entre os precursores, por mudanças químicas na solução ou por evaporação do solvente, passa por um ponto de transição entre estados (ponto gel) acompanhado por aumento da viscosidade da mistura (Wright 2001). O gel coloidal tem por base a agregação de partículas, por alteração das condições físico-químicas da suspensão. O gel polimérico surge com a formação de estruturas tridimensionais com base em ligações covalentes de cadeias poliméricas lineares. As reacções incompletas na etapa de gelificação são completadas durante o envelhecimento (Franco 2009).

### **Envelhecimento**

Esta fase caracteriza-se pela evaporação do solvente que ainda se encontra no interior do gel. Ocorre geralmente hidrólise que quebra algumas cadeias e reduz o peso molecular médio. As propriedades físicas podem também ser alteradas através de polimerização, espessamento ou transformações de fase.

### **Secagem**

O processo de secagem consiste na remoção de solvente do gel, o que provoca contracção do material. Geralmente originam-se aerogéis (com a extracção do solvente) ou xerogéis (evaporação natural do solvente), sendo possível outros tipos de microestruturas. Na secagem, o gel contrai proporcionalmente ao volume de líquido que é extraído/evaporado, permanecendo a interface líquido vapor na superfície exterior do cerâmico. O material fica progressivamente mais rígido enquanto o solvente que se encontra no interior diminui e os poros superficiais do gel são invadidos pelo ar. A contínua entrada de ar na estrutura faz com que um filme líquido com fluxo contínuo seja enviado para o exterior, continuando a evaporação a acontecer à superfície. Simultaneamente, ocorre difusão do vapor para o exterior (Franco 2009).

### **Densificação**

A densificação ou sinterização consiste num processo, impulsionado pela energia interfacial, em que o material se desloca num fluxo viscoso ou por difusão em cristais. Como os géis são amorfos, o mecanismo dominante de densificação é o fluxo viscoso, que é um processo mais rápido que a difusão em cristais.

Durante o tratamento térmico ocorrem processos de desidroxilação estrutural que fazem com que um aquecimento mais rápido provoque uma densificação a temperatura mais baixa. O aumento da temperatura leva a uma perda tendencial de peso devido a degradação da estrutura (Weng and Baptista 1998). Nos géis, as baixas temperaturas ( $\sim 150^{\circ}\text{C}$ ) permitem a perda de solvente normalmente constituído por água adsorvida fisicamente e moléculas com ligações fracas. A temperaturas acima dos  $250^{\circ}\text{C}$  ocorre pirólise com conseqüente decomposição da rede molecular, ou seja ocorre ruptura da estrutura molecular original por acção do calor, com libertação de compostos voláteis e diminuição de peso. Para valores de temperatura superiores a  $800^{\circ}\text{C}$  os resíduos orgânicos são removidos por descarbonação (Luz 2007).

### Vantagens e desvantagens

O método sol-gel é uma opção emergente no que se refere à preparação de revestimentos muito devido ao grande controlo da morfologia de revestimento, da química, da estrutura e à simplicidade da técnica. A utilização de diversas vias químicas e a possibilidade de combinação de compostos orgânicos e inorgânicos são características desta técnica que permite produção de partículas à escala nano, possui enorme flexibilidade na produção de pós nanocristalinos, filmes finos e sólidos monolíticos amorfos e permite um grande controlo de composição, da porosidade e cristalinidade (Weng and Baptista 1998, Wang et al. 2005). Na produção de HAp, a técnica sol-gel evidencia-se ainda com o aumento da homogeneidade e micro-estrutura uniforme de granulação fina (Kim and Kumta 2004, Bogdanoviciene et al. 2006).

As recentes técnicas aliam às propriedades anteriores, a capacidade de síntese a baixa temperatura, a rapidez de processo e o baixo custo, tornando a adopção deste método muito vantajosa.

### 1.7.3 FIAÇÃO HÚMIDA

#### Introdução à técnica

A técnica de fiação húmida (*wet spinning*) consiste num processo de extrusão e precipitação com a finalidade de produzir fibras, normalmente de polímeros que precisam de ser dissolvidos previamente para poderem ser fiados.

Geralmente este processo contínuo envolve as etapas de preparação do polímero, passagem no banho de coagulação, passagem no banho de secagem e recolha final no colectador, mas várias etapas intermédias podem ser introduzidas como por exemplo a lavagem, estiramento e tingimento (Knaul et al. 1998). A figura 13 ilustra um dos possíveis processos da técnica.

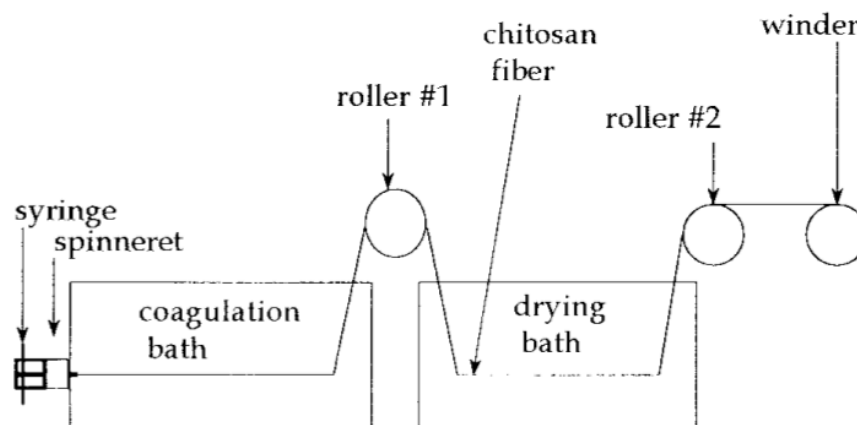


FIG. 13 – ESQUEMA USUAL DO PROCESSO DE FIAÇÃO HÚMIDA (KNAUL ET AL. 1998).

#### Etapas do sistema de *wet spinning*

##### Preparação do polímero

Os polímeros apresentam-se normalmente na sua forma bruta (sólido), tipicamente sob a forma de pós, flocos, grânulos ou blocos. Assim, para poder ser fiado, precisa de ser dissolvido para formar uma solução mais ou menos viscosa (dependendo do grau de dissolução). Posteriormente a solução polimérica é introduzida no sistema de fiação, tipicamente uma seringa, colocada numa bomba infusora, que vai libertando solução gradualmente para o exterior.

A estrutura dos filamentos é condicionada pelo tipo de solução utilizada assim como tamanho e forma do orifício pelo qual a solução é extraída (Hirano 2001).

### **Banho de Coagulação**

À medida que a solução vai sendo expelida através do injector, entra em contacto com o primeiro banho, o banho de coagulação, que causa a precipitação da solução polimérica em fibras de polímero. No caso de ser utilizada uma solução de quitosano, o banho de coagulação consiste num banho com alto teor em iões  $OH^-$ , ou seja, um banho com altos valores de pH, no qual o polímero previamente dissolvido em ácido precipita sob a forma cilíndrica (no caso do sistema de fiação constituído pela seringa). É usado normalmente o *NaOH*.

### **Banho de Lavagem**

Este banho pode ser introduzido como forma de lavar as fibras retirando-lhes um potencial excesso de coagulante. Banho constituído essencialmente por água, podendo também conter uma pequena percentagem de banho de secagem.

### **Banho de Secagem**

A passagem das fibras poliméricas por um banho de secagem, constituído normalmente por um solvente orgânico, permite a remoção de água do precipitado polimérico, promovendo assim a sua secagem. Este passo é importante para prevenir que os filamentos se colem uns aos outros na etapa de recolha e assim se encontrem bem individualizados. Genericamente, são usados como banho de secagem a acetona, metanol, etanol, isopropanol e/ou banhos mistos destes solventes (Knaul et al. 1998).

### **Colector**

O colector consiste geralmente num rolo no qual os filamentos são depositados continuamente. Dependendo da velocidade de rotação do rolo e da velocidade de saída da solução polimérica do injector, as fibras podem ser mais ou menos estiradas.

## 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.1. PRODUÇÃO DE HIDROXIAPATITE PELO MÉTODO SOL-GEL

Na produção de hidroxiapatite foi utilizado um método sol-gel baseado nos trabalhos de Wang Feng e colaboradores (Wang et al. 2005) e Fathi e Hanifi (Fathi and Hanifi 2007), com a introdução de algumas alterações. Este método decorre sem controlo de pH, sem agitação turbulenta e sem utilização de catalisadores.

- **Reagentes:**

Foram utilizados os precursores de cálcio e de fósforo numa razão molar de Ca/P=1,67. Estes reagentes foram dissolvidos em etanol.

⇒ Nitrato de cálcio tetra-hidratado:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Panreac pureza=p.a - ASC

⇒ Pentóxido de fósforo:  $\text{P}_2\text{O}_5$ , Sigma-Aldrich pureza=p.a ASC>98%

⇒ Etanol absoluto:  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , Panreac pureza=p.a – 99,5%

- **Técnica Experimental:**

1. Dissolveram-se 7,10g de pentóxido de fósforo num volume parcial de 100ml de etanol. Como a reacção entre o etanol e o pentóxido de fósforo é exotérmica com consequente libertação de vapores tóxicos, verteu-se o solvente lentamente. Os vapores são originados pelo ácido ortofosfórico na forma gasosa resultante da reacção entre as moléculas de água do etanol não anidro e o pentóxido de fósforo;
2. Colocou-se a solução sob agitação até à dissolução do soluto;
3. Dissolveram-se 39,47g de nitrato de cálcio tetra-hidratado num volume parcial de 100ml de etanol;
4. Colocou-se a solução sob agitação até à dissolução do soluto;
5. Adicionou-se a solução precursora de cálcio à solução precursora de fósforo;
6. Efectuou-se o envelhecimento da mistura durante 10 a 15 minutos sob agitação;
7. Colocou-se a mistura em banho de glicerina durante 25 a 45 minutos entre 90°C e 110°C. Com este processo a solução adquire consistência gelatinosa, com aumento de volume e viscosidade;

8. Seguidamente, a mistura é colocada numa estufa a 80°C durante 24h. O solvente remanescente evapora, obtendo-se um gel seco;
9. O gel foi sinterizado a uma taxa de 2°C/min até se atingir 350°C. Permaneceu 2h neste patamar e posteriormente foi sinterizado a uma taxa de 10°C/min até se atingir 750°C. Permaneceu 30 minutos neste patamar. A sinterização levou à formação de pós e agregados sólidos de HAp;
10. Os pós e agregados sólidos sinterizados foram seguidamente esmagados com recurso a um pilão e almofariz, para homogeneizar e obter pós de dimensão reduzida;
11. Selecionaram-se os pós com diâmetros inferiores a 100 µm com o recurso a um peneiro;
12. Posteriormente analisaram-se os pós de HAp utilizando o software *ImageJ* e as imagens obtidas por *TEM*. Esta análise encontra-se descrita no subcapítulo “Pós de hidroxiapatite” do capítulo “ Resultados e Discussão”.

## 2.2. PRODUÇÃO DAS FIBRAS DE CS E HAP POR FIAÇÃO HÚMIDA

As fibras de quitosano e hidroxiapatite foram produzidas pelo método de fiação húmida. Neste processo estiveram envolvidas as etapas de coagulação, lavagem e secagem. Foram produzidos vários tipos de soluções consoante a utilização final. Para os ensaios de caracterização mecânica e observação por microscópio electrónico de varrimento, foram produzidas fibras de CS com 0%, 5%, 10%, 15% e 20% de HAp. Para a produção de *scaffolds* foram produzidas fibras de CS com 0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% de HAp.

### 2.2.1. Preparação das Soluções de CS e HAp

Foram preparadas soluções de quitosano com diversas quantidades de hidroxiapatite numa relação p/p (figura 14). O polímero foi dissolvido numa solução aquosa de ácido acético a 2%.

- **Materiais:**

- ⇒ Quitosano (CS) : Sigma Aldrich, low molecular weight, DD=91,8%, ref. 448869-250G, lote 06720AE.
- ⇒ Ácido Acético glacial: CH<sub>3</sub>COOH , Panreac p.a.=99,7%.
- ⇒ Água destilada: Auchan , pH=5-7.

- **Procedimento:**

1. Preparou-se ácido acético a 10% com a diluição de 10 ml de ácido acético glacial em 90 ml de água destilada;

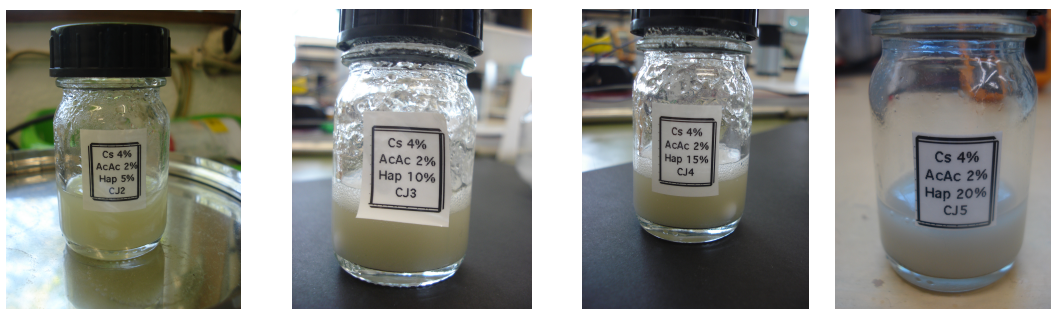


FIG. 14 – SOLUÇÕES DE CS E HAP (5%, 10%, 15% E 20% DE HAP EM P/P).

2. Adicionaram-se 0,4g de CS e as respectivas quantidades de HAp em relação p/p;

3. Suspendeu-se a mistura com a adição de 7,68g de água destilada e manteve-se a solução em agitação durante 10 a 15 minutos;
4. Adicionou-se 1,92g de ácido acético a 10% e manteve-se a solução sob agitação durante 24h, para garantir uma perfeita homogeneização (a adição de 1,92g ácido acético a 10% após a adição de 7,68 g de água destilada equivale à adição de 9,6 g de ácido acético a 2%).

### 2.2.2. Constituição dos Banhos:

#### Banhos de Coagulação:

Foram preparados 3 tipos de banhos de coagulação: **(1)** NaOH 100%, **(2)** NaOH 70% e Etanol 30%, e **(3)** NaOH 70% e Metanol 30%.

- **Materiais:**

- ⇒ Hidróxio de Sódio: NaOH, EKA, lote 190609.

- ⇒ Água destilada: Auchan, pH=5-7.

- ⇒ Etanol absoluto: CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, Panreac p.a. 99,5%.

- ⇒ Metanol: CH<sub>3</sub>OH, Valente e Ribeiro Lda.

- **Procedimento :**

- ⇒ Preparou-se uma solução de NaOH 1M através da dissolução de 40g de NaOH em 1000 ml de água destilada.

- ⇒ Prepararam-se banhos de coagulação de 500 ml dos tipos 1,2 e 3.

#### Banhos de Secagem:

Foram preparados 2 tipos de banhos de secagem: **(1)** Etanol 100% e **(2)** Metanol 100%.

- **Materiais:**

- ⇒ Etanol absoluto: CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, Panreac p.a. 99,5%.

- ⇒ Metanol: CH<sub>3</sub>OH, Valente e Ribeiro Lda.

#### Banhos de Lavagem:

Foram preparados banhos de lavagem de água destilada.

### 2.2.3. Montagem Experimental

Para a produção de fibras de quitosano e hidroxiapatite por fiação húmida foi utilizado o esquema de montagem da figura 15, com o seguinte material:

- Seringa de 10 ml de volume e 13,74 mm de diâmetro interno (1);
- Agulha curva de calibre 22, com diâmetro interno 0,406 mm e diâmetro externo 0,7176 mm (2);
- Bomba infusora – New Era Pump Systems Inc. ( 3 ) ;
- Recipiente paralelepípedo de 40 cm x 15 cm x 3 cm, e respectivos banhos de coagulação (4);
- Rolo cilíndrico de teflon de 6 cm de diâmetro e 6 cm de comprimento (5);
- Motor de ligação da Fonte DC ao eixo de rotação do rolo (6);
- Fonte DC – Agilent U8001A -> Agilent Technologies (7);
- Taças cilíndricas com respectivos banhos de secagem;

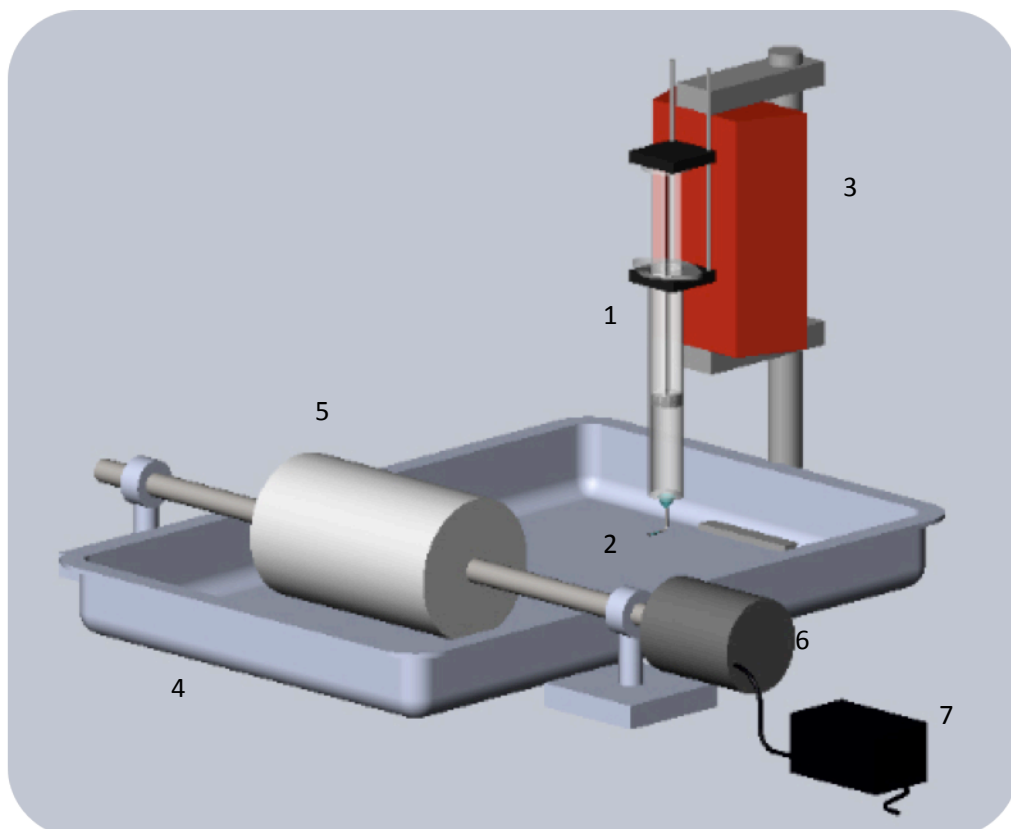


FIG. 15 – ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DA MONTAGEM EXPERIMENTAL.

### 2.2.4. Técnica Experimental

O procedimento experimental utilizado para produzir as fibras compósitas de CS e HAp pode ser descrito pelas seguintes etapas:

1. A solução de quitosano e hidroxiapatite previamente preparada foi introduzida na seringa, e esta foi colocada na bomba infusora;
2. Na bomba seleccionou-se a velocidade de 20 ml/h e o diâmetro de 13,74 mm;
3. Depositou-se o banho de coagulação na taça (banho do tipo 1, 2 ou 3) até cobrir a agulha colocada na extremidade da seringa (figura 16). É necessário garantir que a solução entra em contacto com o banho de coagulação imediatamente à saída da seringa;

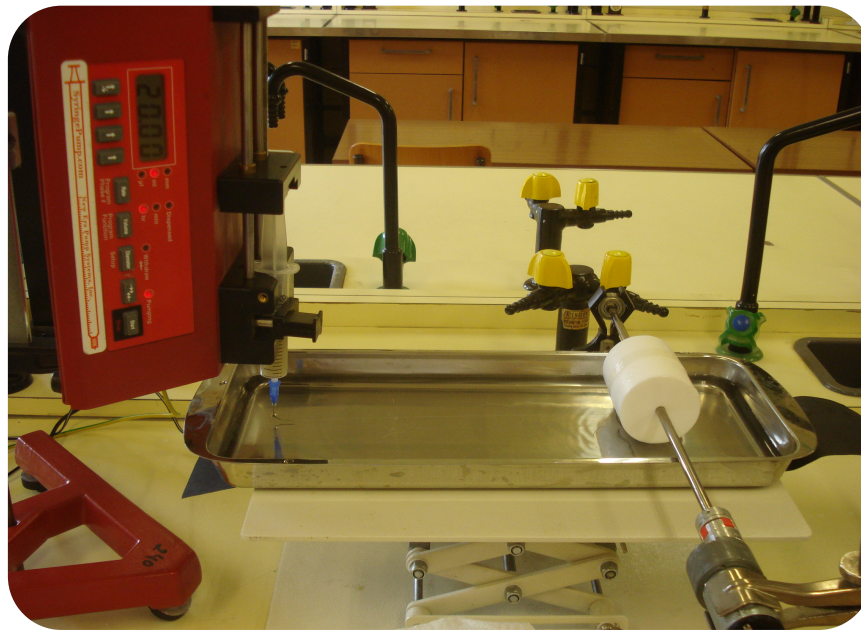


FIG. 16 – FOTOGRAFIA DA MONTAGEM EXPERIMENTAL.

4. O rolo de teflon foi colocado a 22 cm de distancia da ponta agulha, em contacto com o banho, e ligou-se o seu eixo ao motor de rotação;
5. Estabeleceu-se o valor de 1,95 V fornecidos pela fonte DC, conferindo as rotações necessárias ao rolo, para que a velocidade de recolha das fibras seja 1,5 vezes superior à velocidade de saída da solução da seringa (Anexo C);
6. Estando todas as condições reunidas dá-se início ao processo ligando a bomba infusora;
7. Inicialmente, com a saída das primeiras porções de solução é necessário orientar a fibra em direcção ao rolo. Com ajuda de uma pinça puxou-se a ponta da fibra na direcção do enrolamento e a partir daqui o processo tornou-se automático. As fibras

- permanecem cerca de 4 a 5 segundos mergulhadas na solução de coagulação, entrando em contacto posterior com esta à medida que a rotação do rolo o implica;
8. O processo terminou com a saída total da solução da seringa e a recolha das fibras no rolo. Posteriormente, retirou-se o rolo do eixo e mergulhou-se numa taça com 200 ml do banho de secagem. Com a ajuda de uma pinça arrastaram-se as fibras ao longo da superfície do rolo, deslocando-as deste para o banho de secagem, e retirando o rolo do banho, figura 17;



FIG. 17 – FIBRAS DE CS + 15% HAP NO BANHO DE SECAGEM APÓS TEREM SIDO RETIRADAS DO ROLO DE TEFLON.

9. Realizaram-se diferentes experiências tendo em vista o estudo do comportamento mecânico. No primeiro tipo de experiências as fibras permaneceram cerca de 30 minutos dentro dos banhos de secagem e no segundo tipo permaneceram 72h;
10. Para a produção de *scaffolds*, após a montagem das fibras no molde estas foram introduzidas em banhos de lavagem sucessivos.

No total foram produzidos vários tipos de fibras com diferentes finalidades. Para a caracterização mecânica foram produzidas duas classes de fibras em que o banho de coagulação era constituído 100% por NaOH e o banho de secagem 100% por etanol ou metanol, e duas classes de fibras em que o banho de coagulação era constituído por 70% NaOH e 30% de etanol no caso do banho de secagem ser 100% etanol, ou 30% metanol no caso do banho de secagem ser metanol. Na tabela 5 encontra-se a classificação dos vários tipos de fibras produzidos.

TABELA 5 – CLASSIFICAÇÃO DAS FIBRAS DE CS E HAP PRODUZIDAS.

Fibras de quitosano e hidroxiapatite			
Composição	Banho de Coagulação	Banho de Secagem	Designação
CS	100% NaOH	100% Etanol	CJ1E
	100% NaOH	100% Metanol	CJ1M
	70% NaOH + 30% Etanol	100% Etanol	CJ2E
	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ2M
CS + 5% HAp	100% NaOH	100% Etanol	CJ3E
	100% NaOH	100% Metanol	CJ3M
	70% NaOH + 30% Etanol	100% Etanol	CJ4E
	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ4M
CS + 10% HAp	100% NaOH	100% Etanol	CJ5E
	100% NaOH	100% Metanol	CJ5M
	70% NaOH + 30% Etanol	100% Etanol	CJ6E
	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ6M
CS + 15% HAp	100% NaOH	100% Etanol	CJ7E
	100% NaOH	100% Metanol	CJ7M
	70% NaOH + 30% Etanol	100% Etanol	CJ8E
	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ8M
CS + 20% HAp	100% NaOH	100% Etanol	CJ9E
	100% NaOH	100% Metanol	CJ9M
	70% NaOH + 30% Etanol	100% Etanol	CJ10E
	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ10M

Para a produção de *scaffolds* e após as conclusões retiradas com a análise morfológica e caracterização mecânica, foram produzidas fibras cujo banho de coagulação é constituído por 70% NaOH e 30% Metanol e o banho de secagem constituído por 100% Metanol. Na tabela 6 podem ser conferidas as designações atribuídas para cada tipo de *scaffold*.

TABELA 6 – CLASSIFICAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE CS E HA PRODUZIDOS.

Scaffolds			
Composição	Banho de Coagulação	Banho de Secagem	Designação
CS	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ1 Matriz
CS + 10%HAp	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ2 Matriz
CS + 20%HAp	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ3 Matriz
CS + 30%HAp	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ4 Matriz
CS + 40%HAp	70% NaOH + 30% Metanol	100% Etanol	CJ5 Matriz
CS + 50%HAp	70% NaOH + 30% Metanol	100% Metanol	CJ6 Matriz

### 2.3. PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS DE FIBRAS DE CS E HAP

Após a produção de fibras de quitosano e hidroxiapatite foram construídos protótipos de possíveis implantes com a elaboração de *scaffolds* tridimensionais de fibras. Foram produzidos seis tipos de *scaffolds* consoante a composição em HAp (0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em p/p). Para isso foram usados moldes como os da figura 18 para suporte da estrutura de fibras.

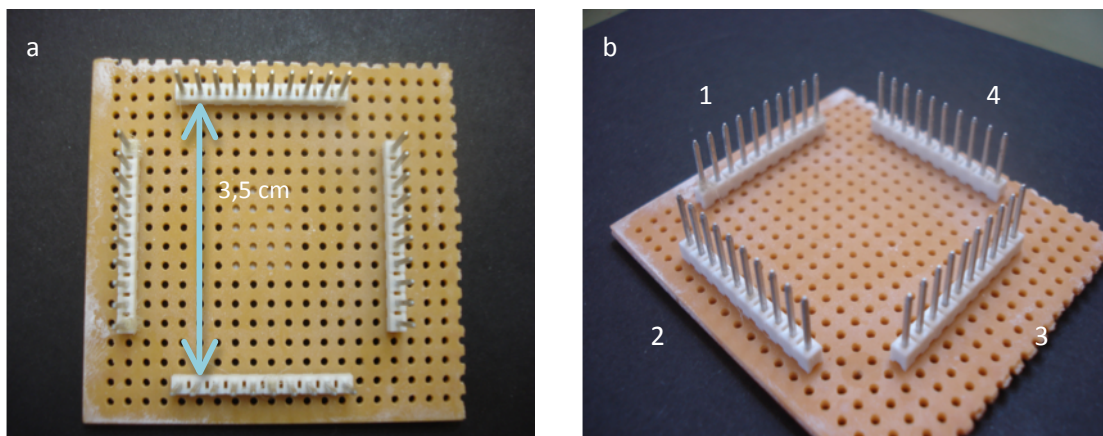


FIG. 18 – IMAGENS DOS MOLDES USADOS PARA PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS DE FIBRAS DE CS/HAP.

Os moldes utilizados são constituídos por uma placa base e quatro segmentos de dez pinos metálicos dispostos perpendicularmente à placa e paralelamente dois a dois. O objectivo de utilização dos moldes foi a produção de uma malha de fibras composta por várias fiadas.

- **Técnica Experimental:**

1. Retiraram-se pequenas porções de fibras de CS/HAp, ainda no banho de secagem, e com as fibras hidratadas teceram-se várias camadas no molde;
2. Escolhendo como ponto de partida o 1º pino do grupo 1 do molde, foi estabelecido um nó com a fibra e esta foi disposta paralelamente ao grupo 2 e em direcção ao 1º pino do grupo 3, contornando-o e voltando em direcção ao grupo 1 e para o 2º pino metálico;
3. Este processo foi repetido até todos os pinos do grupo 1 e grupo 3 estarem ligados com fibras. O mesmo processo foi utilizado para ligar os grupos 2 e 4;
4. Para diminuir os espaços intersticiais existentes na pré-estrutura produzida, teceram-se outros estratos adoptando outro tipo de técnica. Não existindo uma forma ideal de elaborar cada fiada, o método adoptado consistiu em ligar o 1º,

5º e 10º pino metálico de cada grupo, a todos os pinos do grupo na face oposta, dispondo as fibras na diagonal em comparação com os estratos previamente estabelecidos;

5. Este processo foi realizado até se obter uma estrutura tridimensional considerável, como por exemplo a da figura 19;

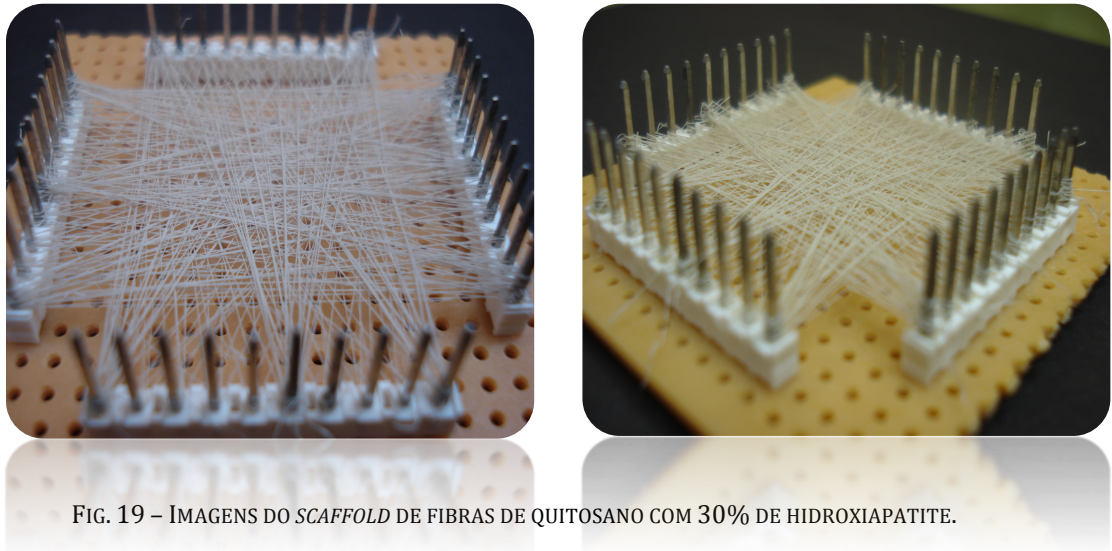


FIG. 19 – IMAGENS DO SCAFFOLD DE FIBRAS DE QUITOSANO COM 30% DE HIDROXIAPATITE.

6. Posteriormente, os moldes contendo as fibras foram inseridos em 3 banhos sucessivos de água destilada, com a duração de 15 minutos, 1 hora e 1 hora respectivamente, com o objectivo de neutralizar as fibras, aproximando-as do pH fisiológico. Esta etapa foi introduzida após os resultados dos testes de toxicidade terem revelado que o pH excessivo foi causador de morte celular;
7. Para conferir uma maior dureza e estabilidade à estrutura foi aplicado gel de cianocrilato, estabelecendo contacto entre as várias camadas de fibras nas extremidades do *scaffold*. Um segundo teste de toxicidade comprovou que o gel atribuía toxicidade às matrizes, pelo que se abandonou a utilização deste. Adoptou-se então a aplicação de uma solução de CS a 6% para promover a viabilidade celular e, simultaneamente, conferir a estabilidade desejada à estrutura.

## 2.4. ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO

Para caracterizar as fibras produzidas por fiação húmida realizaram-se análises morfológicas e ensaios mecânicos. Posteriormente, após a construção dos *scaffolds* de fibras realizou-se análise morfológica e análise citotóxica.

### 2.4.1. Medição de Diâmetros e Ensaio de Tracção

Para efectuar este tipo de caracterização, as fibras sofreram primeiramente um tratamento de secagem ao ar sob tensão. Esta secagem consistiu em cortar porções de aproximadamente 25 cm de comprimento de cada tipo de fibras e coloca-las sobre papel de acetato, fixando-as nas pontas com recurso a fita-cola. Realizaram-se dois tipos de estudos: fibras colocadas a secar ao ar 30 minutos depois de introduzidas no banho de secagem (figura 20), e fibras colocadas a secar ao ar após 72h de permanência no banho de secagem.



FIG. 20– IMAGENS DA SECAGEM DAS FIBRAS AO AR SOB TENSÃO.

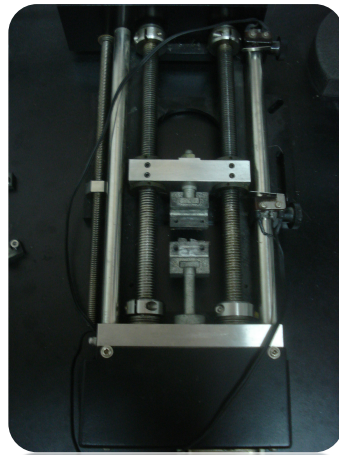
#### Diâmetros:

1. Cortaram-se 24 porções de aproximadamente 3 cm de comprimento de cada tipo de fibras;
2. Através da utilização de uma craveira digital (*Mitutoyo, 0-25 mm 0.001 mm*) mediu-se o diâmetro de cada porção de fibra;
3. Guardaram-se as amostras de 3 cm para posterior utilização nos ensaios de tracção.

### Ensaio de tracção:

Com recurso a uma máquina de tracção, com célula de carga de 20 N, operável através do software “Minimat”, realizaram-se os ensaios de tracção.

1. As porções de 3 cm de comprimento previamente analisadas foram colocadas e presas com as garras;
2. Recorrendo ao programa “Minimat” efectuaram-se os ensaios de tracção.



*Minimat Control Software  
Version 1.60 February 1994  
(c) P.L. Thermal Science 1984-94  
Reometric Scientific Ltd.*

FIG. 21 – MÁQUINA DE TRACÇÃO UTILIZADA NOS ENSAIOS.

### 2.4.2. Culturas Celulares e Testes Citotóxicos

Utilizando os *scaffolds* produzidos realizaram-se testes de citotoxicidade e culturas celulares numa tentativa de aferir a qualidade das fibras enquanto estrutura de viabilidade celular. Este procedimento foi realizado no campus do INETI, em colaboração com a Dr. Sofia Prata, Bióloga da empresa de cerâmicos médicos CERAMED, nos laboratórios da UTPAM do IHMT-UNL, gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Novo.

Para este procedimento foi necessário uma preparação prévia da linha celular SA-OS2 (osteoblastos), multiplicados em meio de cultura a partir de uma alíquota congelada. Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respectivos meios foram realizadas em condições de assepsia, com material estéril e em câmara de fluxo laminar.

Pode-se descrever o procedimento utilizado pelas seguintes etapas:

1. Os *scaffolds* foram cortados em pequenas amostras para posterior utilização nos testes de citotoxicidade e culturas celulares;
2. Todas as amostras foram esterilizadas em etanol durante um período aproximado de 3 horas, com posterior secagem durante 24 horas na câmara de fluxo;

3. Removeu-se o meio de cultura do frasco que continha os osteoblastos previamente preparados e adicionou-se PBS para lavar as células;
4. Adicionou-se tripsina para hidrolisar as proteínas dos osteoblastos responsáveis pela aderência às paredes do frasco;
5. Posteriormente colocou-se o recipiente contendo as células numa estufa (Heraeus HERAcell 240) durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>;
6. Após retirado da estufa, adicionou-se soro fetal bovino (a 15 %), o que inactivou a tripsina;
7. Em seguida, a solução foi transferida para *falcons*, e estes foram centrifugados durante 8 minutos (Centrifugadora – Centurion, Scientific Ltd, C2012). Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em meio de cultura;
8. Para saber a quantidade de meio de cultura a usar, procedeu-se à contagem de células com recurso a um hematocitómetro e posterior extrapolação dos valores seguindo a equação

$$N = n \cdot 10^4 \cdot x$$

em que  $N$  representa a concentração de células por ml,  $n$  representa a contagem do número de células da grelha central, e  $x$  o factor de diluição. Para a realização da contagem utilizou-se o corante celular *Trypan blue* e uma placa *Bright Light Counting Chamber 3100* (Houser Scientific Company). Sabendo então a concentração, foi possível chegar ao volume a utilizar;

9. Retiraram-se 10 ml do *pellet* que foram introduzidos em novos *falcons* juntamente com 40 ml de meio completo (meio de cultura e 15% de soro fetal bovino);
10. Para as **culturas celulares** utilizaram-se 12 amostras correspondentes aos 6 *scaffolds* produzidos. Preencheram-se então 12 poços de uma placa de cultura com as amostras e com a solução preparada no ponto 9 (figura 22);

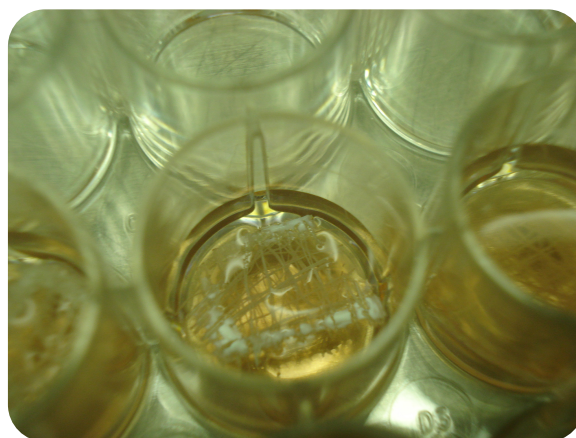


FIG. 22 – POÇO DE CULTURA COM UMA AMOSTRA DE SCAFFOLD DE FIBRAS DE CS COM 30% DE HAP, E COM MEIO DE CULTURA.

11. Introduziu-se a placa na estufa durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>;
12. Finalizado o período de incubação, adicionou-se glutaraldeído a cada um dos poços, o que provocou a morte celular e a fixação das células às amostras;
13. Para preparar as amostras para observação por SEM, retirou-se a fase líquida dos poços e lavaram-se com PBS. Em seguida desidrataram-se as amostras adicionando e retirando soluções de 70%, 80%, 90% e 100% de Etanol, por iguais períodos de 10 minutos;
14. Na realização dos **testes de citotoxicidade**, seguiram-se as directrizes das normas *ISO 10993 -5*. Seleccionaram-se 3 amostras da matriz sem hidroxiapatite, 3 amostras da matriz com 30% HAp e 3 amostras da matriz com 50% HAp, e colocaram-se em poços de cultura;
15. Adicionou-se a solução preparada no ponto 9 às amostras seleccionadas e colocou-se ainda a solução preparada em 3 poços sem conteúdo, funcionando estes como o “controlo positivo”;
16. Introduziu-se a placa de cultura na estufa onde permaneceu 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>;
17. Lavaram-se os poços com PBS e adicionou-se 500 µl de MTT (*tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyl*) a cada um. O método MTT permite avaliar a viabilidade celular e a citotoxicidade do material a testar;
18. Posteriormente, incubou-se as amostras durante 3 horas a 37°C na estufa;
19. A metabolização celular do MTT resultou na formação de sais que foram solubilizados com a adição de HCl e Isopropanol. Os sais, que funcionam como um indicador colorimétrico da viabilidade celular, apresentaram-se com cor púrpura;
20. Retirou-se a fase líquida dos poços e transferiu-se para uma placa celular de 96 poços;
21. Os sais foram quantificados através da leitura da densidade óptica de 570 nm, com um filtro de referência 655. Para esta leitura usou-se um leitor de placas Bio-Rad- Model 550.

### 2.4.3. Análise Morfológica (SEM)

A microscopia electrónica de varrimento (SEM – *Scanning Electronic Microscopy*) foi a técnica escolhida para a análise da morfologia superficial das amostras em estudo. Num SEM, um feixe de electrões, proveniente de um filamento de tungsténio aquecido, é acelerado e projectado contra a amostra. A colisão entre o feixe de electrões e a amostra provoca a emissão de electrões secundários, que são colectados por detectores específicos, transformados em sinal e posteriormente em imagens.

A preparação das amostras inclui a colocação destas num suporte próprio (disco metálico) e a fixação a este através do uso de fita-cola de carbono dupla face, que para além do papel de fixação tem também a função de estabelecer um contacto eléctrico entre a superfície do suporte e a amostra a analisar. As amostras são posteriormente revestidas com uma fina camada de ouro, possibilitando um melhoramento no contraste da imagem e a diminuição da acumulação de campos electrostáticos.

Para a realização deste trabalho foi utilizado o equipamento Zeiss DSM-962 (do CENIMAT/I3N). Foram realizados dois tipos de observações: observação da morfologia das fibras de CS e HAp; observação de porções dos *scaffolds* de CS e HAp após culturas celulares. A observação das fibras de CS e HAp consistiu na captação de imagens de 5 classes de fibras diferentes (0%, 5%, 10%, 15% 20% HAp (p/p)) nos seus diferentes banhos de coagulação e secagem. Por sua vez, a observação de porções de *scaffolds* inclui matrizes de fibras de CS e HAp de 6 classes (0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% HAp (p/p)). Nos dois tipos de observação, o porta-amostras, com várias amostras, foi inserido no interior da câmara de observação do equipamento, sob vácuo, seguindo-se a visualização das amostras a diferentes ampliações.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA

##### 3.1.1. Pós de Hidroxiapatite

Com o objectivo de identificar o tamanho dos grãos da hidroxiapatite produzida, recorreu-se à análise de imagens de *TEM*, através do software *ImageJ*.

A microscopia electrónica de transmissão (*TEM*) baseia-se no princípio de transmissão de um feixe de electrões através de uma amostra ultra fina. Este tipo de microscopia utiliza um canhão de iões como fonte de radiação para a obtenção de uma imagem. Os electrões são emitidos termoionicamente por um filamento de tungsténio e à medida que interagem com o material forma-se uma imagem, devido á menor ou maior absorção destes por parte da amostra. A *TEM* permite obter imagens de alta resolução, constituindo-se como uma ferramenta muito precisa para métodos de análise.

Para a observação do tamanho dos grãos de HAp, utilizou-se o aparelho *TEM Hitachi H-8100*, com a acoplação de um detector EDS para elementos leves da *ThermNoran*, do Instituto Superior Técnico de Lisboa. Este aparelho possui ainda uma câmara CCD para a aquisição de imagem MegaView 1k X 1k. Na observação dos grãos de HAp foi utilizada uma tensão de aceleração de 200 kV.

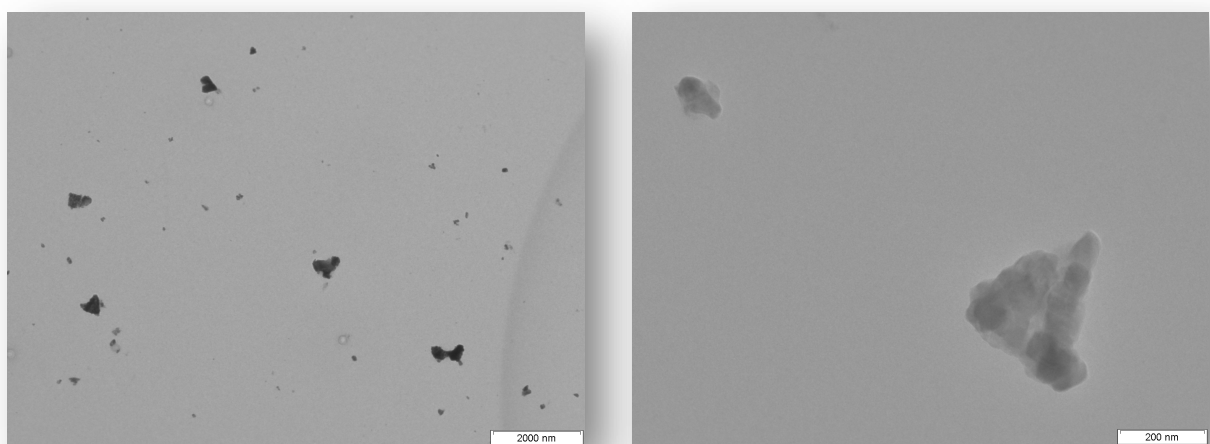


FIG. 23 - IMAGENS DOS GRÃOS DE HAP OBTIDAS POR TEM.

Recorrendo ao software *ImageJ* verificou-se a existência de uma vasta gama de diâmetros dos grãos de hidroxiapatite, muito devido à existência de agregados, figura 23. Tomando como referência 5 amostras de menores dimensões e 5 amostras de maiores dimensões, conseguem-se observar grãos de HAp individualizados com diâmetros menores do que 100 nm, observando-se ainda pequenos agregados com diâmetros menores do que 400 nm.

### 3.1.2. Fibras Compósitas de Quitosano e Hidroxiapatite

Com recurso ao Microscópio Electrónico de Varrimento, observaram-se pequenas porções de fibras de quitosano e de fibras de quitosano com 5%, 10%, 15% e 20% HAp (p/p), figuras 24 a 33.

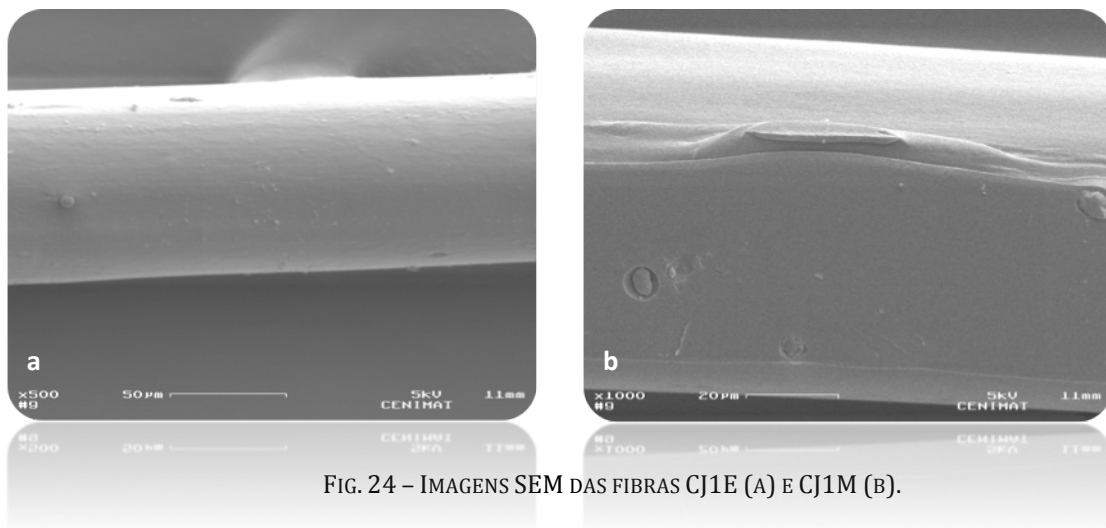


FIG. 24 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS C1E (A) E C1M (B).

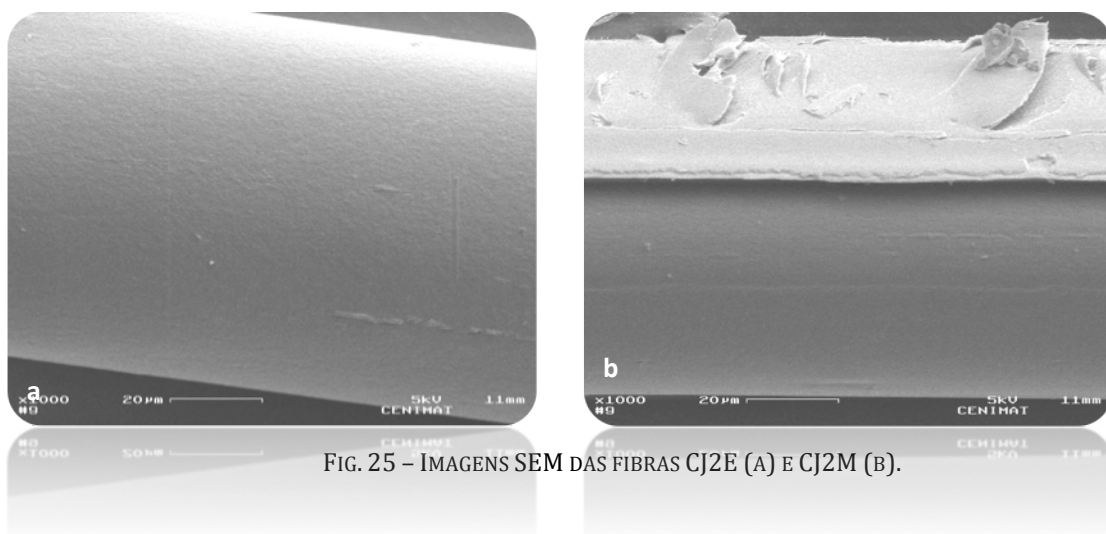


FIG. 25 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS C2E (A) E C2M (B).

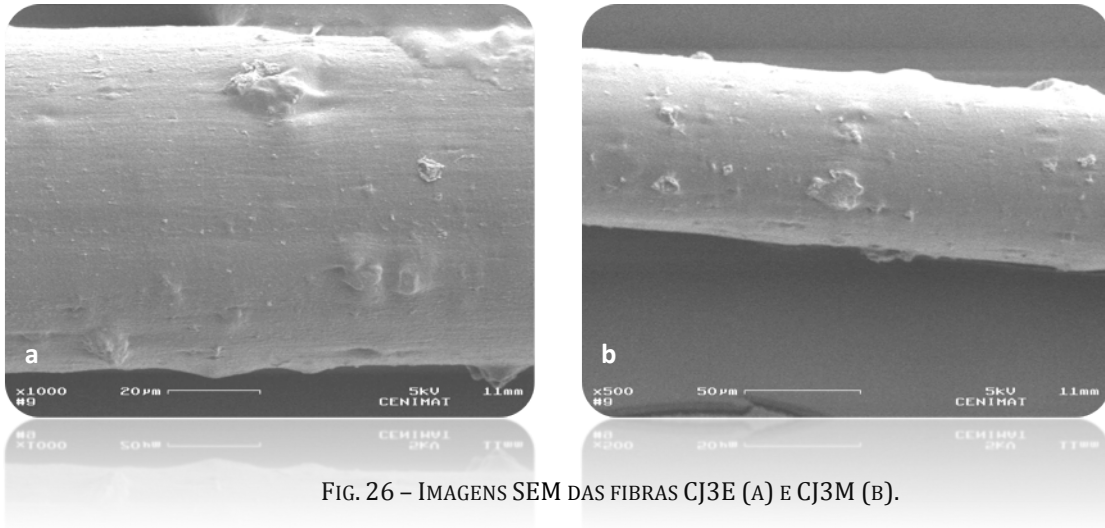


FIG. 26 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ3E (A) E CJ3M (B).

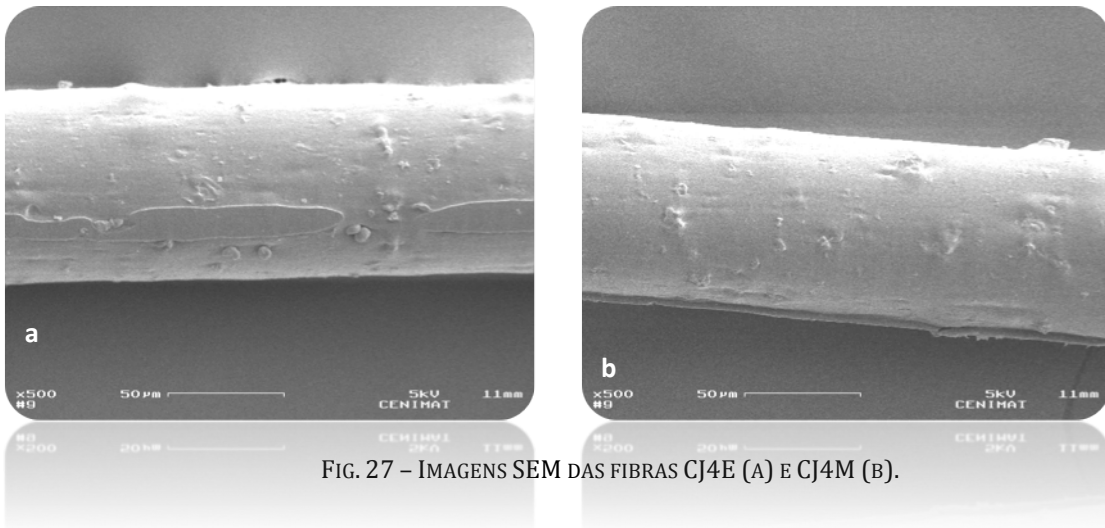


FIG. 27 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ4E (A) E CJ4M (B).

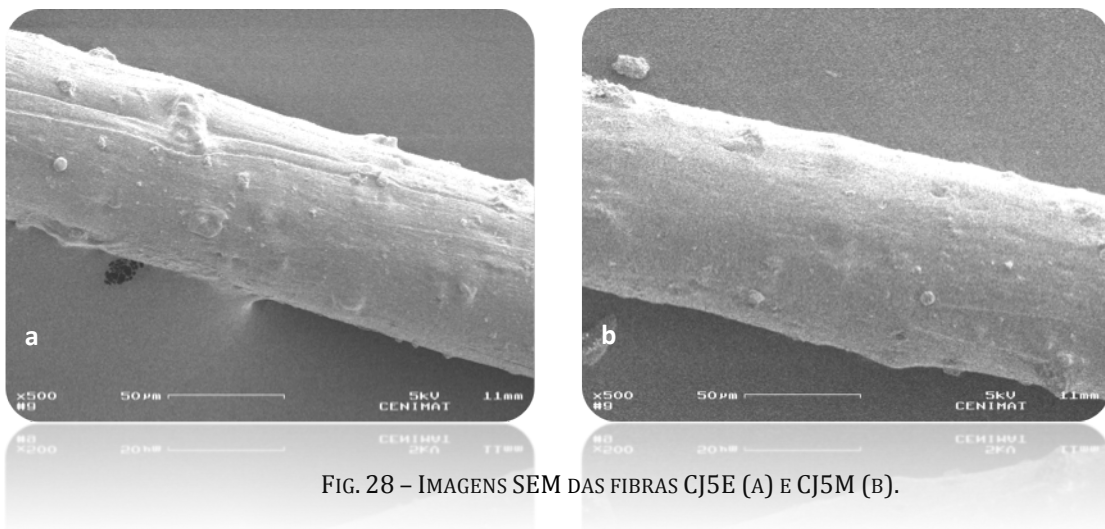


FIG. 28 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ5E (A) E CJ5M (B).

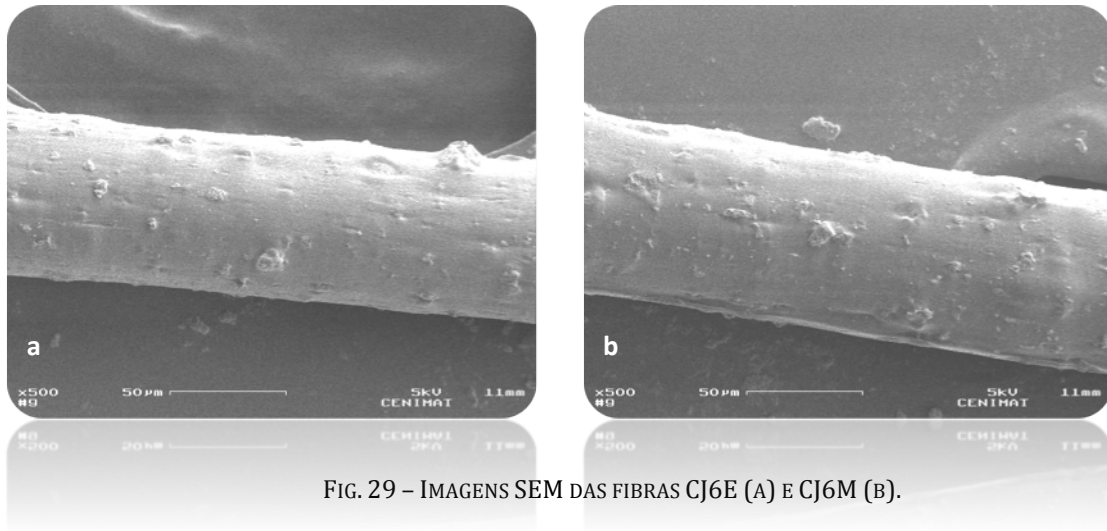


FIG. 29 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ6E (A) E CJ6M (B).

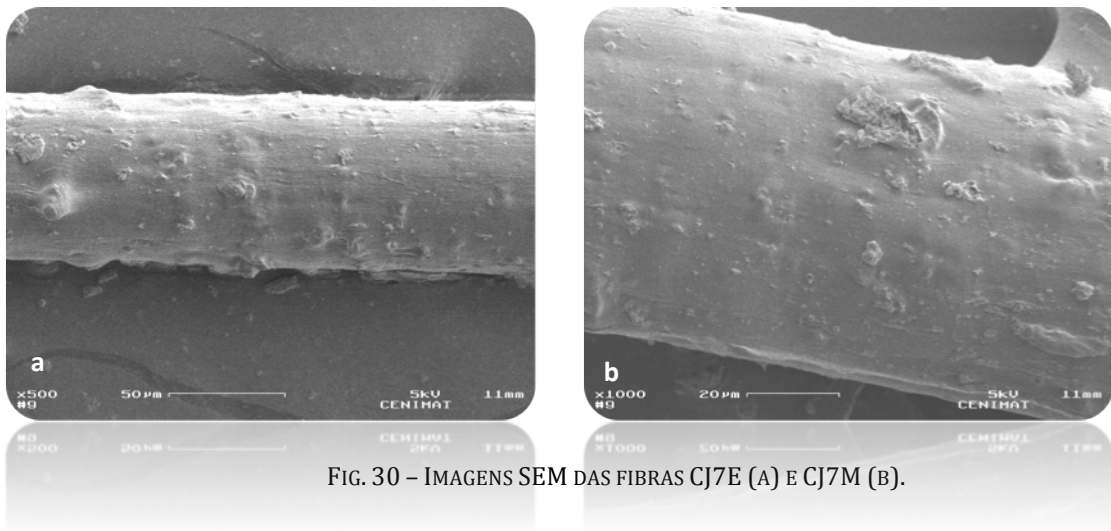


FIG. 30 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ7E (A) E CJ7M (B).

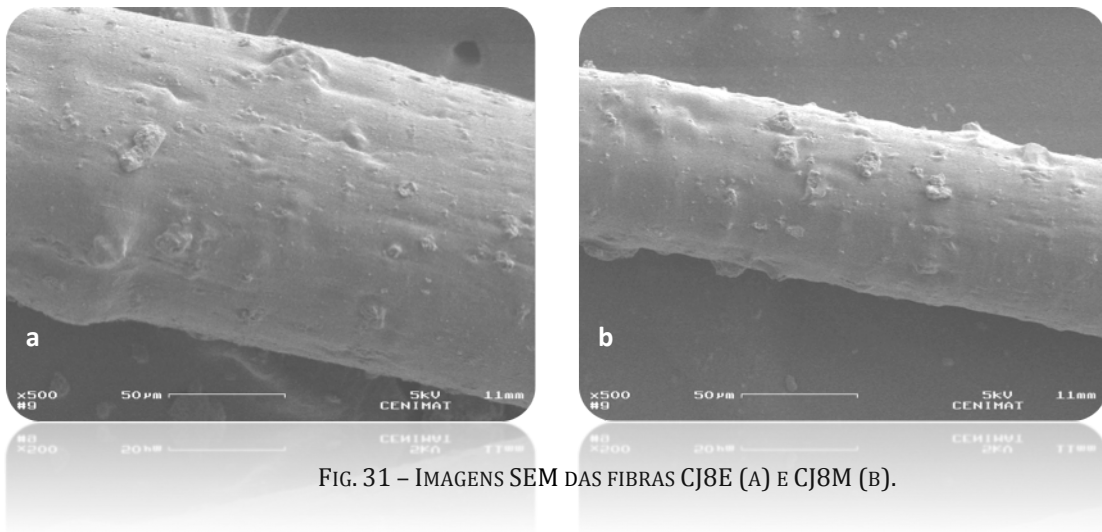


FIG. 31 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ8E (A) E CJ8M (B).

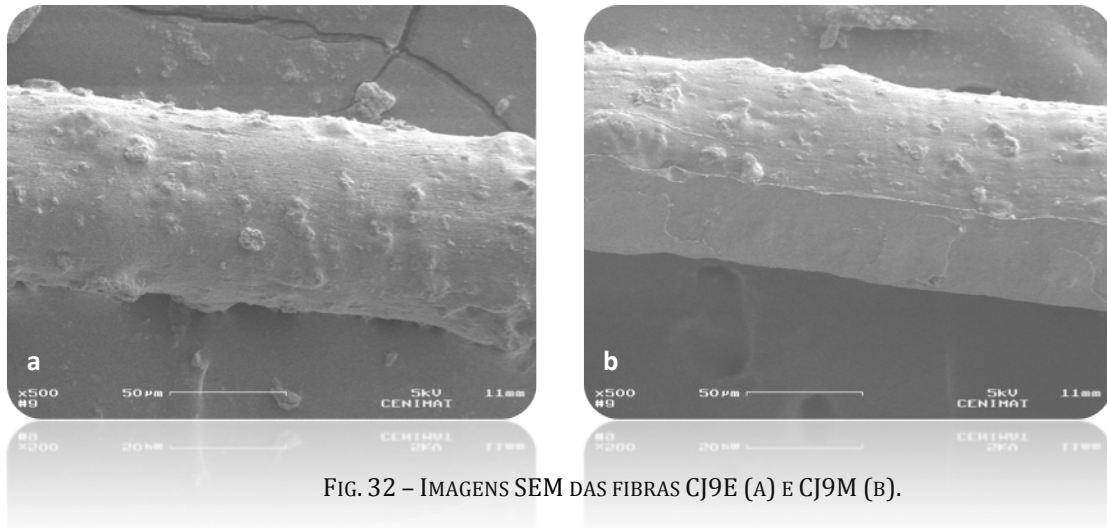


FIG. 32 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ9E (A) E CJ9M (B).

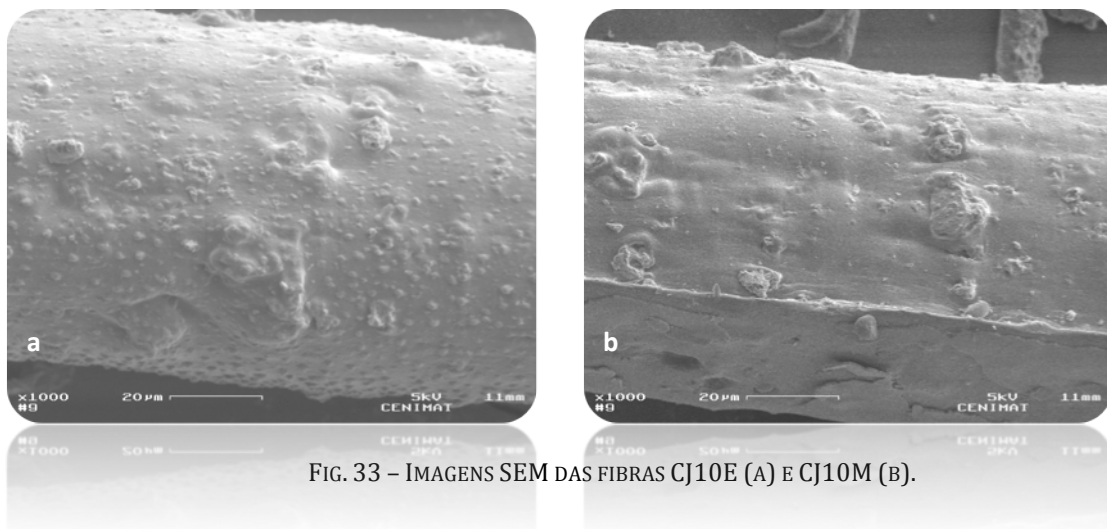


FIG. 33 – IMAGENS SEM DAS FIBRAS CJ10E (A) E CJ10M (B).

As fibras de quitosano revelam uma grande homogeneidade estrutural apresentando-se sem aparentes defeitos. À medida que a quantidade de hidroxiapatite aumenta, as fibras evidenciam uma maior rugosidade. Nas imagens de SEM é visível a perfeita integração da HAp nas fibras de CS, que aprisionam este cerâmico no seu interior.

Nas fibras que estiveram em banhos constituídos por metanol é perceptível a existência de uma zona mais achatada devido ao efeito de colagem que exibem quando em contacto com as folhas de acetato, no processo de secagem ao ar sob tensão. Contudo, este efeito desvanece com contínuo aumento da HAp na constituição da fibra.

As fibras que estiveram em contacto com banhos de metanol não revelam uma diferença morfológica evidente que as distinga das fibras que estiverem em contacto com etanol. Estes resultados são semelhantes aos resultados de Jonathan Knaul (Knaul et al. 1998) em que são estudadas as influências de vários tipos de banhos de secagem, concluindo-se que o etanol e metanol são eficazes na desidratação das fibras, pelo que estas revelam diâmetros menores e superfícies morfológicamente lisas.

### 3.1.3. Diâmetros das Fibras

Apresentam-se em seguida os gráficos (1 a 4) elaborados a partir dos valores médios (em mm) e respectivos desvios padrão, de cada classe de fibras, registados na tabela 7.

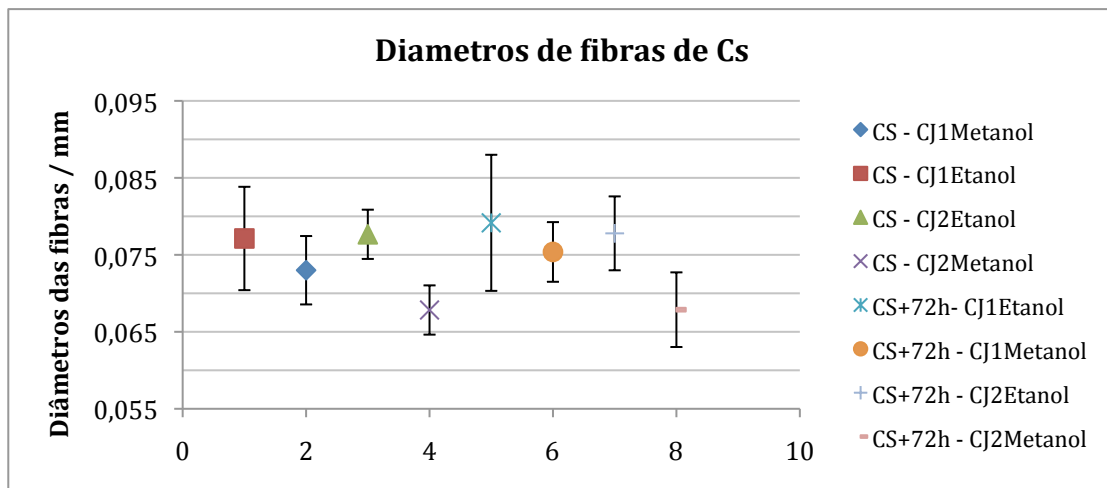


GRÁFICO 1 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS APÓS 30 MIN E APÓS 72H NO BANHO DE SECAGEM.

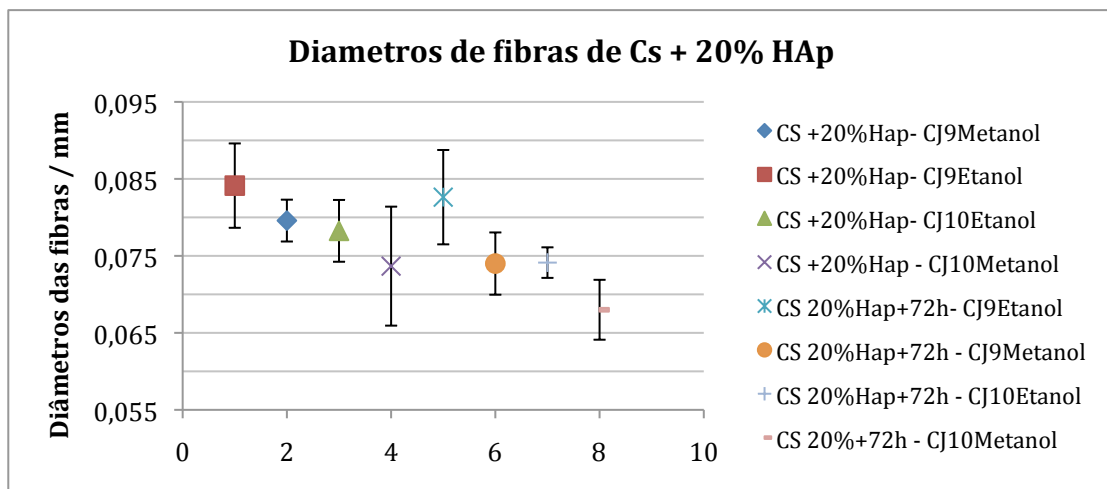


GRÁFICO 2 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS + 20% HAP APÓS 30 MIN E APÓS 72H NO BANHO DE SECAGEM.

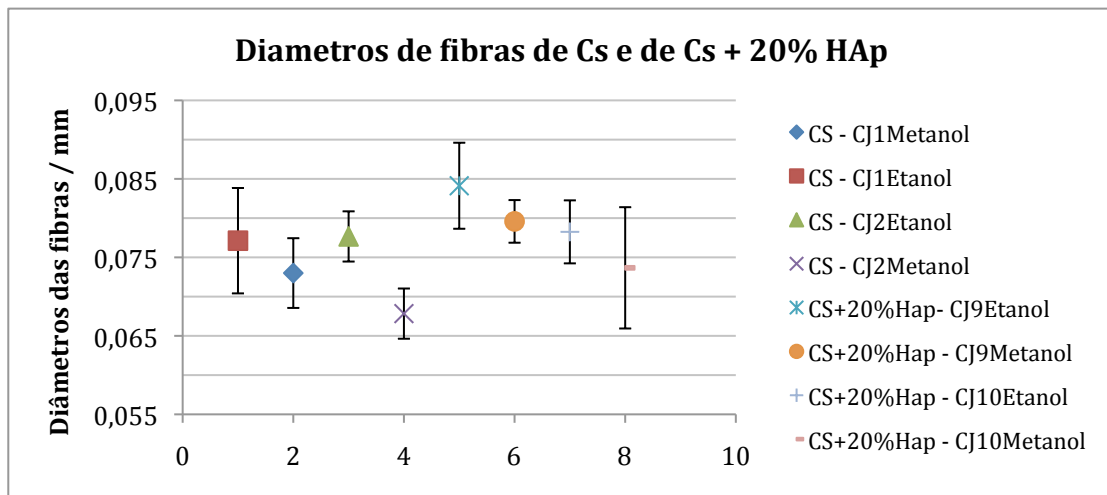


GRÁFICO 3 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS E DE FIBRAS DE CS + 20% HAP , APÓS 30 MIN NO BANHO DE SECAGEM.

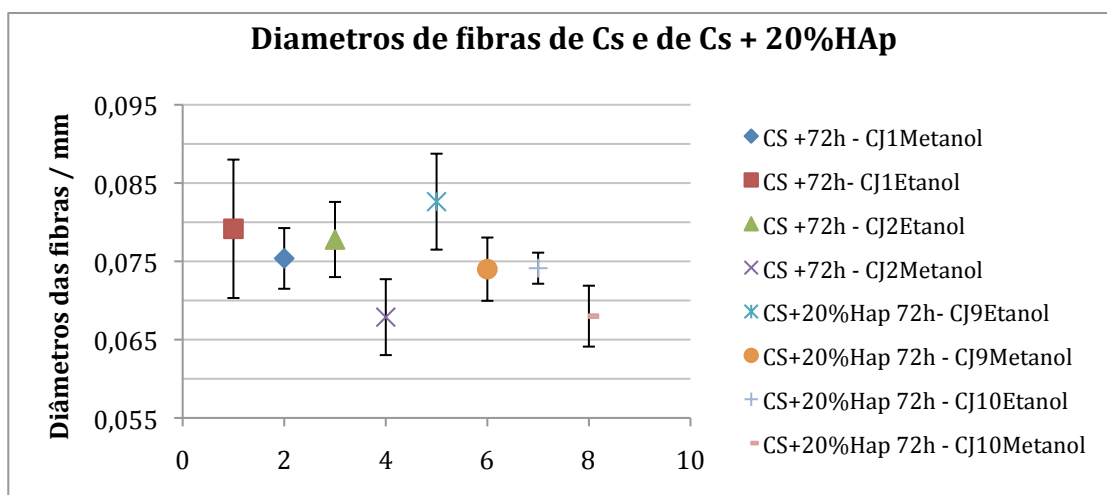


GRÁFICO 4 – DIÂMETROS DE FIBRAS DE CS E DE FIBRAS DE CS + 20% HAP, APÓS 72H NO BANHO DE SECAGEM.

Analisando os gráficos elaborados e os valores envolvidos nas medições (Anexo A) pode-se verificar a semelhança entre os valores dos diâmetros das fibras de CS medidos 30 minutos e medidos 72h após terem sido introduzidos no banho de secagem (Gráfico 1). Nas fibras de CS com 20% HAp verifica-se um ligeiro decréscimo dos valores médios de diâmetro quando o tempo de permanência no banho de secagem aumenta (Gráfico 2).

Embora aparentemente os resultados sejam ligeiramente diferentes, pode-se considerar que nas fibras de quitosano assim como nas fibras de quitosano com 20% de hidroxiapatite incorporada, o tempo de permanência no banho de secagem não é um factor relevante no diâmetro das mesmas, isto atendendo aos valores de desvio padrão associados. Pode-se ainda concluir que a taxa de precipitação do quitosano é suficientemente elevada para formar uma fibra perfeitamente homogénea e por isso os valores dos diâmetros não são directamente influenciados pelos tempos utilizados nos banhos de secagem. O diâmetro das fibras é condicionado, essencialmente, pelas condições de produção (concentração da solução, caudal e estiramento).

TABELA 7 – DIÂMETROS DAS FIBRAS COMPÓSITAS DE QUITOSANO E HIDROXIAPATITE.

Diâmetros das fibras compósitas de quitosano e hidroxiapatite				
Composição	Classe	Valores médios ( $\mu m$ )	Desvio Padrão ( $\mu m$ )	Desvio Padrão (%)
CS após 30 min	CJ1 - Etanol	77	7	9
	CJ1 - Metanol	73	4	6
	CJ2 - Etanol	78	3	4
	CJ2 - Metanol	68	4	7
CS após 72 h	CJ1 - Etanol	79	9	11
	CJ1 - Metanol	75	4	5
	CJ2 - Etanol	78	5	6
	CJ2 - Metanol	68	5	7
CS + 20% HAp após 30 min	CJ9 - Etanol	84	5	7
	CJ9 - Metanol	80	3	3
	CJ10 - Etanol	78	4	5
	CJ10 - Metanol	74	8	11
CS + 20% HAp após 72 h	CJ9 - Etanol	83	6	7
	CJ9 - Metanol	74	4	5
	CJ10 - Etanol	74	2	3
	CJ10 - Metanol	68	4	6

Comparando agora os valores médios dos diâmetros das fibras de CS e das fibras de CS com 20% HAp incorporada, pode-se verificar um aumento ligeiro de diâmetros quando o tempo de estadia das fibras no banho de secagem é de aproximadamente 30 minutos (Gráfico 3). Quando analisamos as fibras 72h depois de terem sido introduzidas no banho, observa-se a semelhança entre valores.

Da observação dos gráficos resulta que, regra geral, os menores diâmetros correspondem a fibras *CJ "par" metanol*, isto é, a fibras cujo banho de coagulação era constituído por 70% NaOH e 30% Metanol, e cujo banho de secagem era constituído por 100% Metanol. As fibras de maior diâmetro correspondem a fibras *CJ "ímpar" etanol*, ou seja, a fibras com banho de coagulação constituído por 100% NaOH e com banho de secagem de 100% Etanol.

## 3.2. CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA

Na caracterização das fibras foram utilizadas fibras de CS e fibras de CS com 20% HAp (p/p). Foram realizados ensaios mecânicos a cada uma das classes de fibras, anteriormente designadas a partir dos tipos de banho de coagulação e secagem envolvidos, e foram ainda distinguidos resultados tendo em conta o tempo de permanência no banho de secagem.

### 3.2.1. Ensaios de Tração

Apresentam-se em seguida os gráficos (5 a 8) elaborados a partir dos valores médios e desvios padrão dos Módulos de Young, obtidos nos ensaios de tração. No Anexo B poderão ser encontrados os dados referentes a cada uma das classes de fibras produzidas assim como os critérios de selecção utilizados.

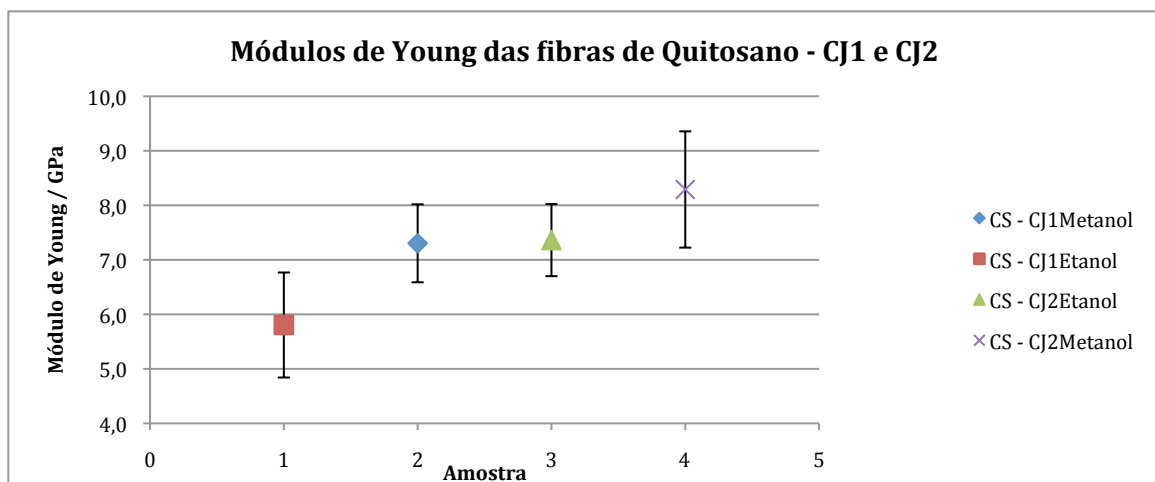


GRÁFICO 5 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NO BANHO DE SECAGEM.

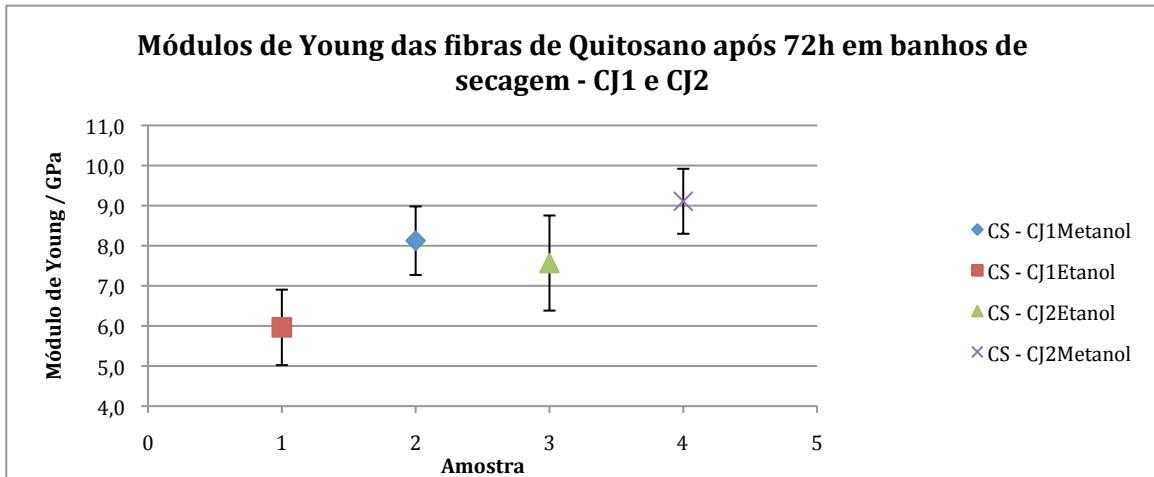


GRÁFICO 6 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS , APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.

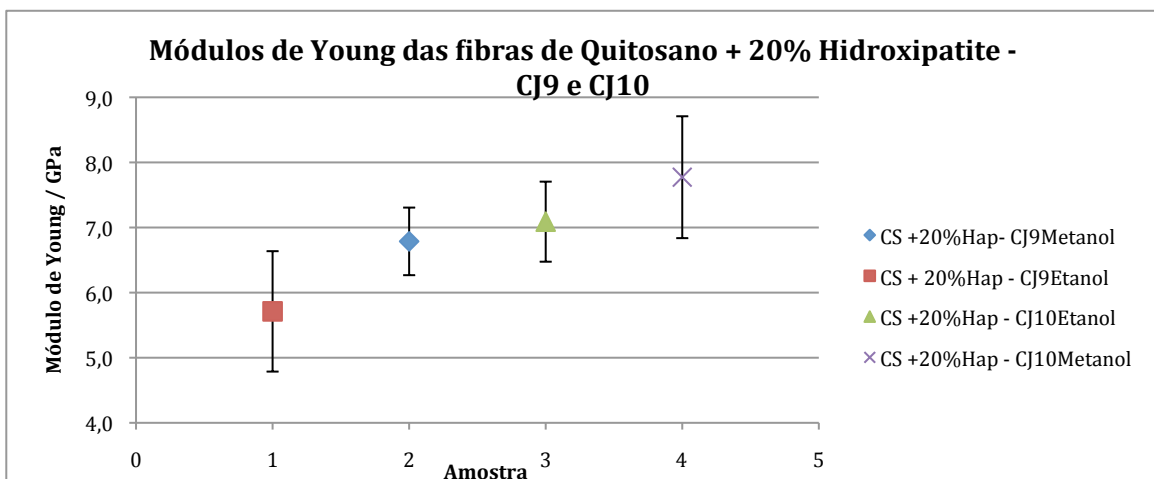


GRÁFICO 7 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM

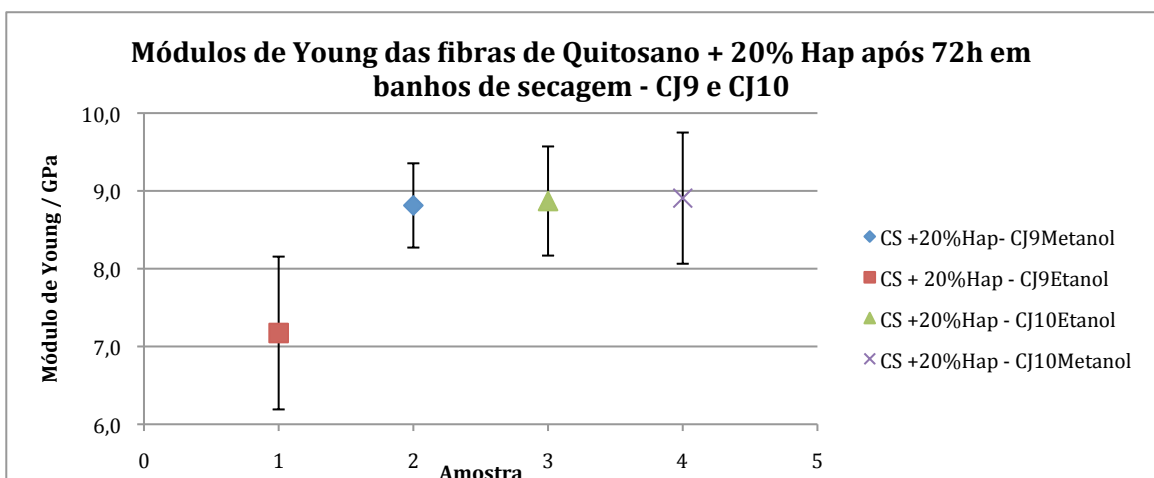


GRÁFICO 8 – MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.

Na tabela 8 encontram-se os valores calculados dos módulos de Young das fibras de CS e HAp, representados graficamente em cima.

Analisando os gráficos, pode generalizar-se a diferença de valores entre fibras com banhos de secagem diferentes, isto é, os módulos de elasticidade de fibras submersas em banhos de secagem de metanol são superiores aos das fibras do mesmo tipo mergulhadas em banhos de secagem de etanol. Também se verificam valores mais elevados de módulos de Young para fibras cujo banho de coagulação é constituído por 70% NaOH e 30% de etanol ou metanol.

Atendendo agora ao tempo de estadia das fibras nos banhos de secagem, e considerando os valores médios e respectivos desvios padrão, verifica-se que não existe uma diferença de valores significativa entre fibras com 30 minutos de permanência e fibras com 72h de permanência. Esta igualdade de valores vem de encontro à similaridade encontrada nos valores dos diâmetros das fibras com diferentes tempos de banhos de secagem.

TABELA 8 – MÓDULO DE YOUNG DAS FIBRAS COMPÓSITAS DE QUITOSANO E HIDROXIAPATITE.

Módulos de Young das fibras compósitas de quitosano e hidroxiapatite				
Composição	Classe	Valores médios (GPa)	Desvio Padrão (GPa)	Desvio Padrão (%)
CS após 30 min	CJ1 - Etanol	5,80	0,96	16,6
	CJ1 - Metanol	7,30	0,71	9,8
	CJ2 - Etanol	7,36	0,66	9,0
	CJ2 - Metanol	8,29	1,07	12,9
CS após 72h	CJ1 - Etanol	5,96	0,94	15,6
	CJ1 - Metanol	8,13	0,85	10,5
	CJ2 - Etanol	7,57	1,19	15,7
	CJ2 - Metanol	9,11	0,81	8,9
CS + 20% HAp após 30 min	CJ9 - Etanol	5,71	0,92	16,2
	CJ9 - Metanol	6,79	0,52	7,7
	CJ10 - Etanol	7,09	0,61	8,7
	CJ10 - Metanol	7,77	0,94	12,0
CS + 20% HAp após 72h	CJ9 - Etanol	7,17	0,98	13,7
	CJ9 - Metanol	8,81	0,54	6,2
	CJ10 - Etanol	8,87	0,70	7,9
	CJ10 - Metanol	8,90	0,84	9,5

Todos os valores registados revelam módulos de Young na ordem dos GPa o que mostra por si só a uniformidade das fibras produzidas, com bom arranjo e empacotamento molecular. Estes valores vêm de encontro aos registados por Qiaoling Hu e colaboradores (Hu et al. 2004), que no

desenvolvimento de cilindros de CS/HAp, estudaram as suas propriedades mecânicas registrando módulos de dobragem de 3,4 GPa. Andrew Wan e colaboradores (Wan et al. 1997) registraram também módulos de elasticidade da ordem dos 4,25 GPa para compósitos de CS e 10% HAp (p/p), ocorrendo diminuição do módulo com o aumento da massa de HAp no compósito.

Pela apreciação dos valores de módulo de elasticidade registrados e respectivos desvios padrão, não se verifica um decréscimo evidente das propriedades mecânicas com o aumento da presença de hidroxiapatite. Atendendo à incerteza associada, os módulos de elasticidade são semelhantes para fibras da mesma classe e com diferente concentração de HAp.

TABELA 9 – TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS COMPÓSITAS DE QUITOSANO E HIDROXIAPATITE.

Tensão de ruptura das fibras compósitas de quitosano e hidroxiapatite			
Composição	Classe	Valores médios (MPa)	Desvio Padrão (MPa)
CS após 30 min	CJ1 - Etanol	89,2	9,0
	CJ1 - Metanol	113,6	16,0
	CJ2 - Etanol	115,3	8,4
	CJ2 - Metanol	134,6	13,4
CS após 72h	CJ1 - Etanol	92,4	20,9
	CJ1 - Metanol	131,3	13,5
	CJ2 - Etanol	111,0	16,9
	CJ2 - Metanol	150,4	16,0
CS + 20% HAp após 30 min	CJ9 - Etanol	62,2	21,1
	CJ9 - Metanol	78,4	26,2
	CJ10 - Etanol	85,8	15,0
	CJ10 - Metanol	102,0	19,2
CS + 20% HAp após 72h	CJ9 - Etanol	86,0	15,0
	CJ9 - Metanol	107,1	13,6
	CJ10 - Etanol	110,3	5,0
	CJ10 - Metanol	117,3	8,4

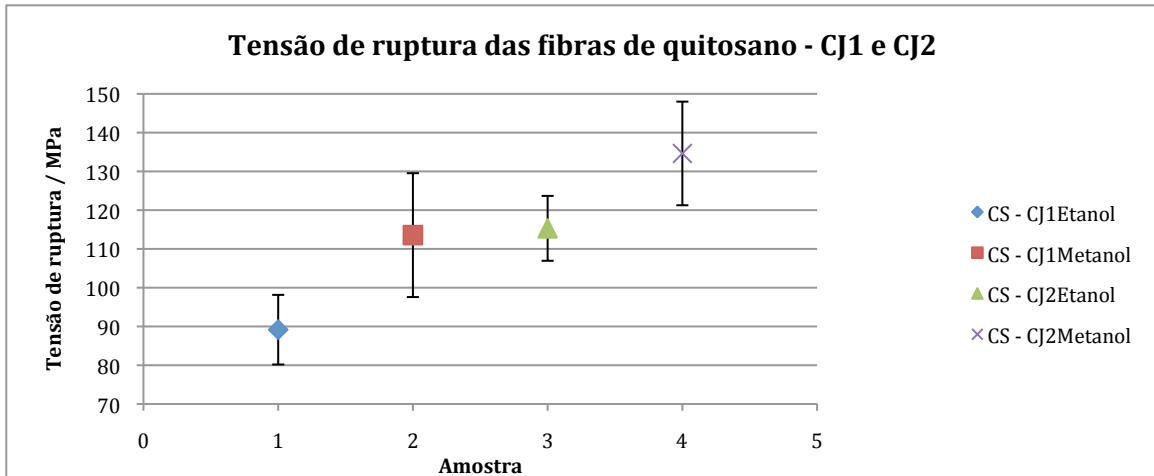


GRÁFICO 9 – TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.

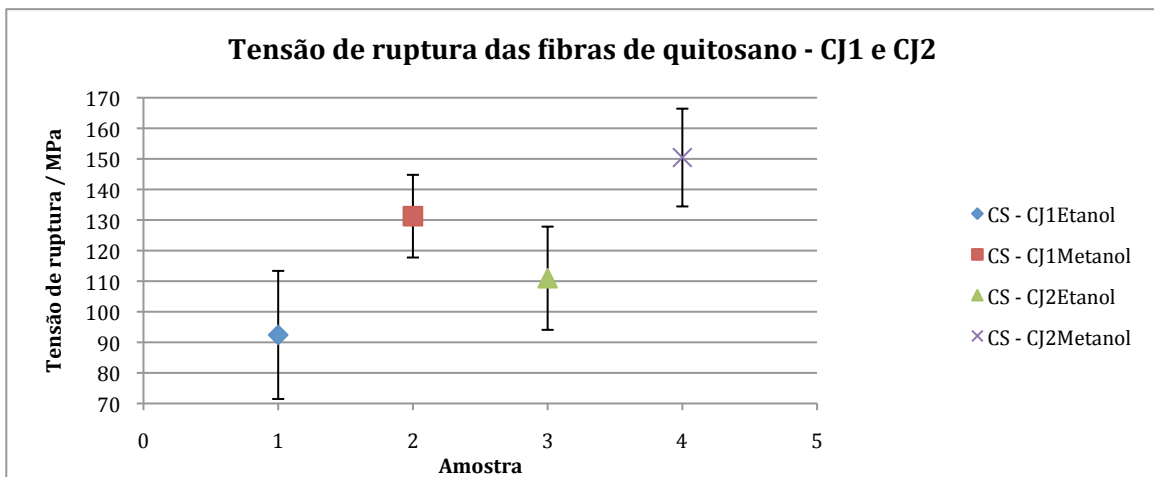


GRÁFICO 10 – TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.

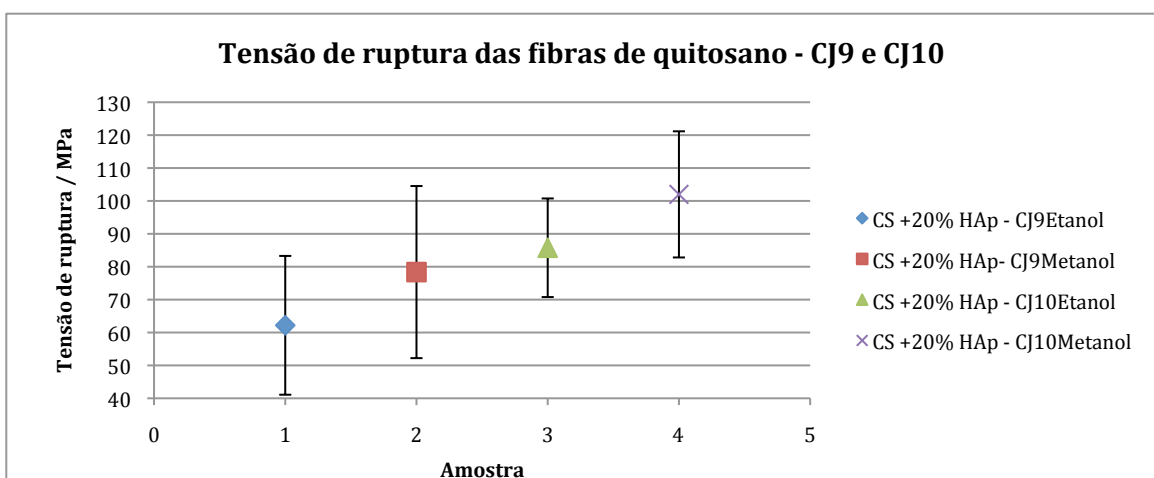


GRÁFICO 11 – TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 30 MIN DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.

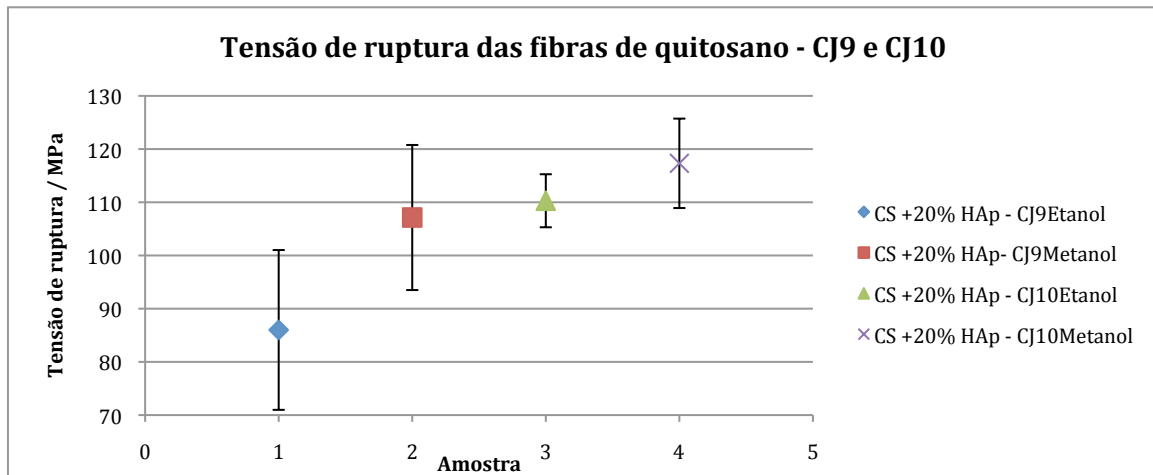


GRÁFICO 12– TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP TRATADAS COM DIFERENTES BANHOS, APÓS 72H DE PERMANÊNCIA NOS BANHOS DE SECAGEM.

O decréscimo das propriedades mecânicas é perceptível com a análise dos valores da tensão de ruptura das fibras compósitas (Tabela 9). Tal como nos valores de módulo de elasticidade, a influência do tempo de permanência nos banhos de secagem não é evidente, tendo sido registados valores semelhantes. Por outro lado, com o aumento da concentração de HAP a tensão de ruptura diminui (ver gráficos 9 a 12), mostrando a crescente fragilidade da fibra. Esta relação é explicada pela fraca adesão do cerâmico ao polímero que levam à ocorrência de quebras internas e naturalmente a uma menor integridade estrutural das fibras, pelo que estas terão tendência a fracturar a valores mais baixos de tensão aplicada.

Pela apreciação das tabelas e gráficos anteriores, pode-se concluir que as fibras produzidas em banhos de coagulação 70% NaOH e 30% metanol e banhos de secagem 100% metanol evidenciam melhores propriedades mecânicas. Com base nesta conclusão, produziram-se fibras com diferentes concentrações de HAP utilizando-se os banhos supra citados. Seguidamente apresentam-se os gráficos (13,14,15) dos módulos de elasticidade, tensões de ruptura e extensões de ruptura das fibras de quitosano com 0%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (p/p) de hidroxiapatite incorporada.

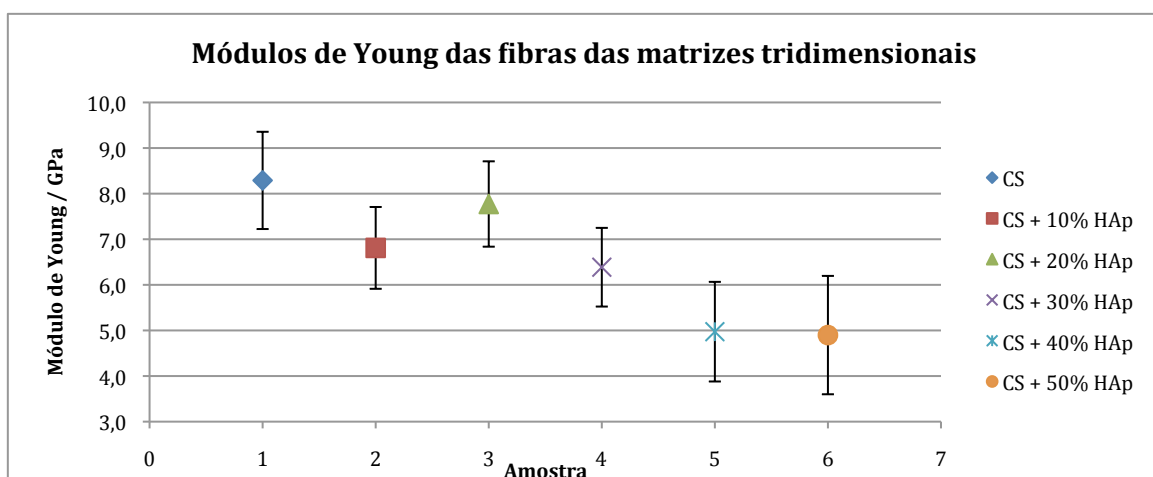


GRÁFICO 13– MÓDULO DE YOUNG DAS FIBRAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

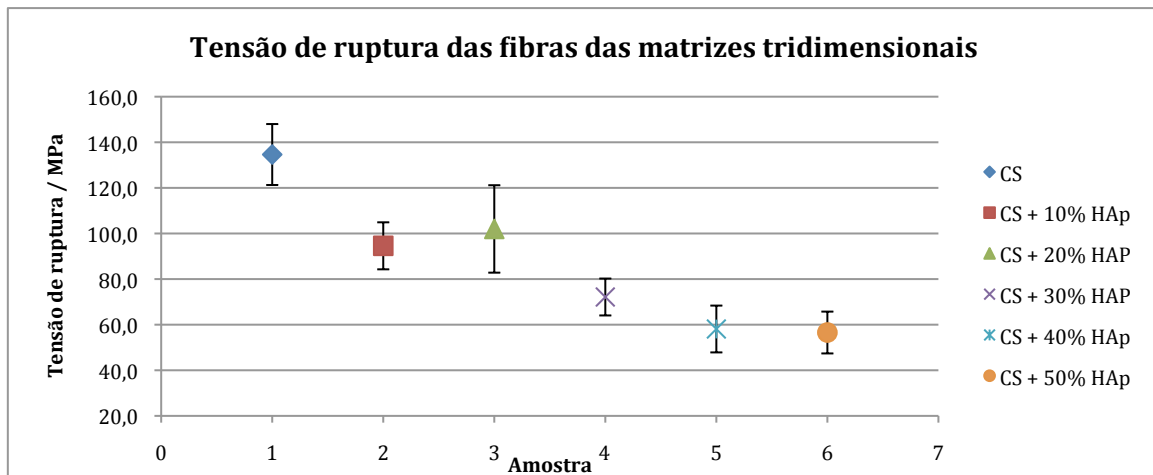


GRÁFICO 14– TENSÃO DE RUPTURA DAS FIBRAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

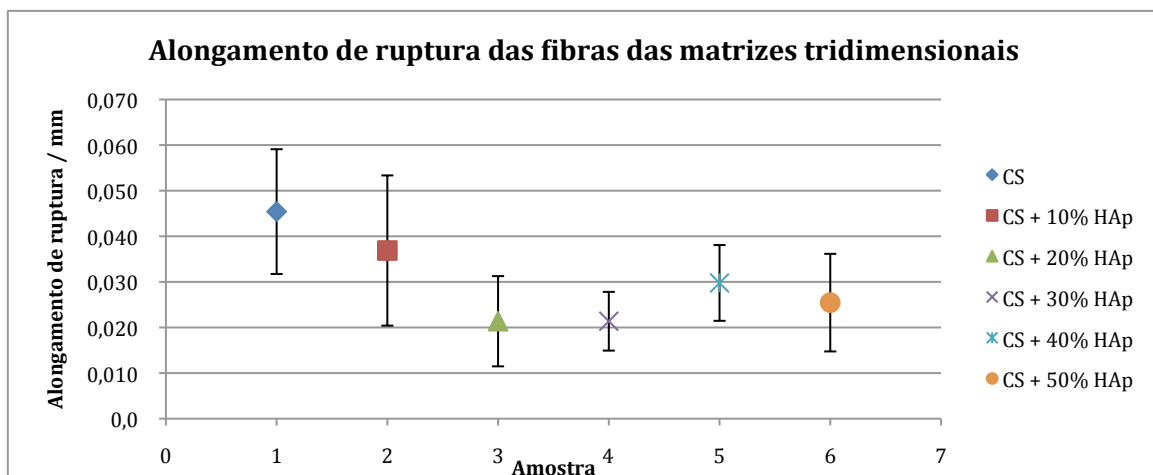


GRÁFICO 15– ALONGAMENTO DE RUPTURA DAS FIBRAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

A análise dos gráficos 13 e 14 revela o decréscimo dos valores de módulo de elasticidade e de tensão de ruptura com o aumento da concentração de hidroxiapatite presente nas fibras. Esta relação vem de encontro à relação encontrada anteriormente entre as fibras de CS e as fibras de CS com 20% HAp. A integridade estrutural das fibras diminui com uma maior concentração de HAp devido à integração da hidroxiapatite no polímero não envolver ligações químicas que actuem como reforço da estrutura do compósito.

Do gráfico 15 pode perceber-se uma contínua diminuição da extensão de ruptura entre fibras de CS, fibras de CS com 10% HAp e fibras de CS com 20% HAp, e a semelhança de valores para fibras de CS com 20%, 30%, 40% e 50% de HAp. Estes últimos valores mostram convergência da extensão de ruptura para concentrações mais elevadas de HAp.

Todos os valores registados foram obtidos com as fibras desidratadas e à temperatura ambiente. É de esperar que ocorra um declínio do módulo de elasticidade e da tensão de ruptura em

aplicações de fibras em meios aquosos, como o ambiente fisiológico, onde as fibras se encontram hidratadas.

Como material de substituição óssea, as fibras compósitas produzidas exibem uma morfologia semelhante às unidades básicas estruturais do osso cortical – *osteons* – compostas por diversos estratos de fibras de colagénio mineralizadas. O osso cortical caracteriza-se por uma estrutura composta por várias camadas de feixes de fibras com alguns milímetros de comprimento e cerca de 20 a 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Pelo método de fiação húmida é possível desenvolver fibras compósitas com morfologia idêntica. No aspecto mecânico, as fibras de CS com 20% HAp possuem uma tensão de ruptura próxima de valores conhecidos de tensão de ruptura longitudinal do osso cortical (115 MPa). Por outro lado, o módulo de elasticidade de  $7,77 \pm 0,98$  GPa que estas fibras evidenciam ainda se encontra algo distante do valor típico médio 17,4 GPa do módulo de elasticidade longitudinal do osso cortical no fémur de adultos. Mesmo assim, o módulo de Young das fibras compósitas aproxima-se do de *osteons* do tipo A ( $5,5 \pm 2,6$  GPa) e do tipo T ( $9,3 \pm 1,6$  GPa) (Cowin 2001).

O osso trabecular possui uma morfologia que não assenta na disposição de fibras (osso cortical) mas sim em blocos originados pela remodelação óssea, dispostos ao longo da trabécula. Possui uma menor densidade e mineralização do que o osso cortical, e caracteriza-se por uma estrutura porosa de 100 a 300  $\mu\text{m}$  de espessura. Os valores das propriedades mecânicas, embora não consensuais na literatura, são da ordem dos 0,76 – 20 GPa (Cowin 2001). Embora morfologicamente as fibras não sejam idênticas ao osso trabecular, poderá ser construída uma estrutura tridimensional, com uma disposição de fibras capaz de simular os poros e a espessura trabecular, através do aperfeiçoamento do método utilizado neste trabalho para a elaboração de *scaffolds*.

### 3.3. ANÁLISE BIOLÓGICA

#### 3.3.1. Testes Citotóxicos

Os testes de citotoxicidade culminaram com a realização da leitura da densidade óptica. Na tabela 10 apresentam-se os valores da densidade óptica de cada uma das amostras utilizadas.

Tomando como referência os valores de controlo celular e considerando o seu valor médio o valor máximo de viabilidade celular (100%), calculou-se a viabilidade celular de cada classe de *scaffold*.

Realizaram-se três experiências diferentes com as matrizes tridimensionais. Nas duas primeiras leituras de densidade óptica os testes de citotoxicidade revelaram que as estruturas produzidas não eram adequadas para interação com o organismo. A toxicidade revelada na primeira experiência foi atribuída ao pH excessivo do meio na presença de microfibras. Na segunda experiência, com a introdução de uma etapa de lavagem da matriz, a presença da cola de cianocrilato foi a responsável pela morte celular. A terceira experiência, em que foi usada solução de CS a 6% como promotora de maior estabilidade da estrutura, revelou ausência de toxicidade da matriz de fibras.

Analisando então os valores de densidade óptica das matrizes produzidas na terceira experiência, pode-se concluir que os *scaffolds* construídos apresentam uma taxa de viabilidade elevada, promovendo o crescimento e a proliferação celular.

TABELA 10 – DENSIDADE ÓPTICA DAS AMOSTRAS DE SCAFFOLDS APÓS OS TESTES DE CITOTOXICIDADE.

Densidade Óptica					
	CS	CS + 30%	CS + 50%	Controlo positivo	Controlo celular
Amostra 1	0,739	0,484	0,536	0,002	0,349
Amostra 2	0,523	0,412	0,632	0,002	0,398
Amostra 3	0,614	0,590	0,753	0,003	0,317
Valores médios	0,625	0,495	0,640	0,002	0,355
Viabilidade Celular média%	176 %	140 %	180 %	0,7 %	100 %

### 3.2.2. Culturas Celulares

Para a observação das amostras de matrizes tridimensionais, após as culturas celulares, utilizou-se novamente o microscópio electrónico de varrimento.

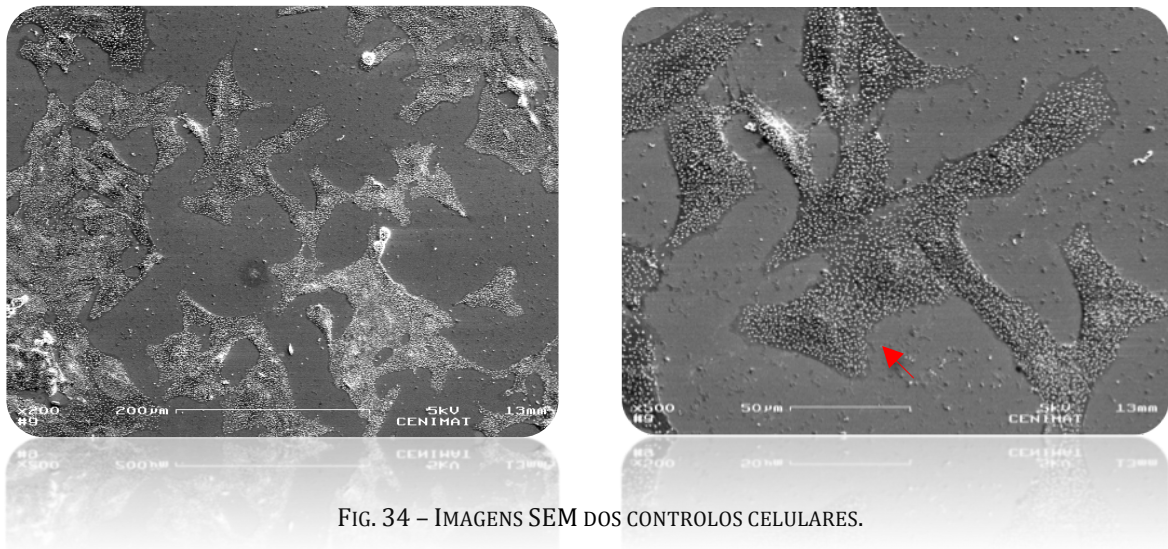


FIG. 34 – IMAGENS SEM DOS CONTROLOS CELULARES.

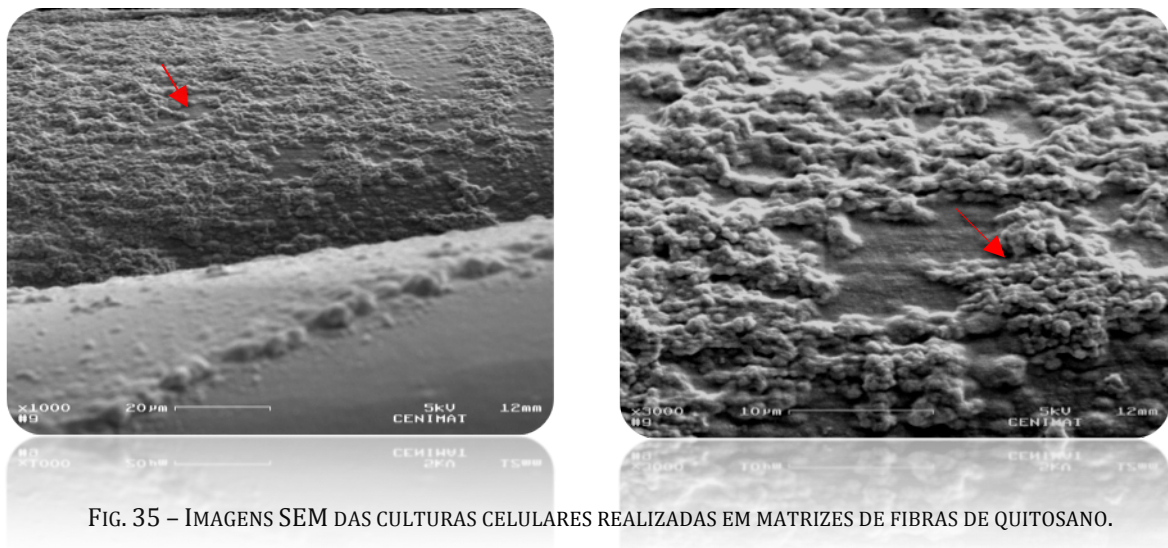


FIG. 35 – IMAGENS SEM DAS CULTURAS CELULARES REALIZADAS EM MATRIZES DE FIBRAS DE QUITOSANO.

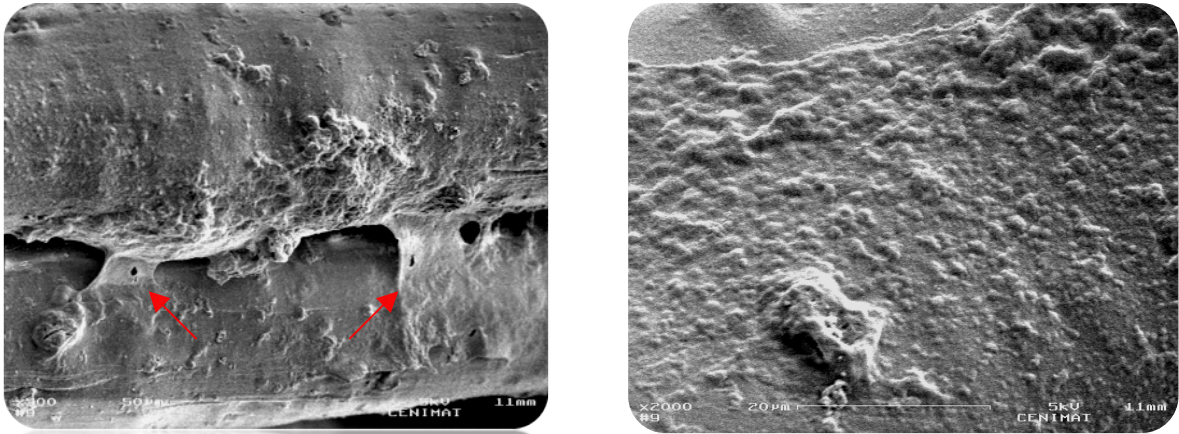


FIG. 36 – IMAGENS SEM DAS CULTURAS CELULARES REALIZADAS EM MATRIZES DE FIBRAS DE QUITOSANO COM 30% DE HIDROXIAPATITE (P/P).

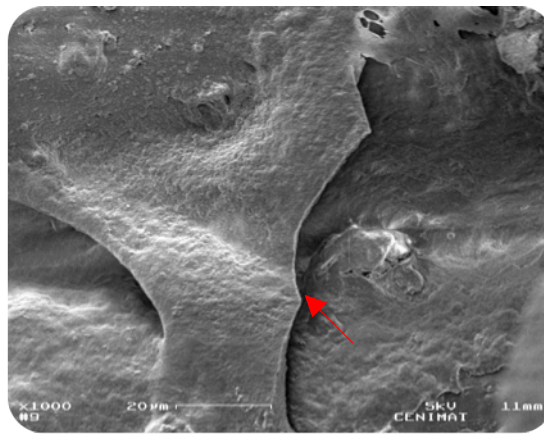


FIG. 37 – IMAGEM SEM DAS CULTURAS CELULARES REALIZADAS EM MATRIZES DE FIBRAS DE QUITOSANO COM 50% DE HIDROXIAPATITE (P/P).

As figuras 35 a 37 mostram as fibras de quitosano com hidroxiapatite, das amostras das matrizes tridimensionais construídas, após a realização das culturas celulares. As setas a vermelho indicam zonas de localização das células. Nas imagens 36 e 37 é possível perceber pequenos tapetes de células que estabelecem uma ligação interfibras.

Estas imagens vêm comprovar os testes de citotoxicidade, demonstrando a viabilidade celular com a existência de células à superfície das fibras, após 24 horas de cultura.

## 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho realizado nesta dissertação, inserido na área dos Biomateriais e da Engenharia de Tecidos, teve como objectivo a produção de microfibras compósitas de quitosano e hidroxiapatite.

Produziram-se nano-pós de HAp pelo método sol-gel, usando um processo que não requer controlo de pH nem temperaturas elevadas. Como precursores de fosfato e cálcio foram usados  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$ , respectivamente, tendo sido preparadas soluções que obedeciam à razão molar  $\text{Ca/P} = 1,67$ . Utilizou-se um período de envelhecimento de 24h sob agitação, o que permitiu uma boa relação entre a viscosidade do sol e a formação da HAp. A análise morfológica por TEM demonstrou a existência de grãos de hidroxiapatite com diâmetros na ordem dos 100 nm, dimensões que permitem integração em fibras à escala micrométrica.

A técnica de fiação húmida possibilitou a produção de microfibras compósitas de uma forma simples, rápida e funcional, conseguindo-se um controlo eficaz de todas as suas etapas de elaboração. Utilizando banhos de coagulação e secagem envolvendo NaOH, etanol e metanol, foi possível coagular soluções envolvendo os biomateriais referidos.

As várias microfibras de CS e HAp foram adquiridas por esta via após a preparação de soluções com quantidades diferentes de HAp em quitosano. A dispersão prévia destes dois materiais em água antes da adição de ácido acético a 10%, levou a maior homogeneização da solução final.

Com o objectivo de caracterizar morfológica e mecanicamente as fibras compósitas, produziram-se várias fibras de quitosano com 0%, 5%, 10%, 15% e 20% de HAp (p/p). As imagens obtidas por SEM revelaram a integração da HAp no polímero. Os ensaios de tracção desvendaram diferenças entre as fibras de CS e as fibras de CS com 20% HAp.

Após a análise das propriedades mecânicas e da morfologia concluiu-se que as fibras resultantes de banhos de coagulação de 70% NaOH e 30% metanol e de banhos de secagem de 100% metanol, possuem as melhores propriedades para a produção de matrizes tridimensionais. O tempo de permanência nos banhos de secagem de 72 horas foi preterido visto não provocar uma melhoria significativa das propriedades mecânicas em relação ao tempo despendido na formação das fibras. Na presença de uma concentração de 40% de HAp (p/p) o processo de fiação das fibras por *wet spinning* tornou-se instável. É frequente a fiação ser interrompida como resultado do “excesso” de cerâmico que integra o polímero, o que resulta na quebra da estrutura.

Com base nas conclusões anteriores, desenvolveram-se *scaffolds* de fibras compósitas de quitosano e 0%,10%,20%,30%,40% e 50% de HAp. A produção de matrizes com fibras de CS e 40% HAp assim como de CS e 50% HAp, mostrou ser de um grau de dificuldade acrescido devido à fragilidade das fibras que compõem o *scaffold*. Frequentemente as fibras não suportaram a torção nos pinos do molde. Apesar disso, foi possível construir estas matrizes tridimensionais. É de esperar que com o aumento da concentração de HAp nas fibras de CS, mais difícil se torne a elaboração de matrizes, pois a fragilidade das fibras terá também tendência a aumentar. Os ensaios de tracção

realizados às fibras utilizadas para a produção de matrizes revelaram uma diminuição do módulo de elasticidade e da tensão de ruptura com o aumento da HAp presente. Mediante esta análise constatou-se a redução das tensões suportadas para os compósitos com mais alto conteúdo de cerâmico, com a conservação da sua ductilidade.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* realizados em amostras de matrizes de CS, CS + 30% HAp e CS + 50% HAp, revelaram a não toxicidade e a viabilidade celular nas mesmas. A análise morfológica por SEM, das matrizes produzidas, nas quais foram realizadas culturas celulares, comprovou os resultados dos testes de citotoxicidade, com a confirmação da existência de células à superfície das fibras que compõem as matrizes.

A realização de testes *in vivo* assim como testes de degradação serão também importantes para aferir o desempenho dos compósitos quando colocados num organismo.

A técnica de produção de fibras compósitas utilizada poderá ser melhorada com a automatização da etapa de secagem e com a introdução de um injetor múltiplo, capaz de produzir maior quantidade de fibras no mesmo espaço de tempo.

Na elaboração de matrizes de fibras será importante aperfeiçoar o método utilizado para que este se torne mais rápido e permita obter matrizes com mais estratos e com menos espaços intersticiais.

Um dos possíveis futuros desenvolvimentos para as fibras compósitas passa pela construção de um sistema misto de produção de fibras e de matrizes em simultâneo. A elaboração de um sistema robotizado que permita a deposição da solução no banho de coagulação com um padrão previamente programado, tornará o método de produção mais eficiente e com melhor controlo da localização das fibras.

Numa outra vertente, conseguindo melhorar as propriedades mecânicas, elevando os módulos de elasticidade e as tensões de ruptura, poderão ser produzidos fios de sutura, como os utilizados na área ortopédica, baseados neste tipo de fibras compósitas.

## 5. BIBLIOGRAFIA

Abe, A., K. Dusek & S. Kobayashi. 2010. Biopolymers - Lignin, Proteins, Bioactive Nanocomposites. Springer. Berlin, German.

Araujo, T. S. d. 2008. Hidroxiapatita Pura e Dopada com Cr<sup>3+</sup>. In *Produção, Propriedades e Aplicação em Biosensores*, ed. J. B. d. Santos-Filho. Aracaju -SE.

Barbucci, R. 2002. Integrated Biomaterials Science. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Bezzi, G., G. Celotti, E. Landi, T. M. G. La Torretta, I. Sopyan & A. Tampieri (2003) A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation. *Materials Chemistry and Physics*, 78, 816-824.

Bogdanoviciene, I., A. Beganskiene, K. Tonsuaadu, J. Glaser, H. J. Meyer & A. Kareiva (2006) Calcium hydroxyapatite, Ca-10(PO<sub>4</sub>)(6)(OH)(2) ceramics prepared by aqueous sol-gel processing. *Materials Research Bulletin*, 41, 1754-1762.

Bose, S. 2003. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanopowders by Emulsion Technique. ed. S. K. Saha. American Chemical Society.

Bronzino, J. 2008. Tissue Engineering. 1st edition - Mar 25. Academic Press. London, UK.

Bronzino, J. D. & J. B. Park. 2003. Biomaterials. In *Principles and Applications*. CRC Press.

Callister Jr., W. D. 2005. Fundamentals of Materials Science and Engineering. In *An Integrated Approach*. John Wiley & Sons, Inc.

Carlson, G. Osteoclasts. <http://www.sciencephoto.com> 25/09/2010, Science Photo Library.

Centexbel. <http://www.centexbel.be/solgel-treatment>, 23/09/2010.

Cowin, S. C. (2001) Bone Mechanics Handbook - Second Edition, 10-7, CRC Press. Florida, USA.

Dubok, V. A. (2000) Bioceramics - Yesterday, today, tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, 39, 381-394.

Eshtiagh-Hosseini, H., M. R. Housaindokht & M. Chahkandi (2007) Effects of parameters of sol-gel process on the phase evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Materials Chemistry and Physics*, 106, 310-316.

Faria, C. C. 2008. Optimização dos Parâmetros de Projecção Térmica em Revestimentos de Hidroxiapatite - Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica. Lisboa: FCT/UNL.

Fathi, M. H. & A. Hanifi (2007) Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method. *Materials Letters*, 61, 3978-3983.

- Franco, P. Q. 2009. Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofiação - Tese de Mestrado em Biotecnologia. Lisboa: FCT/UNL.
- Fung, M. 2001. Hydroxyapatite - Structural Overview. ed. W. J. Huang. New York City: Institute for Collaborative Education.
- Ge, Z., S. Baguenard, L. Y. Lim, A. Wee & E. Khor (2004) Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials*, 25, 1049-1058.
- Gschmeissner, S. Calcium phosphate crystal. <http://www.sciencephoto.com>, 25/09/2010 .Science Photo Library.
- Gutierrez, M. 2006. Substituintes Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual. ed. M. A. Lopes. Porto: Arquivos de Medicina.
- Hirano, S. (2001) Wet-spinning and applications of functional fibers based on chitin and chitosan. *Macromolecular Symposia*, 168, 21-30.
- Hollister. 2005. Cartilage regeneration by chondrocyte delivery on designed Bioplotter-fabricated PEG/PBT scaffolds is superior to PEG/PBT scaffolds made by porogen leaching. 518-524. *Nature Materials*.
- Hu, Q., B. Li, M. Wang & J. Shen (2004) Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, 25, 779-785.
- Khor, E. & L. Y. Lim (2003) Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339-2349.
- Kim, I.-Y., S.-J. Seo, H.-S. Moon, M.-K. Yoo, I.-Y. Park, B.-C. Kim & C.-S. Cho (2007) Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26, 1-21.
- Kim, I. S. & P. N. Kumta (2004) Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder. *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology*, 111, 232-236.
- Knaut, J., M. Hooper, C. Chanyi & K. A. M. Creber (1998) Improvements in the drying process for wet-spun chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 69, 1435-1444.
- Kong, L., Y. Gao, G. Lu, Y. Gong, N. Zhao & X. Zhang (2006) A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 42, 3171-3179.
- Liu, D. M., Q. Z. Yang, T. Troczynski & W. J. J. Tseng (2002) Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*, 23, 1679-1687.

Luz, G. M. d. 2007. Revestimentos de Hidroxiapatite em Titânio pela Técnica Sol Gel. In *Da construção de um Dip Coater ao revestimento de Implantes Dentários*. Lisboa: G.A.M.L - FCT/UNL.

Murugan, R. & S. Ramakrishna (2004) Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials*, 25, 3829-3835.

Pillai, C. K. S., W. Paul & C. P. Sharma (2009) Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641-678.

Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.

Salas, J. 2006. Synthesis of Hydroxyapatite by Mechanochemical transformation. ed. Z. Benzo. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 2004.

Shi, D. 2006. Introduction to Biomaterials. Tsinghua University Press.

Vallet-Regi, M. (2010) Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chimie*, 13, 174-185.

Vital, C. C., A. P. B. Borges, C. C. Fonseca, A. C. Tsiomis, T. B. Carvalho, E. B. Fontes, M. P. Sena & G. Fofano (2006) Biocompatibility and behavior of hydroxyapatite on bone defect on rabbit's ulna. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 58, 175-183.

Wan, A. C. A., E. Khor & G. W. Hastings (1997) Hydroxyapatite modified chitin as potential hard tissue substitute material. *Journal of Biomedical Materials Research*, 38, 235-241.

Wang, F., M. S. Li, Y. P. Lu & Y. X. Qi (2005) A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. *Materials Letters*, 59, 916-919.

Weng, W. J. & J. L. Baptista (1998) Sol gel derived porous hydroxyapatite coatings. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 9, 159-163.

Williams, D. F. 1999. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University Press. Liverpool, UK.

Wise, D. L. 2000. Biomaterials and Bioengineering Handbook. CRC Press.

Wright, J. 2001. Sol-gel materials: chemistry and applications. ed. N. Sommerdijk, 1-7. CRC Press.

Xu, H. H. K., S. Takagi, L. Sun, L. Hussain, L. C. Chow, W. F. Guthrie & J. H. Yen. 2006. Development of a nonrigid, durable calcium phosphate cement for use in periodontal bone repair. 1131-1138. American Dental Association.

Zhao, F., W. L. Grayson, T. Ma, B. Bunnell & W. W. Lu (2006) Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan-gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development. *Biomaterials*, 27, 1859-1867.

## ANEXOS

## ANEXO A – DIÂMETROS DAS FIBRAS

TABELA A1 – VALORES MEDIDOS DOS DIÂMETROS DAS FIBRAS DE CS E DE CS + 20% HAP (EM MILÍMETROS).

Nº Amostra	Quitosano				Quitosano + 20% Hap			
	CJ1 - Etanol	CJ1-Metanol	CJ2-Etanol	CJ2-Metanol	CJ9-Etanol	CJ9-Metanol	CJ10-Etanol	CJ10-Metanol
1	0,076	0,072	0,075	0,074	0,083	0,081	0,077	0,079
2	0,074	0,070	0,081	0,075	0,080	0,074	0,079	0,074
3	0,077	0,075	0,077	0,075	0,079	0,076	0,079	0,077
4	0,083	0,072	0,078	0,072	0,087	0,081	0,079	0,076
5	0,082	0,073	0,081	0,076	0,078	0,080	0,078	0,076
6	0,071	0,073	0,085	0,065	0,091	0,079	0,075	0,069
7	0,071	0,071	0,077	0,067	0,093	0,077	0,080	0,078
8	0,075	0,076	0,078	0,067	0,088	0,083	0,078	0,080
9	0,071	0,079	0,074	0,070	0,089	0,080	0,079	0,079
10	0,074	0,081	0,072	0,071	0,088	0,075	0,082	0,078
11	0,079	0,074	0,074	0,066	0,092	0,083	0,078	0,079
12	0,074	0,081	0,076	0,068	0,078	0,084	0,078	0,080
13	0,074	0,076	0,077	0,064	0,076	0,080	0,080	0,064
14	0,077	0,063	0,076	0,068	0,079	0,080	0,081	0,073
15	0,074	0,070	0,073	0,062	0,080	0,080	0,083	0,046
16	0,088	0,065	0,083	0,064	0,081	0,075	0,082	0,064
17	0,086	0,070	0,079	0,065	0,080	0,081	0,084	0,073
18	0,087	0,077	0,076	0,059	0,078	0,079	0,079	0,072
19	0,088	0,076	0,078	0,069	0,080	0,079	0,080	0,064
20	0,084	0,075	0,075	0,061	0,088	0,083	0,077	0,075
21	0,073	0,071	0,081	0,068	0,091	0,078	0,072	0,078
22	0,083	0,067	0,078	0,069	0,090	0,079	0,064	0,078
23	0,064	0,072	0,079	0,068	0,089	0,080	0,075	0,078
24	0,066	0,073	0,081	0,065	0,081	0,083	0,079	0,078
<b>Média</b>	<b>0,077</b>	<b>0,073</b>	<b>0,078</b>	<b>0,068</b>	<b>0,084</b>	<b>0,080</b>	<b>0,078</b>	<b>0,074</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,007</b>	<b>0,004</b>	<b>0,003</b>	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	<b>0,003</b>	<b>0,004</b>	<b>0,008</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>8,7</b>	<b>6,1</b>	<b>4,1</b>	<b>6,6</b>	<b>6,5</b>	<b>3,4</b>	<b>5,1</b>	<b>10,5</b>

TABELA A2 – VALORES MEDIDOS DOS DIÂMETROS DAS FIBRAS DE CS E DAS FIBRAS DE CS + 20% HAP, APÓS 72H (EM MILÍMETROS).

Nº Amostra	Quitosano - 72h de secagem				Quitosano + 20% Hap - 72h de secagem			
	CJ1 - Etanol	CJ1-Metanol	CJ2-Etanol	CJ2-Metanol	CJ9-Etanol	CJ9-Metanol	CJ10-Etanol	CJ10-Metanol
1	0,078	0,072	0,078	0,058	0,089	0,067	0,074	0,059
2	0,086	0,069	0,077	0,061	0,089	0,075	0,075	0,063
3	0,085	0,074	0,080	0,064	0,087	0,073	0,077	0,063
4	0,082	0,067	0,080	0,067	0,083	0,074	0,074	0,069
5	0,068	0,079	0,081	0,075	0,070	0,073	0,075	0,071
6	0,068	0,079	0,095	0,075	0,086	0,078	0,078	0,073
7	0,076	0,080	0,067	0,073	0,081	0,072	0,074	0,073
8	0,072	0,070	0,078	0,077	0,081	0,071	0,072	0,067
9	0,082	0,076	0,080	0,072	0,087	0,079	0,073	0,067
10	0,074	0,074	0,079	0,068	0,083	0,077	0,074	0,067
11	0,071	0,078	0,080	0,069	0,076	0,073	0,075	0,070
12	0,061	0,078	0,074	0,066	0,076	0,079	0,071	0,069
13	0,088	0,078	0,078	0,069	0,077	0,079	0,070	0,063
14	0,071	0,079	0,072	0,072	0,084	0,072	0,075	0,070
15	0,087	0,074	0,074	0,067	0,087	0,069	0,072	0,063
16	0,089	0,071	0,078	0,067	0,083	0,065	0,074	0,065
17	0,089	0,074	0,078	0,072	0,085	0,069	0,076	0,070
18	0,088	0,071	0,075	0,070	0,082	0,078	0,077	0,070
19	0,089	0,075	0,079	0,066	0,081	0,074	0,074	0,071
20	-	0,076	0,077	0,060	0,101	0,072	0,073	0,067
21	-	0,077	0,079	0,063	0,079	0,075	0,073	0,068
22	-	0,076	0,077	0,064	0,081	0,075	0,077	0,068
23	-	0,081	0,076	0,067	0,080	0,081	0,074	0,076
24	-	0,081	0,075	0,067	0,075	0,076	0,072	0,070
<b>Média</b>	<b>0,079</b>	<b>0,075</b>	<b>0,078</b>	<b>0,068</b>	<b>0,083</b>	<b>0,074</b>	<b>0,074</b>	<b>0,068</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,009</b>	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	<b>0,005</b>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>11,2</b>	<b>5,1</b>	<b>6,2</b>	<b>7,1</b>	<b>7,4</b>	<b>5,5</b>	<b>2,7</b>	<b>5,7</b>

## ANEXO B – ENSAIOS DE TRACÇÃO

### Módulo de Young

O módulo de Young ou módulo de elasticidade consiste num parâmetro mecânico que traduz uma medida de rigidez elástica de um material sólido. Esta medida, estabelecida pela lei de Hooke, é dada pela razão da tensão pela deformação sofrida pelo material, ou seja:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

em que  $\sigma$  corresponde à tensão e  $\varepsilon$  à extensão, e que por sua vez são definidos por

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{e} \quad \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

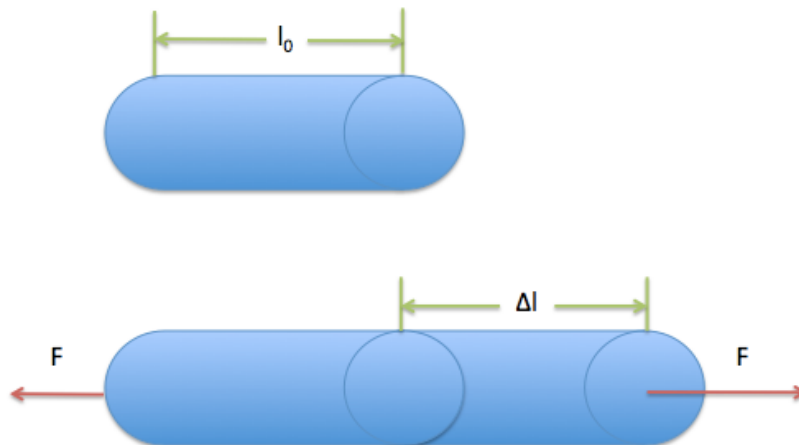


FIG. B1 – ESQUEMA DA DEFORMAÇÃO DE UM PROVETE CILÍNDRICO DEVIDA A UMA FORÇA APLICADA.

onde  $F$  é a força medida em Newton,  $A$  é a área de secção na qual se exerce tensão,  $\Delta l$  é a variação de comprimento,  $l_0$  é o comprimento inicial, e  $E$  é o módulo de Young medido em Pascal. Na figura B1 encontra-se representado o esquema de deformação de um provete cilíndrico, semelhante à deformação provocada nas fibras produzidas, devido a uma força longitudinal aplicada.

## Ensaio

Os ensaios de tracção consistem na realização de um esforço de sobre um corpo de prova, que tende a alongá-lo e esticá-lo até à ruptura.

Com recurso a uma máquina de tracção, os provetes são fixados e sujeitos a aplicação de uma força crescente na sua direcção axial, sendo medidas as deformações correspondentes e registadas as cargas induzidas. Estes dados permitem a construção de gráficos de tensão/deformação no qual se pode avaliar o comportamento do material durante o ensaio.

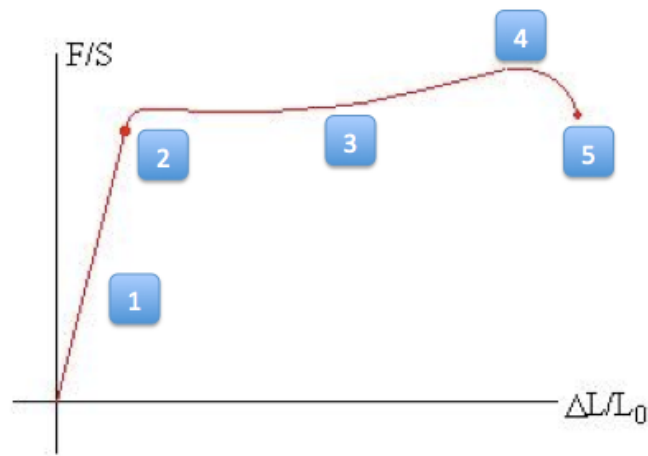


FIG. B2 – GRÁFICO DE TENSÃO/DEFORMAÇÃO.

Existem vários tipos de gráficos de tensão/deformação que variam de formato dependendo do material utilizado. O modelo mais usual (Fig. B2) apresenta 4 zonas diferentes:

- 1- Zona de deformação elástica;
- 2- Tensão máxima de elasticidade;
- 3- Zona de deformação plástica;
- 4- Tensão máxima de tracção;
- 5- Tensão de Ruptura;

A região de **deformação elástica (1)** traduz uma proporcionalidade entre a tensão e a deformação que se rege pela lei de Hooke. As deformações elásticas não são permanentes e quando a carga aplicada é removida, o corpo de prova volta à sua forma original.

A região de **deformação plástica (2)** surge acima de uma **tensão limite (2)** a partir da qual a deformação se torna permanente.

A tensão para continuar a deformar o material aumenta até a um ponto máximo que se designa **tensão máxima de tracção (4)**. A partir deste ponto ocorre uma estricção do material levando à conseqüente fractura do mesmo, que acontece num ponto de tensão chamado **tensão de ruptura (5)**.

## Gráficos

Com a realização de ensaios de tracção de 24 amostras de cada classe de fibras (tabela 5), foram elaborados gráficos de tensão/deformação e destes retiradas informações relevantes como o módulo de elasticidade.

Os seguintes gráficos ilustram a dispersão de valores de módulo de Young de cada classe de fibras. Foi utilizado como critério de exclusão do grupo de amostragem, amostras com valores de módulo de elasticidade inferiores ou superiores a duas vezes o desvio padrão ( $2\sigma$ ) do módulo de Young médio do conjunto total de amostras.

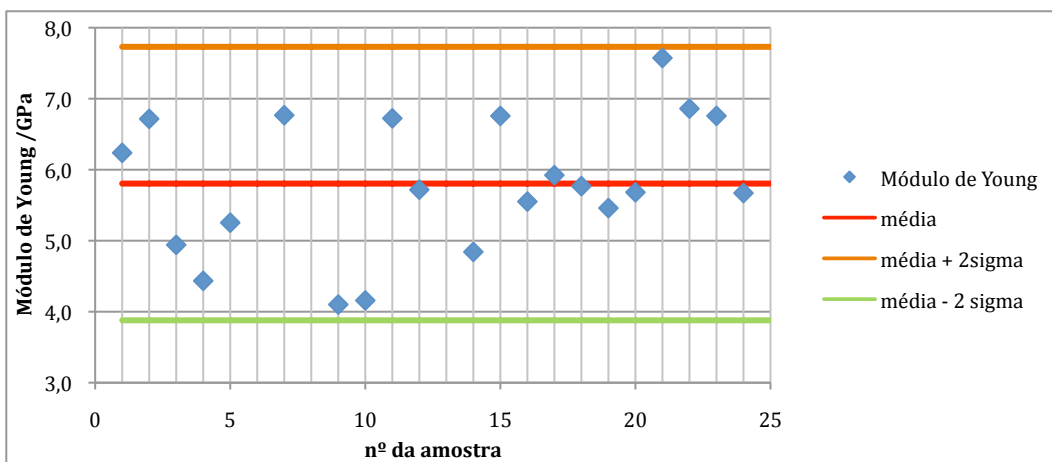


GRÁFICO B1 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ1E.

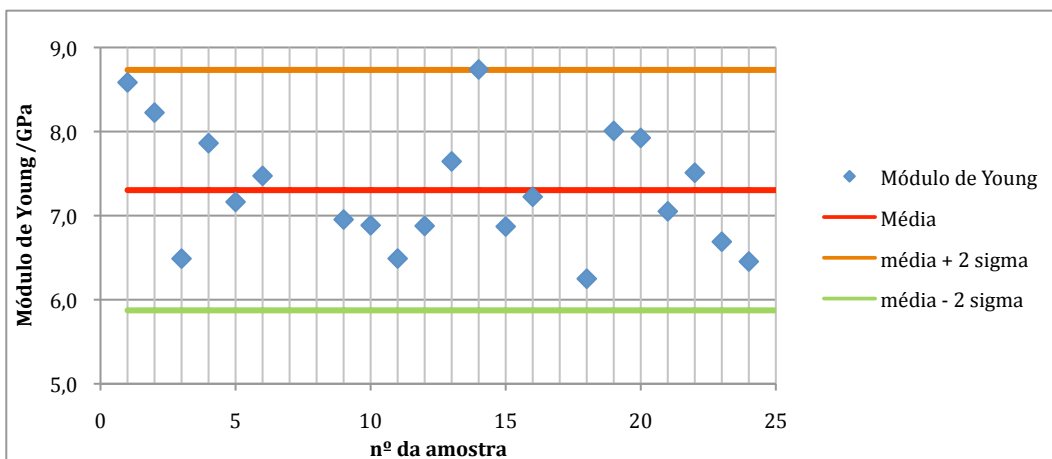


GRÁFICO B2 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ1M.

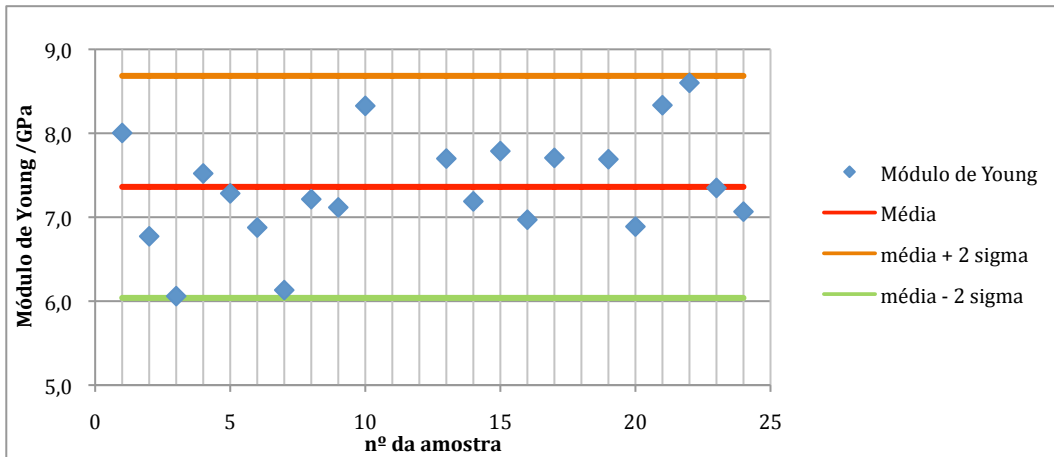


GRÁFICO B3 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ2E.

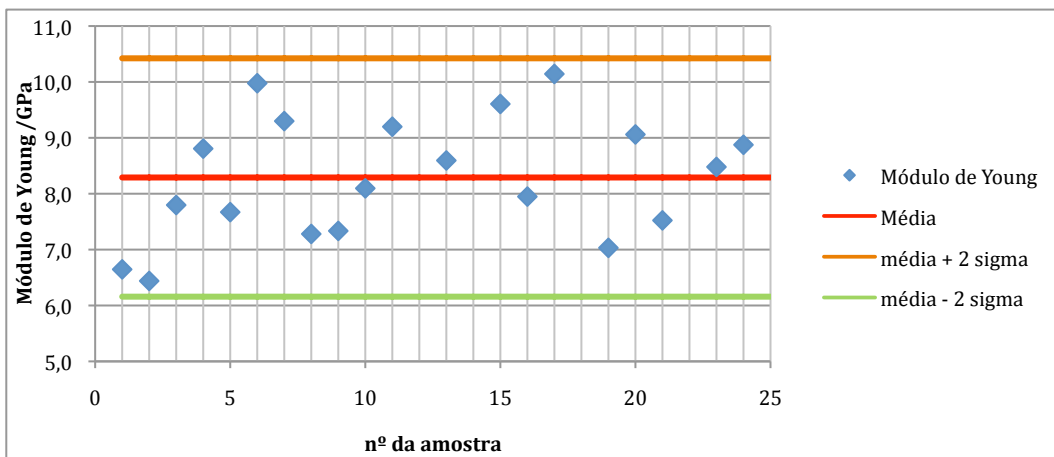


GRÁFICO B4 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ2M.

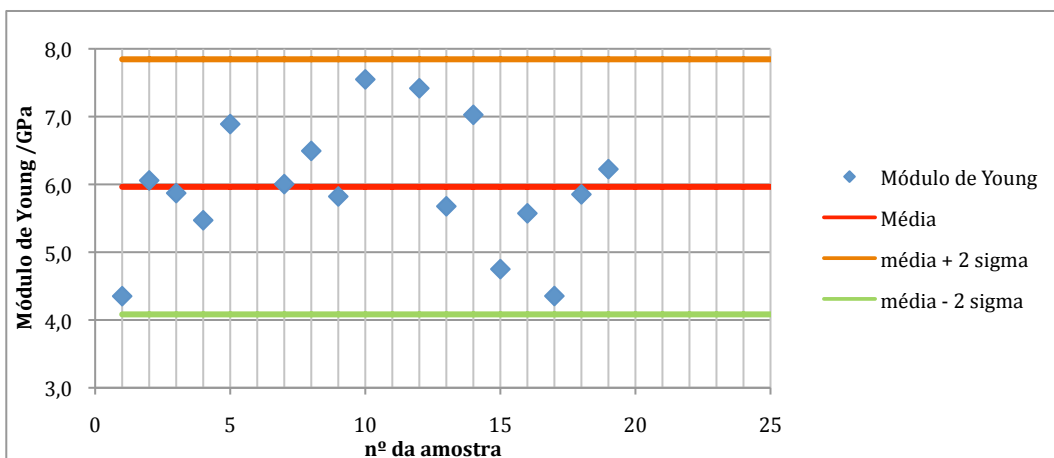


GRÁFICO B5 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ1E APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

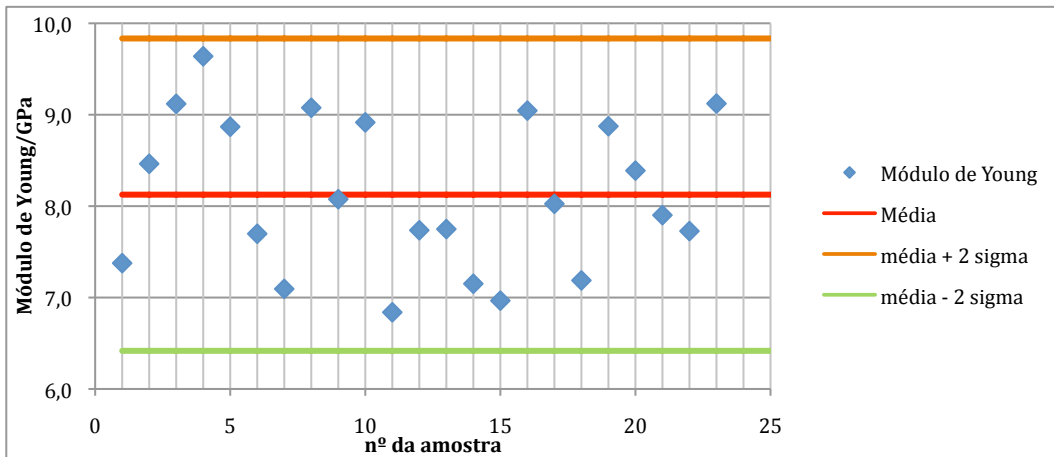


GRÁFICO B6 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ1M APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

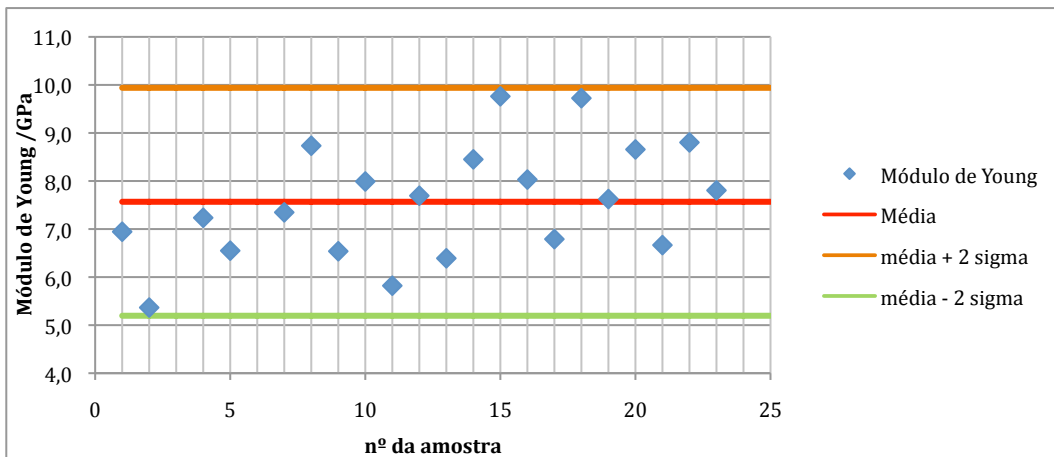


GRÁFICO B7 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ2E APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

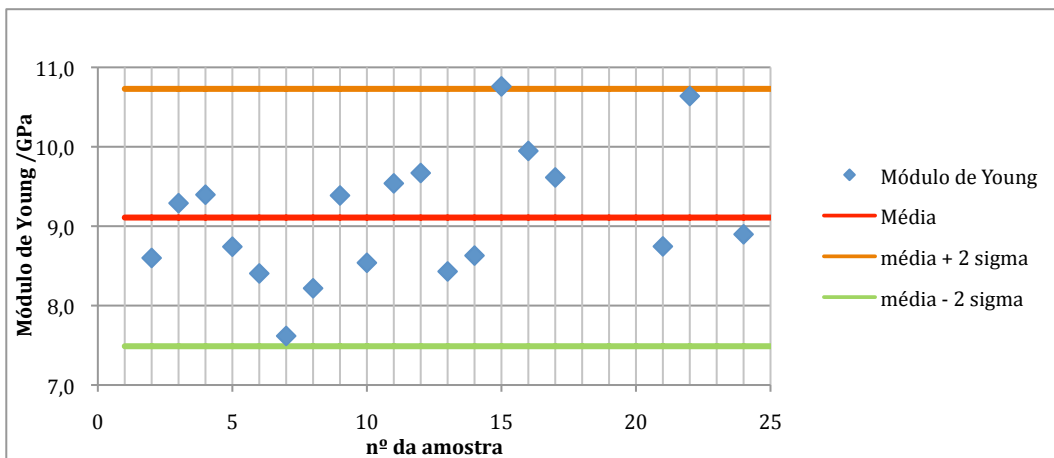


GRÁFICO B8 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO CJ2M APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

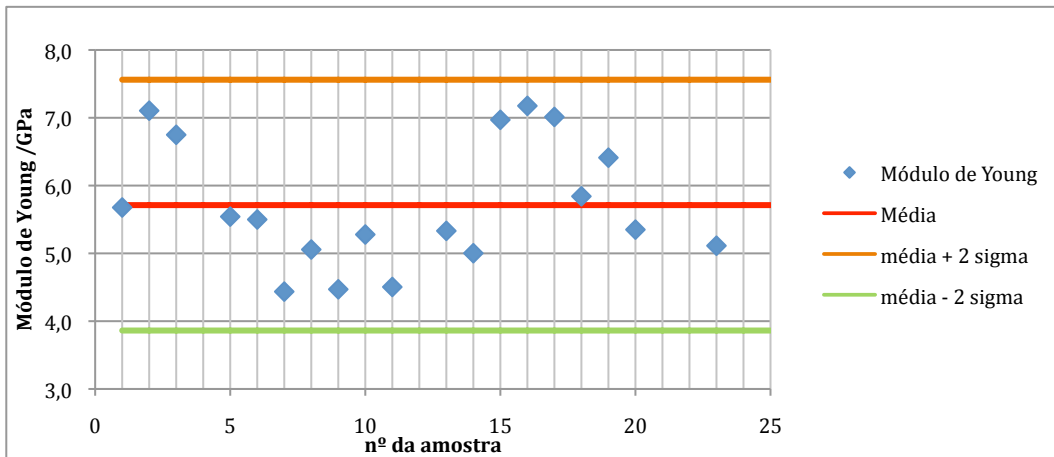


GRÁFICO B9 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ9E.

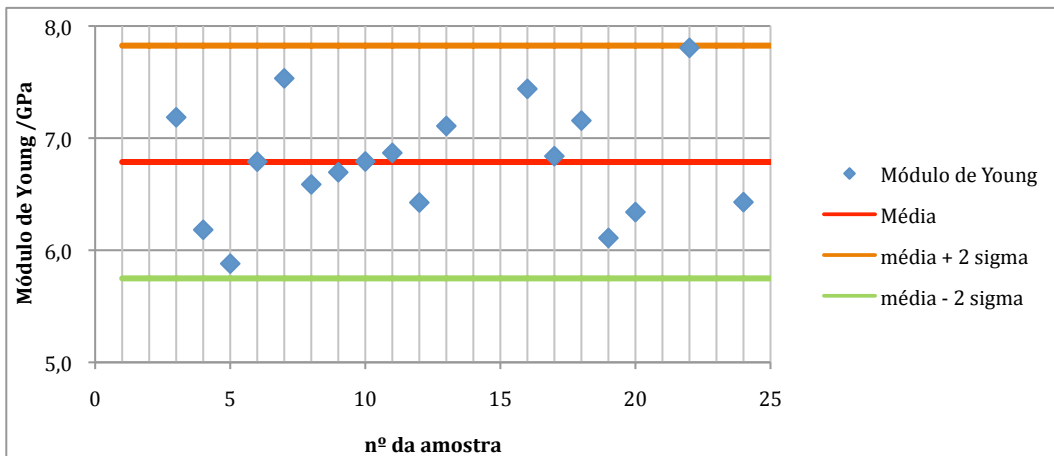


GRÁFICO B10 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ9M.

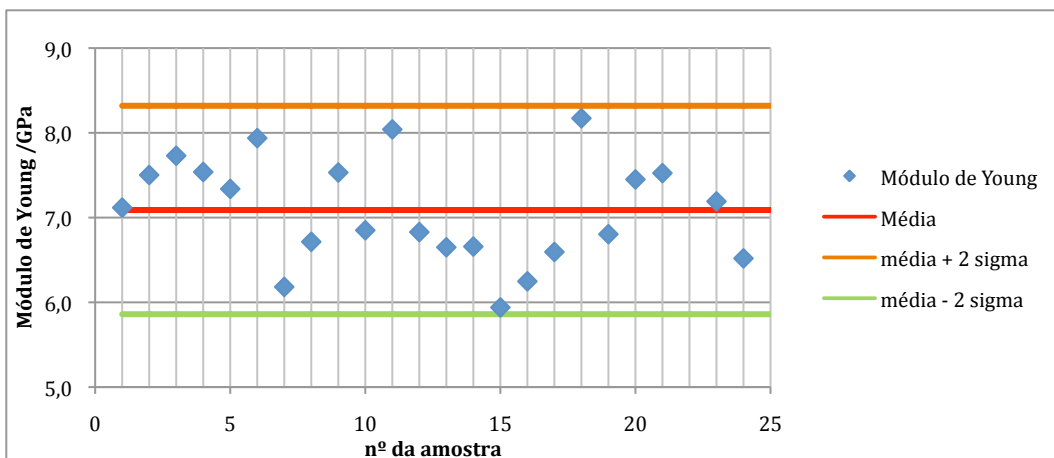


GRÁFICO B11 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ10E.

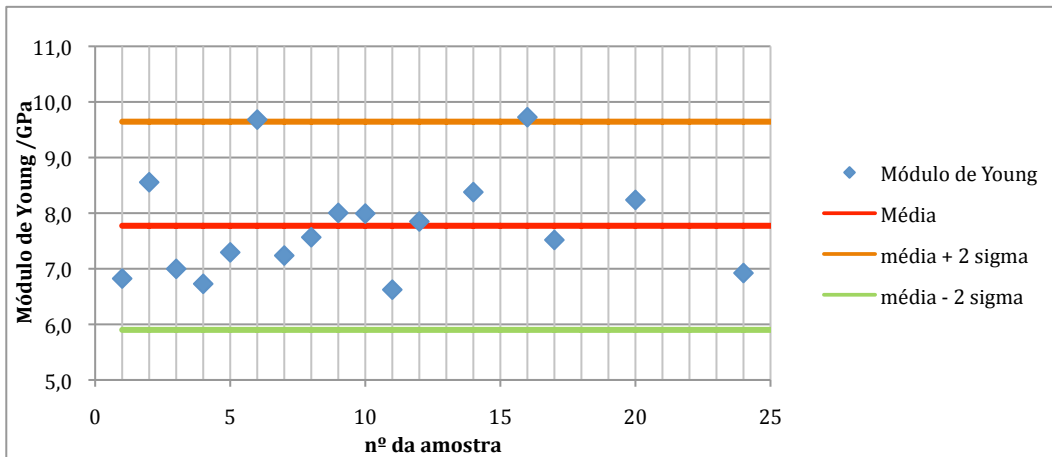


GRÁFICO B12 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ10M.

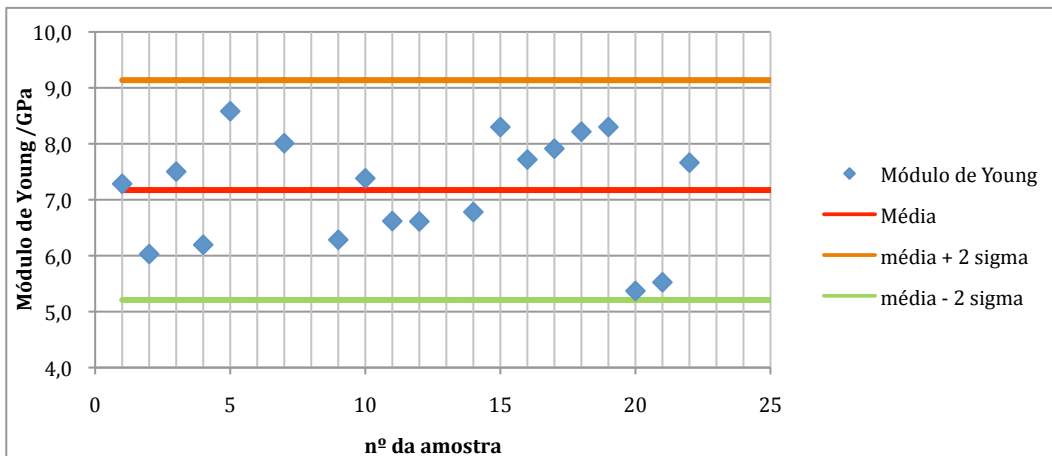


GRÁFICO B13 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ9E, APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

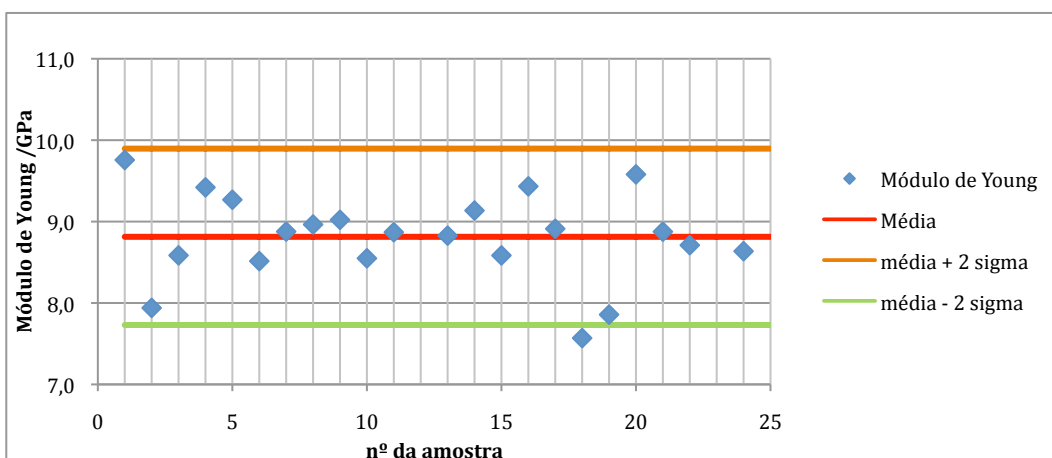


GRÁFICO B14 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ9M, APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

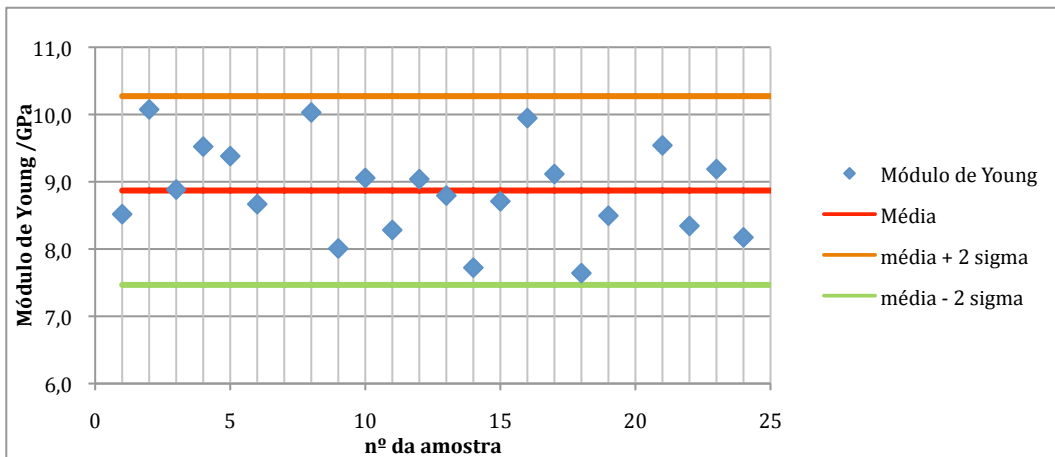


GRÁFICO B15 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ10E, APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

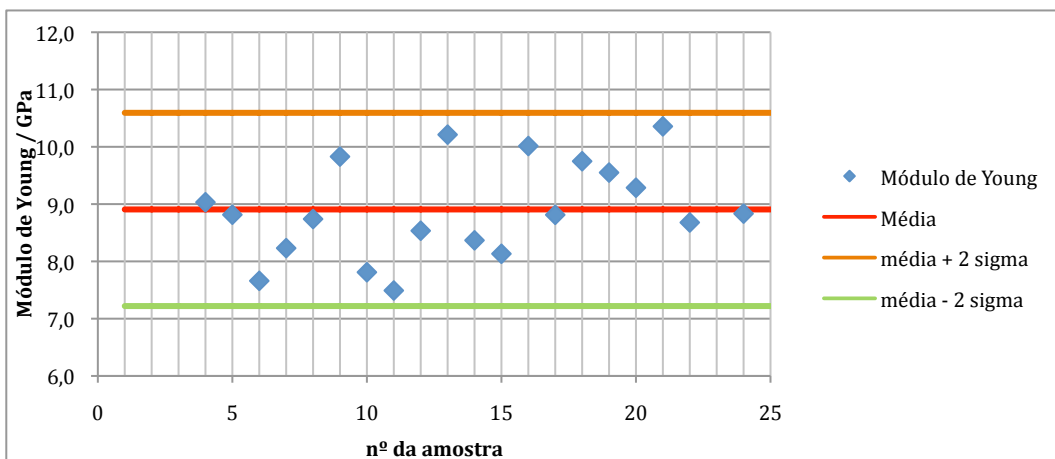


GRÁFICO B16 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% DE HIDROXIPATITE (P/P) CJ10M, APÓS 72H EM BANHO DE SECAGEM.

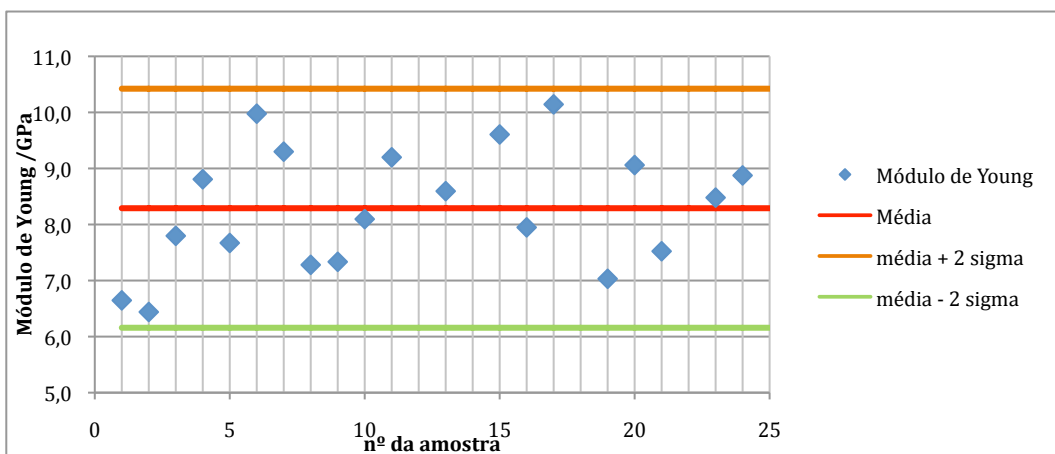


GRÁFICO B17 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

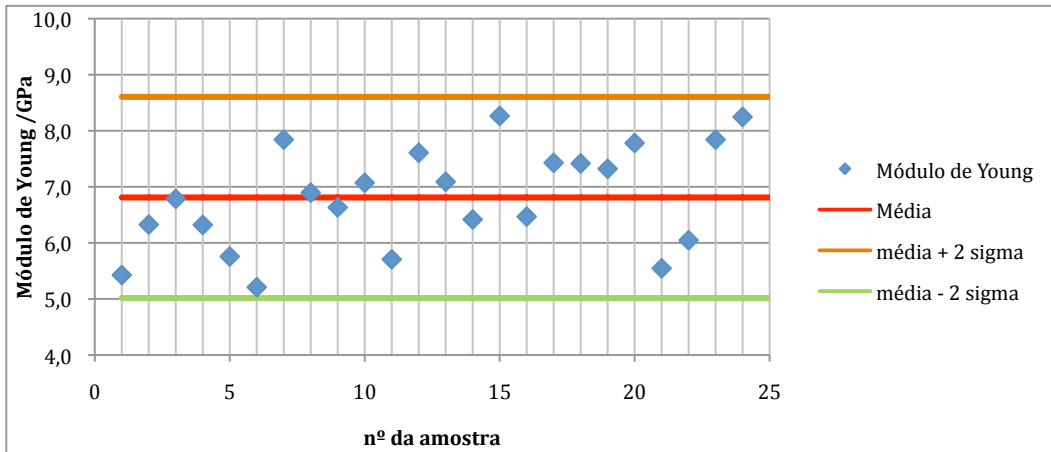


GRÁFICO B18 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 10% HIDROXIPATITE, UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

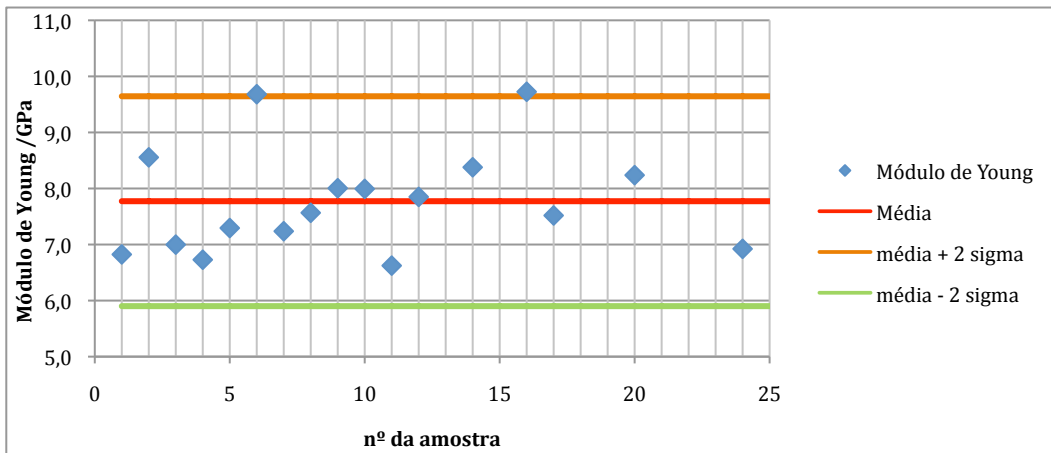


GRÁFICO B19 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 20% HIDROXIPATITE, UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

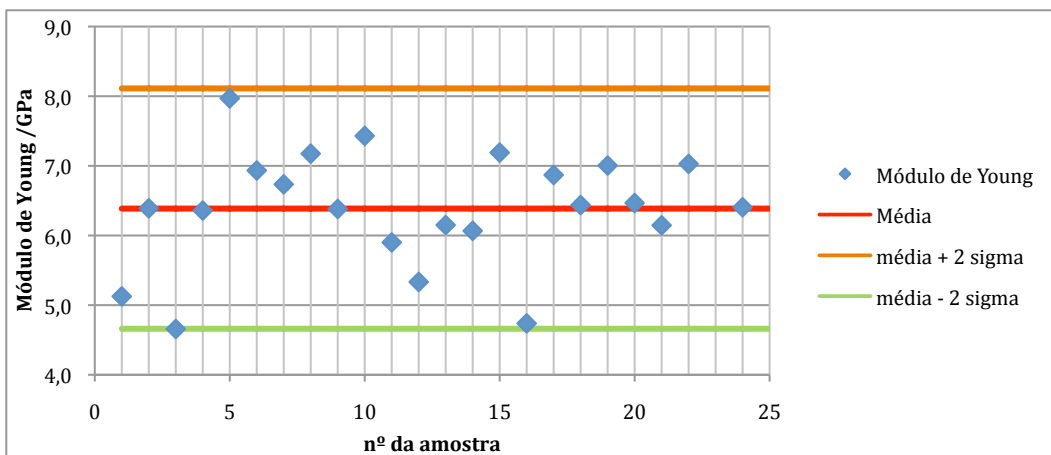


GRÁFICO B20 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 30% HIDROXIPATITE, UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

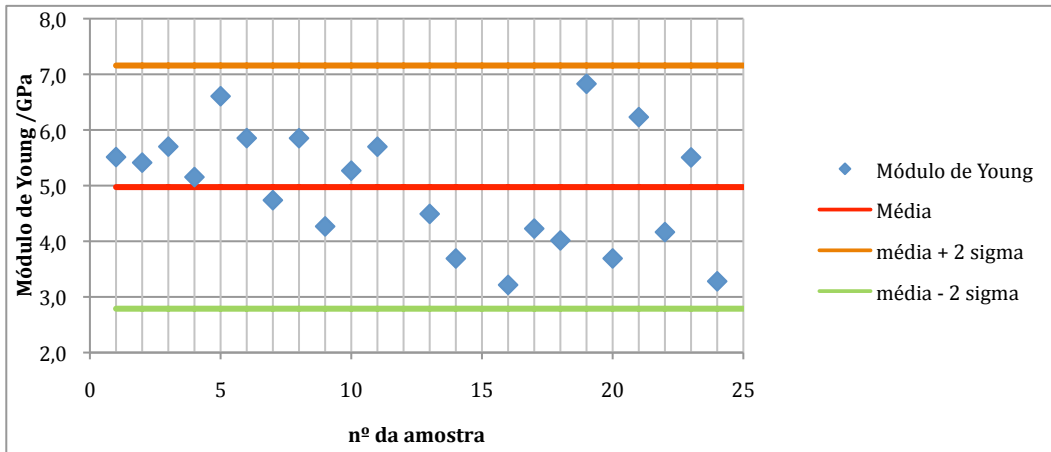


GRÁFICO B21 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 40% HIDROXIPATITE, UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

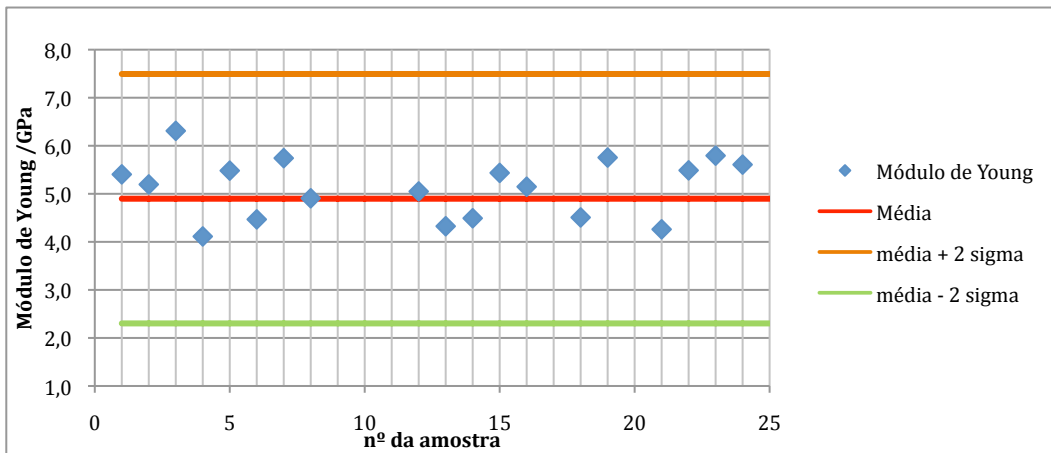


GRÁFICO B22 - MÓDULOS DE YOUNG DAS FIBRAS DE QUITOSANO COM 50% HIDROXIPATITE, UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE MATRIZES 3D.

## ANEXO C – VELOCIDADE DE ROTAÇÃO DO ROLO

Para determinar a tensão a fornecer ao motor de rotação do rolo para que o rolo tenha velocidade 1,5 x superior à velocidade de saída da fibra da agulha, começou por se encontrar a relação entre o período de rotação e a tensão fornecida ao motor.

Utilizando uma célula fotoelétrica (Photogate Timer Model ME-9215A, Pasco Scientific) registou-se a correspondência entre a tensão e 5 períodos de rotação do rolo.

Tensão / V	5 Períodos / s
1,50	22,058
2,00	13,84
2,50	7,82
3,00	5,475
4,00	4,183
5,00	4,183

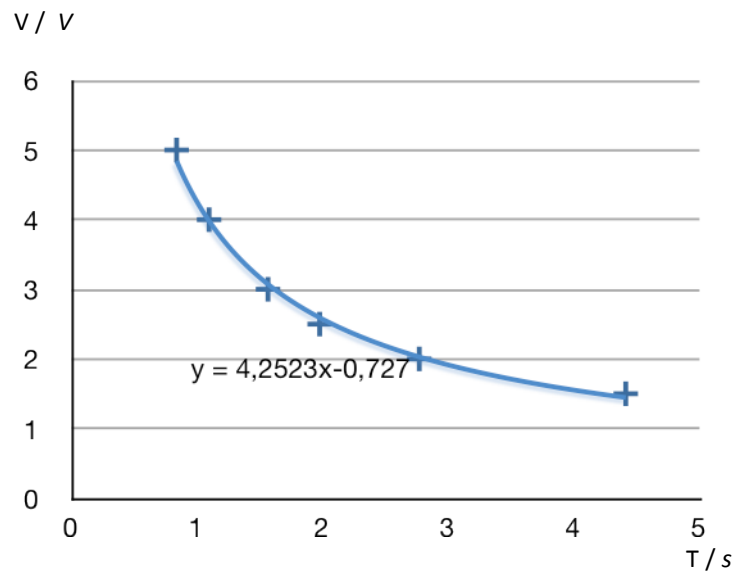


FIG. C1 – TABELA (A) E GRÁFICO (B) DA TENSÃO (V) VS PERÍODO (S).

Com os valores registados foi possível construir o gráfico B que relaciona os vários valores de tensão experimentados no motor com os períodos de rotação correspondentes do rolo. Encontrou-se então a equação que traduz a relação

$$V = 4,25 \times T^{-0,73} \quad (c1)$$

em que  $V$  representa a tensão em volts e  $T$  o período em segundos.

Tendo em conta que o diâmetro interno da agulha utilizada no processo de fiação é de 0,406 mm, que o caudal das soluções utilizadas é de 20 ml/h, e que pode ser descrito pela equação

$$\phi = A \times v_{\phi} \quad (c2)$$

em que  $\phi$  representa o caudal,  $A$  a área de secção e  $v_{\phi}$  velocidade.

Conclui-se que:

$$\phi = A \times v_{\phi} \Leftrightarrow \frac{20\text{cm}^3}{3600\text{s}} = \pi \times (0,0203\text{cm})^2 \times v_{\phi} \Leftrightarrow v_{\phi} = 4,3 \text{ cm/s} \quad (\text{c3})$$

Como se pretende uma velocidade de enrolamento 1,5 X superior á velocidade do fluxo, vem que:

$$v_{\text{rolo}} = 1,5 \times v_{\phi} \Leftrightarrow v_{\text{rolo}} = 1,5 \times 4,3\text{cm/s} = 6,5 \text{ cm/s} \quad (\text{c4})$$

Sabendo que o período é descrito por

$$T = \frac{2\pi r}{v} \quad (\text{c5})$$

em que  $T$  representa o período,  $v$  a velocidade de rotação do rolo e  $r$  o raio do rolo, pode-se calcular o período de rotação correspondente à velocidade do rolo:

$$T = \frac{2\pi r}{v_{\text{rolo}}} \Leftrightarrow T = \frac{2\pi \times 3\text{cm}}{6,5\text{cm/s}} = 2,9 \text{ s} \quad (\text{c6})$$

Substituindo agora na equação c1,

$$V = 4,25 \times T^{-0,73} \Leftrightarrow V = 4,25 \times 2,9^{-0,73} = 1,95 \text{ V} \quad (\text{c7})$$

pelo que se pode concluir que a tensão a fornecer ao motor, para que a velocidade de enrolamento seja 50% superior à velocidade do fluxo de solução na seringa, é de 1,95 volts.