



Bruno Diogo Soledade Marques

Licenciado em Engenharia de Materiais

Estudo das propriedades eléctricas de matrizes porosas de quitosano e de quitosano/hidroxiapatite para possíveis aplicações em implantes ósseos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof. Doutora Maria do Carmo Lança (DCM, FCT-UNL)
Co-Orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges (DCM, FCT-UNL)

Presidente: Prof. Doutor João Pedro Botelho Veiga (DCM, FCT-UNL)
Arguente: Doutor Luís Filipe Verga Vieira Pinto (ALTAKITIN, S. A.)
Vogal: Prof. Doutora Maria do Carmo Henriques Lança (DCM, FCT-UNL)

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

- *Albert Einstein*

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Orientadora e Professora, Doutora Maria do Carmo Lança, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e por todo o apoio e ajuda dada ao longo de todo o percurso.

Ao Co-orientador, Professor Doutor João Paulo Borges, por toda a ajuda e disponibilidade dada no processo de produção das matrizes e ao longo de todo o percurso.

A empresa Altakitín, pelo fornecimento dos materiais com que trabalhei ao longo deste período.

Ao apoio financeiro do PEst-C/CTM/LA0025/2013-14 (Projecto Estratégico – LA 25 – 2013-2014) e do COMPETE/QREN/EU (Projecto POLARBONE nº38996)

Ao Professor Doutor Jorge Silva, por toda a simpatia, paciência e disponibilidade durante todo o processo de culturas celulares *in vitro*.

À Professora Doutora Margarida Rolim, pela análise dos materiais por Difrração de Raios-X e ajuda dada.

Ao Bolseiro de Doutoramento, Carlos João, pela análise dos materiais por Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier.

À Bolseira de Pós-Graduação Ana Pimentel, pela análise dos materiais por Análise Diferencial Calorimétrica e Termogravimetria.

À Bolseira de Pós-Doutoramento, Daniela Gomes, pelo tempo prestado durante as análises dos materiais por Microscopia de Varrimento Electrónico e Espectroscopia de Raios-x por dispersão de Energia.

Ao Bolseiro de Doutoramento da Faculdade de Aveiro, Pedro Prezas, pela análise dos materiais por Espectroscopia de Relaxação Dielétrica.

Ao apoio financeiro do PEst-C/CTM/LA0025/2013-14 (Prohecto Estratégico – LA 25 – 2013-2014) e do COMPETE/QREN/EU (Projecto POLARBONE nº38996)

Às ex-Bolseiras do Projecto POLARBONE, Ana Filipa Correia e Ana Cláudia Videira, por tudo o que me ensinaram, pela companhia e simpatia disponibilizada tal como pela troca de ideias e conselhos.

Aos meus colegas de curso, pelo o companheirismo e pelas experiências compartilhadas ao longo destes 5 anos.

Por fim, um obrigado a todos os meus amigos e família pela motivação, paciência e por me ajudarem a manter a sanidade mental.

A todos, que de uma maneira ou de outra estiveram presentes ao longo desta jornada, um muito obrigado!

Resumo

De modo a perceber-se a vantagem do uso de biomateriais nas áreas ligadas à saúde, o estudo das suas propriedades é bastante importante. Por apresentarem excelentes propriedades de adaptação, remodelação, degradação e serem facilmente modificados estes materiais tornaram-se alvo de numerosos estudos por parte de vários investigadores nas mais diferenciadas áreas.

No caso da sua aplicabilidade em implantes ósseos, o estudo das suas propriedades eléctricas é fundamental visto estas estarem intimamente ligadas com propriedades como a biointegração do material no corpo do paciente e subsequente crescimento ósseo. Diversos estudos demonstram, que ao serem polarizados, estes materiais irão melhorar significativamente os processos de osteointegração e regeneração óssea.

O desenvolvimento deste trabalho envolve a produção de matrizes de quitosano (CS) e de quitosano/hidroxiapatite (CS/HAp), através do processo de liofilização. Para mimetizar a hidroxiapatite natural existente no osso, serão produzidos pós de nano-bastonetes de hidroxiapatite que serão usados na produção das matrizes.

Amostras produzidas, com diferentes concentrações de constituintes, serão caracterizadas quanto às suas propriedades morfológicas, estruturais, eléctricas e dieléctricas. As matrizes serão sujeitas a polarização eléctrica. Por fim serão feitos testes de bioactividade, soluções que simulam o fluído corporal (SBF) e culturas celulares *in vitro*, de forma a comparar a capacidade de osteointegração de amostras polarizadas e não polarizadas.

Palavras chave: Engenharia de Tecidos; Quitosano; Nano-bastonetes; Matrizes; Liofilização; Polarização Eléctrica;

Índice

1. Introdução.....	11
1.1. O osso	11
1.2. Biomaterial.....	12
1.3. Quitosano	12
1.4. Hidroxiapatite.....	13
1.5. Compósitos CS/HAp.....	14
1.6. Propriedades eléctricas	15
1.7. Liofilização	15
2. Materiais e métodos	16
2.1. Produção de amostras	16
2.1.1. Produção de nano-bastonetes de HAp	16
2.1.2. Produção de matrizes de CS e de CS/HAp	16
2.2. Caracterização das amostras.....	16
2.2.1. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM-EDS).....	16
2.2.2. Difracção de Raios-X (XRD)	16
2.2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR)	17
2.2.4. Análise Diferencial Calorimétrica e Termogravimetria (DSC-TGA)	17
2.2.5. Porosimetria de Mercúrio	17
2.2.6. Espectroscopia de Relaxação Dieléctrica (DRS).....	17
2.2.7. Análise de Correntes Termoestimuladas (TSDC).....	17
2.2.8. Culturas Celulares	17
2.2.9. Ensaio de bioactividade.....	17
3. Resultados e discussão	18
3.1. Matrizes de CS e CS/HAp	18
3.2. SEM.....	18
3.3. XRD	19
3.4. FTIR.....	21
3.5. DSC-TGA	23
3.6. Porosimetria de Mercúrio	24
3.7. DRS	25
3.8. TSDC.....	30
3.9. Culturas Celulares	33
3.10. Ensaio de bioactividade.....	35
Conclusões e perspectivas futuras	38
APÊNDICE A: Técnicas de Caracterização	40
APÊNDICE B: Procedimentos Experimentais.....	45

APÊNDICE C: Tamanho de Partícula da HAp comercial	49
APÊNDICE D: Difractograma da HAp – Fichas auxiliares.....	50
Referências bibliográficas	52

Índice de Figuras

Figura 1 - Unidades funcionais da molécula de quitina/quitosano.....	12
Figura 2 - Amostras produzidas pelo processo de liofilização	18
Figura 3 - Imagens de SEM: a) HAp comercial; b) nano-bastonetes de HAp produzidos pela técnica de liofilização;	18
Figura 4 - Imagens SEM das amostras produzidas pela técnica de liofilização: a) CS; b) 75CS-25HAp; c) 50CS-50HAp; d) HAp incorporada nas matrizes de CS/HAp;	19
Figura 5 - Espectro de XRD dos pós de HAp comercial e dos nano-bastonetes produzidos	20
Figura 6 – Espectro de XRD das diferentes amostras produzidas pelo processo de liofilização	20
Figura 7 - Espectro FTIR da HAp comercial e nano-bastonetes produzidos pela técnica de liofilização	21
Figura 8 - Ampliação de uma zona do espectro de FTIR da figura 7	22
Figura 9 - Espectro FTIR das diferentes amostras produzidas pelo processo de liofilização	22
Figura 10 - Ampliação de uma zona do espectro de FTIR da figura 9	23
Figura 11 - Espectro DCS-TGA do pó comercial de CS	24
Figura 12 - Espectro DSC-TGA de uma amostra de CS produzida pelo processo de liofilização	24
Figura 13 - Espectro de DRS da condutividade ac em função da frequência e da temperatura para uma amostra de CS	26
Figura 14 - Espectro de DRS da condutividade ac em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 75CS-25HAp	26
Figura 15 - Espectro de DRS da condutividade ac em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 50CS-50HAp	26
Figura 16 - Espectro de DRS da componente real da permitividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de CS.....	27
Figura 17 - Espectro de DRS da componente real da permitividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 75CS-25HAP	27
Figura 18 - Espectro de DRS da componente real da permitividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 50CS-50HAp	27
Figura 19 - Espectro de DRS da componente imaginária da permitividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de CS.....	28

Figura 20 - Espectro de DRS da componente imaginária da permitividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 75CS-25HAp	28
Figura 21 - Espectro de DRS da componente imaginária da permitividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 50CS-50HAp	28
Figura 22 - Espectro de DRS de $\ln \sigma_{ac}$ em função de $1000/T$ à frequência de 10 kHz, das amostras produzidas pelo processo de liofilização.....	29
Figura 23 - TSDC das amostras produzidas pelo processo de liofilização, 1 hora após polarização: a) CS; b) 75CS-25HAp;	30
Figura 24 – Gráfico de $\ln \tau$ em função de $1000/T$ obtido através dos gráficos de TSDC das amostras, 1 hora após polarização: a) CS; b) 75CS-25HAp;	31
Figura 25 – Estudo do decaimento de carga a partir do TSDC das amostras produzidas pelo processo de liofilização, polarizadas positivamente: a) CS; b) 75CS-25HAp;.....	32
Figura 26 - Taxas de adesão das amostras de CS e 75CS-HAp, com e sem polarização	33
Figura 27 - Taxa de proliferação para 4 e 7 dias de incubação, das amostras de CS, com e sem polarização	34
Figura 28 - Taxa de proliferação para 4 e 7 dias de incubação, das amostras de 75CS-25HAp, com e sem polarização	34
Figura 29 - Imagens SEM das amostras de CS imersas 7 dias em SBF à temperatura de 37°C: a) sem polarização; b) com polarização positiva; c) com polarização negativa; d) cristais de sal e de fosfatos de cálcio precipitados nas amostras;	35
Figura 30 - Imagem SEM de uma amostra de CS, imersa 7 dias em SBF à temperatura de 37°C e respectivos espectros EDS	36
Figura 31 - Imagens SEM das amostras de 75CS-25HAp imersas 1 dia em SBF à temperatura de 37°C: a) sem polarização; b) com polarização positiva; c) com polarização negativa; d) cristais de sal e fosfatos de cálcio precipitados sobre a HAp das amostras;	36
Figura 32 - Amostra de 75CS-25HAp imersa 7 dias em SBF à temperatura de 37°C: a) com polarização negativa; b) camada de fosfatos de cálcio formada por toda a amostra;	37
Figura 33 - Imagem SEM de uma amostra de 75CS-25HAp, imersa 1 dia em SBF à temperatura de 37°C e respectivos espectros EDS	37
Figura 34 - Processos dinâmicos possíveis de ser observados num espectro DRS de ϵ' e ϵ'' em função da frequência	42
Figura 35 - Esquema de um ensaio de TSDC [58]	43

Índice de tabelas

Tabela 1 - Valores da porosidade, e volume total de poros para uma amostra de cada composição, produzidas pelo processo de liofilização	25
Tabela 2 - Valores das constantes eléctricas, dieléctricas e energia de activação de uma amostra de cada composição, à temperatura de 300 K e à frequência de 10 kHz	29
Tabela 3 – Valores médios das cargas espaciais, energias de activação e tempos de relaxação médios das amostras de CS e de 75CS-25HAp, calculados apartir dos gráficos de TSDC 1 hora após polarização	32
Tabela 4 - Valores da carga espacial das amostras, provenientes do estudo de decaimento de cargas das amostras de CS e 75CS-25HAp, polarizadas positivamente	32

1. Introdução

1.1. O osso

Os ossos actuam como um órgão funcional e desempenham um papel fundamental na sustentação do corpo. Em conjunto com os músculos possibilitam os movimentos, protegem tecidos moles e estão directamente relacionados com a reprodução de células do sangue através da medula óssea [1].

São um tipo de tecido conjuntivo, constituído por células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e matriz extracelular, diferenciando-se dos outros tecidos conjuntivos pelo facto dessa matriz ser mineralizada [2].

Conhecidos por serem um compósito natural, os ossos são compostos por uma matriz 35% orgânica (m/m) e 65% inorgânica (m/m). A parte orgânica da matriz é constituída essencialmente por fibras de colagénio do tipo I e é esta que confere a flexibilidade ao osso. A parte inorgânica é formada por HAp em forma de nano-bastonetes sendo esta a responsável pela sua rigidez e resistência mecânica [3].

O osso é caracterizado quanto à sua composição, morfologia, estrutura, tamanho de partícula e orientação [3]. Morfologicamente existem duas formas de osso: o cortical ou compacto e o trabecular ou esponjoso. O osso cortical é formado por lâminas ósseas paralelas e extremamente próximas entre si enquanto que o osso trabecular é muito menos espesso, já que é formado por lâminas ósseas irregularmente dispostas nos vários sentidos, formando uma matriz muito porosa. A função que cada um desempenha no organismo está intimamente ligada à sua estrutura. O osso cortical é responsável pelas funções mecânicas e protectoras, já o osso trabecular é responsável pelas funções metabólicas [4], [5].

O osso pode ser considerado como um "biomaterial vivo" pois as suas células estão em permanente actividade. O processo de formação do osso começa com a acção dos osteoblastos, células que sintetizam a parte orgânica (colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea. Os osteoblastos são aprisionados na matriz recém-sintetizada, passando a ser chamados de osteócitos. Entretanto, um outro tipo de células, os osteoclastos, catabolizam o osso antigo, destruindo-o. Este processo dinâmico de formação e destruição do osso é chamado de remodelação óssea e é responsável pelo crescimento e reestruturação do osso, possibilitando a sua regeneração em caso de fractura. No entanto, quando as lesões sofridas são demasiado grandes formam-se defeitos ósseos que requerem a utilização de implantes para ajudar na sua reparação [2], [6].

Ainda no que respeita à actividade de formação óssea, vários estudos recentes baseados no conceito de piezoelectricidade óssea descrito por Yasuda e Fukada em 1957, afirmam que a estimulação eléctrica promove a formação óssea [7].

1.2. Biomaterial

Por definição, biomaterial é “qualquer material de origem natural ou sintética usado para substituir parte de um sistema vivo ou para funcionar em contacto com tecido vivo, mantendo a sua estrutura e propriedades, sem provocar alterações no meio fisiológico envolvente” [8].

As características mais importantes para seleccionar um material para utilização médica são a biocompatibilidade, a ausência de efeitos nocivos ou tóxicos para o organismo e propriedades biomecânicas capazes de responderem às solicitações dinâmicas e estáticas a que estará sujeito durante a sua vida útil [9].

No caso de substituição óssea estes devem ser bioactivos de modo a promover uma ligação físico-química entre o material e o tecido ósseo envolvente devido a presença de iões cálcio e fósforo na superfície do material, facilitando assim a adesão óssea e promovendo assim a osteocondução, processo que ocorre pela penetração de vasos nos espaços e/ou nos poros existentes na estrutura do biomaterial, que vai induzir a deposição de osso no mesmo. Neste aspecto, o uso de biomateriais com um alto índice de porosidade e tamanho adequado de poros promove a eficiência destes efeitos quando implantados no osso, permitindo assim aos tecidos regenerar não só à sua superfície mas também no seu interior [2], [10].

1.3. Quitosano

O quitosano, é um biopolímero obtido através da desacetilação da quitina. Este polissacarídeo linear é composto por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina e de D-glucosamina unidas entre si pelos seus carbonos 1 e 4 em ligações glicosídicas. A diferença entre a quitina e o quitosano parte do balanço entre essas unidades. Um composto com uma maior percentagem de *N*-acetil-D-glucosamina denomina-se de quitina enquanto que um composto com maior percentagem de unidades D-glucosamina, tipicamente entre 70-80 %, denomina-se de quitosano [11], [12].

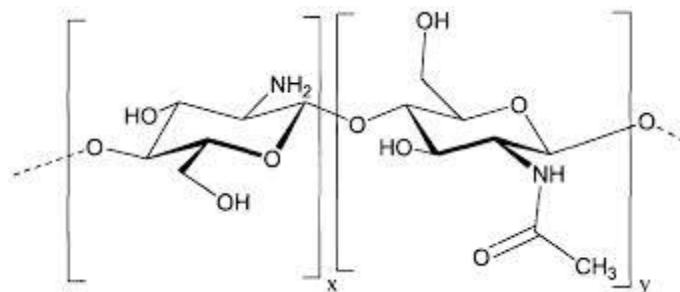


Figura 1 - Unidades funcionais da molécula de quitina/quitosano

Trata-se de uma base fraca, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apenas solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos ou inorgânicos com um pH < 6.

Por apresentar excelentes propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioactividade, ausência de toxicidade, boas propriedades de absorção, capacidade de formar membranas, bioadesividade, poder hemostático, actividade contra fungos, bactérias e vírus este biopolímero tem vindo a ser bastante requisitado por várias áreas. Desde a indústria alimentar, quer em agricultura, em aplicações biomédicas e farmacêuticas tais como como substituição de pele humana, implantes ortopédicos e periodontais, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas, sistemas de libertação controlada de fármacos, suturas cirúrgicas, reconstituição óssea, lentes de contacto, encapsulamento de substâncias, entre outras [13]. Este é normalmente produzido sob a forma de membranas, hidrogéis, esponjas, filmes, fibras e micro/nanopartículas [12].

Um dos principais factores inerentes a estas diversas propriedades biológicas é o grau de acetilação deste biomaterial. Propriedades como a biocompatibilidade, viscosidade, bioadesividade, poder hemostático e actividade contra agentes patogénicos estão inversamente relacionadas com o seu grau de acetilação [14]. O contrário verifica-se para a biodegradabilidade, que esta directamente relacionada com este factor. Outro factor importante que faz variar as propriedades físico-químicas e biológicas do quitosano é o peso molecular. Compostos de quitosano com elevado peso molecular apresentam uma menor solubilidade e têm uma boa bioadesividade mas por sua vez será mais difícil para estes se biodegradarem [12], [14].

1.4. Hidroxiapatite

De entre os fosfatos de cálcio bioactivos a hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) tem sido extensivamente estudada como material de substituição óssea. Com uma razão atómica de Ca/P de 1,67, este é o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel de todos. Características como a sua bioactividade, biocompatibilidade e osteocondução fazem com que a HAp seja considerada um material de eleição no campo da substituição/reparação óssea [15].

É conhecida como a componente mineral dos ossos e dentes e por ter uma estrutura cristalina semelhante à da HAp biológica torna-se assim o componente ideal para implantes ósseos e próteses usadas em humanos [16].

O osso do corpo humano é constituído por uma HAp não estequiométrica, contendo vários iões na sua estrutura tais como Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , HPO_4^{2-} , F^- , Cl^- mas principalmente iões CO_3^{2-} provenientes das substituições parciais dos iões PO_4^{3-} e dos iões OH^- . Tais substituições afectam propriedades como a sua bioactividade, biocompatibilidade, solubilidade e velocidade de degradação. Devido à presença de iões CO_3^{2-} , entre 4-8 % na sua rede cristalina, tanto a solubilidade como a velocidade de degradação da HAp biológica são muito superiores às encontradas nas HAp's sintéticas [3], [17].

Para além das substituições iónicas, o tamanho reduzido dos seus cristais e a sua baixa cristalinidade são factores muito importantes que diferenciam ambas. Ao longo dos anos as substituições iónicas da HAp biológica vão diminuindo, tornando-se assim a sua estrutura mais

cristalina. Este aumento da cristalinidade diminui a sua velocidade de degradação o que provoca uma diminuição na taxa de remodelação óssea. Já o reduzido tamanho dos seus nanocristais têm uma influência directa na solubilidade da mesma [17], [18].

Para mimetizar parcialmente estes efeitos serão produzidos nanopós de HAp em forma de nano-bastonetes, de tamanho e morfologia semelhantes à do mineral ósseo, de modo a que as suas propriedades sejam as mais idênticas à da HAp biológica. Quanto mais idêntica for a sua composição, tamanho e morfologia, comparativamente à do mineral ósseo, melhores serão as suas propriedades mecânicas e biológicas [18].

Ao ser implantada e devido à actividade celular dos ossos que provocam a dissolução parcial dos fosfatos de cálcio, existe uma libertação para o meio de iões Ca^{2+} e PO_4^{3-} , aumentando ainda mais a já existente supersaturação dos fluídos corporais levando assim à precipitação de HAp carbonatada, que por sua vez se irá depositar sobre a superfície e no interior dos biomateriais levando assim à formação e crescimento de novo osso [19].

1.5. Compósitos CS/HAp

A substituição efectiva do tecido ósseo defeituoso ou fracturado continua a ser ainda um grande desafio nos dias de hoje. Uma das principais soluções a estes problemas tem como foco o desenvolvimento de materiais bioactivos e biocompatíveis adequados, que possam ser utilizados com êxito para uso a longo prazo na reparação e regeneração óssea [21].

Neste contexto tem sido dada especial atenção aos compósitos polímero/cerâmico. Estes constituem excelentes candidatos em engenharia de tecidos ósseos devido às suas excelentes propriedades biológicas, químicas e mecânicas [22].

O conceito original de compósito polimérico biocerâmico foi introduzido pela primeira vez por Bonfield em 1981 e foi baseado no conceito de que o próprio osso cortical em si, é formado por uma matriz orgânica reforçada por um componente mineral [10].

Como visto anteriormente, o CS é um biomaterial de fácil obtenção e com diversas vantagens para o uso na engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade e à sua bioactividade porém, devido à sua baixa rigidez e incapacidade de manter a sua estrutura íntegra em ambientes húmidos origina matrizes com propriedades mecânicas pouco desejáveis para aplicações em tecidos rígidos [23], [24].

Ao aliar-se a HAp ao CS não só fortalecemos mecanicamente as propriedades deste material como iremos melhorar propriedades biológicas e físico-químicas do mesmo. Por apresentar uma resistência mecânica elevada e uma taxa de degradação muito inferior à do mineral ósseo, a HAp sintética irá melhorar as suas propriedades mecânicas oferecendo-lhe uma melhor resistência mecânica e uma maior capacidade de resistência à ambientes húmidos, desacelerando assim a taxa de degradação do mesmo. Por outro lado a elevada flexibilidade do CS irá compensar a baixa resistência à fractura da HAp. Vários estudos efectuados, comprovam esta melhoria de propriedades quando aliados cerâmicos bioactivos ao CS [23], [24], [25].

1.6. Propriedades eléctricas

O osso é um tecido altamente orientado e é electricamente activo. A pesquisa sobre a piezoelectricidade no osso feita em 1957, por Fukada e Yasuda confirmou evidências empíricas que ligavam potenciais gerados por tensões mecânicas no osso à piezoelectricidade linear [26]. Esta descoberta, juntamente com observações mais recentes de Yasuda sobre a ligação entre um estímulo eléctrico e conseqüente crescimento ósseo, abriu o caminho para muitos investigadores durante os anos que se seguiram. Por exemplo, Bassett e Becker em 1962, propuseram que esses potenciais eléctricos podem ser a principal causa das respostas de adaptação do osso e, Shamos e Lavine em 1967, explicaram a importância das funções fisiológicas de tais potenciais eléctricos na remodelação óssea [27], .

Durante várias décadas pensou-se que a piezoelectricidade óssea devia-se única e exclusivamente à presença das fibras de colágeno, o principal componente orgânico do osso, devido às suas propriedades piezoeléctricas a nível macroscópico. Hoje em dia sabe-se que esse comportamento deve-se também à estrutura do mineral ósseo, orientação, ordem e polarização resultante das forças a que este é sujeito [7].

Desde então, várias estratégias foram desenvolvidas para a utilização de materiais electricamente activos em engenharia de tecidos, como o uso de materiais piezoeléctricos e a polarização eléctrica de vários biomateriais, de maneira a acelerar a regeneração de tecidos em fracturas ósseas e a promover propriedades como adesão óssea e osteocondução [28].

Yamashita descobriu que a HAp ao ser polarizada a altas temperaturas, acelera o crescimento da camada apatítica, igual à do mineral ósseo nos locais onde as superfícies dos materiais tenham cargas negativas, devido a atracção de iões Ca^{2+} que fazem aumentar a taxa de nucleação da HAp [29]. Posteriormente, vários estudos foram feitos, que confirmam este efeito, porém, muitos outros indicam que o crescimento ósseo é influenciado nos locais onde as superfícies de carga são positivas, não havendo por isso um consenso na literatura [22].

Foi ainda experimentalmente demonstrado que a interface entre a HAp e as células tanto *in vivo* como *in vitro*, é influenciada pela polarização eléctrica [30].

1.7. Liofilização

A técnica de liofilização, é uma técnica que consiste na sublimação da água no seu estado sólido, diminuindo drasticamente a pressão e a temperatura na câmara onde as amostras se encontram [31]. Este é um processo composto por duas etapas: a congelação e a desidratação. A primeira etapa, a congelação, é feita antes das amostras serem colocadas na câmara de liofilização. Esta etapa pode ser feita directamente pelo equipamento ou colocando as amostras previamente no congelador e/ou mergulhá-las em azoto líquido. A segunda etapa consiste na remoção total da água presente nas amostras onde numa fase inicial faz-se diminuir a pressão da câmara para pressões na ordem de grandeza dos 10^{-1} - 10^{-2} mbar e em seguida diminui-se a sua temperatura para valores entre os -30°C e os -60°C [32]. Esta técnica permite a produção de matrizes porosas fundamentais às propriedades biológicas deste tipo de materiais [33].

2. Materiais e métodos

No seguimento deste trabalho foram utilizadas as matérias primas, CS e HAp, ambas produzidos pela empresa Altakitin. O CS utilizado apresenta um peso molecular médio de 500.000 kDa e um grau de desacetilação de 76,0%. A HAp usada apresenta um tamanho de grão micrométrico com uma relação atômica Ca/P de 1,669 e uma densidade de 3,10 g.cm⁻³.

2.1. Produção de amostras

2.1.1. Produção de nano-bastonetes de HAp

Adicionaram-se 10 g de HAp a 1 L de água destilada sob agitação. Com a ajuda de um medidor de pH adicionou-se ácido nítrico 60% (HNO₃) até a solução apresentar um valor de pH próximo de 2. Uma vez estabilizado o pH, adicionou-se amónia 25% (NH₃) até este atingir o valor 9. Levou-se à estufa a 37°C onde se deixou a maturar durante 7 dias. Retiraram-se os nano-bastonetes da estufa, decantou-se o excesso de água e após congelação levou-se ao liofilizador durante 24 horas. Por fim, conservaram-se os nano-bastonetes numa estufa a 37°C.

2.1.2. Produção de matrizes de CS e de CS/HAp

Para a produção de matrizes de CS pesou-se 25,84 g de água destilada e adicionou-se 1 g de CS sob agitação. Lentamente, juntou-se 6,46 g de uma solução de ácido acético 10% (CH₃COOH) e deixou-se homogeneizar. Pipetou-se 1 mL de solução para cada poço de várias placas de poços e após congelação levou-se ao liofilizador durante 24 horas. Para a produção de matrizes de CS/HAp utilizou-se o mesmo procedimento apenas com uma ligeira mudança. Antes de se adicionar o CS à água destilada, adiciona-se 333 mg ou 1 g de nano-bastonetes de HAp, para a respetiva produção de matrizes de 75CS-25HAp (% m/m) ou 50CS-50HAp (% m/m). Por fim, colocaram-se as amostras num exsiccador à temperatura de 60°C durante 3 dias.

2.2. Caracterização das amostras

2.2.1. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM-EDS)

O recurso à técnica de SEM-EDS permitiu visualizar a estrutura morfológica dos pós e amostras tal como obter uma análise elementar da composição das suas superfícies, utilizando para tal um Microscópio Electrónico de Varrimento Zeiss, modelo Auriga, existente no CENIMAT/I3N. As amostras tiveram de ser previamente metalizadas com uma fina camada de ouro com cerca de 5 nm, pela técnica de *sputtering*.

2.2.2. Difracção de Raios-X (XRD)

As amostras foram caracterizadas por XRD num difractómetro Phillips, presente no CENIMAT/I3N, com raios-X gerados a partir de uma ampola de cobre sob um potencial de aceleração de 30 kV e um feixe de corrente de 15 mA. O recurso a esta técnica serviu para

verificar as fases presentes na HAp comercial e nos nano-bastonetes produzidos, tal como para verificar o efeito da adição da HAp às matrizes de CS.

2.2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR, foi utilizada para a identificação dos grupos funcionais presentes na HAp comercial, nano-bastonetes e matrizes produzidas. Para tal recorreu-se ao espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR existente no CENIMAT/I3N.

2.2.4. Análise Diferencial Calorimétrica e Termogravimetria (DSC-TGA)

Para a técnica de DSC-TGA foi utilizado o analisador térmico simultâneo STA 449 F3 Jupiter, existente no CENIMAT/I3N. Esta técnica foi utilizada para observar a perda de massa e as variações de entalpia, do CS comercial e das matrizes de CS. A taxa de aquecimento usada foi de 10 °C/min e o ensaio decorreu em atmosfera de nitrogénio.

2.2.5. Porosimetria de Mercúrio

A porosidade das matrizes foi obtida pelo porosímetro de mercúrio Micromeritics, modelo Autopore IV 9500, presente no Departamento de Química.

2.2.6. Espectroscopia de Relaxação Dielétrica (DRS)

A técnica de DRS, foi usada para observar a variação de parâmetros eléctricos e dieléctricos das matrizes produzidas, em função da frequência e da temperatura. Os ensaios decorreram sob uma atmosfera de hélio e foram feitos através do analisador de impedâncias Agilent 4294, acoplado a um controlador de temperatura Oxford IT-C4, presente na Universidade de Aveiro.

2.2.7. Análise de Correntes Termoestimuladas (TSDC)

A técnica de TSDC permitiu avaliar os picos de polarização de cada amostra tal como calcular os seus valores de carga. O setup, presente no Departamento de Ciência dos Materiais, permitiu a polarização das amostras tal como os ensaios de TSCD. A taxa de aquecimento dos ensaios foi de 2 °C/min e o campo aplicado durante a polarização foi de $\pm 450 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$.

2.2.8. Culturas Celulares

As culturas celulares *in vitro*, feitas no Departamento de Física, serviram para determinar os valores de adesão e de proliferação das células. Semearam-se 30.000 células do tipo SAOS-2 em cada poço, usando 4 réplicas de cada amostra com e sem polarização.

2.2.9. Ensaio de bioactividade

Os ensaios de SBF realizaram-se utilizando uma solução de concentração iónica de 1,5x, relativamente ao plasma sanguíneo. Os tempos de ensaio usados foram de 1 e 6 horas e de 1, 3 e 7 dias. Foram usadas 1 réplica de cada amostra, com e sem polarização, para cada tempo.

3. Resultados e discussão

3.1. Matrizes de CS e CS/HAp

As amostras produzidas, representadas na Figura 2, apresentam uma geometria cilíndrica com um diâmetro de cerca de 1,4 cm e uma altura variável entre os 4,60 mm e os 5,40 mm. Esta diferença de espessuras deve-se a incorporação de bolhas de ar durante a sua produção e aos espaços deixados pela água sublimada durante o processo de liofilização. Estes factores irão influenciar directamente a sua porosidade, factor principal para a variação das suas espessuras.

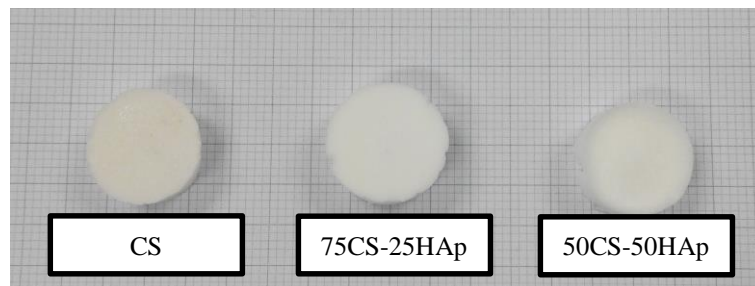


Figura 2 - Amostras produzidas pelo processo de liofilização

3.2. SEM

A técnica de microscopia de varrimento electrónico, SEM, foi utilizada para visualizar a estrutura morfológica tanto da HAp comercial e dos nano-bastonetes, Figura 3a) e 3b), como das estruturas das amostras de CS e CS/HAp produzidas pela técnica de liofilização, Figuras 4a), 4b) e 4c). Na Figura 3a), relativa à HAp comercial, é possível observar um grão de tamanho micrométrico, tal como as suas várias camadas de crescimento [34], [35]. O tamanho médio dos grãos de HAp foi estimado em 24,9 μm (ver APÊNDICE C). Através da Figura 3b), verifica-se a presença de HAp em forma de nano-bastonetes não sendo possível o cálculo rigoroso do seu tamanho médio devido à agregação dos mesmos. Porém, são observáveis nano-bastonetes com um comprimento de cerca de 100 nm e com largura compreendida entre os 10 e os 20 nm.

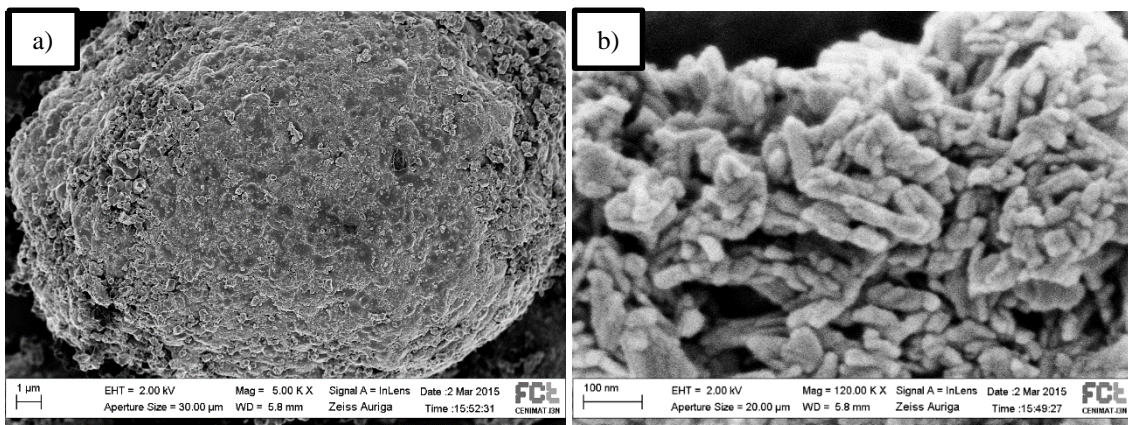


Figura 3 - Imagens de SEM: a) HAp comercial; b) nano-bastonetes de HAp produzidos pela técnica de liofilização;

As Figuras 4a), 4b) e 4c) apresentam a estrutura morfológica das matrizes de CS e CS/HAp produzidas. Ao observar as figuras pode ver-se a presença de estruturas altamente porosas diminuindo assim a sua porosidade à medida que a concentração de HAp aumenta na amostra devido ao recobrimento da superfície do CS pela mesma. Nas matrizes de CS/HAp é possível observar pequenos flocos em toda a sua estrutura, referentes à HAp incorporada, sendo estes mais visíveis na amostra de 50CS-50HAp devido a uma maior concentração. A HAp mostra-se bem distribuída por toda a rede do polímero. Na Figura 4d), zona ampliada da Figura 4b), podemos observar um aglomerado de nano-bastonetes incorporados nas matrizes de CS/HAp.

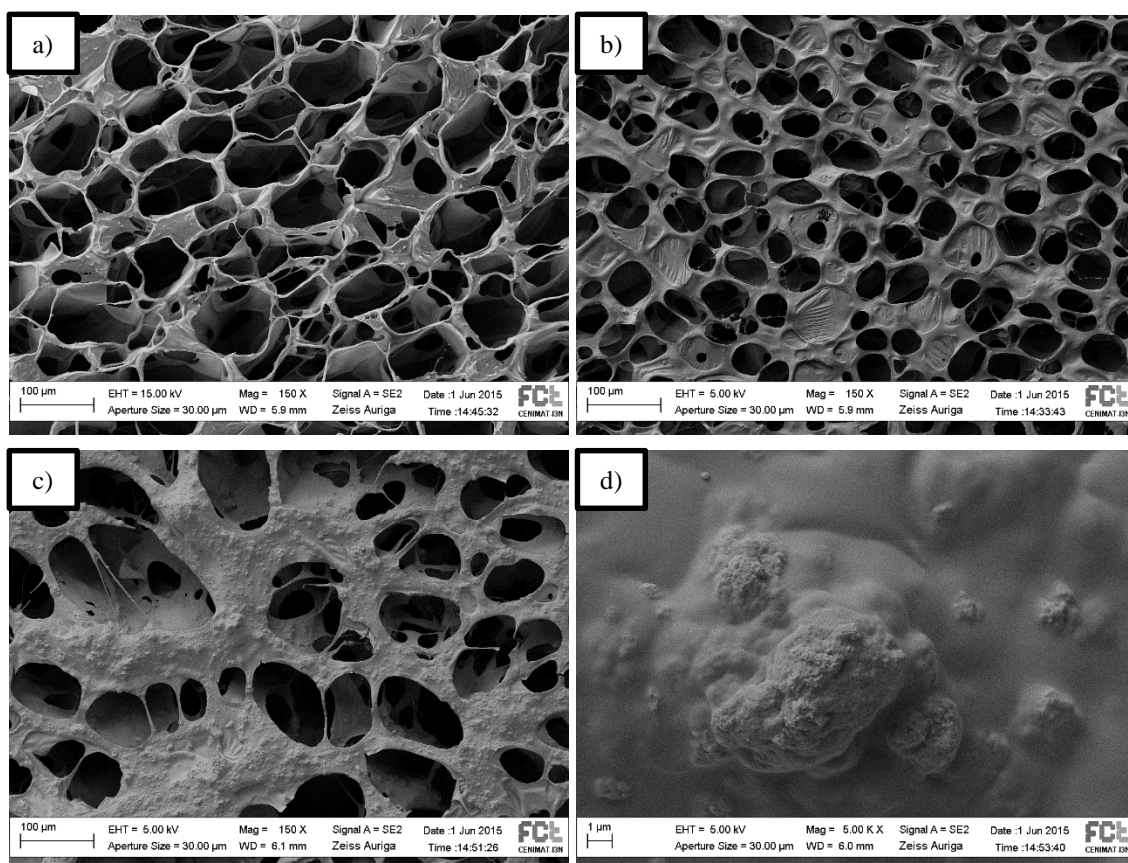


Figura 4 - Imagens SEM das amostras produzidas pela técnica de liofilização: **a) CS; b) 75CS-25HAp; c) 50CS-50HAp; d) HAp incorporada nas matrizes de CS/HAp;**

3.3. XRD

Na Figura 5, encontra-se o espectro de XRD dos pós de HAp comercial e dos nano-bastonetes de HAp produzidos pela técnica de liofilização. Observando-os podemos aferir que os pós se encontram cristalinos, uma vez que os picos correspondentes a cada plano de refração se encontram bem definidos. Com a ajuda da ficha JCPDS do *International Centre for Diffraction Data* relativa à HAp (ver em APÊNDICE D), podemos afirmar que os pós são, única e exclusivamente compostos por HAp não existindo assim a presença de fases secundárias como óxido de cálcio (CaO) ou fosfato tricálcico (α -TCP/ β -TCP) em ambos as estruturas [36], [37].

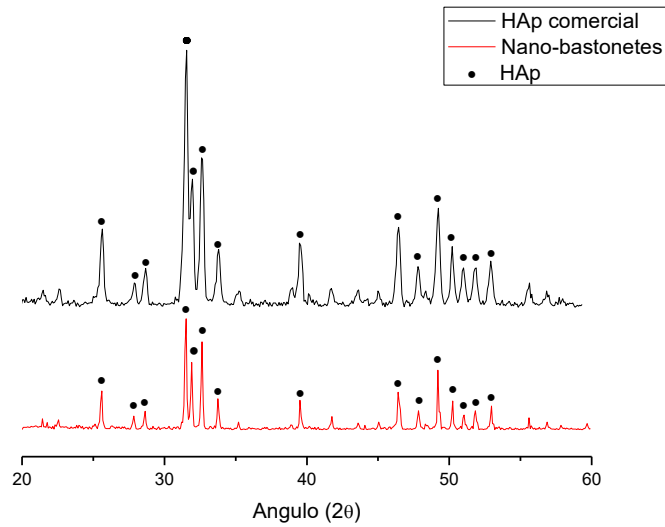


Figura 5 - Espectro de XRD dos pós de HAp comercial e dos nano-bastonetes produzidos

A Figura 6 mostra-nos os difractogramas das matrizes produzidas pelo processo de liofilização. Para a amostra de CS é possível observar os picos característicos do material perto dos ângulos 2θ de 10° e 20° , estando o primeiro um pouco atenuado devido ao ruído. Por ser um polímero, este apresenta uma banda de $8-80^\circ$ representativa da fase essencialmente amorfa neste tipo de materiais. Nos espectros dos compósitos é observável os picos de maior intensidade da HAp, intensificando-se para concentrações mais elevadas. Verifica-se também que à medida que a concentração de HAp na amostra aumenta os picos relativos ao CS ficam mascarados pelos da HAp, tal como a banda relacionada com sua parte amorfa [38], [39].

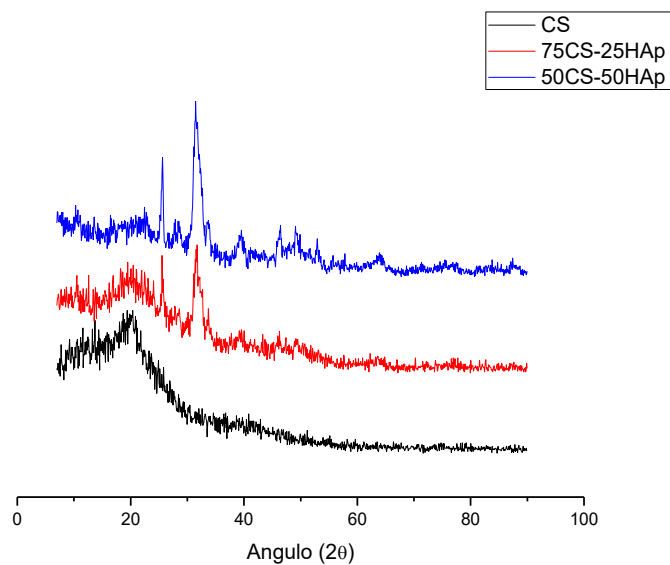


Figura 6 – Espectro de XRD das diferentes amostras produzidas pelo processo de liofilização

3.4. FTIR

Com o intuito de observar os grupos funcionais da HAp comercial, nano-bastonetes e amostras produzidas recorreu-se à espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Ambos os espectros, Figura 7 e 8, foram identificados quanto aos modos de vibração dos seus grupos funcionais. A partir do espectro da Figura 7, referente à HAp comercial e aos nano-bastonetes produzidos, podemos observar a presença de uma banda que se prolonga entre os comprimentos de onda de 3600-2600 cm^{-1} . Esta banda é relativa à água adsorvida pela rede cristalina de ambos os pós. É também possível averiguar em ambas as amostras, os modos vibratórios estiramento simétrico dos grupos hidroxilos (OH^-) típicos da HAp a 3570 cm^{-1} e a 630 cm^{-1} , este último observável na figura 8 [40], [41].

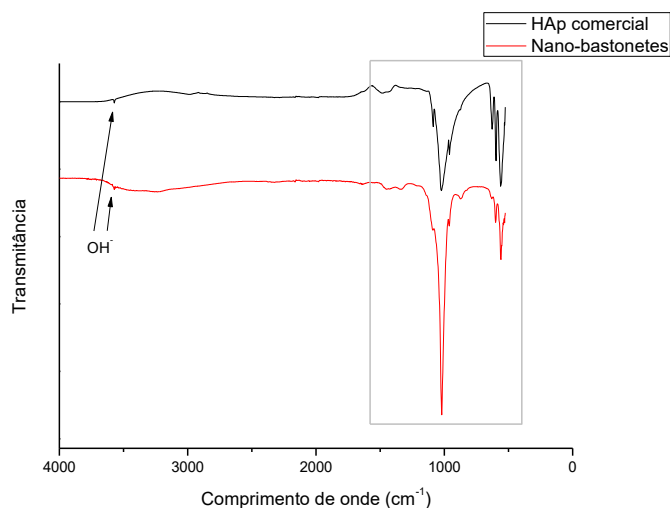


Figura 7 - Espectro FTIR da HAp comercial e nano-bastonetes produzidos pela técnica de liofilização

Observando a Figura 8, ampliação da zona a cinzento do espectro de FTIR da Figura 7, verificamos a presença de vários modos de vibração das moléculas dos grupos fosfatos. Entre 1120-1020 cm^{-1} podemos ver a banda relativa à deformação angular dos grupos fosfatos (PO_4^{3-}) tal como entre os 600-560 cm^{-1} . Ainda no que respeita ao grupo fosfato (PO_4^{3-}) podemos observar a 960 cm^{-1} o modo vibratório estiramento simétrico. Por sua vez, é visível a 1460 cm^{-1} e a 870 cm^{-1} o modo estiramento simétrico dos grupos carbonatos (CO_3^{2-}) presentes na HAp. Estes sugerem a presença de um HAp do tipo B, característica da substituição dos grupos fosfatos (PO_4^{3-}) por grupos carbonatos (CO_3^{2-}). Por fim é ainda observável um modo de vibração estiramento simétrico do grupo nitrato a 1380 cm^{-1} para os nano-bastonetes, sendo estes um resíduo comum proveniente da sua etapa de produção [40], [41].

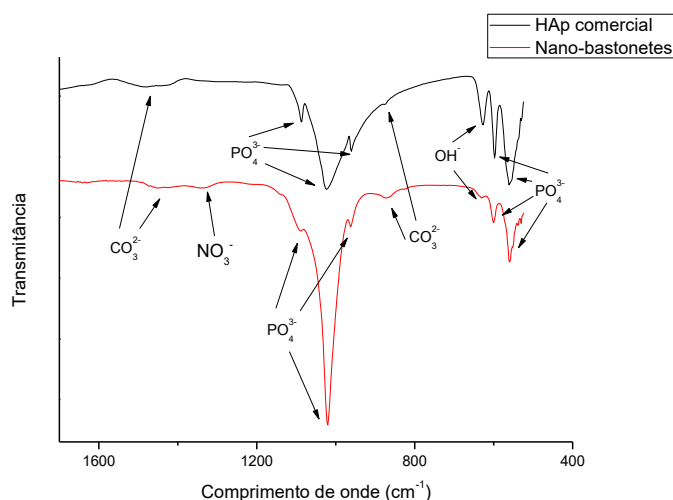


Figura 8 - Ampliação de uma zona do espectro de FTIR da figura 7

Tal como nos cerâmicos falados anteriormente, recorreu-se à técnica de FTIR para analisar os grupos funcionais presentes nas matrizes de CS e CS/HAp. Ao observar o espectro relativo a matriz de CS na Figura 9, podemos verificar a presença de uma banda relativa ao modo estiramento simétrico das ligações N-H e O-H, com dois picos distintos a 3353 cm^{-1} e a 3288 cm^{-1} e a presença de uma outra banda com um pico de maior intensidade em 2870 cm^{-1} relacionada ao mesmo modo de vibração das ligações C-H. Partindo para a figura 10, ampliação da zona a cinzento da figura 9, observa-se uma banda com um pico em 1655 cm^{-1} referente à amida I e outro pico de maior intensidade em 1556 cm^{-1} sendo este atribuído ao modo deformação angular das ligações N-H provenientes da amida II e da amina. Aos picos 1408 cm^{-1} e 1376 cm^{-1} correspondem respectivamente ao modo deformação angular das ligações de $-\text{CH}_2$ e ao modo deformação simétrica das moléculas $-\text{CH}_3$. Aos 1316 cm^{-1} encontra-se o pico relativo à amida III. Por fim, aos 1150 cm^{-1} observa-se o modo estiramento anti-simétrico das ligações C-O-C e aos 1062 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} o modo estiramento simétrico das ligações C-O. À medida que aumentamos a concentração de HAp nas amostras, picos relativos ao CS tendem a diminuir enquanto que picos referentes à HAp começam a tornar-se mais definidos [21], [42], [43].

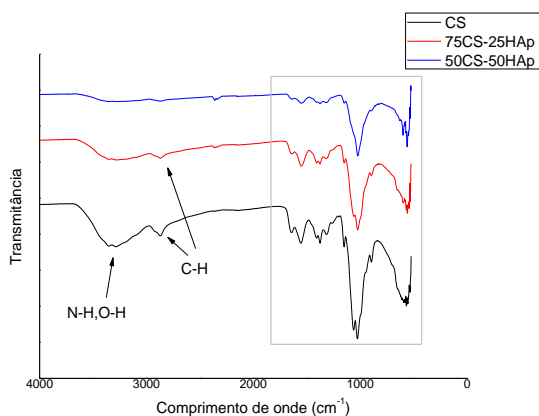


Figura 9 - Espectro FTIR das diferentes amostras produzidas pelo processo de liofilização

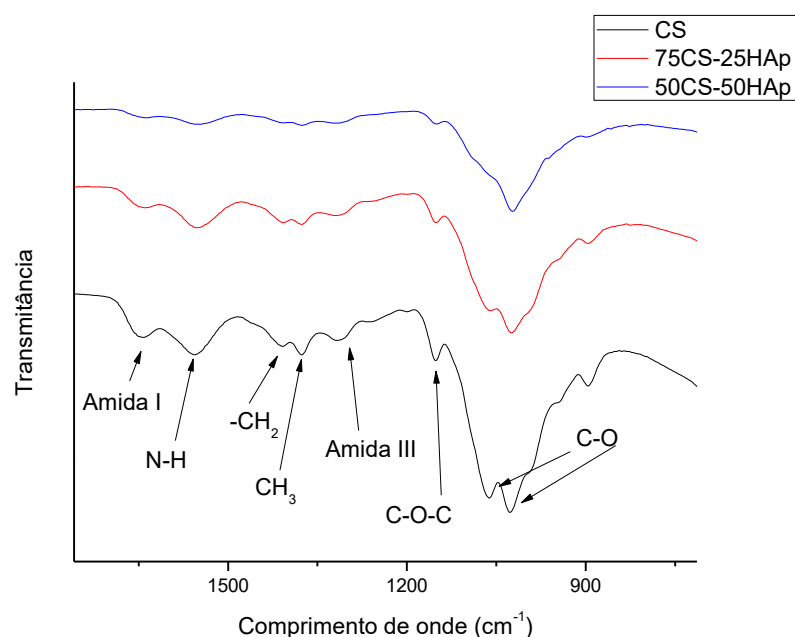


Figura 10 - Ampliação de uma zona do espectro de FTIR da figura 9

3.5. DSC-TGA

De modo a estudar a perda de massa e as variações de entalpia do pó comercial de CS e das matrizes de CS produzidas fez-se uma análise diferencial térmica assim como uma análise termogravimétrica. Pela observação dos gráficos presentes nas Figuras 15 e 16, podemos verificar a presença de um pico endotérmico à temperatura de 60 °C para o CS e à temperatura de 69 °C para a matriz de CS. Esse pico é descrito como o pico relativo à perda de massa em água adsorvida pelos grupos hidrofílicos destes materiais. A percentagem de massa perdida para ambas as amostras foi cerca de 12% começando desde a temperatura ambiente até à temperatura de 130°C para o pó e 110° C para a matriz. É ainda observável outra perda por parte da matriz de CS entre os 110-220 °C. Esta perda pode estar relacionada com a decomposição de grupos acetil, provenientes do seu processo de produção. Por volta dos 300 °C, 310 °C para o CS e 293 °C para a matriz de CS encontramos o pico exotérmico relativo à decomposição dos grupos amida. O decréscimo na estabilidade térmica da matriz de CS, comparada à do pó, pode estar relacionada com a presença de ácido acético, que irá influenciar a cinética de degradação da amostra. Dos 300 °C até aos 650° C as amostras perdem respectivamente 63% e 53% da sua massa, perdendo um total em massa de 75% e 70% desde o início do ensaio. É ainda possível verificar um pico endotérmico, não muito comum na literatura, a 370° para o pó e a 390 °C para a matriz que pode indicar a presença de resíduos derivados do processo de purificação do quitosano ou da decomposição de subprodutos criados pela decomposição da amida [44], [45], [46], [47], [48].

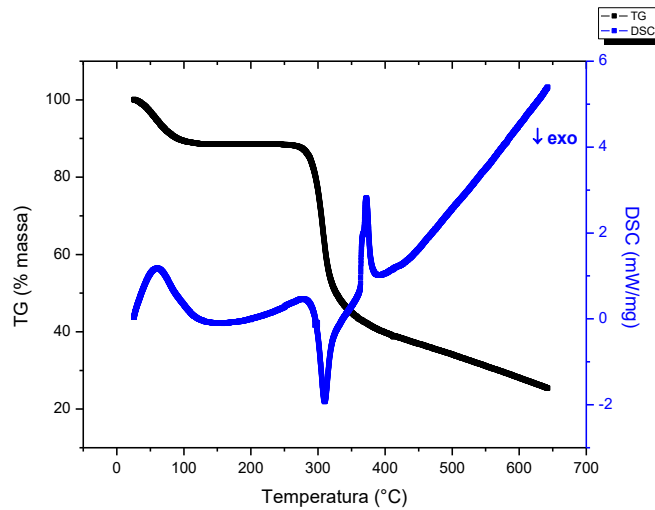


Figura 11 - Espectro DCS-TGA do pó comercial de CS

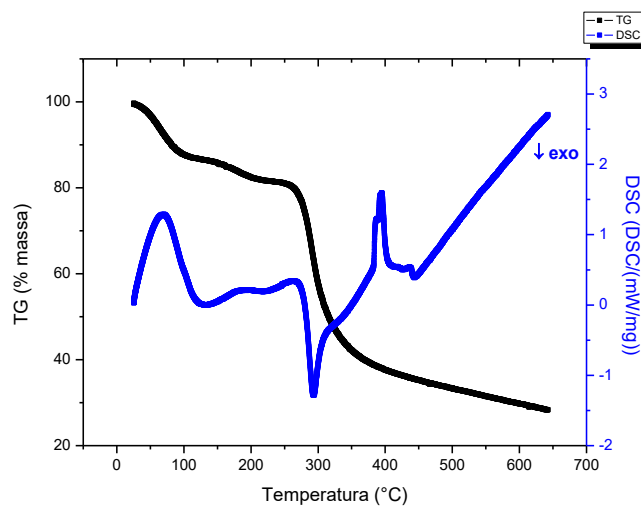


Figura 12 - Espectro DSC-TGA de uma amostra de CS produzida pelo processo de liofilização

3.6. Porosimetria de Mercúrio

A porosidade das amostras, indexadas na Tabela 1, medida através da técnica de porosimetria de mercúrio, foi superior a 95% para a amostra de CS e 75CS-25HAp e superior a 91% para a amostra de composição 50CS-50HAp. Tal como referido anteriormente pela análise por SEM, a porosidade das amostras diminui com o aumento da HAp presente na sua estrutura. Porém, devido ao ensaio da porosidade ter sido feito apenas com uma amostra de cada composição e as amostras apresentarem uma grande variabilidade, a amostra de 75CS-25HAp apresenta uma porosidade mais elevada que a de CS. Foi ainda possível calcular o volume total de poros em cada amostra. Analisando os valores, verificamos que tal como na porosidade, a

amostra com maior volume de poros é a de CS, diminuído esse valor à medida que a concentração de HAp vai aumentando na composição das matrizes.

	CS	75CS-25HAp	50CS-50HAP
Porosidade (%)	95,9	96,0	91,2
Volume total de poros (cm³)	0,73	0,66	0,50

Tabela 1 - Valores da porosidade, e volume total de poros para uma amostra de cada composição, produzidas pelo processo de liofilização

3.7. DRS

Através da análise de DRS foi possível estudar a variação das propriedades eléctricas e dieléctricas das matrizes produzidas em função da frequência e da temperatura. As Figuras 13, 14 e 15 mostram-nos os gráficos da condutividade σ_{ac} , em função da frequência e da temperatura, sendo visível o aumento da condutividade com o aumento das mesmas. Para frequências e/ou temperaturas mais baixas as amostras apresentam um patamar onde a sua condutividade é pouco variável. É visível para todos os gráficos da σ_{ac} , a presença de um pico, no fim do espectro, à temperatura de 400K e à frequência de 1 GHz. Através da análise dos gráficos verificamos que, a amostra de CS atinge um valor de condutividade mais elevado ($\sigma_{ac}= 1,635 \times 10^{-5} [\Omega.m]^{-1}$), seguida da amostra de 75CS-25HAp ($\sigma_{ac}= 1,355 \times 10^{-5} [\Omega.m]^{-1}$) e da amostra de 50CS-50HAp ($\sigma_{ac}= 1,280 \times 10^{-5} [\Omega.m]^{-1}$). As Figuras 16, 17 e 18 são relativas à componente real da permissividade, ϵ' , em função da frequência e da temperatura onde é visível um aumento da mesma à medida que a frequência diminui e a temperatura aumenta. Supõe-se que este fenómeno esteja relacionado com algum tipo de mecanismo de polarização do material visto que o mesmo acontece para os gráficos da componente imaginária da permissividade, ϵ'' [49] (ver APÊNDICE A). Verifica-se que dentro dos intervalos estudados, a amostra de CS apresenta um maior valor desta propriedade ($\epsilon'= 35,60$) seguido da amostra de 75CS-25HAp ($\epsilon'= 35,40$) e da amostra de 50CS-50HAp ($\epsilon'= 33,80$). Por fim encontram-se as Figuras 19, 20 e 21, estando nestas representadas a componente imaginária da permissividade, ϵ'' , em função da frequência e da temperatura. Esta vai aumentar à medida que a frequência diminui e a temperatura aumenta. Mais uma vez observa-se que dentro dos intervalos estudados a amostra com maior valor desta propriedade é a amostra de CS ($\epsilon''= 227,0$), seguida da amostra de 75CS-25HAp ($\epsilon''= 147,0$) e da amostra de 50CS-50HAp ($\epsilon''= 52,20$). É ainda visível, nos gráficos relativos a amostra de 50CS-50HAp a existência de um segundo pico entre o intervalo de temperaturas de 300 a 360 K. Tal pico deve-se, possivelmente, à presença de moléculas de água na sua estrutura, incorporada pela amostra ao longo de todo o processo de produção e armazenamento devido aos valores de intervalo em que este se encontra [50].

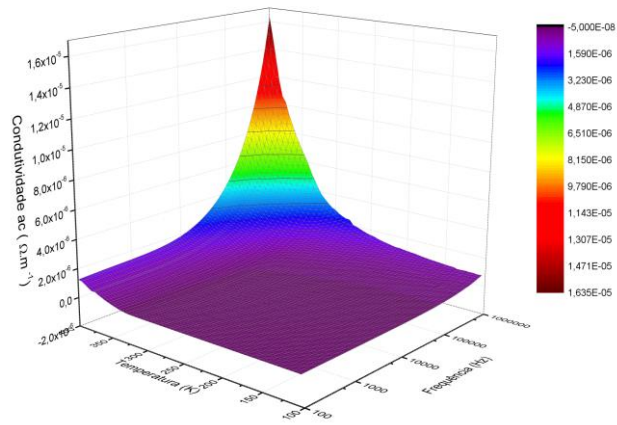


Figura 13 - Espectro de DRS da condutividade ac em função da frequência e da temperatura para uma amostra de CS

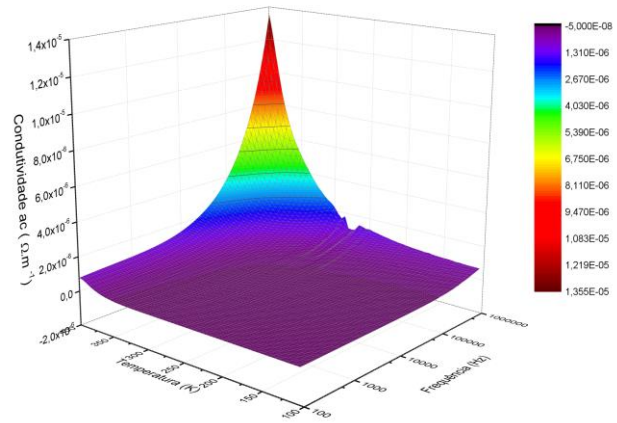


Figura 14 - Espectro de DRS da condutividade ac em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 75CS-25HAp

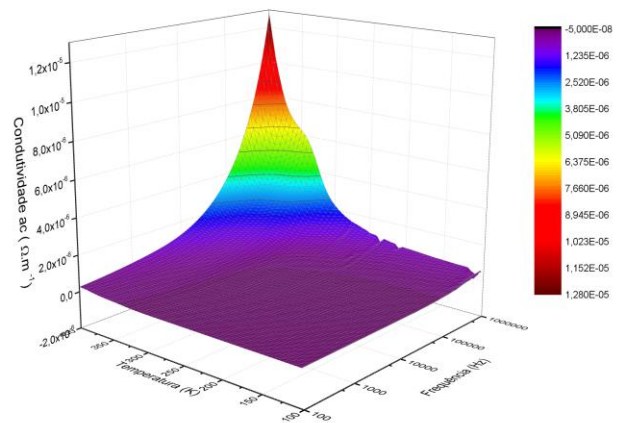


Figura 15 - Espectro de DRS da condutividade ac em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 50CS-50HAp

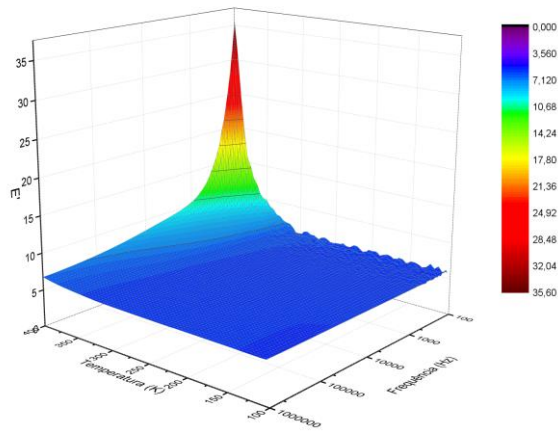


Figura 16 - Espectro de DRS da componente real da permissividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de CS

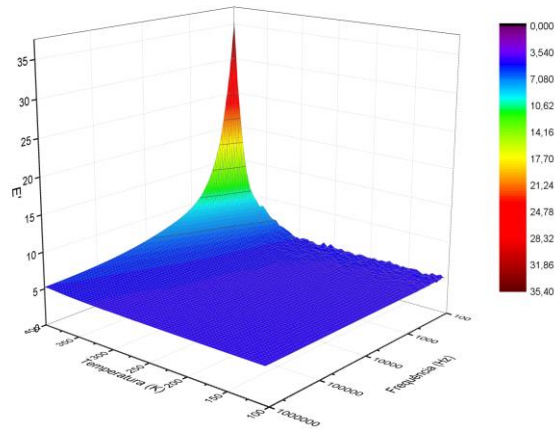


Figura 17 - Espectro de DRS da componente real da permissividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 75CS-25HAP

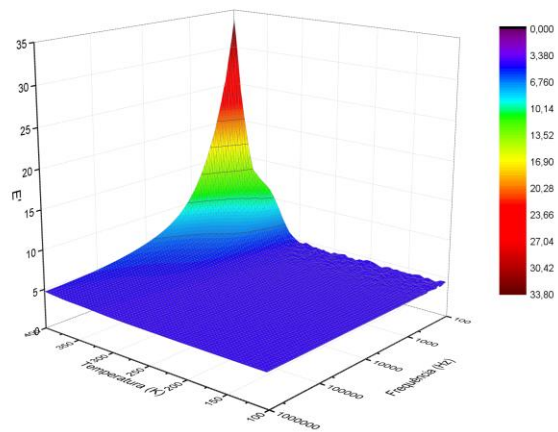


Figura 18 - Espectro de DRS da componente real da permissividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 50CS-50HAP

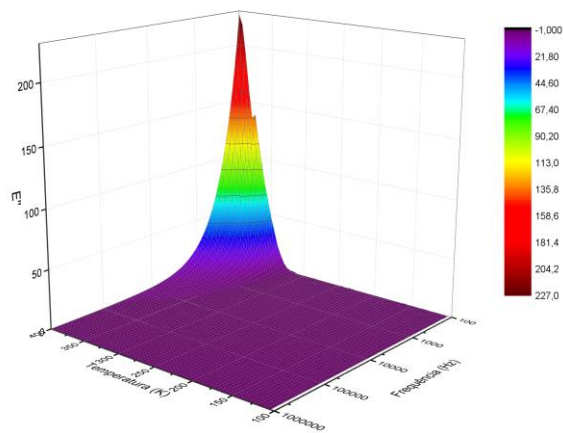


Figura 19 - Espectro de DRS da componente imaginária da permissividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de CS

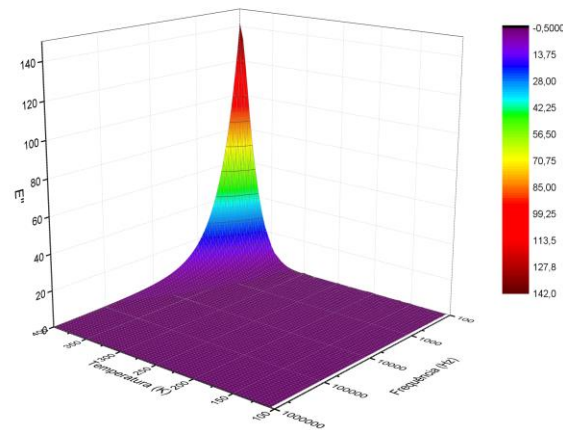


Figura 20 - Espectro de DRS da componente imaginária da permissividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 75CS-25HAp

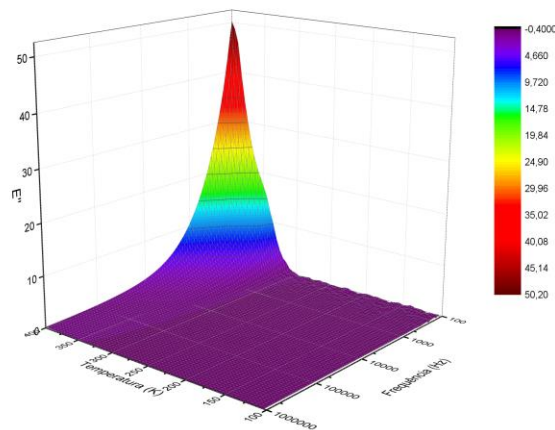


Figura 21 - Espectro de DRS da componente imaginária da permissividade em função da frequência e da temperatura para uma amostra de 50CS-50HAp

Na Tabela 2, encontram-se os valores das propriedades obtidas pelos espectros de DRS à frequência de 10 kHz e à temperatura de 300 K. Como é verificável através dos gráficos de DRS anteriormente vistos o valor das propriedades diminui à medida que a concentração de HAp aumenta nas amostras. Na tabela observamos esse decréscimo das amostras de CS para as de 75CS-25HAp mas comparando aos valores das amostras de 50CS-50HAp existe um aumento nestes, em relação com os anteriores. Isto deve-se ao facto, já visto anteriormente, da presença de água na amostra a esta temperatura, que faz aumentar os valores das suas propriedades relativamente ao seu valor real comparativamente com as outras amostras.

Foi ainda possível calcular, através da equação de Arrhenius, a energia de activação, E_a , de cada amostra a uma frequência de 10 kHz para temperaturas superiores a 300 K. Para isso construiu-se um gráfico $\ln \sigma_{ac}$ vs. $1000/T$ e a partir do declive das rectas obtidas foi possível o cálculo dos seus valores como é visível na Figura 22. É observável a diminuição deste valor à medida que a concentração de HAp aumenta nas amostras.

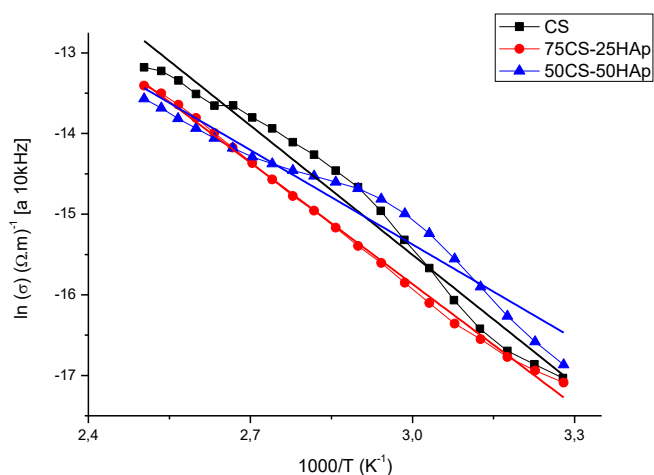


Figura 22 - Espectro de DRS de $\ln \sigma_{ac}$ em função de $1000/T$ à frequência de 10 kHz, das amostras produzidas pelo processo de liofilização

	$\sigma_{ac} (\Omega.m)^{-1} (x 10^{-8})$	ϵ'	$\epsilon'' (x10^{-2})$	$E_a (eV)$
CS	3,60	5,98	6,47	$0,46 \pm 20\%$
75CS-25HAp	2,83	5,02	5,09	$0,43 \pm 6\%$
50CS-50HAp	3,84	4,39	6,90	$0,34 \pm 21\%$

Tabela 2 - Valores das constantes eléctricas, dieléctricas e energia de activação de uma amostra de cada composição, à temperatura de 300 K e à frequência de 10 kHz

3.8. TSDC

Com o intuito de estudar a resposta eléctrica das matrizes produzidas em função da temperatura, realizaram-se ensaios de TSDC em amostras com superfícies não polarizadas, polarizadas positivamente e polarizadas negativamente. As amostras foram sujeitas a um aquecimento com taxa de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, desde a temperatura ambiente até 130°C onde por sua vez, nas amostras polarizadas, foi aplicado um campo de $\pm 450 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$ durante 1 hora e feito posteriormente um arrefecimento rápido da amostra com o campo aplicado de modo a aprisionar as cargas e dipólos da mesma. A Figura 23, apresenta alguns dos TSDC feitos nas amostras de CS e amostras de 75CS-HAp, de acordo com a polarização aplicada, passado 1 hora entre a remoção da polarização e a aquisição da corrente de despolarização. É visível, em todas as amostras, a presença de um pico entre o 30°C e os 80°C . Da análise feita anteriormente por DSC, presume-se que esse pico seja relativo à água incorporada pelas amostras derivada do seu processo de fabrico e do tempo de armazenamento das mesmas. Verifica-se que os valores de densidade de carga destes picos são mais elevados para as amostras de 75CS-25HAp o que indica uma maior concentração de água nestas amostras possivelmente pelo presença da HAp servir como um barreira, inpendido assim a saída de água na amostra e do maior tempo de armazenamento das mesmas. É observável pela Figura 23a, que as amostras de CS produzidas, sem qualquer tipo de polarização, apresentam um pico de intensidade $-5 \times 10^{-8} \text{ A}/\text{m}^2$ perto dos 150°C provavelmente originário do processo de formação da matriz. Já nas amostras de 75CS-25HAp não polarizadas, Figura 23b), este pico é inexistente possivelmente devido à incorporação de HAp na matriz. Na Figura 23 a), é ainda visível a presença de um pico com uma densidade de corrente de $-3 \times 10^{-7} \text{ A}/\text{m}^2$, próximo da temperatura de polarização, nas amostras que sofreram polarização positiva. Este pico, designado por pico aparente, tem a particularidade de aparecer cerca de $20\text{-}30^{\circ}\text{C}$ acima da temperatura de polarização a que o campo aplicado e a temperatura de polarização são suficientemente elevados e o material suficientemente isolante [51].

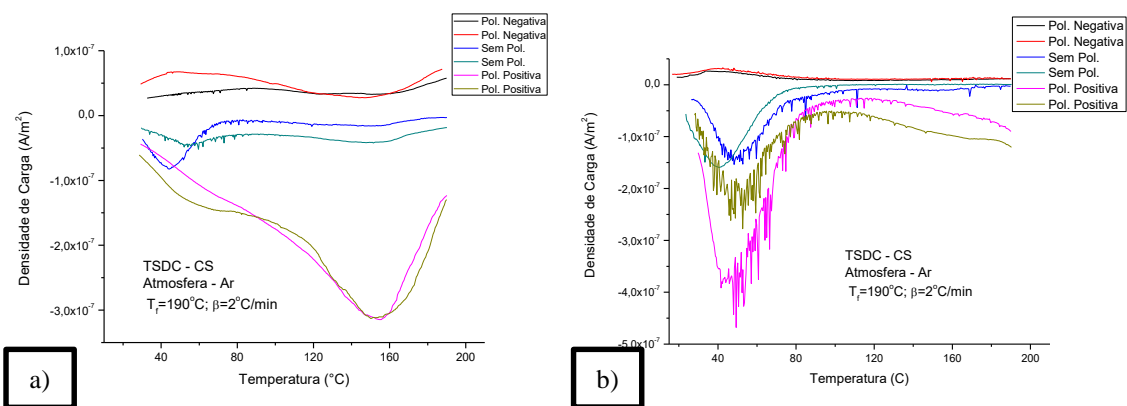


Figura 23 - TSDC das amostras produzidas pelo processo de liofilização, 1 hora após polarização: a) CS; b) 75CS-25HAp;

Para as amostras de 75CS-25HAp polarizadas positivamente, verificamos um aumento em módulo da densidade de corrente à medida que a temperatura aumenta mas sem observação nenhuma de pico aparente. Isto pode ser explicado pelas razões anteriormente descritas, sendo que a adição de HAp ao CS torna o material menos susceptível à polarização, o que seria necessário um aumento do campo aplicado para verificar o seu aparecimento dentro do intervalo de temperaturas estudado. Por fim, relativamente a ambas as amostras, verifica-se que o pico aparente da polarização não se manifesta nas amostras sujeitas a polarização negativa nestas condições de ensaio.

Através do cálculo integral das áreas dos gráficos de TSDC obtidos anteriormente, foi ainda possível calcular a densidade de carga de cada amostra tal como a energia de activação, E_a , e tempo de relaxação a 37°C , τ , através da aplicação da equação de Arrhenius $\ln \tau$ em função de $1000/T$, presente na Figura 24 (APÊNDICE A). Ao consultar a Tabela 3, verifica-se que as amostras polarizadas positivamente são as que apresentam um maior valor de carga em módulo sendo que o módulo de cargas das amostras sem polarização e com polarização negativa é praticamente idêntico. É de notar que as cargas das amostras exibem valores na mesma ordem de grandeza sendo o módulo de carga das amostras de CS mais elevada. Observa-se que as energias de activação obtidas são menores que as calculadas anteriormente pelo gráfico DRS de $\ln \sigma_{ac}$ em função de $1000/T$ à frequência de 10 kHz mas apresentam a mesma ordem de grandeza. Verifica-se que as amostras de 75CS-25HAp são as que apresentam maior valor desta propriedade possivelmente devido a maior incorporação de água pelas amostras ou devido a ocorrência de algum tipo de mecanismo de polarização nestas condições de ensaio, visto os ensaios TSDC serem o equivalente de um ensaio de DRS à frequência de 10^{-3} Hz. Os tempos de relaxação médio das amostras são maiores nas matrizes que apresentam HAp na sua composição e estas, apresentam uma variação inversamente proporcional com a sua energia de activação. Para as amostras de CS, a amostra polarizada positiva é a que apresenta uma maior valor desta propriedade seguida da amostra polarizada negativamente e da amostra sem polarização. Já nas amostras de C75CS-25HAp a amostra com maior tempo de relaxação é a amostra polarizada negativamente, seguida da polarizada positivamente e da sem polarização.

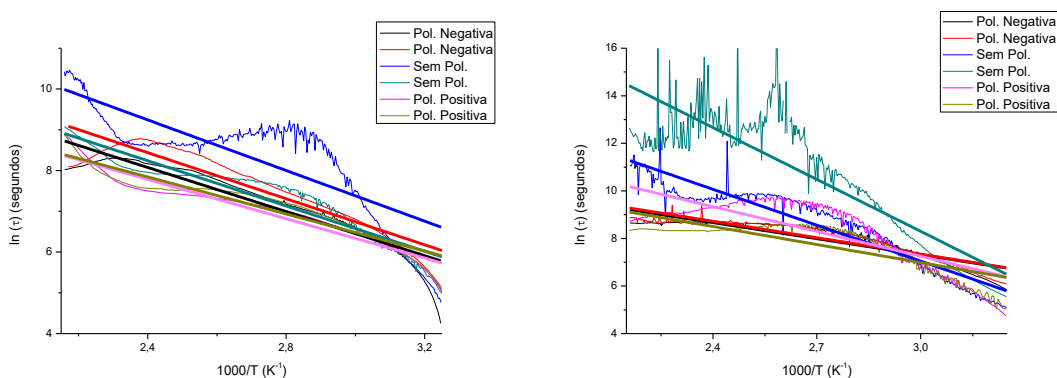


Figura 24 – Gráfico de $\ln \tau$ em função de $1000/T$ obtido através dos gráficos de TSDC das amostras, 1 hora após polarização: **a)** CS; **b)** 75CS-25HAp;

		Sem Polarização	Polarização Positiva	Polarização Negativa
CS	Carga (C/m ²) (x10 ⁻⁴)	-1,31	-9,05	2,07
	Ea (eV)	0,25 ± 9%	0,20 ± 6%	0,24 ± 4%
	τ à 37 °C (segundos)	358 ± 24%	561 ± 11%	380 ± 12%
75CS-25HAp	Carga (C/m ²) (x10 ⁻⁴)	-1,59	-5,24	0,75
	Ea (eV)	0,53 ± 17%	0,26 ± 13%	0,20 ± 6%
	τ à 37 °C (segundos)	545 ± 17%	626 ± 34%	898 ± 12%

Tabela 3 – Valores médios das cargas espaciais, energias de activação e tempos de relaxação médios das amostras de CS e de 75CS-25HAp, calculados apartir dos gráficos de TSDC 1 hora após polarização

Visto as amostras polarizadas positivamente apresentarem uma maior densidade de carga, estudou-se o decaimento da mesma fazendo variar o tempo entre o fim da polarização e a aquisição da corrente de despolarização. Como era de esperar, ao observar as Figuras 25a) e 25b), quanto maior for a variação de tempo entre a aquisição da corrente de depolarização e a remoção do campo eléctrico, menor será a sua densidade de carga. Verifica-se também, com o auxílio da Tabela 4, que ao fim de 7 dias as amostras apresentam uma densidade de carga inferior em quase duas ordens de grandeza comparativamente a carga 1 hora após polarização.

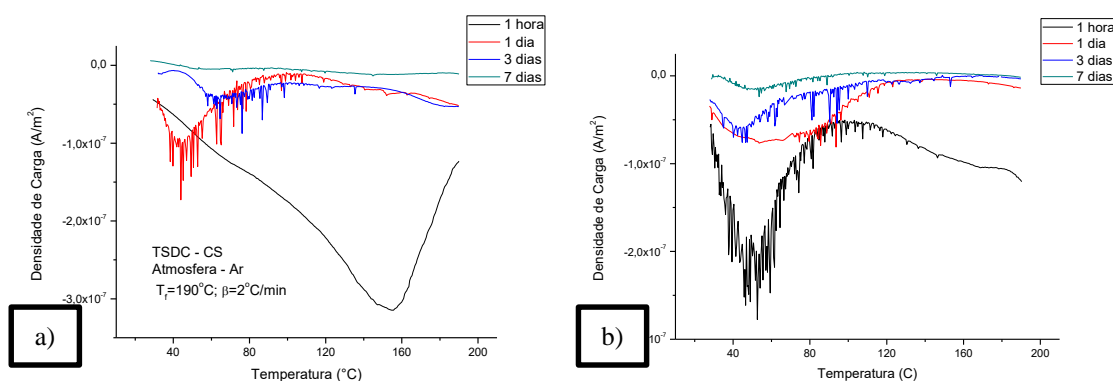


Figura 25 – Estudo do decaimento de carga apartir do TSDC das amostras produzidas pelo processo de liofilização, polarizadas positivamente: a) CS; b) 75CS-25HAp;

		1 hora	1 dia	3 dias	7 dias
Densidade de Carga (C/m ²)	CS	-8,78x10 ⁻⁴	-1,89x10 ⁻⁴	-1,49x10 ⁻⁴	-3,14x10 ⁻⁵
	75CS-25HAp	-5,03x10 ⁻⁴	-1,61x10 ⁻⁴	-8,83x10 ⁻⁵	-7,91x10 ⁻⁶

Tabela 4 - Valores da carga espacial das amostras, provenientes do estudo de decaimento de cargas das amostras de CS e 75CS-25HAp, polarizadas positivamente

3.9. Culturas Celulares

De modo a estudar a biocompatibilidade das nossas amostras foram semeadas 30.000 células do tipo SAOS-2 em cada poço de cultura. As amostras utilizadas foram polarizadas num intervalo de 3 dias de maneira a que a carga das amostras permaneça-se o mais igual possível.

Para o cálculo inicial dos valores da taxa de adesão das células, as amostras ficaram 24 horas numa incubadora a 37°C e numa atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. No cálculo das absorvâncias foi ainda necessário utilizar um factor de correcção pois devido à elevada porosidade das amostras, torna-se impossível retirar todo o líquido de cada poço de ensaio fazendo diluir assim o meio com resazurina (ver em APÊNDICE B). Este factor de correcção foi aplicado nas absorvâncias dos poços das amostras de controlo de meio material. Visto as amostras de 50CS-50HAp se desfazerem no meio de cultura, devido possivelmente à falta de adesão entre os dois materiais, não foi possível calcular os valores das suas taxas de adesão e de proliferação celular.

Como é observável pela Figura 26, verificamos que existe uma melhor taxa de adesão para as amostras de 75CS-25HAp, com valores superiores a 25%, em comparação com as amostras compostas única e exclusivamente por CS, valores entre 15-20%. Este aumento pode estar relacionado com a morfologia das amostras, devido à rugosidade que a HAp confere às matrizes, aumentando assim a adesão celular [25]. Relativamente às amostras de 75CS-25HAp, constata-se também que a adesão celular é maior nas amostras onde foram aplicadas uma polarização eléctrica negativa, ou seja, com superfícies de carga positivas.

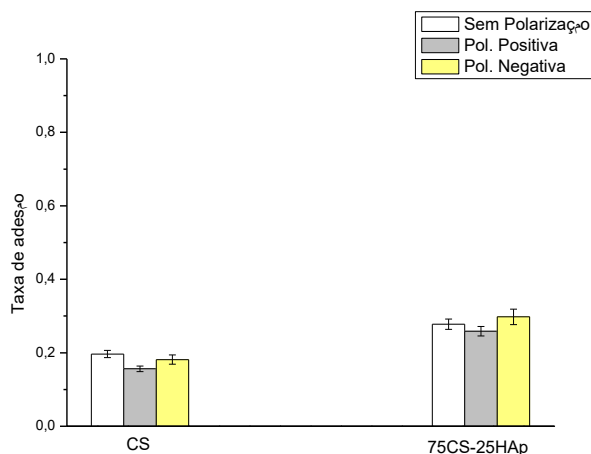


Figura 26 - Taxas de adesão das amostras de CS e 75CS-HAp, com e sem polarização

As Figuras 27 e 28, apresentam os gráficos da proliferação das células comparativamente com o número de células semeadas inicialmente em cada poço. Para ambas as amostras verificou-se que desde o 1º dia (adesão) até ao 4º e 7º dia houve um aumento do número de células em cada tipo de amostras. Da Figura 27, relativa às amostras de CS, observou-se um aumento de cerca de 200% do 1º para o 4º dia de incubação, nas amostras sem polarização e

um aumento de 250% nas amostras com polarização positiva. Já as amostras polarizadas negativamente sofreram um aumento superior a 300%. Do 4º para o 7º dia de incubação, observou-se um aumento significativo apenas nas amostras polarizadas negativamente, passando a ter uma população de cerca de 4 vezes superior em relação as células aderidas às matrizes no 1º dia. As amostras de 75CS-25HAp, Figura 28, apresentam um aumento de cerca de 300% do 1º para o 4º dia na incubadora e tal como nas amostras de CS, a amostra polarizada negativamente é a que apresenta uma melhor taxa de proliferação ao fim de 7 dias de incubação. As amostras sem polarização e com polarização positiva tiveram um aumento 420% enquanto que as polarizadas negativamente obtiveram um aumento de 440% das suas células ao longo dos 7 dias.

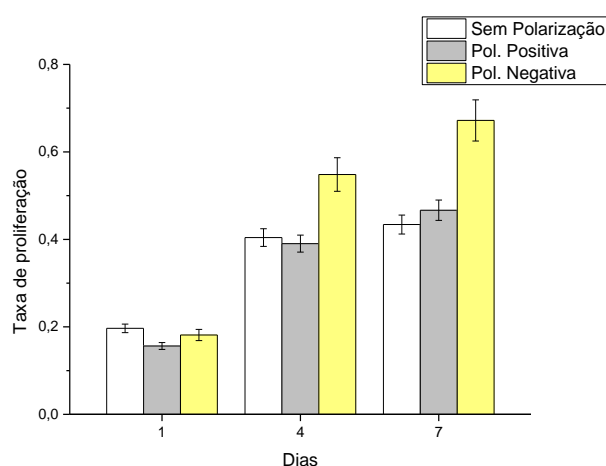


Figura 27 - Taxa de proliferação para 4 e 7 dias de incubação, das amostras de CS, com e sem polarização

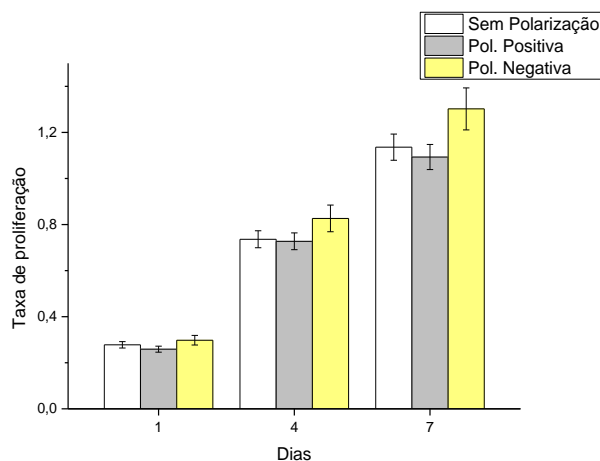


Figura 28 - Taxa de proliferação para 4 e 7 dias de incubação, das amostras de 75CS-25HAp, com e sem polarização

3.10. Ensaios de bioatividade

Para verificar a deposição de fosfatos de cálcio nas amostras recorreu-se ao ensaio de SBF numa solução de concentração 1.5x. Depois de colocadas à uma temperatura de 37° C de acordo com vários períodos de incubação, as amostras foram liofilizadas e levadas a SEM-EDS para observar a sua estrutura morfológica e posterior análise elemental. A Figura 29, mostra as superfícies de várias amostras de CS, com e sem polarização. Nestas amostras o único tempo de ensaio em que se fez observar uma deposição de fosfatos de cálcio foi o de 7 dias. Em todos os restantes tempos, só foram observados cristais de NaCl. Como é observável nas figuras, o polímero encontra-se praticamente coberto por uma camada mais clara, camada essa composta por cristais de cloreto de sódio (mais pequenos) e cristais de fosfato de cálcio (maiores com geometria esférica). Nas figuras 29a), 29b) e 29c), podemos verificar que houve deposição de cristais em todas as amostras como também observar que a amostra que apresenta uma maior deposição de fosfatos de cálcio é a da Figura 29a, relativa à amostra sem polarização seguida da amostra com polarização negativa, Figura 29c). A Figura 29d), mostra a uma maior escala ambos os cristais, sal e fosfatos de cálcio, onde podemos facilmente observar o seu tamanho e forma. Da sua análise elemental feita por EDS, Figura 30, e através dos espectros 17 e 19 confirma-se a presença de estruturas compostas maioritariamente por Ca e P como por Na e Cl.

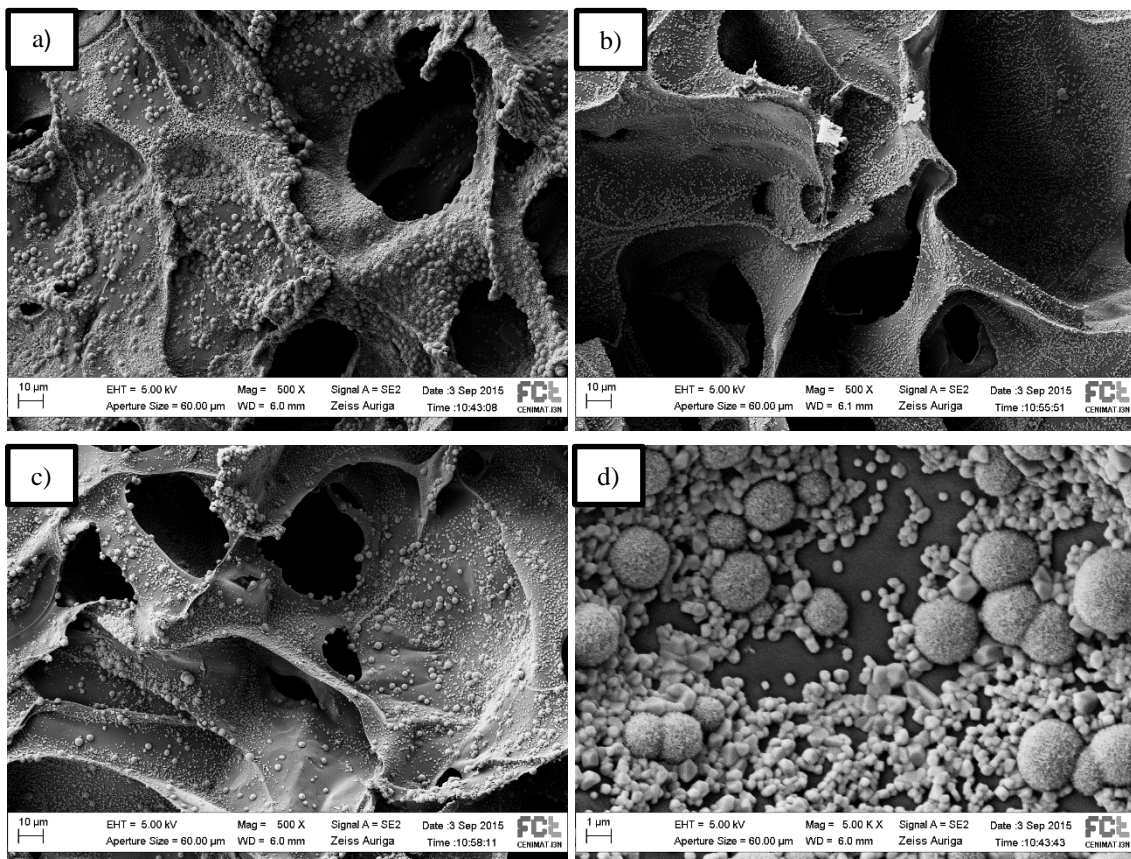


Figura 29 - Imagens SEM das amostras de CS imersas 7 dias em SBF à temperatura de 37°C: **a)** sem polarização; **b)** com polarização positiva; **c)** com polarização negativa; **d)** cristais de sal e de fosfatos de cálcio precipitados nas amostras;

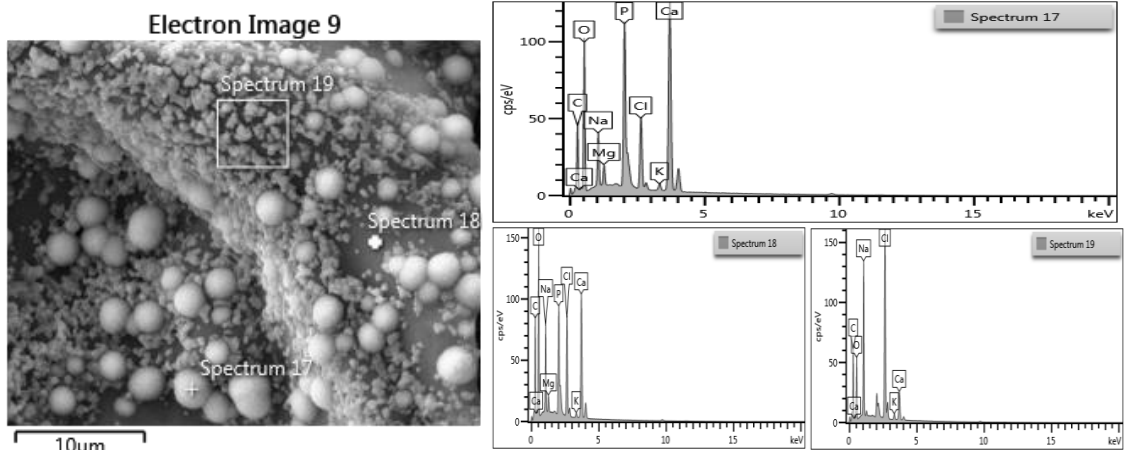


Figura 30 - Imagem SEM de uma amostra de CS, imersa 7 dias em SBF à temperatura de 37°C e respectivos espectros EDS

Através da Figura 31, superfícies das amostras de 75CS-25HAp depois de imersas durante 1 dia em SBF, verifica-se a existência de fosfatos de cálcio onde estes, preferencialmente, precipitam sobre a HAp presente na matriz. Nestas verifica-se, tal como nas amostras de CS, que existe uma maior deposição sobre a superfície da amostra não polarizada, Figura 31a), seguido da amostra com polarização negativa, Figura 31c). Da Figura 31d), ampliação de uma zona das amostras, observa-se a presença dos fosfatos de cálcio sobre a HAp já existente.

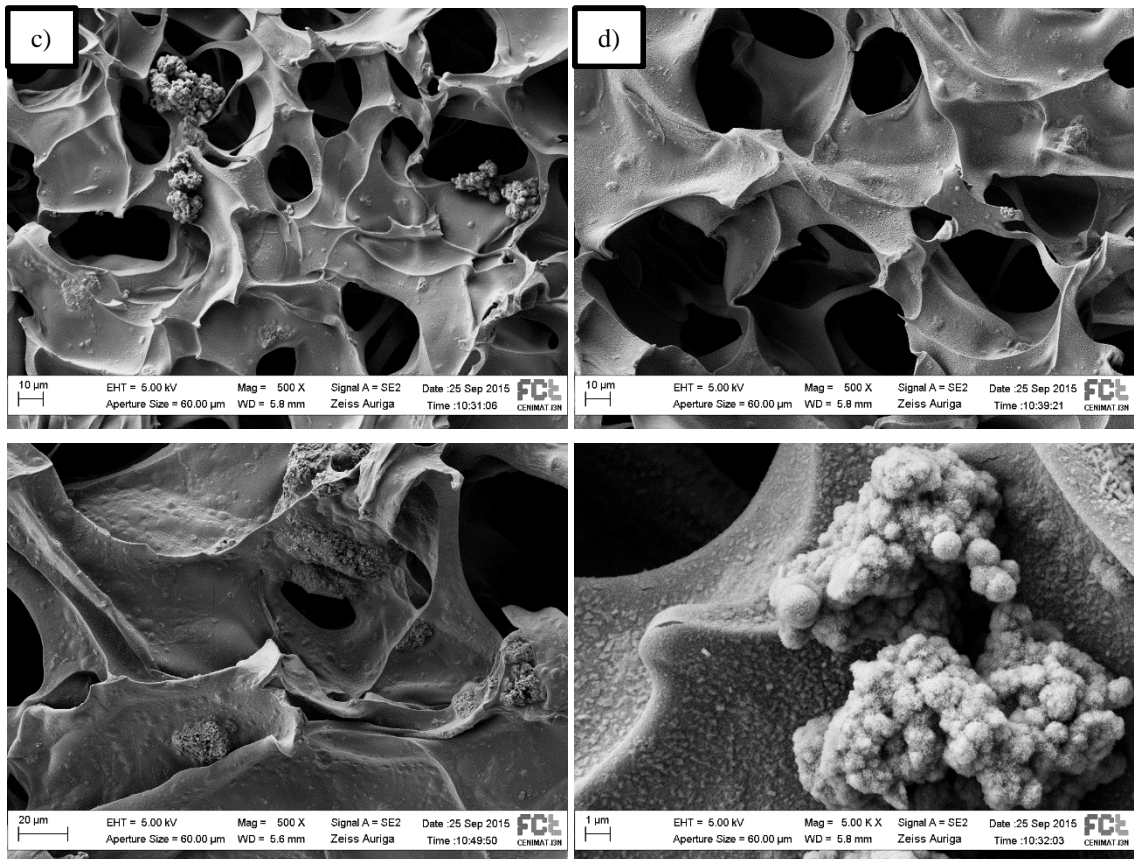


Figura 31 - Imagens SEM das amostras de 75CS-25HAp imersas 1 dia em SBF à temperatura de 37°C: a) sem polarização; b) com polarização positiva; c) com polarização negativa; d) cristais de sal e fosfatos de cálcio precipitados sobre a HAp das amostras;

Apesar da amostra de 75CS-25HAp sem polarização apresentar, para um tempo de incubação de 1 dia, uma maior deposição de fosfatos de cálcio sobre os seus cristais de HAp, ao fim de 7 dias a amostra que apresenta uma melhor evolução e crescimento destas estruturas é a amostra que foi sujeita a polarização negativa, apresentada na Figura 32a). Também é observável, pela Figura 32b), que ao fim de 7 dias imersas em SBF, as amostras apresentam a deposição de uma ligeira camada apatítica por toda a sua estrutura.

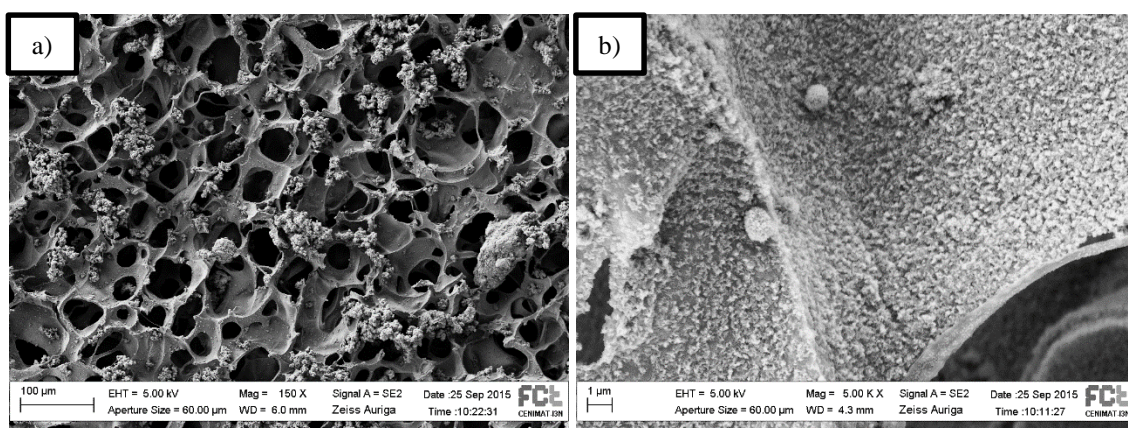


Figura 32 - Amostra de 75CS-25HAp imersa 7 dias em SBF à temperatura de 37°C: **a)** com polarização negativa; **b)** camada de fosfatos de cálcio formada por toda a amostra;

Foi ainda feita um análise elemental por EDS, nas superfícies das amostra imersas durante 1 dia em SBF para confirmar a presença de fosfatos de cálcio na sua estrutura. Através da Figura 33 e dos espectros 16 e 17 pode-se observar a presença de Ca e P em toda a estrutura das amostras com uma maior intensidade destes elementos sobre a zona relativa aos precipitados. Através destas análises, calculou-se a razão atômica entre estes dois elementos para as amostras de CS e 75CS-25HAp. Nas amostras sem polarização, a razão Ca/P dos fosfatos de cálcio, varia entre 1,80-1,82 aumentando nas amostras polarizadas positivamente, 2,22-1,83, sendo que as amostras polarizadas negativamente são as que apresentam valores mais baixos da mesma 1,72-1,54, verificando assim a deposição preferencial de estruturas ricas em cálcio.

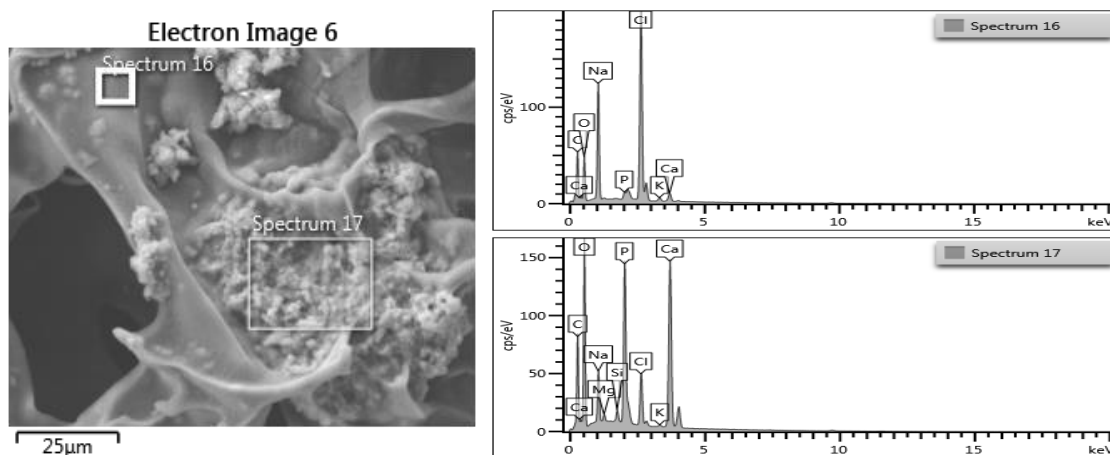


Figura 33 - Imagem SEM de uma amostra de 75CS-25HAp, imersa 1 dia em SBF à temperatura de 37°C e respectivos espectros EDS

Conclusões e perspectivas futuras

O processo de osteointegração é um processo muito complexo sendo por isso afectado por vários factores sendo um deles a polarização dos materiais implantados. Este trabalho teve como principal objectivo estudar a bioactividade e a cultura celular de matrizes porosas de CS e CS/HAp com e sem a influência de polarização eléctrica.

Inicialmente produziram-se nano-bastonetes de HAp, a partir de pós comerciais micrométricos de HAp, por um processo de precipitação química. Estes foram liofilizados e analisados em SEM, verificando assim a sua morfologia em forma de bastões com um comprimento próximo de 100 nm e largura entre 10-20 nm. Estes pós foram caracterizados em análises de XRD e FTIR. Da análise de XRD observa-se que os nano-bastonetes produzidos mantiveram a sua estrutura cristalina e não houve aparecimento de fases secundárias durante o seu processo de fabrico. Da análise de FTIR constata-se a formação de estruturas apatíticas com bandas características entre os 1100 cm^{-1} e 900 cm^{-1} tal como a ligeira presença de iões CO_2^{3-} na sua estrutura.

As matrizes de CS e CS/HAp foram produzidas pela técnica de liofilização e analisadas em SEM onde foi possível confirmar a produção de matrizes com alto índice de porosidade e a distribuição homogénea dos nano-bastonetes por toda a matriz. As técnicas de XRD e FTIR serviram para investigar a estrutura das matrizes produzidas verificando assim o aumento dos picos característicos da HAp à medida que a sua concentração aumenta nas amostras. A porosidade das matrizes foi calculada por Porosimetria de Mercúrio onde se confirmaram porosidades acima de 90%. Pela técnica de DSC-TGA é possível notar-se que as amostras de CS não se encontram totalmente secas, contendo água na sua estrutura proveniente do seu processo de produção ou tempo de armazenamento e que as amostras apresentam restos de ácido acético na sua composição.

O mesmo se pode concluir da caracterização eléctrica e dieléctrica das amostras constatando-se que as matrizes tem uma certa facilidade de incorporar água na sua estrutura. Da sua análise de DRS verifica-se que a σ_{ac} aumenta com o aumento da frequência e da temperatura tendo um pico onde estes valores são máximos. À medida que a concentração de HAp aumenta nas amostras, menores são os valores da sua σ_{ac} . Para ϵ' e ϵ'' estes aumentam com a diminuição da frequência e com o aumento da temperatura sendo por isso perceptível um mecanismo de polarização nas amostras. Tal como na σ_{ac} , estes valores diminuem à medida que a concentração de HAp aumenta nas amostras.

Dos ensaios de TSDC é possível observar que o CS sem polarização apresenta um pico entre os 150-160 °C proveniente da libertação de algum tipo de mecanismo no polímero a esta temperatura e que a adição de HAp faz desaparecer esse mesmo mecanismo. Ainda é possível verificar que para as condições estudadas as amostras de CS polarizadas positivamente apresentam um pico relativo à polarização sendo visível o deslocamento deste pico para temperaturas superiores nas amostras de 75CS-HAp polarizadas positivamente. As amostras de CS são as que apresentam uma maior densidade de carga em módulo e as que apresentam

menores picos relativos a incorporação de água. Para ambas as composições, a amostra sem polarização é a que apresenta uma maior energia de activação, E_a . O tempo de relaxação, τ , é superior nas amostras de 75CS-25HAp e verifica-se que quanto maior o valor da E_a , menor este será. Os tempos de relaxação médio das amostras estão compreendidos entre os 6 e 15 minutos, valores comuns para materiais poliméricos, o que significa que para estas condições as amostras mantêm a sua polarização durante curtos períodos de tempo. Porém existem certas cargas nas amostras, embora uma minoria, onde τ é muito superior visto que pelo estudo de decaimento de cargas, as amostras apresentam uma carga residual ao fim de 7 dias e visto ser susceptível o efeito das polarizações durante as culturas celulares *in vitro* e durante o SBF.

Nos ensaios de culturas celulares, verificam-se que as taxas de adesão e proliferação das células são mais elevadas nas amostras de 75CS-25HAp destacando as amostras polarizadas negativamente que apresentam melhores valores para ambas as taxas.

Por fim, após os ensaios de bioactividade em SBF 1.5x, foi possível observar no SEM a morfologia da superfície das amostras observando que ao fim de 7 dias imersas em SBF e a uma temperatura de 37°C, existe precipitação de fosfatos de cálcio nas amostras de CS sendo que nas amostras de 75CS-25HAp essa precipitação dá-se ao fim de 1 dia de incubação. É ainda observável que ao fim de 7 dias as amostras de CS não polarizadas são as que apresentam maior concentração de fosfatos sendo que nas amostras de 75CS-25HAp são as polarizadas negativamente. Nas amostras de 75CS-25HAp é verificável que existe uma precipitação preferencial de fosfatos sobre a HAp já existente e que ao fim de 7 dias há uma ligeira camada apatítica que cobre toda a superfície do compósito. Atráves da técnica de EDS confirmou-se a formação de CaP, preferencialmente, com razões atómicas Ca/P superiores aos da HAp.

Atráves deste trabalho foi possível demonstrar a biocompatibilidade de matrizes porosas de CS e CS/HAp tal como verificar melhorias significativas na sua bioactividade quando sujeitas a polarização eléctrica. Estes materiais demonstraram assim ser promissores para aplicações futuras. Porém ainda existe uma grande necessidade de optimização de vários aspectos, o que seria interessante:

- Melhorar o processo de produção das amostras de maneira a estas apresentarem uma maior homogeneidade e uma menor variabilidade.
- Aplicar algum tratamento superficial na HAp de modo a que a coesão entre o CS e HAp aumente, possibilitando a produção e caracterização de matrizes com uma %HAp ≥ 50 .
- Estudar as propriedades mecânicas em regime de compressão, das matrizes secas e húmidas.
- Analisar por DCS e TSDC amostras de CS, neutralizadas em etanol e liofilizadas, de modo a perceber a influência do ácido acético na sua estrutura.
- Aumentar o campo eléctrico de polarização para as amostras de CS/HAp.
- Aumentar o número de réplicas das amostras nos ensaios de cultura celular *in vitro* de maneira a minimizar o erro associado e prolongar os tempos de incubação.
- Estudar por micrografia confocal a proliferação das células nas amostras.

APÊNDICE A: Técnicas de Caracterização

Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM-EDS)

A microscopia electrónica é o ramo da microscopia que recorre a interacções entre um feixe de electrões altamente energético e uma amostra de modo a extrair informações morfológicas do material em estudo. Mediante a utilização da técnica de microscopia electrónica de varrimento, é possível observar e caracterizar materiais heterogéneos orgânicos ou inorgânicos à escala nano (nm) ou micrométrica (μm), devido à sua grande profundidade de campo. Esta é uma técnica que apresenta um poder de ampliação de 10 a 1.000.000 vezes com resoluções acima dos 5Å. O seu princípio de funcionamento baseia-se na incidência de um feixe de electrões altamente acelerados que interagem com a matéria da amostra gerando um conjunto de sinais, captados por vários detectores incorporados no microscópio. Os electrões de maior relevância para a formação da imagem são os electrões secundários e os retrodifundidos, uma vez que actuam nas superfícies das amostras. As energias envolvidas neste processo andam na casa dos 1-100keV e a intensidades da sua emissão varia consoante a amostra. Amostras que apresentam na sua estrutura electrões fortemente ligados, como o caso dos polímeros, cerâmicos e componentes orgânicos, requerem uma metalização prévia sobre a amostra, por um material condutor. Para a determinação da análise química elementar da amostra, análise EDS, utiliza-se um detector de raios-X capaz de obter a composição da amostra numa determinada zona micrométrica [52].

Difracção de Raios-x (XRD)

A difracção de raios-X é uma técnica que permite obter informação sobre a microestrutura de um determinado material fazendo incidir um feixe de raios-X no material, causando assim interferências construtivas responsáveis pelo padrão de difracção característico que surge quando o sólido cristalino é irradiado. Uma vez que os comprimentos de onda dos raios-X são aproximadamente iguais às distâncias entre os planos atômicos dos sólidos cristalinos, quando um feixe de raios-X colide com um sólido cristalino, produzem-se picos reforçados de radiação, de diversas intensidades. A intensidade desses picos é obtida pela aplicação da lei de Bragg, $n\lambda=2d\text{sen}\theta$, que relaciona a distância entre os planos cristalográficos, d , o comprimento de onda dos raios-x incidentes, λ , com o ângulo de difracção dos planos cristalográficos, θ . Existindo uma relação entre o ângulo de incidência, θ , e a distância, d , entre os planos e o comprimento de onda, λ , dos raios-X incidentes, as reflexões reforçam-se umas às outras, dizendo-se que as reflexões estão em fase. Porém, se o ângulo θ não satisfaz a condição para que as diferentes reflexões estejam em fase, estas interferem umas com as outras e o feixe é fraco ou nulo. Os planos de difracção, assim como as suas respectivas distâncias interplanares, densidades dos átomos ao longo de cada plano cristalino e o padrão de difracção por ela gerado, são características específicas e únicas de cada substância cristalina [53].

Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR é uma das principais técnicas de caracterização química, sendo bastante útil na identificação de grupos funcionais e de compostos químicos orgânicos ou inorgânicos no estado sólido, líquido ou gasoso, podendo ser utilizada para quantificar componentes de misturas desconhecidas. Da utilização desta técnica resultam espectros, característicos de cada composto, que permitem deduzir a composição da amostra em questão a partir das ligações presentes ou através da comparação do espectro obtido com um de referência.

Os espectros de FTIR são obtidos por absorção da radiação infravermelha. Esta absorção de radiação causa alterações no estado vibracional das ligações covalentes entre os átomos, ou moléculas, e, deste modo, quando a frequência da radiação incidente é próxima de uma frequência natural de vibração da rede, ocorre a absorção da energia e o aumento da amplitude de vibração das ligações covalentes entre os átomos e grupos de átomos. Atendendo à mecânica quântica, estas frequências correspondem ao estado fundamental (estado de menor frequência) e a vários estados excitados (estados com frequências mais elevadas). Assim, a absorção da radiação ocorre apenas em determinadas regiões do espectro que dependem de factores como o tipo de ligações presentes, átomos envolvidos e o próprio modo de vibração. De um modo geral, os modos de vibração podem ser divididos em dois grandes tipos: estiramento, que envolve mudanças na distância de ligação e, conseqüentemente, na distância interatômica, e deformação angular, que envolve mudanças no ângulo da ligação ou na posição relativa dos átomos na molécula [54].

A aquisição do espectro de FTIR pode ser feita no modo de transmissão, detectando a irradiância que atravessa a amostra, ou no modo de absorção, medindo a irradiância absorvida pela amostra.

Análise Diferencial Calorimétrica e Termogravimetria (DCS-TGA)

A análise por DCS é uma técnica que mede a diferença de calor necessária para elevar a temperatura de uma amostra referencial e da amostra que se quer analisar. Ambas as amostras são mantidas à mesma temperatura ao longo do processo e aquecidas a uma taxa de aquecimento constante numa atmosfera controlada. O princípio fundamental subjacente a esta técnica é que, ao sofrer uma transformação física, tal como uma transição de fase, a amostra irá precisar de um maior ou menor fluxo de calor para manter-se à mesma temperatura que a nossa referência. Essa diferença de fluxos irá indicar a presença de um processo endotérmico ou exotérmico na amostra, a uma determinada temperatura [55]. Por exemplo, na transição de fase de um sólido para um líquido mais energia terá de ser fornecida a amostra para esta manter-se à mesma temperatura indicado assim pela presença de um pico endotérmico no gráfico. Para além de transições de fase é possível ainda observar as transições vítreas de um material e calcular o seu grau de pureza. Acoplando uma balança a este sistema pode-se ainda verificar a variação de massa da amostra à medida que a temperatura aumenta indicando assim factores como a decomposição da amostra, oxidação ou a presença de compostos voláteis.

Porosimetria de Mercúrio

A porosimetria de mercúrio é uma técnica que permite obter a porosidade de amostras porosas. As amostras são colocadas num dilatómetro onde são desgaseificadas por acção de vácuo. O dilatómetro é preenchido com mercúrio e transferido para o porosímetro, onde ocorre o aumento gradual da pressão e a intrusão do mercúrio nas amostras. O volume de intrusão é registado e os valores de pressão são convertidos em valores de diâmetro de poros equivalentes, baseado-se na equação de Washburn, onde por sua vez é calculada a porosidade da amostra. Todos os parâmetros são calculados pelo software do equipamento [56].

Espectroscopia de Relaxação Dielétrica (DRS)

A espectroscopia de relaxação dielétrica é uma técnica que permite a medição da condutividade ac e da permissividade dielétrica em função da temperatura e da frequência pela actuação de um campo eléctrico variável ao longo do tempo numa amostra. Esta pode ser aplicada em todos os materiais isolantes e semicondutores numa gama de frequências que se estende ao longo de quase 18 ordens de grandeza, entre os 10^{-3} Hz e os 10^{15} Hz, Esta é uma técnica sensível a espécies dipolares na amostra tal como a cargas localizadas do material capaz de determinar a sua força, cinética e interacções. Esta técnica apresenta uma grande contribuição na caracterização eléctrica e propriedades dielétricas de materiais não condutores ou semi-condutores e distingue-se das outras técnicas espectroscópicas, por ser especialmente sensível a interacções intermoleculares [57].

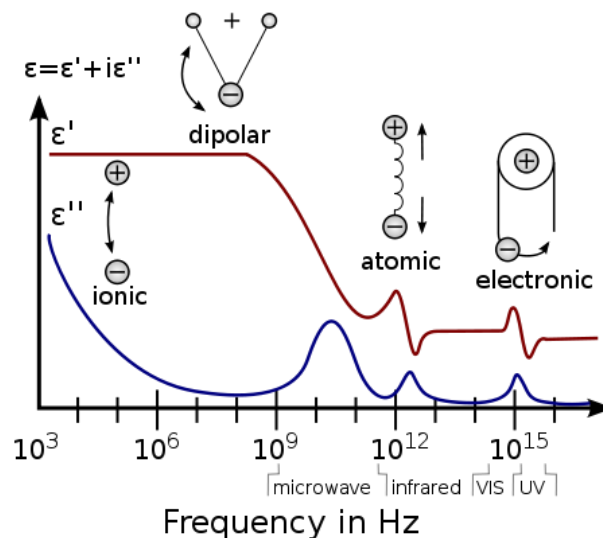


Figura 34 - Processos dinâmicos possíveis de ser observados num espectro DRS de ϵ' e ϵ'' em função da frequência

Análise de Correntes Termoestimuladas (TSDC)

A técnica de TSDC utiliza a mobilidade molecular como sonda de medição, sendo particularmente adequada para materiais com carácter polar num intervalo de temperaturas variável entre 15-600 K e campos eléctricos de intensidade entre 10^1 - 10^4 V/mm. Esta técnica consiste na polarização uniforme da amostra pela aplicação de um campo eléctrico, E_p , a uma temperatura constante de polarização, T_p , durante um período de tempo, t_p , suficientemente grande para permitir que as diferentes unidades móveis do material se orientem sob a acção do campo eléctrico dc. A configuração de polarização é então “congelada” devido a uma diminuição rápida na temperatura, para uma temperatura T_0 baixa o suficiente, de modo a que a mobilidade molecular possa ser considerada nula. À temperatura T_0 o campo é desligado e a amostra é curto-circuitada durante um período de tempo t_0 , para que se possa eliminar a carga espacial de rápida relaxação e estabilizar a amostra a esta temperatura. Por último, durante o aquecimento a uma taxa de aquecimento constante, β , o retorno ao equilíbrio das entidades previamente orientadas gera uma corrente de despolarização, I_d , que é registada, em função da temperatura, com um electrómetro de elevada sensibilidade [58].

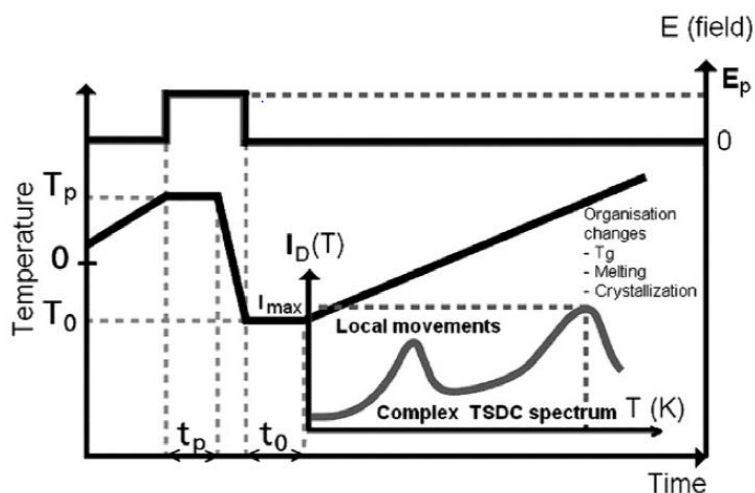


Figura 35 - Esquema de um ensaio de TSDC [58]

Os fenómenos observados num espectro de TSDC, Figura 34, ocorrem devido à sensibilidade da orientação molecular, fragmentos ou dipolos ligados, e cargas livres (prótons, iões e electrões) ao campo electromagnético ou electrostático externo. Isto é, a orientação de um sistema de dipolos e distribuição de cargas é caracterizada por determinadas “memórias” estruturais e espaciais específicas para o material estudado. Características dessa memória estão relacionadas com a dependência do tempo/temperatura de relaxação dos dipolos (cargas ligadas que causam relaxação dipolar), carga espacial e cargas livres (iões, prótons e electrões) que fornecem relaxações de corrente dc assim como relaxação da carga relacionada com o mecanismo de Maxwell-Wagner-Sillars (MWS) associado à polarização na interface [59].

A partir dos espectros de TSDC calculou-se a carga de polarização, Qp , inerente aos diferentes processos de polarização, utilizando-se para tal a equação

$$Qp = \frac{1}{\beta} \int_{T_i}^{T_f} J(T) dT \quad \text{Equação I}$$

sendo $J(T)$ a densidade de corrente, medida à temperatura T , e β a taxa de aquecimento. Analisando a Tabela 4 verifica-se que com o aumento da intensidade do campo aplicado aumenta a carga de polarização, Qp , e a densidade de corrente máxima, J_{max} .

Sabe-se que a polarização induzida por um campo eléctrico DC diminui após a remoção do mesmo, sendo a carga de polarização (P) descrita como função do tempo t pela expressão:

$$\frac{dP(t)}{dt} = -\frac{P(t)}{\tau(T)} \xrightarrow{R = dT/dt} \frac{dP(T)}{dT} = -\frac{P(T)}{\beta\tau(T)} \quad \text{Equação II}$$

Deste modo, a carga de polarização residual à temperatura T pode ser expressa como:

$$P(T) = \frac{1}{\beta} \int_T^{\infty} J(T) dT \quad \text{Equação III}$$

Partindo das equações II, III e $J(T) = -\beta dP(T)/dT$, $\tau(T)$ pode ser representado por:

$$\tau(T) = \frac{1}{\beta J(T)} \int_T^{\infty} J(T) dT \quad \text{Equação IV}$$

Assumindo que o tempo de relaxação, τ , pode ser descrito pela Lei de Arrhenius:

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{Ea}{RT}\right) \quad \text{Equação V}$$

onde τ_0 é o factor pré-exponencial, Ea a energia de activação e k a constante de Boltzmann, combinando a equação IV com a equação V resulta:

$$\frac{Ea}{RT} + \ln \tau_0 = \ln\left[\frac{1}{\beta} \int_T^{\infty} J(T) dT\right] - \ln J(T) \quad \text{Equação VI}$$

Da equação VI verifica-se que a energia de activação, Ea , pode ser obtida pelo declive da recta de regressão linear do gráfico obtido fazendo o termo do lado direito da equação VI *versus* $1/T$, sendo τ_0 calculado a partir da ordenada na origem desta mesma recta de regressão linear.

APÊNDICE B: Procedimentos Experimentais

Polarização de matrizes de CS e CS/HAp

1ª Fase - Polarização

- Escolher a amostra e medir o seu diâmetro e espessura (e).
- Calcular a área (πr^2) e a tensão a aplicar ($V=E.e$)
- Abrir o Matlab e alterar o nome e as condições do programa para:

$$\beta = 2 \text{ }^\circ\text{C/min} \quad T_f / T_p = 130 \text{ }^\circ\text{C} \quad \text{Reset} = 130 \text{ }^\circ\text{C}$$

(Nota: não esquecer de gravar o programa)

- Colocar a amostra no setup, ligar o vácuo e iniciar o programa.
- Desligar o vácuo aos 100 °C.
- Aos 130 °C esperar 1 minuto e aplicar a tensão calculada.
- Ao fim de 5 minutos, medir o valor da corrente no electrómetro.
- Esperar 54 minutos até o programa parar de correr.
- Fazer o reset ao controlador ao aparecer o valor 20°C no mesmo.
- Colocar um frapé em volta do tubo do setup e aos 100 °C ligar a água.
- Aos 27 °C desliga-se a corrente e com a ajuda de uma pistola de ar, retira-se a água ao sistema.
- Esperar **1 hora** de intervalo para descarregar a amostra.

2ª Fase - Ensaio TSDC

- Abrir o Matlab e alterar o nome e as condições do programa para:

$$\beta = 2 \text{ }^\circ\text{C/min} \quad T_f / T_p = 190 \text{ }^\circ\text{C} \quad \text{Reset} = 0 \text{ }^\circ\text{C}$$

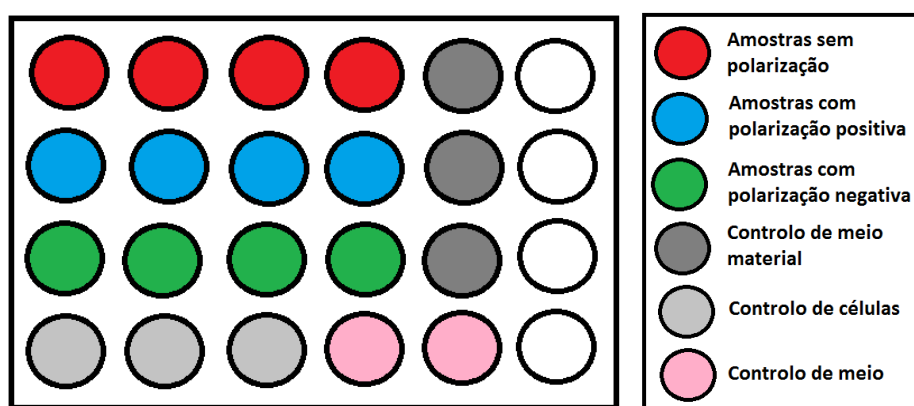
(Nota: não esquecer de gravar o programa)

- Iniciar o programa e ao surgir o valor 20 °C no controlador, fazer o reset ao mesmo.
- Colocar um frapé em volta do tubo do setup e aos 100 °C ligar a água.
- Aos 27 °C retira-se a água ao sistema, com a ajuda da pistola de ar.

Culturas Celulares

1º Dia – Esterilização dos materiais

- Colocar 5 pastilhas de cada composição (amostras + controlo de meio material) em frascos, devidamente identificados.
- Encher cada frasco com etanol até todas as pastilhas se encontrarem submersas
- Meter os frascos em vácuo durante 5 minutos.
- Lavar cada amostra com 1000 µl de PBS⁻, 2 vezes esperando 10 min entre lavagens.
- Lavar com 1000 µl de meio cada amostra, deixando 10 a 15 min na incubadora.
- Colocar 1000 µl de meio em cada poço de amostra e levar à incubadora.



2º Dia – Sementeira e contagem de células

- Remover o meio de cultura do frasco de cultura T25 com uma pipeta de Pasteur, inclinando o frasco e sem tocar na superfície onde se encontram as células.
- Lavar as células com 5 mL de PBS⁻ e deixar actuar alguns segundos, retirando-o de seguida.
- Colocar 500 µl de tripsina e colocar na incubadora por 5 minutos.
- Observar ao microscópio e verificar se as células estão em suspensão. Bater lateralmente no frasco para ajudar a soltar as células.
- Com uma pipeta colocar 5 ml de meio no T25. Aspirar e suspender várias vezes, para homogeneizar.
- Transferir estes 5 ml de meio para um falcon de 15 ml. Além disso, pode inverter-se o falcon para evitar aglomerados de células.
- Retirar 50 µl da suspensão de células e colocar num microtubo e com outra ponta adicionar mais 50 µl de azul tripano. Aspirar e suspender a solução no microtubo.
- Preparar o hemocitómetro (umedecer a lâmina do próprio hemocitómetro e colocar a lamela sobre a mesma).
- Encher as duas câmaras de contagem com a mistura preparada.

- Fazer a contagem das células. No mínimo temos de contar 100 células.
- Prepara-se a suspensão com base nos cálculos efectuados anteriormente e pipeta-se 1000 µl por cada poço (incluindo o controlo de células). Colocar a placa na incubadora.

3º Dia – Teste de Resazurina

- Preparar uma solução de meio com 10% de resazurina. Como tenho 20 (fundo do poço) + 15 (pastilhas) poços, preparo 36 mL de solução (3,6 mL de resazurina + 32,4 mL de meio).
- Colocar a solução num falcon de 50 ml. Em primeiro lugar, com a micropipeta de 100-1000 µl pipetar 4 x 900 µl de resazurina, depois com a pipeta de 10 ml, pipetar 4 x 8,1 ml de meio fresco.
- Mudar os materiais para uma placa de poços nova e dispersar 1000 µl de solução para cada poço.
- Aspirar com a pipeta de 1000 µl, sem tocar no fundo do poço, o meio existente na placa sem os materiais e dispersar 1000 µl da solução preparada para cada poço (usando pontas diferentes).
- Levar à incubadora as duas placas durante 3 horas.
- Após o tempo de incubação, pipetar 150 µl de cada poço (4 vezes) para a placa de 96 poços.
- Dar pancadas ligeiras na microplaca e furar as bolhas maiores com uma agulha.
- Fazer a leitura das absorvâncias no leitor de microplacas.
- Na placa que contém as amostras, aspirar o resto da resazurina (+/- linha a linha ou no máximo 2 a 2), lavar com 1000 µl de PBS++ 2 vezes e deixar uns minutos a actuar.
- Aspirar o PBS e adicionar 1000 µl de meio fresco.
- Manter a placa na incubadora.
- Repetir todo o processo do teste de resazurina mais 2 ou 3 vezes.

Factor de correcção

- x – quantidade de meio retido na amostra
- y – quantidade de resazurina na amostra (100 µl)
- z – quantidade de meio na amostra (900 µl)
- Ar – absorvância da resazurina (-4,69867)
- Am – absorvância do meio (0,2185)
- Acmm – absorvância do meio material
- Fc – factor de correcção

$$x = \frac{z * Am + y * Ar + (y + z) * Acmm}{Acmm - Am}$$

$$Fc = \frac{x + y + z}{y + z}$$

Ensaio de SBF 1.5x

1ª Parte - Preparação de 1L de solução

- Medir com a ajuda de uma proveta graduada 700 mL de água millipore para um copo de precipitação.
- Colocar um agitador magnético dentro do copo e pousar sob uma placa de agitação
- Ligar o medidor de pH e ter o cuidado de abrir a tampa antes de lavar a ponta do eléctrodo abundantemente com água.
- Inserir a ponta dentro do copo de precipitação e ligar a placa de agitação com uma velocidade de 100-300 rpm.
- Com a ajuda de uma pipeta ou uma espátula e um vidro de relógio medir/pesar os determinados reagentes, adicionando-os pela ordem descrita à solução:

1 - 9.8184 g de NaCl

2 - 3.4023 g de NaHCO₃

3 - 0.5591 g de KCl

4 - 0.2129 g de Na₂HPO₄

5 - 0.4574 g de MgCl₂.6H₂O

6 - 15 ml de 1M HCL

7 - 0.5822 g de CaCl₂.2H₂O

8 - 0.1080 g de Na₂SO₄

9 - 9.0945 g de Tris

(Nota: para reagentes hidratados, pesar em folha de alumínio de modo a evitar perdas)

- Adicionar com a ajuda de uma pipeta, 1M HCL à solução (aproximadamente 50 mL) até o pH desta ser próximo de 7,4.
- Passar a solução para um balão volumétrico e adicionar água millipore até perfazer 1L.
- Lavar abundantemente com água a ponta do eléctrodo e em seguida fechar a tampa.
- Arrumar o material e conservar a solução no frigorífico.

2ª Parte - Cálculo do volume de solução para cada amostra

- Calcular o volume de solução a usar para cada amostra através da fórmula:

$$0,1 \text{ cm}^{-1} = \frac{As}{V}$$

Onde: As – Área Superficial da amostra e V – Volume de solução

- Com uma proveta medir o volume de solução, colocar num frasco e em seguida colocar a amostra.
- Levar à estufa a 37°C durante vários períodos de tempo (ex: 1 hora, 6 horas,...).
- Congelar as amostras e liofilizar durante 24 horas.

APÊNDICE C: Tamanho de Partícula da HAp comercial

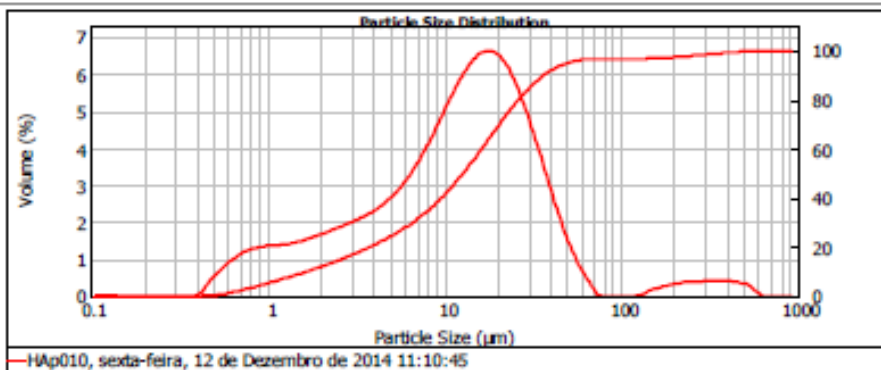


Result Analysis Report

Sample Name: HAp010
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: W7
Result Source: Measurement
Measured: sexta-feira, 12 de Dezembro de 2014 11:10:45
Analysed: sexta-feira, 12 de Dezembro de 2014 11:10:48

Particle Name: Tricalcium Phosphate	Accessory Name: Hydro 2000MU (A)	Analysis model: General purpose	Sensitivity: Normal
Particle RI: 1.627	Absorption: 0.1	Size range: 0.100 to 1000.000 um	Obscuration: 6.80 %
Dispersant Name: Water	Dispersant RI: 1.330	Weighted Residual: 0.555 %	Result Emulation: Off
Concentration: 0.0042 %Vol	Span : 2.742	Uniformity: 1.51	Result units: Volume
Specific Surface Area: 1.3 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 4.627 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 24.866 um	

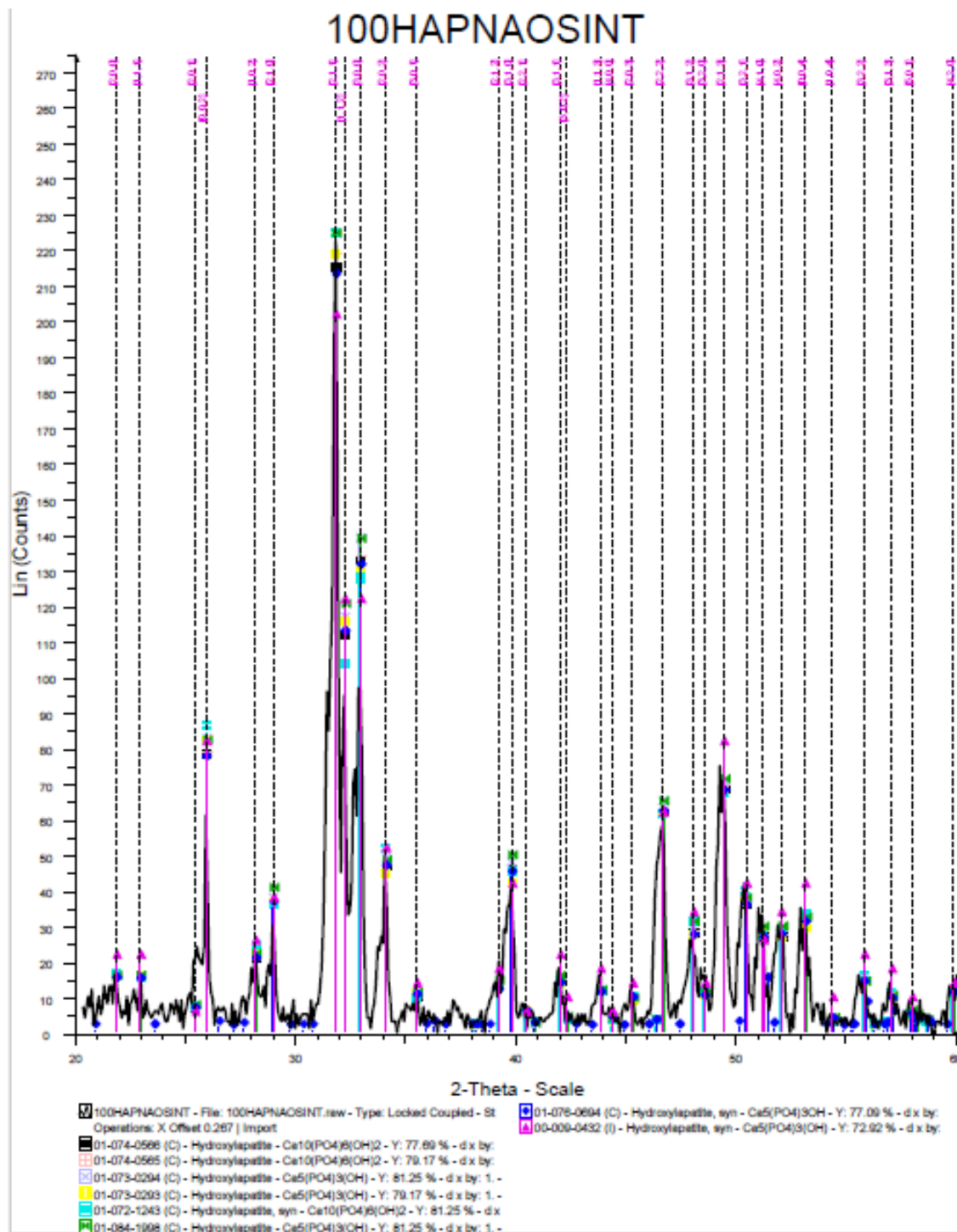
d(0.1): 1.658 um d(0.5): 12.747 um d(0.9): 36.612 um



Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)	Size (µm)	Volume (%)
0.075	0.00	0.106	0.00	1.396	1.25	11.462	5.30	100.226	0.00	1296.925	0.00
0.091	0.00	0.120	0.00	1.259	1.29	13.193	5.70	138.028	0.15	1446.440	0.00
0.073	0.00	0.138	0.00	1.446	1.36	15.136	5.95	158.469	0.23	1659.587	0.00
0.075	0.00	0.158	0.00	1.690	1.40	17.279	5.98	181.870	0.29	1935.401	0.00
0.071	0.00	0.182	0.00	1.995	1.50	19.963	5.78	208.900	0.33	2187.792	0.00
0.070	0.00	0.209	0.00	2.198	1.60	22.909	5.34	238.983	0.35	2511.886	0.00
0.070	0.00	0.240	0.00	2.612	1.70	26.303	4.70	275.423	0.36	2894.022	0.00
0.076	0.00	0.275	0.00	2.894	1.84	30.200	3.91	316.228	0.38	3311.211	0.00
0.070	0.00	0.316	0.00	3.211	1.96	34.674	3.06	363.078	0.38	3821.894	0.00
0.076	0.00	0.360	0.00	3.602	2.11	39.811	2.22	416.869	0.35	4385.158	0.00
0.070	0.00	0.417	0.24	4.085	2.30	45.759	1.47	478.620	0.30	5011.872	0.00
0.076	0.00	0.479	0.54	5.012	2.65	52.481	0.86	546.541	0.28	5754.288	0.00
0.070	0.00	0.550	0.80	5.754	2.95	60.256	0.41	620.967	0.28	6606.624	0.00
0.070	0.00	0.625	0.96	6.607	3.27	69.183	0.04	704.406	0.28	7580.775	0.00
0.070	0.00	0.724	1.13	7.586	3.74	79.433	0.00	821.754	0.28	8709.028	0.00
0.070	0.00	0.832	1.20	8.710	4.26	91.201	0.00	964.980	0.28	10000.000	0.00
0.070	0.00	0.960	1.23	10.000	4.80	104.713	0.00	1096.478	0.28		
0.100	0.00	1.096	1.23	11.482	4.80	120.226	0.00				

Operator notes:

APÊNDICE D: Difractograma da HAp – Fichas auxiliares



84-1998

Wavelength= 1.54060

C

Ca5(PO4)3(OH)		d(A)				Int				h k l			
Calcium Phosphate Hydroxide													
		5.1560	171	1	0	0	1.9422	285	2	2	2	2	2
		5.2581	47	1	0	1	1.8894	131	3	1	2		
		4.7080	24	1	1	0	1.8700	41	3	2	0		
		4.0775	83	2	0	0	1.8389	511	1	2	3		
		3.8845	83	1	1	1	1.8052	161	3	2	1		
		3.5070	28	2	0	1	1.7795	125	4	1	0		
		3.4372	360	0	0	2	1.7535	125	4	0	2		
		3.1874	91	1	0	2	1.7535	3	0	3			
		3.0620	174	1	2	0	1.7100	137	0	0	4		
		2.8125	969*	1	2	1	1.6818	10	1	0	4		
		2.7791	532	1	1	2	1.6432	56	2	3	2		
		2.7183	614	3	0	0	1.6432	56	2	2	3		
		2.6290	209	2	0	2	1.6310	1	5	0	0		
		2.5278	42	3	0	1	1.6297	36	1	3	3		
		2.3541	2	2	2	0	1.5869	19	5	0	1		
		2.2947	57	1	2	2	1.5837	13	2	0	4		
		2.2617	215	3	1	0	1.5803	14	1	4	2		
		2.2271	18	2	2	1	1.5694	7	3	3	0		
		2.2090	3	1	0	3	1.5411	42	4	2	0		
		2.1486	83	3	1	1	1.5300	34	3	3	1		
		2.1321	11	3	0	2	1.5033	32	4	2	1		
		2.0634	45	1	1	3	1.5010	48	2	1	4		
		2.0387	10	4	0	0	1.4735	82	5	0	2		
		1.9978	35	2	0	3	1.4848	18	1	5	0		
		1.9546	8	4	0	1	1.4529	74	3	0	4		
Peak height intensity. Specimen from Holly Springs, GA, USA. R-factor: 0.018. POC: 1P44. Structural reference: Hughes, J.M., Cameron, M., Crowley, K.D., Am. Mineral., 74, 870 (1989). Wvt: 502.32. Volume(CD): 527.91.													

d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
1.4482	94	2	3	3	1.1132		1	1	6
1.4325	72	1	5	1	1.1079	25	3	2	5
1.4082	25	2	4	2	1.1033	62	5	3	2
1.4052	25	1	4	3	1.0930	1	6	1	3
1.3830	1	2	2	4					
1.3694	3	1	3	4					
1.3591	2	6	0	0					
1.3557	1	1	0	5					
1.3474	20	1	5	2					
1.3406	5	3	4	0					
1.3287	1	5	0	3					
1.3197	4	1	1	5					
1.3158	39	3	4	1					
1.3058	34	2	5	0					
1.3028	20	2	0	5					
1.2948	3	3	3	3					
1.2829	21	2	5	1					
1.2798	39	4	2	3					
1.2656	14	3	2	4					
1.2639	11	6	0	2					
1.2556	45	1	2	5					
1.2490	31	4	3	2					
1.2436	19	1	6	0					
1.2382	49	4	1	4					
1.2341	41	1	5	3					
1.2289	2	3	0	5					
1.2237	9	6	1	1					
1.2207	61	5	2	2					
1.1872	2	2	2	5					
1.1830	5	5	0	4					
1.1770	17	4	4	0					
1.1748	11	3	1	5					
1.1694	6	6	1	2					
1.1694	6	6	0	3					
1.1650	7	5	3	0					
1.1631	11	4	4	1					
1.1609	11	3	3	4					
1.1671	36	3	4	3					
1.1473	22	4	2	4					
1.1457	16	0	0	6					
1.1399	2	4	0	5					
1.1345	21	2	5	3					
1.1147	24	1	5	4					
1.1132	38	4	4	2					

© 2001 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.
 PCPDFWIN v. 2.2

Referências bibliográficas

- [1] S. Weiner and H. D. Wagner, "THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations," *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 271–298, 1998.
- [2] A. D. S. Afonso, "Interação entre Biomateriais e Tecido Ósseo," p. 213, 1998.
- [3] M. Vallet-Regí and J. M. González-Calbet, "Calcium phosphates as substitution of bone tissues," *Prog. Solid State Chem.*, vol. 32, no. 1–2, pp. 1–31, 2004.
- [4] J. E. Aubin and J. T. Triffitt, *Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation*. 2002.
- [5] A. Ficai, E. Andronescu, V. Trandafir, C. Ghitulica, and G. Voicu, "Collagen/hydroxyapatite composite obtained by electric field orientation," *Mater. Lett.*, vol. 64, no. 4, pp. 541–544, 2010.
- [6] T. Lemaire, E. Capiez-Lernout, J. Kaiser, S. Naili, E. Rohan, and V. Sansalone, "A Multiscale Theoretical Investigation of Electric Measurements in Living Bone," *Bull. Math. Biol.*, vol. 73, no. 11, pp. 2649–2677, Nov. 2011.
- [7] Y. Zhang, A. Gandhi, J. Zeglinski, M. Gregor, and S. Tofail, "A complementary contribution to piezoelectricity from bone constituents," *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, vol. 19, no. 4, pp. 1151–1157, 2012.
- [8] D. F. Williams, "Biomaterials On the nature of biomaterials q," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897–5909, 2009.
- [9] A. J. Mieszawska, N. Fournalis, I. Georgakoudi, N. M. Ouhib, D. J. Belton, C. C. Perry, and D. L. Kaplan, "Biomaterials Osteoinductive silk e silica composite biomaterials for bone regeneration," *Biomaterials*, vol. 31, no. 34, pp. 8902–8910, 2010.
- [10] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, Eds., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed. San Diego: Elsevier, Academic Press, 2004.
- [11] P. K. Dutta, J. Dutta, and V. S. Tripathi, "Chitin and chitosan : Chemistry , properties and applications," vol. 63, no. January, pp. 20–31, 2004.
- [12] C. Chatelet, O. Damour, and A. Domard, "Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films," *Biomaterials*, vol. 22, no. 3, pp. 261–268, 2001.
- [13] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, Jul. 2006.
- [14] A. Anitha, S. Sowmya, P. T. S. Kumar, S. Deepthi, K. P. Chennazhi, H. Ehrlich, M. Tsurkan, and R. Jayakumar, "Chitin and chitosan in selected biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 9, pp. 1644–1667, 2014.

- [15] N. K. Nga, L. T. Giang, T. Q. Huy, P. H. Viet, and C. Migliaresi, "Surfactant-assisted size control of hydroxyapatite nanorods for bone tissue engineering," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 116, pp. 666–673, 2014.
- [16] J. Liu, X. Ye, H. Wang, M. Zhu, B. Wang, and H. Yan, "The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method," *Ceram. Int.*, vol. 29, no. 6, pp. 629–633, Jan. 2003.
- [17] E. S. Kovaleva, M. P. Shabanov, V. I. Putlayev, Y. Y. Filippov, Y. D. Tretyakov, and V. K. Ivanov, "Carbonated hydroxyapatite nanopowders for preparation of bioresorbable materials," *Materwiss. Werksttech.*, vol. 39, no. 11, pp. 822–829, Nov. 2008.
- [18] D. Tadic, F. Peters, and M. Epple, "Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites," *Biomaterials*, vol. 23, no. 12, pp. 2553–2559, Jun. 2002.
- [19] H. Zhou and J. Lee, "Acta Biomaterialia Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 7, pp. 2769–2781, 2011.
- [20] M. R. Christoffersen, J. Dohrup, and J. Christoffersen, "Kinetics of growth and dissolution of calcium hydroxyapatite in suspensions with variable calcium to phosphate ratio," vol. 186, 1998.
- [21] N. Davidenko, R. G. Carrodegua, C. Peniche, Y. Solís, and R. E. Cameron, "Chitosan/apatite composite beads prepared by in situ generation of apatite or Si-apatite nanocrystals," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 2, pp. 466–476, 2010.
- [22] A. R. Boccaccini, "Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds," vol. 10, pp. 4433–4442, 2008.
- [23] X. Pu, Q. Yao, Y. Yang, Z. Sun, and Q. Zhang, "In vitro degradation of three-dimensional chitosan/apatite composite rods prepared via in situ precipitation," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 5, pp. 868–873, 2012.
- [24] R. E. Cameron and C. Peniche, "Preparation, characterization, and in vitro evaluation of nanostructured chitosan / apatite and chitosan / Si-doped apatite composites," pp. 841–849, 2013.
- [25] J. Zhang, J. Nie, Q. Zhang, Y. Li, Z. Wang, and Q. Hu, "Preparation and characterization of bionic bone structure chitosan/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering.," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 25, no. 1, pp. 61–74, 2014.
- [26] E. Fukada and I. Yasuda, "On the piezoelectric effect of bone," *J. Phys. Soc. Japan*, vol. 12, no. 10, pp. 1158–1162, 1957.
- [27] C. A. L. Bassett, "Biologic significance of piezoelectricity," *Calcif. Tissue Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 252–272, 1967.

- [28] A. Jalalian and A. M. Grishin, "Piezoelectricity and electrostriction in biocompatible (Na,K)NbO₃ nanofiber scaffolds," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 104, no. 24, p. 243701, 2014.
- [29] N. Wada, Y. Tanaka, M. Nakamura, K. Kanamura, and K. Yamashita, "Controlled crystallization of calcite under surface electric field due to polarized hydroxyapatite ceramics," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 92, no. 7, pp. 1586–1591, 2009.
- [30] N. Horiuchi, S. Nakaguki, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, a. Nagai, K. Katayama, and K. Yamashita, "Polarization-induced surface charges in hydroxyapatite ceramics," *J. Appl. Phys.*, vol. 116, no. 1, p. 014902, 2014.
- [31] S. F. Badylak, D. O. Freytes, and T. W. Gilbert, "Extracellular matrix as a biological scaffold material : Structure and function," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–13, 2009.
- [32] W. Wang, *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals*, vol. 203. 2000.
- [33] S. V. Madhally and H. W. T. Matthew, "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering," vol. 20, no. November 1998, pp. 1133–1142, 1999.
- [34] H. Chen, B. H. Clarkson, K. Sun, and J. F. Mansfield, "Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure," vol. 288, pp. 97–103, 2005.
- [35] S. Kunjalukkal, A. Balakrishnan, M. Chu, Y. Jin, T. Nam, and S. Cho, "Particucology Sol – gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods," vol. 7, pp. 466–470, 2009.
- [36] F. Chen, Z. Wang, and C. Lin, "Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite / chitosan nano-composite for use in biomedical materials," vol. 57, no. December, pp. 858–861, 2002.
- [37] Y. Liu, D. Hou, and G. Wang, "A simple wet chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 86, no. 1, pp. 69–73, Jul. 2004.
- [38] E. S. Costa-Júnior, E. F. Barbosa-Stancioli, a. a P. Mansur, W. L. Vasconcelos, and H. S. Mansur, "Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, no. 3, pp. 472–481, 2009.
- [39] M. T. Yen, J. H. Yang, and J. L. Mau, "Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells," *Carbohydr. Polym.*, vol. 75, no. 1, pp. 15–21, 2009.
- [40] S. Raynaud, E. Champion, and D. Bernache-Assollant, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering," *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1073–1080, 2002.
- [41] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, "Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy," in *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, InTech, 2012, pp. 123–148.

- [42] G. Lawrie, I. Keen, B. Drew, A. Chandler-Temple, L. Rintoul, P. Fredericks, and L. Grøndahl, "Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 8, pp. 2533–2541, 2007.
- [43] K. M. Gregorio-Jauregui, M. G. Pineda, J. E. Rivera-Salinas, G. Hurtado, H. Saade, J. L. Martinez, A. Ilyina, and R. G. López, "One-step method for preparation of magnetic nanoparticles coated with chitosan," *J. Nanomater.*, vol. 2012, 2012.
- [44] E. A. El-hefian, "Characterization of chitosan in acetic acid : Rheological," vol. 34, pp. 47–56, 2010.
- [45] L. S. Guinesi, "The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin / chitosan samples," vol. 444, pp. 128–133, 2006.
- [46] F. A. A. Tirkistani, "Thermal analysis of some chitosan Schiff bases c I-," vol. 3910, no. 97, pp. 67–70, 1998.
- [47] E. R. Dockal, "Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens," vol. 13, pp. 242–249, 2003.
- [48] M. A. Witt, G. M. O. Barra, J. R. Bertolino, and A. T. N. Pires, "Crosslinked Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blends with Proton Conductivity Characteristic," vol. 21, no. 9, pp. 1692–1698, 2010.
- [49] A. Schönhals and F. Kremer, *Broadband Dielectric Spectroscopy*. 2003.
- [50] M. C. Lança, M. Brandt, E. R. Neagu, C. J. Dias, and J. N. Marat-mendes, "Dielectric spectra of natural cork and derivatives," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 356, no. 11–17, pp. 763–767, 2010.
- [51] E. R. Neagu, "Thermally Stimulated Discharge Current: A Method to Study the Molecular Movements in Dielectric Materials," 2010.
- [52] Joseph Goldstein et al., *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists and Geologists*. 1992.
- [53] N. Suryanarayana et. al, *X-Ray Diffraction: A Practical Approach*. 1998.
- [54] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2011.
- [55] Günther Höhne, W. Hemminger, H.-J. Flammersheim, *Differential Scanning Calorimetry*. 2003.
- [56] H. Ma, "Mercury intrusion porosimetry in concrete technology: tips in measurement, pore structure parameter acquisition and application," *J. Porous Mater.*, vol. 21, no. 2, pp. 207–215, 2014.
- [57] P. Frubing, "Dielectric spectroscopy," no. 0331, pp. 1–21, 2001.

- [58] V. M. Gun'ko, V. I. Zarko, E. V. Goncharuk, L. S. Andriyko, V. V. Turov, Y. M. Nychiporuk, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zięba, a. L. Gabchak, V. D. Osovskii, Y. G. Ptushinskii, G. R. Yurchenko, O. a. Mishchuk, P. P. Gorbik, P. Pissis, and J. P. Blitz, "TSDC spectroscopy of relaxational and interfacial phenomena," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 131, no. 1–2, pp. 1–89, 2007.
- [59] A. Alegria, L. Goitiandia, and J. Colmenero, "On the interpretation of the TSDC results in the study of the β -relaxation of amorphous polymers," *Polymer (Guildf)*., vol. 37, no. 14, pp. 2915–2923, 1996.