

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
ENGENHARIA DE PROCESSOS**

**INFLUÊNCIA DE ALGINATO E QUITOSANA NA
PRECIPITAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO**

Autor: Daniel Oliveira de Lima

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Masumi Beppu

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Engenharia Química.

**Campinas – São Paulo
Abril de 2006**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNICAMP
L628i
Ed.
O BC/ 72702
16.145-07
 D
O 1100
2365407
411935

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

L629i
L628i
Lima, Daniel Oliveira de
Influência de alginato e quitosana na precipitação de
fosfatos de cálcio / Daniel Oliveira de Lima.--Campinas,
SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Marisa Masumi Beppu
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Alginatos. 3. Fosfato de cálcio. I.
Beppu, Marisa Masumi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Influence of alginate and chitosan on the precipitation of calcium
phosphates

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Alginate, Calcium phosphates

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Marcelo Henrique Prado da Silva e Cecília Almeida de Carvalho
Zavaglia

Data da defesa: 27/04/2006

Dissertação de Mestrado defendida por Daniel Oliveira de Lima e aprovada em 27 de abril de 2006 pela banca examinadora constituída pelos Doutores:


Dra. Marisa Masumi Beppu


Dr. Marcelo Henrique Prado da Silva


Dra. Cecília A. C. Zavaglia

2007 2007

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado defendida por Daniel Oliveira de Lima em 27 de abril de 2006



Prof. Dra. Marisa Masumi Beppu
(Orientadora)

Prof. Dra. Marisa Masumi Beppu

Prof. Dra. Marisa Masumi Beppu

*Dedico este trabalho àqueles que acreditam
que a ciência pode ser um instrumento de
transformação, quando aplicada pensando
no bem de nossos semelhantes.*

"The most learned philosopher [...] might dissect, anatomise, and give names; but, not to speak of a final cause, causes in their secondary and tertiary grades were utterly unknown to him."

- Frankenstein, Mary Shelley.

"A hierarquia científica deve ser estabelecida em função da criatividade e não dos títulos acadêmicos. Há doutos que não são doutores e há doutores que não são doutos."

- Zeferino Vaz.

*"May the road rise with you
May the wind be always at your back
May the sun shine warm upon your face
May the rain fall softly upon your fields
Until we meet again -
May God hold you in the palm of His
hand."*

- Prece Irlandesa

Agradecimentos

No dia em que defendi esse trabalho, me senti ao mesmo tempo muito alegre e muito triste. E a causa das duas era a mesma: sabia que havia terminado, que mais uma fase da minha vida havia chegado ao fim. Então, misturada à sensação de dever cumprido, havia a tristeza de deixar os amigos e a Unicamp, aos quais tanto me afeiçoei. Não chegaria onde estou hoje sem a ajuda de Deus e dessas ótimas pessoas, a quem devo tanto, e que agradeço agora.

À Ancelita, pelo seu amor irrestrito, sua amizade e inspiração;

À minha orientadora, Marisa Masumi Beppu, pela orientação, paciência e por sua ajuda e conselhos, nos bons e nos maus momentos;

Aos meus amigos (e colegas de laboratório nas horas vagas) Cassiano, Grínia (e um agradecimento especial ao caderno da Grínia, que tanto me ajudou nas disciplinas), Rodrigo, Gilberto, Rafael Gonçalves, Aline, Rafael Tiba, Marco, Emerson, Santizta (vulgo Leandro) e Paula; pela boa vontade e pelas risadas. E a eterna amizade.

À Professora Cecília Zavaglia, pelos conselhos e apoio;

Ao Professor Celso Bertran e Sergio Bertazzo, pelas valiosas sugestões e apoio nas análises de FTIR, Cálcio e Fósforo;

Ao Professor Marcelo Prado da Silva, do CBPF, pelos conselhos e apoio experimental;

À Solange (LUC-FEQ) e a Claudenete (FEM) por sua ajuda na difratometria e MEV/EDX;

Ao Professor Cléber Cândido da Silva (DEMM-UFC) e Prof. Lindberg Lima Gonçalves, por me cederem o Laboratório de Biomateriais e contribuir nas análises de MEV e DRX;

Ao pessoal do Laboratório de Biomateriais, Francieli, Suelena, Thauzer e Francisco Pinto.

Não falei que ia dar certo?

Ao Prof. Antônio Sérgio Bezerra Sombra (Física-UFC), Júlio Figueiro Góes (Física-UFC) e João Batista Araujo Silva Júnior, por terem gentilmente me cedido, espaço, equipamentos, e contribuído para as análises em MEV e FTIR.

Ao pessoal da Thundertoca, pelo abrigo (que chegou justo na hora da tempestade), Rafael Gonçalves, Guilherme, Gonçalves, Cassiano, Santizta (vulgarmente conhecido por Leandro), Danilo e Roberto.

Ao CNPq, pela ajuda financeira.

ABSTRACT

Natural systems are able to create organic-inorganic composites of remarkable properties. Bone, for instance, presents properties that are found both in ceramics and polymers. This effect is related to the organic matrix, which controls nucleation and growth of calcium phosphate crystals, besides composite's organization and architecture in nanometric levels. In order to achieve a better understanding of this process, precipitation of calcium phosphate was carried out in a medium which contained small amounts of alginate and chitosan, seeking to emulate the matrix effect. Calcium phosphates precipitates were obtained using two different concentrations of the biopolymer and one control sample. The experiments were divided in two groups, depending on the system's initial pH. In the first group, the starting pH was acid. However, part of the reaction medium was separated and had its pH adjusted to an alkaline range. In the second group, the initial pH was calculated in order to be in the range of hydroxyapatite stability. Characterization was accomplished by scanning electron microscopy, X-Ray diffraction and Fourier-transform infrared spectroscopy. The powders obtained in the first group were composed mainly by brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and its anhydrous phase, monetite, CaHPO_4 . In the first group of experiments with alginate, monetite concentration was related mainly to the reaction medium pH, suggesting that alginate-calcium interaction was strongly dependent on the formation of complexes among carboxyl radicals and calcium, which avoided water bonding. Chitosan-doped samples, on the other hand, seemed to be affected mainly by the biopolymer concentration. Chitosan and monetite concentration seemed to be inversely proportional. This is attributed to the ionotropic effect, which reduced auto-diffusion and consequently, calcium phosphate-chitosan interaction. These samples also possessed an apparent degree of orientation, supposedly due to a coherent growth of calcium phosphate crystals over heterogeneous nuclei. Alginate-doped samples obtained in the second group of experiments presented reduced crystallinity, which was related to reprecipitation of the crystals over biopolymers nuclei. Chitosan-doped samples, however, presented an increase in crystallinity. This may be attributed to a process of nucleation inside the gel, implying in crystalline growth controlled by sterical effects.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	1
1.1. O Tecido Ósseo	1
1.2. Tipos e Mecanismos de Calcificação nos Organismo	4
1.3. Compósitos Naturais	6
1.4. Biomimetismo	7
1.5. Motivação à Pesquisa / Estado da Arte	8
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS	13
2.1. Objetivos Gerais	13
2.2. Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Biomateriais	15
3.1.1. Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio	17
3.1.1.1. Processos de Obtenção de Fosfatos de Cálcio	20
3.2. Biopolímeros	22
3.2.1. Carboidratos	23
3.2.2. Alginato	24
3.2.3. Quitina e Quitosana	26
CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Reagentes	30
4.1.1. Fontes de Cálcio e Fósforo	30
4.1.2. Biopolímeros	31
4.2. Ensaio de Precipitação	33
4.2.1. Precipitação na Presença de Alginato	33
4.2.1.1. Precipitação de Fosfatos de Cálcio Dopados com Alginato	33
4.2.1.2. Precipitação no pH de Estabilidade da Hidroxiapatita	36
4.2.2. Precipitação na Presença de Quitosana	38
4.2.2.1. Precipitação de Fosfatos de Cálcio Dopados com Quitosana	38
4.2.2.2. Precipitação com Quitosana no pH de Estabilidade da Hidroxiapatita	39

4.3 . Tratamento Térmico	41
4.4. Caracterização	42
4.4.1. Difração de Raios-X	42
4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	43
4.4.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	44
4.4.4. Determinação do Grau de Desacetilação da Quitosana	44
4.4.5. Determinação da Presença de Alginato no Sobrenadante	45
4.4.5. Determinação de birrefringência das amostras precipitadas com quitosana	46
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Biopolímeros	47
5.1.1. Alginato	47
5.1.2. Quitosana	47
5.2. Influência do Alginato na Precipitação de Fosfatos de Cálcio	51
5.3. Influência da Quitosana na Precipitação de Fosfatos de Cálcio	64
5.4. Precipitação na Presença de Alginato e Quitosana no pH de Estabilidade da Hidroxiapatita.	71
5.5 Estudo da Composição de Fases após o Tratamento Térmico	89
CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO FINAL	95
6.1. Mecanismo de Ação do Alginatos	95
6.2 Mecanismo de Ação da Quitosana e Comparação com Ação do Alginato	97
CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	101
6.1. Conclusões	101
6.2 Sugestões de Trabalhos Futuros	104
CAPÍTULO 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O corpo humano é um dos maiores mistérios da natureza. A importância em compreendê-lo é incontestável, mas a tarefa não é das mais simples, pois o mesmo é formado por um conjunto extenso de sistemas, dos mais variados tamanhos e tipos, que interagem de forma altamente complexa e que, entretanto, resultam em um grande sistema final que chama a atenção por sua simetria, harmonia e equilíbrio dinâmico. Infelizmente, este sistema também está exposto a uma grande quantidade de problemas.

Por exemplo, o ser humano está sujeito a acidentes ou doenças que podem, muitas vezes, afetar órgãos ou tecidos do corpo e, para não afetar o perfeito funcionamento do todo, precisam ser parcial ou totalmente substituídos. Tal fato acarreta transtornos que diminuem a qualidade de vida das pessoas, em um plano físico e psicológico. Surge então, a necessidade de substituir as partes perdidas e minimizar o impacto.

Esta substituição deve ser feita levando-se em conta as particularidades do tecido atingido, tais como: tipo do tecido, carga suportada, meio no qual está imerso, toxicidade local e sistêmica, etc. [1,2]. Por exemplo, enquanto um polímero que incentivasse a calcificação seria de grande utilidade em tecidos ósseos, sua aplicação no sistema cardiovascular seria negativa, pois levaria a calcificação de vasos e a posterior formação de trombos [2]. Esse tipo de necessidade levou à criação da Engenharia Biomédica, uma ciência que incorpora tecnologia e medicina, de forma que o melhor da primeira torne máximo o desempenho da última.

1.1 O Tecido Ósseo

O primeiro passo no projeto de implantes é observar a própria natureza do tecido que se está tentando substituir. O tecido ósseo, por exemplo, é formado por duas fases, sendo uma inorgânica e a outra orgânica. A última, que representa cerca de 30% em peso do tecido, consiste principalmente em uma matriz polimérica composta por fibras de

colágeno, associada a um líquido conhecido como substância fundamental, composto por proteoglicanos como condroitina-sulfato e ácido hialurônico, que aparentemente regula a deposição da fase inorgânica. Problemas na produção desse líquido podem resultar em doenças como a gota. Essa fase representa cerca de 30% do total [3].

Já a composição da fase inorgânica é, de certa forma, controversa [1,3]. Acreditava-se, após estudos de difração de Raios-X, que esta fase fosse composta de hidroxiapatita [3]. Isto não é estritamente verdadeiro. A hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um composto de estequiometria e cristalografia definidas. As apatitas, que são comumente encontradas em calcificações normais, ou seja, ossos e dentes apresentam importantes diferenças. Têm fórmula geral semelhante à da hidroxiapatita, $(\text{Ca},\text{Z})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6(\text{OH},\text{X})_2$, sendo X, Y e Z substituintes. Estas substituições, que dependem do local e função do tecido, fazem com que este material seja não-estequiométrico e de cristalografia não muito bem definida, o que afeta de forma ímpar suas propriedades. No osso, por exemplo, ocorrem, entre outros substituintes, o sódio, o magnésio e o carbonato [4]. É interessante observar que são encontrados muitos outros íons substituintes, entre eles estrôncio e zinco. Obviamente, estas substituições são afetadas pela exposição do indivíduo ao ambiente (no caso de exposição à radiatividade pode chegar a haver substituição por urânio e plutônio), e em alguns casos pode existir relação com sarcomas osteogênicos [3]. Outro aspecto importante é a morfologia da fase inorgânica. Cada cristal tem cerca de 400 Å de comprimento, de 10 a 30 Å de espessura e cerca de 100 Å de largura. Ou seja, são nanocristais.

Assim, a hidroxiapatita sintética apresenta algumas diferenças significativas quando comparada às apatitas naturais, relacionadas principalmente à presença de substituintes, cristalinidade e morfologia. Essas diferenças resultam em uma atividade fisiológica diferenciada, mas que mesmo assim resulta em grande bioatividade, devido à sua grande semelhança química com os fosfatos de cálcio biológicos. Uma comparação entre a composição e as propriedades cristalográficas da hidroxiapatita sintética, estequiométrica e altamente cristalina, esmalte e osso humano é apresentada na Tabela 1.1 [1].

Cada fosfato de cálcio apresenta composição e estrutura cristalina específica, o que

afeta diretamente as suas propriedades, tornando determinados compostos mais adequados para bioaplicações. Exemplos de fosfatos de cálcio de relevância biológica são a brushita ou fosfato dicálcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a monetita ou fosfato de cálcio anidro (CaHPO_4), o fosfato de cálcio octacálcio ($\text{Ca}_8\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), o fosfato de cálcio tricálcio (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o fosfato de cálcio amorfo [5]. Quando em contato com fluidos corporais, o fosfato de cálcio pode ser reabsorvido ou transformado em outro fosfato cálcio mais estável. Durante a etapa de dissolução, supersaturações locais de cálcio e fósforo irão aparecer, levando à reprecipitação de outras fases. Por exemplo, a dissolução da hidroxiapatita pode levar à reprecipitação de fosfato octacálcio e fosfato de cálcio amorfo, dentre outros, dependendo das condições de pH, temperatura e concentração do meio [4]. Sabe-se que diferentes fosfatos de cálcio possuem diferentes solubilidades, por exemplo, α -TCP é mais solúvel que β -TCP que por sua vez é mais solúvel que hidroxiapatita pura e cristalina [4,6, 5]. A hidroxiapatita é, portanto, pouco solúvel.

Tabela 1.1: Comparação entre composição e parâmetros cristalográficos do esmalte dentário, osso cortical e hidroxiapatita sintética.

	<u>Esmalte</u>	<u>Osso</u>	<u>HA</u>
<i>Constituintes (wt%)</i>			
Cálcio	36	24.5	39.6
Fósforo	17.7	11.5	18.5
Razão Ca/P	1.62	1.65	1.67
Sódio	0.5	0.7	traços
Potássio	0.08	0.03	traços
Magnésio	0.44	0.55	traços
Carbonato	3.2	5.8	-
Fluoreto	0.01	0.02	-
Cloreto	0.3	0.1	-
<i>Parâmetros Cristalográficos</i>			
a (Å)	9.441	9.419	9.422
c (Å)	6.882	6.880	6.880
Cristalinidade (%)	70-75	33-37	100

1.2 Tipos e Mecanismos de Calcificação nos Organismos

A calcificação é um processo complexo, intermediado por diversas proteínas e organelas, sendo extremamente sensível a condições do meio. Pode vir a ser desejável ou não, dependendo da forma e local em que ocorra. No caso do osso, ocorre inicialmente a produção de colágeno e outras substâncias pelos osteoblastos [3]. A fibra de colágeno age como matriz para a formação de núcleos de fosfatos de cálcio, que dão origem a fases cristalinas, como a brushita [3]. Após a precipitação inicial ocorre um mecanismo de troca e substituição que, após um período de várias semanas resulta na formação dos cristais de apatita. O mecanismo de deposição desses sais no colágeno *não* é bem compreendido.

Esse processo de deposição óssea ocorre de forma contínua durante toda a vida. É importante observar que a presença de osteoblastos depende da cristalinidade da fase inorgânica. Por exemplo, o esmalte dos dentes é altamente cristalino, devido à substituição por ânions fluoreto. O tipo de substituinte afeta esse índice de cristalinidade. É interessante observar que o hábito moderno de se incorporar flúor a água tratada deriva da observação de que, em algumas regiões, a incidência de cáries era extremamente reduzida. Uma pesquisa mais detalhada provou que esse fato advinha da água normalmente consumida nessas regiões, que era uma água mineral rica em fluoretos. A contínua exposição a esses sais resultava em um esmalte com maior índice de substituição por esses ânions, mais cristalino e, portanto, menos sujeito ao ataque bacteriano. Infelizmente, devido a esses aspectos de sua composição, o esmalte apresenta um baixo número de osteoblastos, tornando mínima sua capacidade de regeneração [3,7].

No organismo, há produção contínua de mais tecido ósseo para compensar o desgaste natural do material. Entretanto, ao mesmo tempo em que este novo tecido é formado, o equilíbrio dinâmico do organismo exige que o antigo seja continuamente absorvido, função esta exercida por grandes células multinucleadas denominadas por osteoclastos. Esse processo, além de renovar o tecido, permite que o cálcio e o fosfato sejam aproveitados em outros pontos, já que os ossos são o grande depósito desses elementos em nosso organismo [3].

É interessante notar que os processos de produção e absorção encontram-se naturalmente em equilíbrio. A osteoporose é justamente um processo de descalcificação óssea resultante de uma menor atividade osteoblástica, que não é acompanhada por uma redução simultânea na atividade dos osteoclastos. Um dos tratamentos empregados é justamente reduzir a atividade osteoclástica com o uso de bifosfonatos, que promovem a apoptose (suicídio celular) dessas células, ajudando a restaurar o equilíbrio [8].

A discussão desse mecanismo de absorção/deposição é de grande importância no projeto de implantes ósseos, pois, como foi discutido anteriormente, diferentes fosfatos de cálcio apresentam diferentes taxas de absorção fisiológica. Assim, a taxa de deposição óssea deve ser igual à taxa de absorção do implante pelo organismo. Caso isso não ocorra, há possibilidades de formação de defeitos. Uma das formas de regular essa taxa de absorção é a produção de cerâmicas bifásicas, que contenham β -TCP e HA. Como a primeira é mais facilmente absorvível que a segunda, o controle da razão dessas duas fases permite regular melhor a taxa de absorção do implante [9].

Entretanto, não é apenas nos tecidos ósseos que ocorre a calcificação. Existem também as chamadas calcificações anormais. A arteriosclerose é a calcificação dos vasos sanguíneos, que pode resultar na interrupção do fluxo sanguíneo e na formação de trombos. Além disso, certas dietas ou condições, como o hiperparatireoidismo, podem resultar em um excesso de cálcio e fosfato no organismo, que se precipitam nos rins formando cálculos [3]. Ou seja, no projeto de vasos artificiais ou biomateriais que fiquem em contato com o sangue, deve-se tomar grande cuidado para que o mesmo iniba o processo de calcificação. É comum, por exemplo, a inserção de válvulas cardíacas artificiais que precisam ser trocadas porque houve deposição de fosfatos de cálcio sobre a mesma, podendo mesmo resultar na formação de novos trombos. Uma melhor compreensão do processo de calcificação poderia aumentar a vida útil desses materiais e diminuir o trauma devido a seguidos procedimentos cirúrgicos.

1.3 Compósitos Naturais

Um dos grandes problemas na utilização de fosfatos de cálcio em Engenharia Biomédica é que, justamente por sua natureza cerâmica, estes possuem baixa tenacidade e são passíveis a sofrerem fratura frágil. Dessa forma, em situações de sollicitação mecânica, costuma-se utilizá-los apenas como recobrimento de implantes metálicos, como o titânio, de forma a aumentar a bioatividade. Entretanto, a presença de metal no organismo, apesar de necessária, ocasiona problemas. Deixando de lado possíveis complicações como rejeição e toxicidade local e sistêmica, pode-se citar novamente os mecanismos de aposição óssea. Um dos mecanismos reguladores da atividade osteoblástica é a sollicitação mecânica do osso. Assim, uma perna fraturada sofre uma descalcificação de até 30% em poucas semanas justamente devido à sua inatividade, que inibe a ação dos osteoblastos [3]. No caso de um implante metálico, os ossos são submetidos a uma sollicitação mecânica diferente, justamente devido às naturezas díspares dos dois materiais, podendo levar a problemas de calcificação. O ideal seria ter um material que tivesse resistência mecânica semelhante à do osso, incluindo sua capacidade de sofrer deformação elástica. A pergunta é: se o osso possui uma percentagem tão grande de um fosfato de cálcio, que é um material cerâmico, por que é mais tenaz do que as cerâmicas?

A resposta está na própria forma que o tecido ósseo é produzido. O fosfato de cálcio está ligado à matriz de colágeno, formando um material compósito, com uma arquitetura finamente controlada em nível molecular [10]. Assim, o material formado apresenta propriedades intermediárias entre os dois, apresentando resistência mecânica (devido à presença da fase inorgânica) e boa tenacidade (devido ao colágeno). Nesses casos, a matriz polimérica afeta o tamanho, a forma, a orientação e até mesmo a composição de fases das partículas formadas provendo sítios de nucleação, regulando a concentração local dos íons e inibindo determinadas reações [11].

Essa associação, que resulta em materiais *sui generis*, não é incomum na natureza. A carapaça dos crustáceos é formada pela associação da quitina, um polissacarídeo, com carbonato de cálcio. Os corais formam seus exoesqueletos através da manipulação da concentração de cálcio e carbonato no ambiente marinho, que é normalmente metaestável,

fornecendo sítios para nucleação e crescimento através de sua matriz polimérica, em um processo que é eminentemente dependente do equilíbrio do dióxido de carbono entre atmosfera e oceanos. Assim, há nucleação de pequenos cristais de calcita, sobre os quais crescem posteriormente cristais de aragonita [12]. O nácar é formado pela associação de uma fase orgânica, a conchiolina, um material protéico rico nos aminoácidos alanina e glicina, associada com diversos polissacarídeos, e cristais de carbonato de cálcio [13].

1.4 Biomimetismo

A perfeição com que os compósitos naturais adaptam-se as suas funções despertou interesse para a chamada biomimética, que é, como definida por Green *et al.* [14], “o estudo da estrutura, função e otimização de materiais e sistemas biológicos que inspiram o projeto de materiais sintéticos análogos”. Assim, o próprio uso de hidroxiapatita como material para enxerto ósseo é um exemplo simples de biomimética, pois esse material tenta copiar a composição química desses tecidos.

Dois aspectos são fundamentais no biomimetismo: reconhecimento molecular e auto-organização [15]. Os dois aspectos são bem exemplificados no trabalho de Walsh *et al.* [16], no qual microemulsões de bicarbonato de sódio em óleo, estabilizadas por um surfactante, dão origem a uma estrutura especial: esferóides ocós. Deve-se isso ao agrupamento das emulsões como micro-gotas (auto-organização); e também à ação dos grupos funcionais do surfactante, onde ocorre o processo de nucleação e crescimento dos cristais de vaterita (reconhecimento molecular), que é uma forma cristalina metaestável do carbonato de cálcio.

Apesar do nome, o biomimetismo é amplamente utilizado na fabricação de microsensores, chips e está profundamente relacionado a avanços na nanotecnologia. Yoo *et al.* [17] utilizaram técnicas de biomimética para produzir microdiafragmas para uso em equipamentos como microválvulas e bombas. Khomutov *et al.* [18] utilizaram ácido esteárico, uma molécula anfotérica, para criar filmes planares, nanoestruturados, capazes de agir como semicondutores.

Relacionado a esse tópico está a elaboração de micropadrões. O objetivo dessa técnica é criar microregiões na superfície de um substrato, de forma que este mantenha regiões que interajam diferentemente com o ambiente. Uma das técnicas de obtenção é

através de fotolitografia [19]. Nesta técnica, uma máscara é colocada sobre uma superfície que é tratada com radiação UV. As regiões expostas apresentam propriedades diferentes, permitindo, por exemplo, a ocorrência de reações de polimerização [20] e produzindo padrões como o mostrado na Figura 1.1.

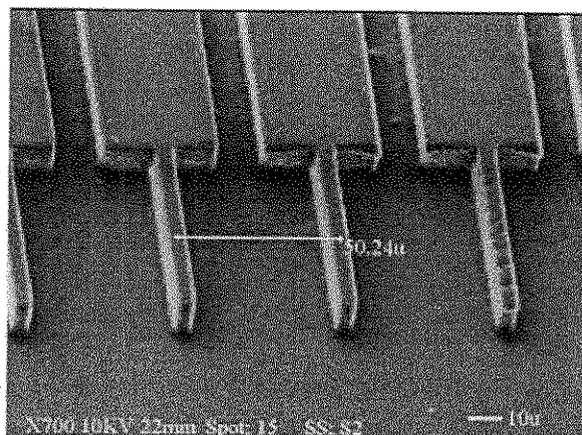


Figura 1.1: Padrões obtidos por fotolitografia [74].

A utilização de técnicas biomiméticas no projeto de biomateriais é ainda mais importante. A compreensão dos fenômenos fisiológicos é, por si só fundamental para o projeto de biomaterias. Quando associado ao melhoramento das respostas *in vivo* através da incorporação de aspectos de reconhecimento molecular e auto-organização, obtêm-se materiais com bioatividade geralmente muito superior aos de origem. Por exemplo, o tratamento de titânio com NaOH seguido por tratamento térmico produz um titanato de sódio que apresenta alta bioatividade, devido à funcionalização da superfície, sem redução das propriedades mecânicas [21].

1.5 Motivação à Pesquisa/Estado da Arte

Apesar de ser um material muito importante do ponto de vista biomédico, os fosfatos de cálcio não são facilmente sintetizados. Isso ocorre, em parte, pela própria multiplicidade de fases cristalinas que podem surgir. Além disso, os processos de obtenção são geralmente muito sensíveis a fatores externos e nem sempre geram resultados reprodutíveis. Como é de extrema importância que a composição química e distribuição de fases seja finamente controlada para garantir um desempenho adequado, vê-se que essas

dificuldades na sua produção podem ser extremamente prejudiciais de um ponto de vista econômico e industrial.

Outro fator que restringe sua utilização é a própria limitação na aplicação desse material devido a suas propriedades mecânicas. Próteses cerâmicas devem ser sempre aplicadas em situações de baixa solicitação mecânica. Isso complica o projeto e leva à introdução de outros tipos de próteses, como as metálicas, que acarretam novos problemas.

É lógico que, em face de todas essas complicações, procuremos estudar e entender um caso em que esses problemas estejam adequadamente resolvidos. Os tecidos ósseos desempenham o seu papel perfeitamente através da associação de componentes cerâmicos e biopoliméricos. Compreender como se dá esse processo permitiria ajudar a reproduzir esse processo artificialmente.

Além disso, os biopolímeros afetam a distribuição de fases e morfologia dos materiais, através dos processos biomiméticos. Existe a possibilidade de que seu uso na síntese de fosfatos de cálcio permitisse formular novos processos, com melhor controle das propriedades dos produtos finais.

Finalmente, um melhor entendimento de como se dá o processo de calcificação *in vitro* pode contribuir em entender e evitar as ditas calcificações anormais. Assim, seria possível selecionar alguns fatores que devem ser evitados no projeto de materiais em contato com o sistema cardiovascular.

Dessa forma, dada a importância dos compostos de cálcio na Engenharia Biomédica, e a importância que os biopolímeros exercem nos processos naturais de calcificação, a proposta desse trabalho é estudar os efeitos de dois biopolímeros em um processo de obtenção de fosfatos de cálcio por precipitação. Neste trabalho escolheu-se o alginato e a quitosana. O primeiro é extraído primariamente de algas marrons, como a *Laminaria hyperborea* e a *Ascophyllum nodosum*, representando cerca de 40% de seu peso seco. Encontra aplicações na indústria de alimentos, cosmética e biomédica, inclusive na produção de vacinas de ação local e liberação controlada de fármacos [22]. O segundo é produto direto da desacetilação da quitina, que por sua vez é um polissacarídeo encontrado

no exoesqueleto de insetos, como a barata, e de crustáceos, como o camarão. A quitosana é utilizada como complemento alimentar e está sendo estudada para inúmeras aplicações biomédicas. Assim, esses dois compostos foram escolhidos por sua abundância, por suas propriedades bioquímicas e aplicações biomédicas, além do seu provável potencial econômico.

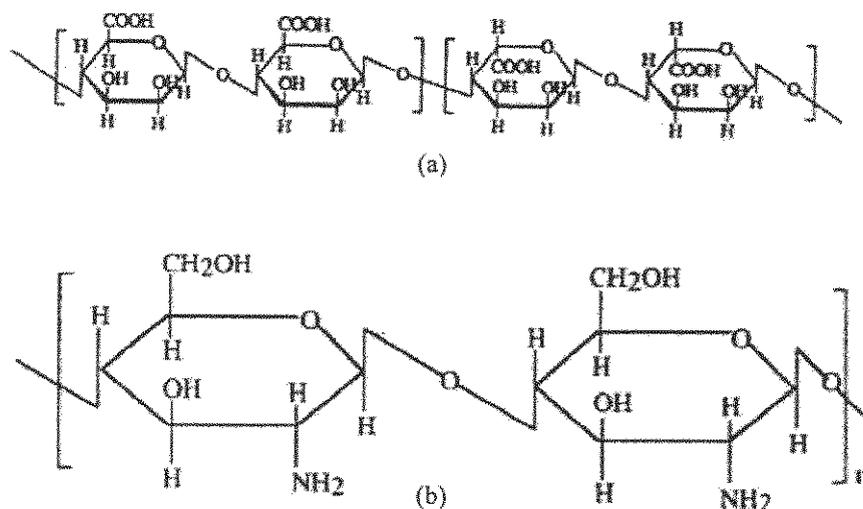


Figura 1.2: Estrutura do (a) alginato e da (b) quitosana.

É fato que, na natureza, nenhum desses dois biopolímeros toma parte de processos de calcificação com fosfatos de cálcio. A quitina participa da calcificação com o carbonato de cálcio. As matrizes orgânicas que executam este processo na natureza são as proteínas. Entretanto, uma série de fatores depõe contra a utilização destas em um trabalho que visa tentar entender o processo de calcificação e ao mesmo tempo obter novos processos ou conceitos para obtenção de biomateriais que possam ter alguma aplicabilidade. O primeiro fator a ser considerado é a própria natureza da proteína. Sabe-se que estas exercem um papel fundamental na regulação dos processos bioquímicos (como as enzimas) e formação de estruturas (colágeno, conchiolina). Sua estrutura é complexa, com quatro níveis de arranjo espacial diferenciados, mas são compostas por monômeros relativamente simples conhecidos como aminoácidos, que têm como principal característica seus dois grupamentos, amina e carboxila [13]. Por sua vez, os biopolímeros escolhidos apresentam um arranjo estrutural bem mais simples, como pode ser visto na Figura 1.2, e apresentam os

mesmos grupamentos das proteínas separadamente (alginato - carboxila e quitosana - amina). Ou seja, simplifica-se o problema e isola-se o efeito dos grupamentos. Além disso, não é simples trabalhar com proteínas mantendo seu arranjo espacial intacto, e processos que porventura as incorporem serão necessariamente mais complexos. Finalmente, a presença de proteínas estranhas pode levar a formação de fibrina, processo que é regulado pela presença do íon cálcio.

Estudos anteriores do efeito desses biopolímeros e de outros polieletrólitos na calcificação já foram feitos. Beppu e Santana [24] estudaram a calcificação sobre filmes de quitosana, e descobriram que esta é fortemente dependente do pH, sendo mais intensa em pHs maiores. Os depósitos ocorrem através de um mecanismo de nucleação e crescimento em sítios específicos da membrana, relacionados à presença de cargas pontuais [24,25]. Diferentes concentrações de cálcio e fósforo na solução-mãe também afetam a morfologia dos precipitados [53,69], sendo que no caso de soluções ricas em fósforo esses apresentam grande interconectividade. Isso ocorre, segundo Beppu *et al* [69], ou devido a uma melhor interconectividade entre a matriz e o precipitado, levando a uma redução da energia livre de nucleação desse processo; ou a um maior tamanho crítico dos núcleos formados em solução ricas em cálcio. De qualquer forma, a energia livre de nucleação heterogênea nas fases ricas em fósforo é menor que das fases ricas em cálcio.

Em outro trabalho de Beppu e Santana [26], a membrana de quitosana foi modificada pela adição de poli(ácido acrílico), resultando em uma adição líquida de íons carboxila. A taxa de calcificação aumentou, provavelmente pela adição de sítios de nucleação. Também houve uma modificação na cristalinidade das fases, tornando claro que a matriz influencia a orientação cristalográfica dos depósitos.

Outros trabalhos evidenciam o uso de outros polieletrólitos em sistemas semelhantes. Jada e Verraes [27] utilizaram poliestireno sulfonato para afetar a precipitação de carbonatos de cálcio. As partículas obtidas foram modificadas tanto em sua composição de fases, com a presença da fase metaestável vaterita, quanto na sua morfologia, apresentando uma distribuição mais uniforme de tamanho. O primeiro fator foi atribuído aa

estabilização da vaterita, que é a fase inicial formada no processo de formação da calcita. O último efeito foi atribuído às cargas do polieletrólito sobre a superfície das partículas.

Alguns processos utilizados para obter fosfatos de cálcio na presença de biopolímeros são mostrados na literatura. Yamaguchi *et al.* [27] preparou hidroxiapatita por co-precipitação com as seguintes proporções de quitosana: 0, 20,50 e 80%. Os compósitos apresentaram variações cristalográficas - menor cristalinidade- e morfológicas – orientação em relação ao eixo c da hidroxiapatita - crescente com o aumento de quitosana. As propriedades mecânicas sofreram uma melhora considerável. Lin *et al.* [28] produziram compósitos alginato/HA através da simples imersão do último em um gel do segundo, e ainda assim houve alterações morfológicas no material. Chang *et al.* [29] produziram HA na presença de alginato por coprecipitação, utilizando entre 5 e 40 g de alginato, e obtiveram forte orientação cristalográfica. Com algumas exceções, esses trabalhos tiveram como foco principal a produção do compósito em si, e não o estudo do processo de calcificação.

Na maior parte dos trabalhos mencionados anteriormente, os biopolímeros participaram do processo na forma de filmes ou foram largamente incorporados ao processo de precipitação. Seria interessante observar o efeito dos biopolímeros em pequenos níveis de concentração, quando eles pudessem ser considerados apenas aditivos ou dopantes. Isso ajudaria a isolar alguns efeitos e a ter um quadro mais completo do processo biomimético.

Através de uma melhor compreensão do processo de calcificação sobre os biopolímeros espera-se obter também um maior controle sobre os processos de obtenção dos fosfatos de cálcio por precipitação, obtendo biocerâmicas mais bem projetadas, além de poder sugerir novas aplicações aos biopolímeros estudados.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar como a presença de biopolímeros afeta a formação dos fosfatos de cálcio obtidos por um processo de precipitação. Diferenciar os efeitos das funcionalidades ácidas (grupo carboxílico) dos efeitos das básicas (grupo amino) e obter informações sobre como, utilizando-se esses polímeros, obter-se um melhor controle sobre o processo de precipitação.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar ensaios de precipitação para obtenção de fosfatos de cálcio na presença e ausência dos biopolímeros quitosana e alginato, em meio sem ajuste inicial de pH, e com ajuste posterior.
2. Realizar ensaios de precipitação no pH de estabilidade da hidroxiapatita na presença e ausência dos biopolímeros quitosana e alginato.
3. Caracterizar as fases presentes no substrato obtido através de difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
4. Calcificação e sinterização do substrato obtido em temperaturas de 550 e 1000°C. Caracterização do material por DRX para determinação da nova distribuição de fases.
5. Sinterização do substrato obtido na temperatura de 1000°C. Re-caracterização do material por DRX para determinação do efeito dos biopolímeros na formação de Cerâmicas Bifásicas.

-
6. Relacionar as variações nas propriedades do substrato com as propriedades de solução dos biopolímeros. Utilizar essas relações de forma a poder realizar avaliações simplificadas das propriedades *in vivo*.

 7. Elaborar métodos que utilizem os biopolímeros anteriormente citados na obtenção de hidroxiapatita e cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas, de forma a adquirir melhor controle sobre o produto final.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BIOMATERIAIS

Datam de muito tempo atrás as tentativas do homem de utilizar materiais para substituir partes perdidas do corpo. Os chineses, astecas e romanos já utilizavam ouro como próteses dentais há mais de 2.000 anos atrás. Muitos experimentos foram feitos, e em um procedimento que era quase de tentativa-e-erro, materiais adequados eram descobertos, ao mesmo tempo em que uma melhor compreensão dos mecanismos de resposta fisiológicos era adquirida. Por exemplo, durante a segunda guerra mundial, estilhaços de poli(metil metacrilato) da cabine por vezes atingiam os olhos dos aviadores. Os médicos notaram que este material provocava apenas uma reação leve do organismo. Na cirurgia cardiovascular tentou-se utilizar Dacron[®] (tecido que deveria ser, segundo a sugestão de um livro-texto da época, adquirido pelo médico na mercearia local) a Vinyon N[®], usado na confecção de pára-quedas [2].

O próprio termo “biomaterial” é de origem imprecisa. Acredita-se que tenha surgido, ou pelo menos adquirido seu sentido atual, por volta dos anos 60. Há, ainda, numerosas definições. Uma delas é a publicada por Williams, em 1999, conforme a tradução abaixo [30,31]: “qualquer substância, excluindo-se drogas, ou combinação de substâncias, sintética ou natural, que pode ser usadas por qualquer período de tempo, como todo ou parte de um sistema que trata, aumenta ou repõe qualquer tecido, órgão ou função do corpo”.

A definição acima inclui uma grande quantidade de dispositivos, das mais diversas formas, funções e naturezas. Isso é estritamente necessário, visto que cada tecido possui necessidades específicas e vai interagir diferentemente com o implante. A Tabela 3.1 dá exemplos de aplicações e o tipo de material utilizado em cada uma [2].

Tabela 3.1: Exemplos de Biomateriais e Aplicações – adaptada de [2].

Aplicação	Material
Ortopédicas	
Prótese de Fêmur	Ligas de Titânio
Reparo de Defeitos Ósseos	Cerâmicas de Fosfato de Cálcio
Cardiovascular	
Vasos artificiais	Teflon [®] , Poliuretano
Válvula Cardíaca	Carbono, Válvulas Cardíacas de Suínos
Órgãos Artificiais	
Pele	Compósitos de Colágeno
Coração Artificial	Titânio
Oftalmológicos	
Lentes de Contato	Hidrogel
Bandagem Córnea	Colágeno

Ou seja, cada material é colocado em contato com um tecido com o qual ele possa interagir adequadamente. Esse é o conceito-base de biocompatibilidade, como foi definido por Williams em 1987 [30]: “Biocompatibilidade é a capacidade do material de atuar com uma resposta adequada do hospedeiro em uma aplicação específica”.

É importante observar que um material, mesmo sendo biocompatível, pode exibir respostas diversas do tecido hospedeiro. A Tabela 3.2 apresenta o tipo de cada reação e suas características comuns [2].

Tabela 3.2: Formas de interação dos implantes – adaptada de [2]

Tipo de Interação	Reação do Tecido Hospedeiro
Tóxica	Morte do tecido circundante
Bioinerte	Formação de uma cápsula de tecido fibroso envolvendo o implante.
Bioativo	O tecido se liga ao biomaterial.
Bioreabsorvível	O implante é dissolvido, sendo substituído novamente por tecido.

O tipo de interface formada tem grande impacto no desempenho do biomaterial. Por exemplo, a formação de tecido fibroso não é tão importante em implantes submetidos à firme compressão, mas pode levar ao afrouxamento e conseqüente falha do mesmo, se colocado em situações onde o tecido apresenta movimento freqüentemente.

3.1.1 BIOCERÂMICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO

As primeiras cerâmicas utilizadas como biomateriais foram a alumina e a zircônia, devido a sua boa biocompatibilidade, alta resistência ao desgaste, boa resistência mecânica e excelente resistência à corrosão, derivada de uma cinética reacional extremamente lenta. Ainda são amplamente aplicados em próteses de quadril, por exemplo. A sua bioinércia representa, entretanto, uma limitação em suas aplicações.

Os fosfatos de cálcio apresentam um tipo totalmente diferente de interação. Sua semelhança à fase inorgânica dos tecidos ósseos torna-os bioativos ou mesmo bioreabsorvíveis, dependendo da distribuição de suas fases cristalinas, da área superficial, da cristalinidade, dentre outros [32]. Aliás, é possível a formação de grande quantidade de

fases, dependendo da razão entre cálcio e fósforo, como mostrado na Tabela 3.3, adaptada de [33].

Tabela 3.3: Tipos de Fosfatos de Cálcio [33]

Razão Ca/P	Nome	Fórmula
2,0	Fosfato Tetracálcio	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
1,67	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1,50	Fosfato Tricálcio (α, β, γ)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,33	Fosfato Octacálcio	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,00	Fosfato Dicálcio Dihidratado ou Brushita	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,00	Fosfato Dicálcio Anidro ou Monetita	CaHPO_4
1,00	Pirofosfato de Cálcio (α, β, γ)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
1,00	Pirofosfato de Cálcio Dihidratado	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,7	Fosfato Heptacálcio	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$
0,5	Metafosfato de Cálcio (α, β, γ)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$

Esta multiplicidade de fases é uma das grandes dificuldades ao se trabalhar com fosfatos de cálcio. Primeiro, em relação à própria conversão que pode ocorrer entre esses compostos em condições reacionais e que são, em alguns casos, indesejáveis. Por outro lado, os parâmetros de rede desses são muito semelhantes, e uma identificação precisa pode não ser possível apenas com técnicas relativamente simples, como a difração de raios-X. Desta forma, é necessário que por vezes sejam utilizadas técnicas mais avançadas, como a microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, o refinamento de Rietveld e a luz síncrotron [33, 34,35].

A hidroxiapatita (HA) é muito semelhante à fase mineral do osso, apresentando por isso, propriedades como biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. Sua morfologia assemelha-se a agulhas, provavelmente devido a um arranjo preferencial em

direção a um dos eixos cristalinos. Sua simetria é hexagonal e pertence ao grupo espacial P6/3m. [6, 36]. A Figura 3.1 (extraída de [33]) mostra sua estrutura cristalina.

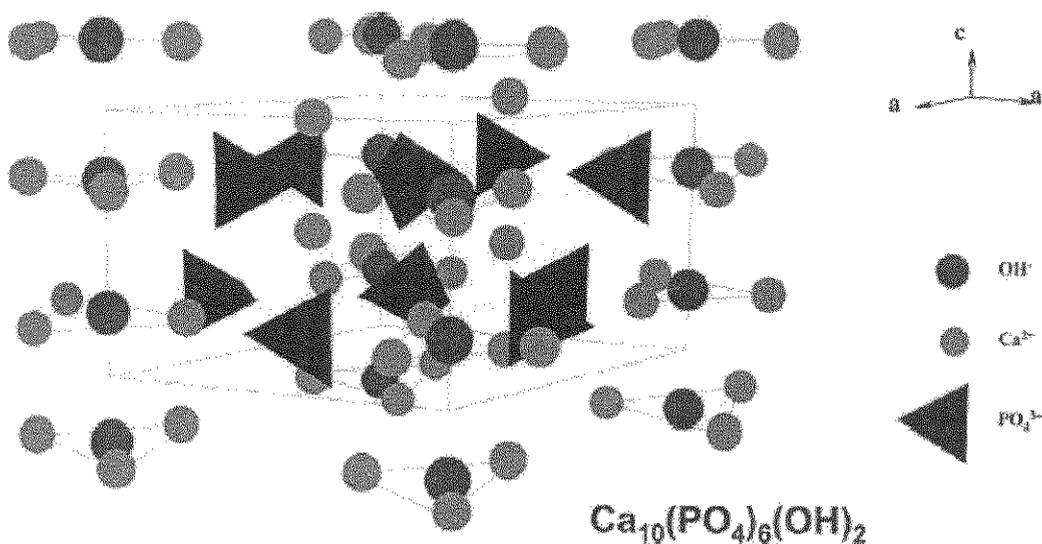


Figura 3.1: arranjo cristalino da hidroxiapatita [33].

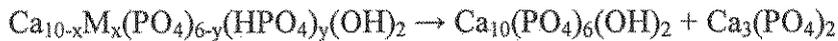
Pode apresentar diversas substituições, formando compostos como a hidroxiapatita cálcio-deficiente e a carbonato-substituída. Tipicamente, apatitas apresentam de 5 a 8% em peso de carbonato, além de substituições por íons como magnésio, sódio, potássio, fluoreto e cloreto [37].

A hidroxiapatita é aplicada em biomedicina para preenchimento de defeitos ósseos e recobrimento de implantes metálicos (como o de fêmur), de forma a aumentar a osteointegração [38]. Entretanto, dentre os fosfatos de cálcio, é um dos menos solúveis, tornando-o inapto para uso isolado como material bioreabsorvível.

A brushita é encontrada no corpo humano, tanto na formação da fase óssea quanto em calcificações anormais, como cálculos renais. É estável em pHs fracamente ácidos (entre 4 e 6) e pode ser usada como precursor da hidroxiapatita. Também é normalmente associada à monetita, que é a forma anidra desse fosfato[37].

O fosfato tricálcio (TCP) apresenta dois polimorfos principais, denominados α e β . Acreditava-se que nenhum deles pode ser obtido por precipitação, devido a sua

instabilidade em água, sendo normalmente obtidos a partir de apatitas com deficiência em cálcio, quando estas são aquecidas acima de 700°C, segundo a reação:



onde M é um cátion cálcio-substituinte.

A fase α , por sua vez, só é obtida em temperaturas acima de 1125°C. Quanto maior a deficiência de cálcio, maior a quantidade de TCP formada [9], sendo que essa deficiência é função das condições de preparação. Como será discutido adiante, os processos de obtenção apresentam, muitas, vezes reprodutibilidade limitada, o que dificulta a obtenção de implantes mais precisamente projetados.

Os fosfatos tricálcio têm grande importância em engenharia biomédica. São muito mais solúveis que a hidroxiapatita, por isso são usados freqüentemente associados a essa na fabricação de cerâmicas bioreabsorvíveis. Controlando a razão entre HA e β -TCP controla-se a taxa de solubilidade do implante, que ao mesmo tempo em que se degrada, libera íons cálcio e fosfato no organismo, sendo estes usados na reconstrução do tecido []. Esta associação é conhecida como cerâmica bifásica (BCP, *Biphasic Calcium Phosphate*).

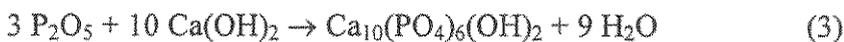
3.1.1.1 Processos de obtenção dos fosfatos de cálcio

Existem inúmeros métodos para preparar fosfatos de cálcio. Cada um apresenta certas vantagens e desvantagens inerentes, sendo que a escolha de qualquer destes vai depender da otimização de fatores como qualidade/quantidade desejada e capital disponível.

Técnica do Aerosol: é um método capaz de produzir partículas com fino controle de parâmetros como morfologia e tamanho de partícula. Nesse caso, cálcio e fosfato são introduzidos em um reator de pirólise como uma fina névoa, permitindo uma mistura altamente eficiente, em nível atômico. Um tratamento térmico posterior permite novas modificações em parâmetros como textura [40]. É um processo que exige equipamentos especiais e pessoal altamente especializado, não sendo de implementação simples.

A **moagem mecânica** tem origem na década de 60, desenvolvida inicialmente para fabricação de ligas ODS (*oxide dispersion strengthening*) para turbinas de avião [41]. O equipamento básico para essa técnica é o moinho de bolas de alta energia. Dentro desse moinho há jarras, onde são colocados os reagentes e as bolas. A rápida movimentação das jarras provoca o choque entre as bolas e os reagentes, e a alta energia do impacto, adicionada à energia do atrito, induz a reação química. São utilizadas bolas de carbetto de tungstênio, aço ou cerâmica, sendo que o tipo afeta a composição final do material.

Este método é muito utilizado na síntese de HA, sendo que vários dos reagentes utilizados são fosfatos de cálcio, de menor razão Ca/P, e uma fonte de cálcio não-associada a fosfatos. Por exemplo, Yeong *et al.* obtiveram HA nanométrica através da moagem de CaHPO₄ e CaO em meio contendo etanol seguido de moagem por 25 horas [42]. Sang-Hoon Rhee [43] preparou hidroxiapatita por moagem de Ca₂P₂O₇ e CaCO₃ em meio contendo acetona/água, seguido de tratamento térmico a 1000°C por 1 hora. Cândido da Silva [41] obteve hidroxiapatita em meio seco e **sem** tratamento térmico com as reações das equações 1 a 4.



A reação representada pela equação 3 foi a única que não teve fosfato de cálcio como reagente inicial.

O método da **mistura líquida** (*liquid mix technique*) é baseado em uma patente de Pechini [44] utilizada inicialmente na síntese de titanatos e niobatos. Neste método, sais de cálcio e fósforo (como o CaNO₃ e NH₄H₂PO₄) são adicionados a uma solução contendo um ácido policarboxílico, como o ácido cítrico. Após aquecimento para redução do volume da solução, um diol, como o etileno-glicol, é adicionado a solução. A intenção é produzir uma rede de ésteres polimérica e tri-dimensional, que ajudaria a solução a reter a

homogeneidade presente na solução no estado sólido, evitando a segregação parcial das espécies iônicas. As desvantagens estão relacionadas à incapacidade do ácido cítrico de complexar todas as espécies, podendo, a partir disso, ocorrer perda da homogeneidade e na técnica em si, que exige aquecimento durante a reação e **antes** do tratamento térmico a temperaturas que podem chegar a 350°C [33,45].

O **método da precipitação** é o mais simples de todos os citados. O fosfato de cálcio é obtido pela mistura de uma solução de sal fosfato e uma de outro sal de cálcio seguida de posterior precipitação do fosfato de cálcio formado. O grande problema desse método é a falta de reprodutibilidade obtida, devido à grande sensibilidade a variações de pequenos parâmetros como pH, temperatura, razão Ca/P dos reagentes, etc. Isso resulta em diferentes propriedades cristalinas e morfológicas que por sua vez alteram o comportamento *in vivo* de tais materiais. Diversas variações do método original com a finalidade de diminuir esse problema e/ou direcionar as propriedades do precipitado são encontradas na literatura. Parhi *et al.* [46] procedeu a reação de precipitação em um forno microondas comum e obteve HA cristalino. Mais diferenciada foi a técnica de Manjubala e Sivakumar [47] que, variando a razão Ca/P em uma reação executada em forno microondas, obteve cerâmicas bifásicas **sem** tratamento térmico. Como citado nessa mesma revisão, não se acreditava que isso fosse possível pela pura instabilidade do TCP em água. Esse artigo sugere que talvez o problema seja apenas de energia de ativação e/ou de cinética molecular. É um assunto que merece um estudo posterior aprofundado.

3.2. BIOPOLÍMEROS

Polímeros são moléculas compostas pela repetição de determinadas unidades básicas denominadas monômeros em longas cadeias, formando compostos de propriedades ímpares. Apesar de ser um conceito normalmente associado a produtos modernos como o Teflon®, o PET e o PVC, a natureza apresenta uma enorme quantidade de polímeros naturais que são, sem nenhum exagero, a base de toda a vida no planeta.

Os biopolímeros ou polímeros naturais podem ser divididos em 3 classes: as proteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos. As duas primeiras classes serão discutidas

apenas superficialmente neste trabalho, visto que apenas a última destas tem relação real com a presente investigação.

As **proteínas** são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, responsáveis por grande diversidade de funções biológicas [23]. Seus monômeros são os aminoácidos, assim conhecidos por possuírem um grupo amina e um carboxil, ligados a um carbono central. Esse carbono também está ligado a um radical, sendo que cada um corresponde a um aminoácido diferente. Há apenas vinte aminoácidos, e a combinação desses é responsável pela formação de milhões de proteínas diferentes. A mera alteração na ordem de um aminoácido na cadeia pode modificar totalmente a propriedade do composto final. Exemplos de proteínas: o colágeno, presente nos ossos; a queratina, presente em cabelos, unhas, cornos e penas; e a serina, um dos componentes básicos da seda.

Os **ácidos nucleicos** formam o meio pelo qual a informação genética é transmitida nos seres vivos [32]. São compostos por uma base nitrogenada (pirimidinas ou purinas) associada a uma pentose e a um fosfato. Por exemplo, no caso do ácido desoxirribonucleico (DNA), as bases nitrogenadas presentes são a adenina, guanina, citosina e timina. A ordem dessas bases nitrogenadas nos genes é a responsável pelo chamado código genético [23].

3.2.1 Carboidratos

Os carboidratos são as moléculas mais abundantes da face da terra. Exercem numerosos papéis, desde estrutural (como a quitina e a celulose) até funcional (lubrificação de articulações). Seu nome deriva diretamente da fórmula empírica de sua unidade monomérica, onde a razão C:H:O é de aproximadamente 1:2:1, ou seja, a de um “hidrato de carbono”.

Na verdade, o monômero dos carboidratos é o chamado sacarídeo, que é formado por uma cadeia carbônica heterogênea contendo 5 ou 6 átomos, sendo que um deles encontra-se ligado a um grupamento carbonila e o restante a grupamentos hidroxila. Apresenta-se na natureza na forma cíclica, mas é comumente representado em forma linear, sendo que ambas são intercambiáveis [23]. Um exemplo é visto na Figura 3.2.

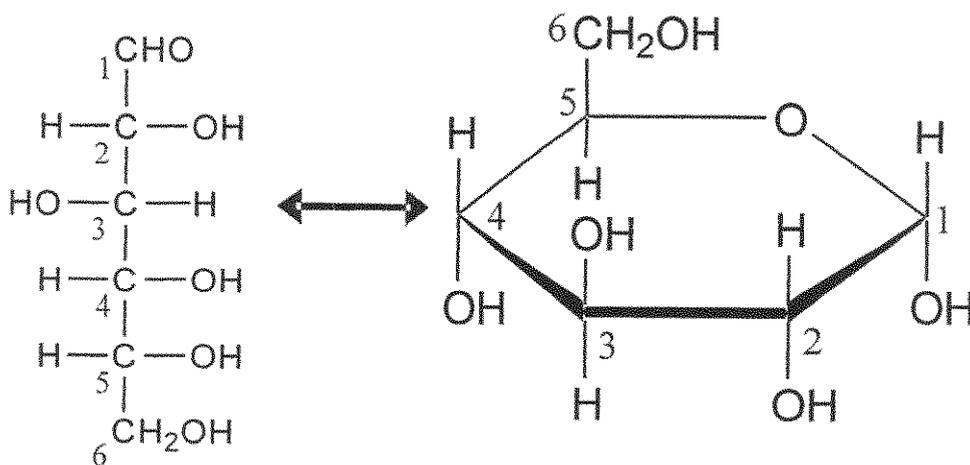


Figura 3.2: Estrutura linear e cíclica da glicose.

Estão divididos, de forma semelhante aos polímeros, em três classes, dependendo do número de unidades monoméricas que os compoem. Os monossacarídeos são formados apenas por um sacarídeo, como o mostrado na Figura 3.2. Os oligossacarídeos consistem de cadeias, com número de monômeros maior que 2, formando pequenas cadeias. Os mais abundantes desta espécie são os dissacarídeos, entre os quais achamos o açúcar comum ou sacarose. Já os polissacarídeos são formados por milhares de unidades monoméricas. Exemplos de polissacarídeos são a quitina, a quitosana e o alginato [23].

3.2.2. Alginato

O alginato é um polissacarídeo que ocorre em algas, especialmente em algas marrons como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, e *Macrocystis pyrifera*. Representa cerca de 40% do peso seco dessas espécies, sendo encontrado especialmente na matriz intracelular, associado a íons como magnésio, cálcio, sódio e bário. Vem sendo amplamente utilizado na indústria de alimentos como agente espessante e estabilizador de colóides [22].

Quimicamente, é um polissacarídeo que contém proporções variáveis de ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico, como pode ser visto na Figura 3.3 A distribuição desses

sacarídeos não é regular e não pode ser previsto estatisticamente, dependendo do organismo do qual foi isolado.

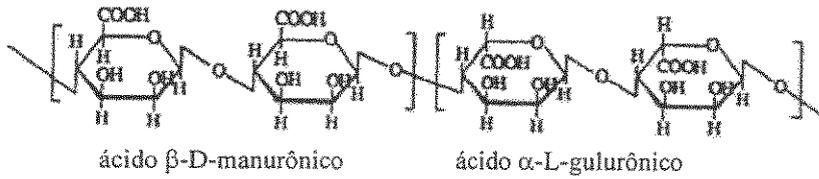


Figura 3.3: Estrutura do Alginato

O alginato apresenta um interessante efeito quando em contacto com íons divalentes. A associação de ambos leva à formação de um gel, através do efeito ionotrópico. Nesse efeito ocorre a reticulação das cadeias de alginato ao redor do íon divalente, formando um gel que contém capilares. Dessa forma o alginato se agrupa ao redor dos íons em uma estrutura que lembra uma caixa de ovos (*egg box model*), como mostrado na Figura 3.4. Aparentemente, há uma certa preferência na associação íon-ácido α -L-gulurônico, levando a torção dessas cadeias. [22;48].

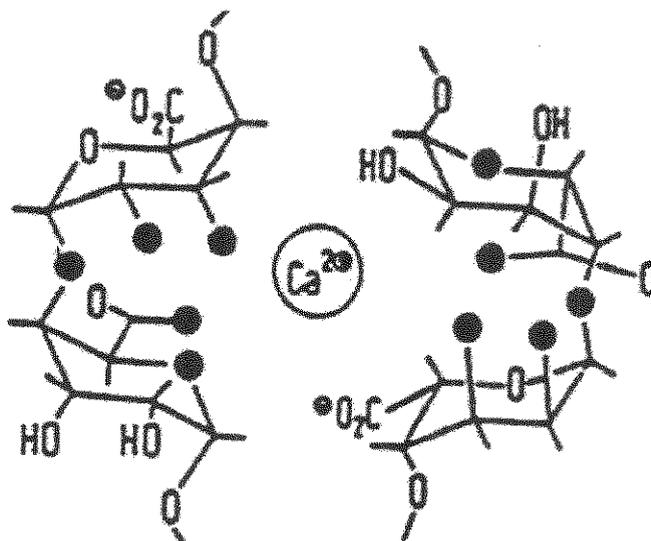


Figura 3.4: Representação do efeito ionotrópico no alginato com o íon cálcio como agente de reticulação.

Essa interação entre alginato e íons divalentes é de extrema utilidade no preparo de géis que podem ser utilizadas em numerosas aplicações, tanto na indústria de alimentos quanto na biomedicina. Por exemplo, a interação entre alginato e os íons cálcio presentes normalmente no plasma humano levam à formação de gel *in situ*, formando camadas protetoras em estruturas tão diversas quanto a pele e o olho [49].

A segurança em aplicações biomédicas depende em grande parte da forma com que o alginato é aceito pelo organismo, ou seja, se ele provoca reações imunes. O alginato purificado apresenta baixa reação imune, sendo que parte dessa reação pode estar associada a uma quantidade excessiva de ácido α -L-gulurônico [50].

Entretanto, a grande utilização do alginato é, realmente, na liberação controlada de fármacos e proteínas. Essa propriedade está ligada à formação do gel através do efeito ionotrópico, que leva a formação de um gel com permeabilidade reduzida, liberando o fármaco na medida em que se degrada [51]. Outra aplicação sugerida é o uso como vaso artificial, devido a sua propriedade de reter o íon cálcio e supostamente evitar a formação de arteriosclerose [52,53].

2.3. Quitina e Quitosana

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante no planeta, ficando atrás apenas da celulose. Está presente na carapaça de crustáceos, em insetos. Daí vem seu nome, que deriva do grego e significa armadura [54]. Sua denominação científica é poli[β -(1 \rightarrow 4)-2-acetoamida-2-deoxi- β -D-glicose]. Sua estrutura pode ser visualizada na Figura 3.5. Apresenta baixa resposta imune e é um material altamente insolúvel e de baixa reatividade química. São propriedades muito semelhantes à da celulose, diferenciando-se quimicamente dela apenas pela substituição do grupamento hidroxila em C-2 por um grupamento acetoamida [55].

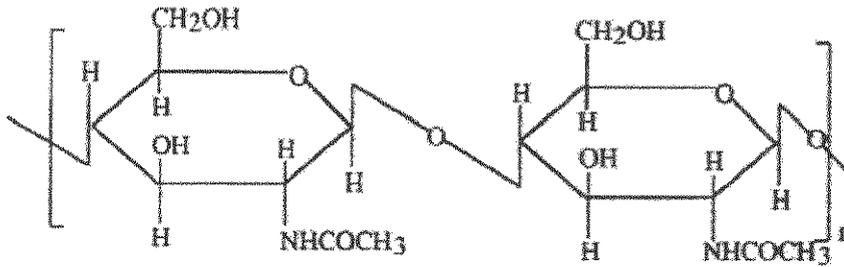


Figura 3.5: Estrutura da Quitina.

A quitosana é um produto derivado da quitina, obtido por uma reação de desacetilação. Sua denominação científica é poli[β-(1→4)-2-amino-2-dioxo-D-glicose]. Sua descoberta data de 1859, quando Rouget se referiu pela primeira vez a essa reação [56, *apud* 57]. Sua estrutura é mostrada na Figura 3.6. A desacetilação tem um impacto considerável em suas propriedades. Normalmente, considera-se quitosana a quitina cujo índice de desacetilação superior a 60% [58].

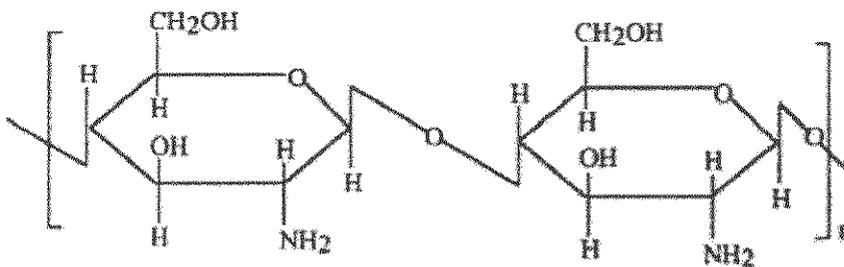


Figura 3.6: Estrutura da Quitosana

A quitina utilizada para a produção de quitosana pode ser obtida por processamento de cascas de crustáceos, como o caranguejo, ou através da fermentação realizada por certas espécies de fungos. No processamento das cascas, é necessário que haja antes, remoção do carbonato de cálcio e das proteínas. Em ambos os casos, a desacetilação é feita através de reação com hidróxido de sódio a 40%, durante algumas horas [55].

A quitina é altamente hidrofóbica, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em cloro-álcoois associados a ácidos minerais, hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetona e dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de

lítio [55]. A quitosana é mais facilmente solubilizada, sendo isso possível através do uso de ácidos diluídos. Além disso, apresenta uma propriedade rara em polieletrólitos catiônicos: é um agente quelante eficiente [54,59]. Esta propriedade se deve à presença de dois pares de elétrons não ligantes do nitrogênio.

A quitosana tem propriedades que a tornam excelente para aplicações biomédicas [59]. Apresenta baixa resposta imune, além de poder ser usada para inibir a fibroplasia em ferimentos, acelerando sua cicatrização. Culturas celulares mostram que promove crescimento e diferenciação celular. Além disso, possui atividade bactericida, e é altamente biocompatível. Essa aplicação fina, inclusive, condiz com seu valor de mercado, cerca de U\$0,75/g [55,60].

Um exemplo mais específico é a sua utilização em engenharia de tecidos. Aparentemente, a semelhança da quitosana com as glicosaminas existentes na pele a torna ideal como substrato de crescimento para este tecido. Yamaguchi *et al.* [61] sugeriram o uso desse material, associado com hidroxapatita na forma de tubos, como substrato para regeneração de tecido nervoso periférico, sendo que testes em ratos obtiveram sucesso.

Outro ponto no qual a quitosana tem sido aplicada com sucesso é na liberação controlada de fármacos. Uma das suas propriedades é a capacidade de aderir às mucosas, o que a torna apta a liberar medicamentos em pontos específicos do corpo, com conseqüente redução dos efeitos colaterais e um melhor aproveitamento da droga. Um exemplo é o da elaboração de um sistema contendo amoxicilina que aderiria à mucosa estomacal, liberando então o medicamento, utilizado no tratamento de *Helicobacter pylori* [57, 62, 63].

Além disso, a quitosana pode ser utilizada juntamente com fosfatos de cálcio na fabricação de compósitos para substituição de tecidos ósseos. Yamaguchi [60] sugeriu o uso de tais compósitos como uma maneira de compensar a fragilidade mecânica da hidroxapatita. Em um método de coprecipitação similar ao que foi usado neste trabalho obtiveram um compósito homogêneo e flexível. Entretanto, utilizaram quantidades de quitosana próximas a de fosfato de cálcio. Outra vantagem da utilização de compósitos quitosana-fosfatos de cálcio é a maximização da osteocondutividade. Isso decorre, segundo Wan *et al.*, da ação dos grupamentos iônicos presentes na matriz polimérica, que atrairiam

os íons cálcio à medida que a cerâmica se degradasse, dando origem a um processo de degradação e crescimento tecidual auto-sustentado. [63,64].

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

4.1.1 Fontes de Cálcio e Fosfato

Diversas fontes de cálcio e fosfato podem ser usadas na obtenção de fosfatos de cálcio através dos métodos de precipitação. A literatura cita, por exemplo:

- a) Ca(OH)_2 e H_3PO_4 [65];
- b) CaCl_2 e Na_3PO_4 [46];
- c) $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ [40].

Misturas entre as alternativas acima também são encontradas, além de outras fontes menos comuns, como acetato de cálcio. Dada à baixa reprodutibilidade e a grande sensibilidade a pequenas variações nos parâmetros reacionais normalmente encontrada nos métodos de precipitação, a escolha dos reagentes é um passo fundamental. Vallet-Regí e Gonzáles-Calbet [40] citam a última das alternativas acima como sendo uma das melhores fontes, devido ao fato que seus subprodutos são íons (NH_4^+ , NO_3^-) que não são facilmente incorporados à rede cristalina. Dessa forma, foram escolhidos como fontes de fosfato e cálcio, respectivamente, o nitrato de cálcio (Merck, 99%) e o fosfato dibásico de amônio (Merck, 99%). Ambos foram usados sem purificação posterior.

Deve ser observado que quase todos os fosfatos de cálcio, com exceção do fosfato tetracálcio, apresentam razão Ca/P que é inferior a 1,67. Dessa forma, essa foi razão Ca/P escolhida para ser utilizada em todos os experimentos. O volume das duas soluções foi o mesmo em todos os experimentos, de forma que para as concentrações utilizadas a razão Ca/P fosse constante, e fossem minimizadas as mudanças nos parâmetros reacionais. Os

valores, mostrados na Tabela 3.1, foram escolhidos de forma a se obter uma quantidade apreciável de amostra para análise e usos em experimentos posteriores.

Tabela 4.1: Concentração das soluções utilizadas como fontes de cálcio e fosfato.

Reagente	Concentração (M)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2505
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,15
Razão Ca/P*	1,67

* Foram utilizados volumes idênticos de solução (250 mL).

4.1.2 Biopolímeros

Foi utilizado alginato de sódio (VETEC) sem purificação posterior. A quitosana utilizada (Sigma-Aldrich, índice mínimo de deacetilação de 85%), entretanto, necessitou de purificação. Essa necessidade deriva da própria forma de obtenção do material, na qual a quitina é desacetilada através de reação heterogênea com o NaOH, e da sua forte natureza associativa [50].

Procedeu-se a purificação da quitosana através de um sistema de dissolução/filtração/reprecipitação, semelhante ao empregado por Signini [66]. Inicialmente foi pesado aproximadamente 1 grama de quitosana. Essa massa foi dissolvida em 500 mL de solução de ácido acético a 1% (V/V), através de agitação por 24 horas. A solução foi então submetida à filtração sob pressão reduzida, procedendo-se a reprecipitação através do gotejamento de NH_4OH concentrado. O precipitado foi separado por filtração e em seguida submetido à lavagem com água deionizada. O material era então redissolvido, sendo que esse procedimento foi executado por 3 vezes. A secagem foi feita à temperatura ambiente. Um fluxograma do procedimento é mostrado na Figura 4.1.

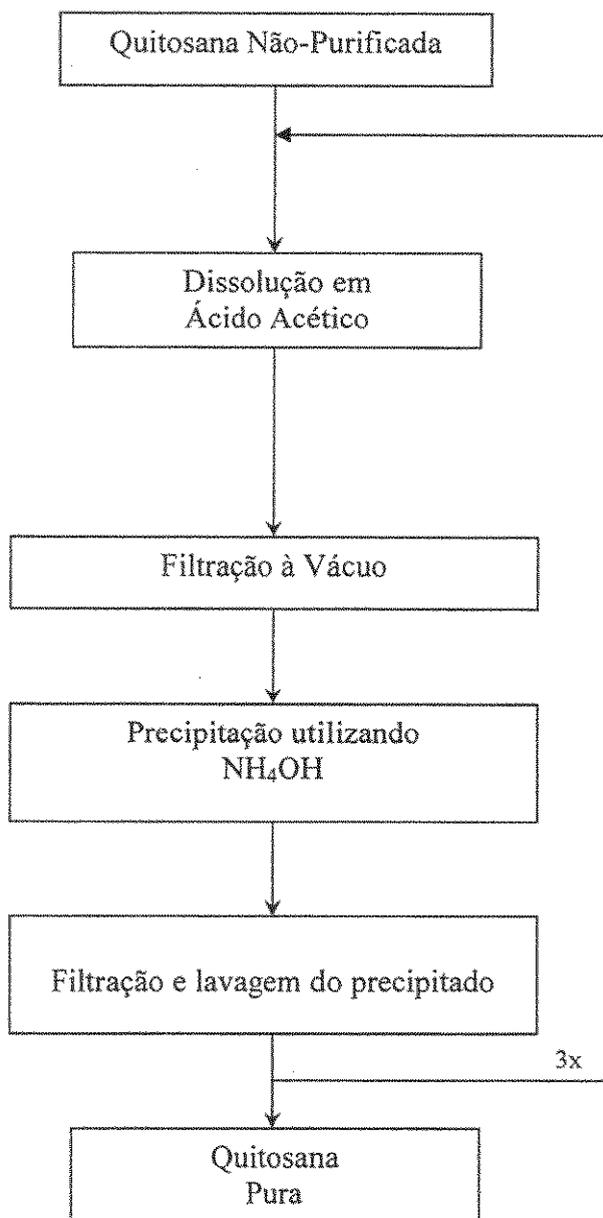


Figura 4.1: Fluxograma do Procedimento de Purificação da Quitosana

4.2 ENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO

4.2.1 Precipitação na presença de alginato

4.2.1.1 Precipitação de fosfatos de cálcio dopados com alginato

Neste ensaio, foram preparadas 250 mL de solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, com as concentrações anteriormente especificadas. Esta quantidade foi utilizada em todos os ensaios de precipitação citados daqui por diante, de forma a se obter uma quantidade de amostra que fosse suficiente para análise e experimentos posteriores. Um total de 1,00 g de alginato foi cuidadosamente pesado em balança analítica, dissolvido em água deionizada quente, resfriado e aferido para 500 mL em balão volumétrico. Aliquotas dessa solução eram retiradas e dissolvidas para a concentração desejada.

A reação foi executada em um béquer de polietileno, contendo inicialmente 50 mL de água deionizada ou de solução de alginato. Os ensaios foram realizados em três concentrações de alginato: 0 (branco), 7 e 70 ppm. A concentração foi calculada tendo por base o volume final do meio, que era de 570 mL, sendo 500 mL das soluções de cálcio e fosfato, 50 mL da solução de alginato e 20 mL de água deionizada para retirar os restos dos reagentes que porventura pudessem estar ainda aderidos aos balões, de forma a minimizar a perda de reagente e garantir que a razão Ca/P fosse efetivamente de 1,67.

Deve ser destacada a importância do ensaio em branco ou controle nos experimentos realizados nesse trabalho. Como já foi discutido no capítulo 3, o processo de obtenção de fosfatos de cálcio por precipitação é caracterizado por dificuldades em relação à sua reprodutibilidade. Nessa situação, é de grande importância ter um padrão de comparação que permita diferenciar o comportamento do sistema em condições padrões, ou condições de controle, do comportamento obtido na presença de biopolímeros. Dessa forma pode-se, comparando os resultados do branco com os resultados obtidos em condições de precipitação heterogênea, diferenciar e isolar os efeitos dos biopolímeros. Assim, os brancos permitem comparar ensaios realizados dentro da mesma série, ou seja, seguindo nos mínimos detalhes o procedimento utilizado na precipitação, sendo a única diferença a ausência do biopolímero.

Ao meio, mantido sob agitação, foram adicionadas as soluções gota a gota, de forma tal que a taxa de adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ fosse o dobro da taxa do $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. O objetivo foi manter uma concentração inicial de cálcio superior a de fosfato, tendo em vista :

- 1) Maximizar a probabilidade de interação alginato/cálcio.
- 2) Produzir uma assimetria que facilitasse a comparação entre os dados obtidos nos brancos e nos que utilizassem biopolímeros.

Note que uma certa assimetria na taxa de adição é de certa maneira encontrada em todos os processos de precipitação feitos em escala laboratorial. Como a adição é feita gota-a-gota, e não se costuma utilizar um meio diluente, geralmente se adiciona um dos reagentes sobre o meio reacional que contém previamente o outro.

Observe que, devido à assimetria, terminava-se a adição de cálcio antes da de fosfato, que continuava sendo adicionado normalmente, na mesma velocidade. Terminada a adição dos reagentes, o pH era medido, deixava-se o meio reagindo por uma hora, sendo após isso separado em duas partes. Uma das partes recebia adição de NH_4OH até que o pH alcançasse o valor de aproximadamente $8,4 \pm 0,1$. Assim, poder-se-ia entender como o alginato influenciaria o meio em duas condições diferentes. O pH foi escolhido de forma que não fosse muito próximo ao neutro, nem muito alcalino. Esse valor é, na verdade, uma unidade superior ao normalmente encontrado no plasma humano, que é de 7,4.

A parte que não sofreu ajuste de pH, daqui por diante chamada de ácida é filtrada e lavada com água deionizada. A porção que sofreu adição, chamada de porção básica, reagiu por mais uma hora, foi filtrada e então lavada com água deionizada. As duas porções foram secas em estufa a 100°C por 12 horas. O fluxograma do processo é mostrado na Figura 4.2. As amostras produzidas por esse procedimento são mostradas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Amostras de fosfato de cálcio produzidas através da precipitação na presença de alginato

Amostra	Concentração de Alginato (ppm)	pH final
Branco Ácido	0	5,4
Branco Básico	0	8,4
Alginato Ácido 1	7	5,4
Alginato Básico 1	7	8,4
Alginato Ácido 2	70	5,4
Alginato Básico 2	70	8,4

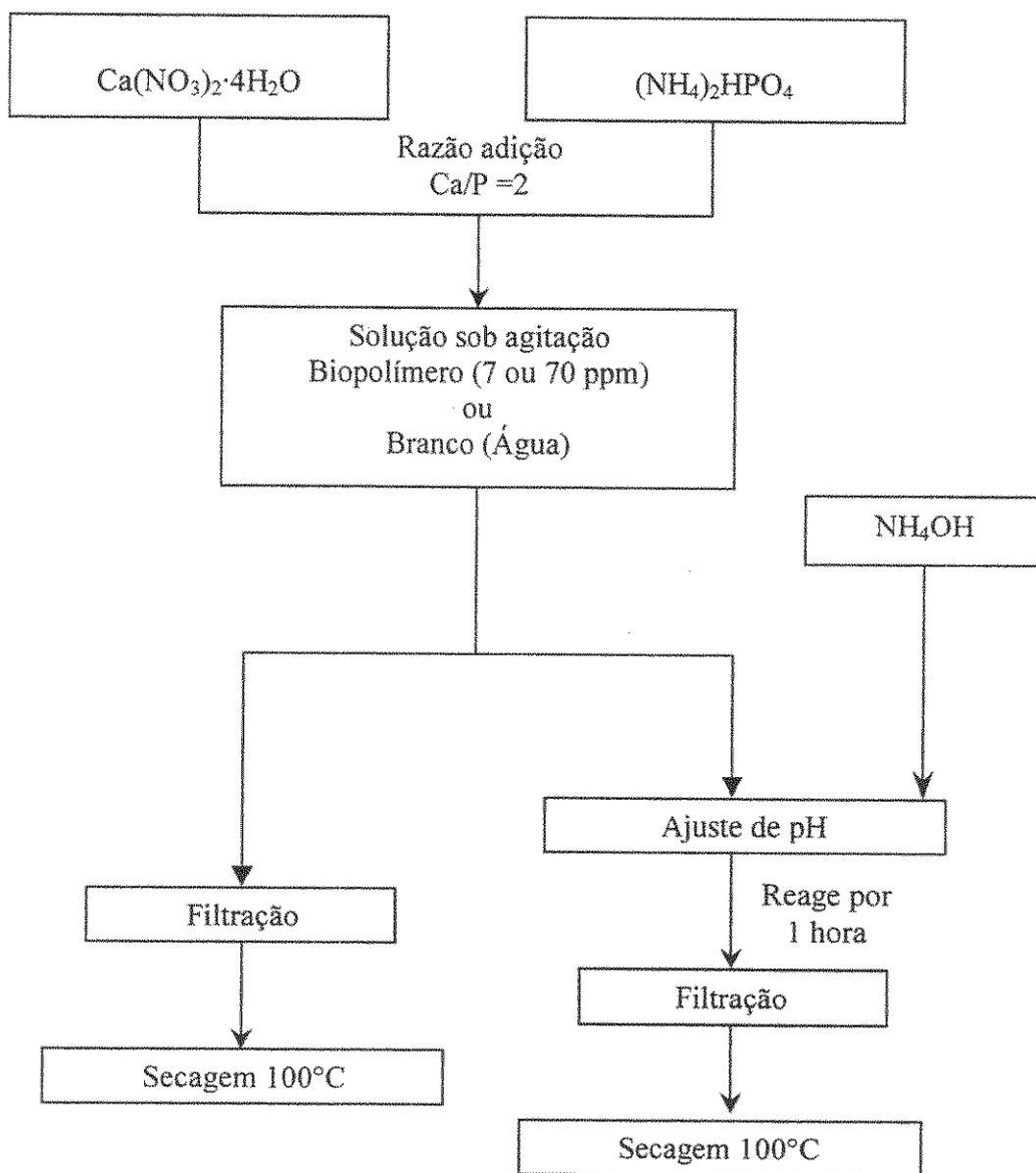


Figura 4.2: Fluxograma do processo de produção de fosfato de cálcio dopado com alginato

4.2.1.2 Precipitação no pH de estabilidade da hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio estável em pHs mais elevados. Dessa forma, a grande diferença deste procedimento em relação ao mostardo no item 4.2.2.1 é a adição de 10 mL de NH₄OH puro ao meio reacional, antes do cálcio e do fosfato, de forma a levar o meio reacional à zona de estabilidade dessa fase. A quantidade de hidróxido de amônio foi calculada tendo por base a reação de formação da hidroxiapatita, como apresentada por Vallet-Regí e Gonzáles-Calbet [40] e acrescentando um fator de segurança de 20%, como forma de compensar a grande volatilidade desse reagente:



Nesse caso, as taxas de adição das fontes de cálcio e fosfato foram mantidas iguais. Houve dois motivos principais para isso:

- 1) A assimetria já teve seu efeito estudado no caso anterior.
- 2) A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio facilmente sujeito a substituições e a cristalinidade do pó obtido em temperatura ambiente por precipitação é normalmente baixa. Assim, eventuais mudanças na estrutura cristalina poderiam não ser facilmente perceptíveis e/ou conduzir a erros de avaliação. Ou seja, em vez de ajudar a desvendar o mecanismo de reação, a assimetria poderia confundir ainda mais o problema.

É comum que, durante o processo de produção da hidroxiapatita haja um tempo de digestão. Em situações normais, este permitiria a incorporação de íons carbonato à rede. Além disso, diversas propriedades, como cristalinidade e morfologia do material são alteradas [67]. No caso da dopagem com biopolímeros, seus efeitos são desconhecidos, e parte do material produzido foi separada, filtrada, lavada e seca a 100°C por 12 horas. Outra parte fez digestão por um período de 12 horas (*overnight*), sendo, após isso, submetida ao mesmo processo. Dessa forma, poder-se-ia averiguar a importância do amadurecimento na interação HA- alginato.

As concentrações de alginato utilizadas foram as mesmas do ensaio anterior. As amostras obtidas são apresentadas na Tabela 4.3, e o fluxograma do processo é apresentado na Figura 4.3. Observe que o volume do meio reacional se manteve igual, em 570 mL, pois apenas 10 mL foram utilizados na lavagem dos balões. O pH das amostras foi medido ao final da reação, sendo de aproximadamente 9,5 ($\pm 0,1$).

Tabela 4.3: Amostras produzidas utilizando alginato no pH de estabilidade/HA

Amostra	Envelhecimento	Conc. de Alginato (ppm)
Branco HA Alginato Pré	Não	0
Branco HA Alginato Pós	Sim	0
Alginato HA Pré 1	Não	7
Alginato HA Pós 1	Sim	7
Alginato HA Pré 2	Não	70
Alginato HA Pós 2	Sim	70

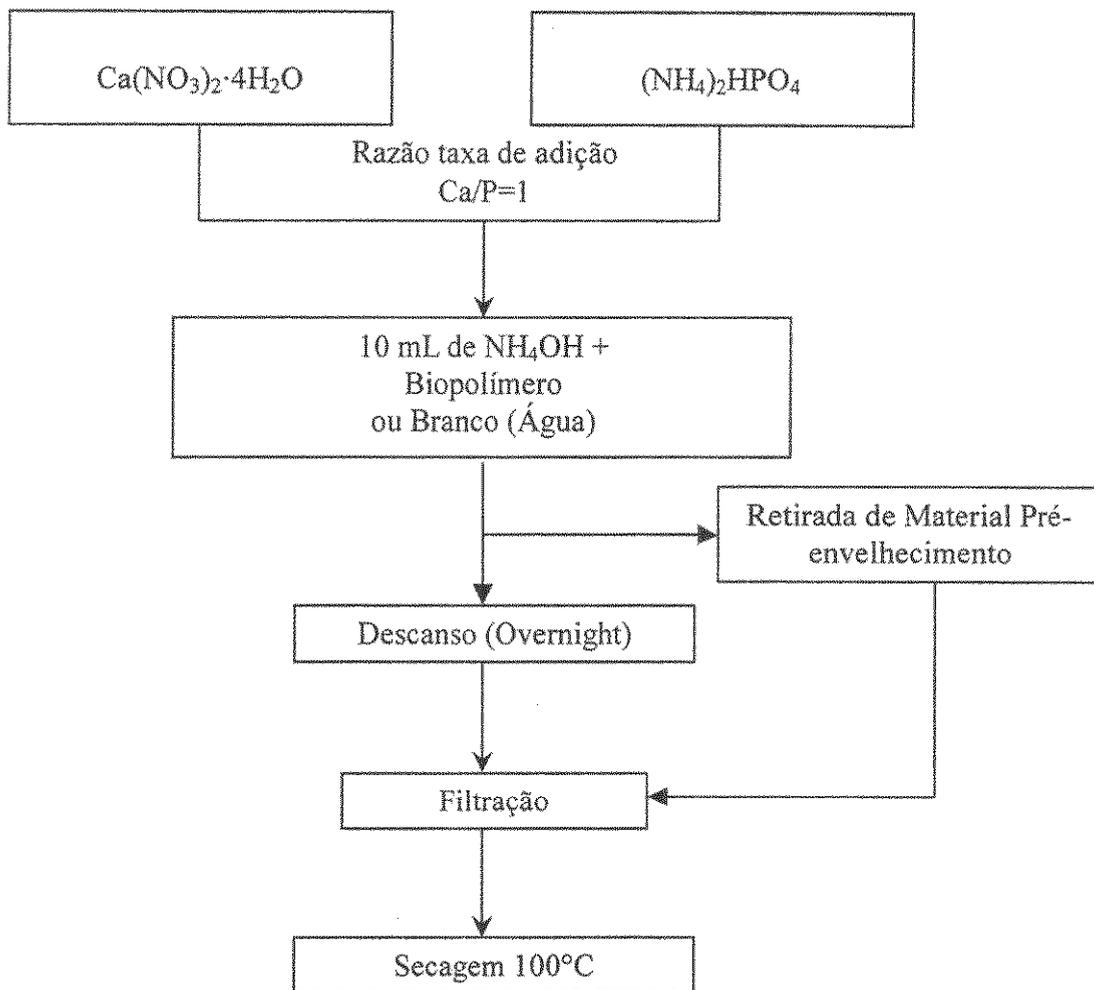


Figura 4.3: Fluxograma do processo de obtenção de hidroxiapatita dopada com alginato.

4.2.2 Precipitação na presença de quitosana

4.2.2.1 Precipitação de fosfatos de cálcio dopados com quitosana

Esse procedimento é praticamente igual ao executado com alginato, sendo diferente apenas em dois pontos. O primeiro deles é a preparação da solução inicial de quitosana. Nesse caso, 0,1021 gramas de quitosana purificada foram dissolvidos em ácido acético 1% (V/V), por agitação durante 72 horas, depois do qual foi obtido um líquido claro e homogêneo. O volume final foi ajustado para 50 mL em balão volumétrico com mais ácido acético 1%, sendo que depois de vigorosa homogenização mecânica a mesma foi deixada em repouso por 24 horas. A concentração final no meio reacional foi, na verdade, de 7,2 e

72 ppm. O segundo ponto é o branco utilizado. Enquanto no caso do alginato, água deionizada foi o branco, nesse processo utilizou-se uma solução de ácido acético 1%(V/V) sem quitosana adicionada. As amostras obtidas são mostradas na Tabela 4.4. O fluxograma do processo é praticamente idêntico ao mostrado na Figura 4.2, diferenciado-se apenas em relação ao material do branco.

Tabela 4.4: Amostras produzidas por precipitação de fosfatos de cálcio dopados com quitosana.

Amostra	Concentração de Quitosana (ppm)	pH final
Branco Quitosana Ácido	0	4,9
Branco Quitosana Básico	0	8,4
Quitosana Ácida 1	7,2	4,8
Quitosana Básica 1	7,2	8,4
Quitosana Ácida 2	72	4,9
Quitosana Básica 2	72	8,4

4.2.2.2 Precipitação com quitosana no pH de estabilidade da Hidroxiapatita.

A precipitação de fosfatos de cálcio em pHs elevados apresenta um problema quando feita na presença de quitosana: esse biopolímero não é solúvel em meio alcalino. Dessa forma, não se poderia usar o procedimento anterior, sob pena de haver uma precipitação de quitosana antes de a reação ocorrer, ficando a mesma indisponível para participar da reação efetivamente.

Para resolver esse problema, criou-se um novo procedimento: em vez de se adicionar as fontes de cálcio e fosfato sobre um meio contendo o NH_4OH e a quitosana, agrupou-se os quatro elementos em duas duplas por ordem de similaridade. Dessa forma, a mistura $\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + quitosana foi adicionada, gota a gota, sobre a mistura $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + NH_4OH . Com isso evitou-se que o biopolímero fosse excluído da reação de precipitação.

As concentrações de biopolímero foram de 7,2 e 72 ppm, e a solução-mãe foi a mesma utilizada no procedimento descrito no item 4.2.2.1. Utilizou-se 50 mL da solução de

biopolímero, e a lavagem dos frascos, para garantir que todo cálcio fosse adicionado ao meio reacional, foi feita com 10 mL de água deionizada. Assim, o volume final do meio foi, novamente, de 570 mL. No branco utilizou-se água deionizada no lugar da solução de biopolímero. Os passos posteriores foram semelhantes ao do processo com alginato. Descanso (*overnight*), filtração e secagem. O fluxograma pode ser visto na Figura 4.4. As amostras são relacionadas na Tabela 4.5, e o pH final destas foi de aproximadamente 9,5 ($\pm 0,1$).

Tabela 4.5: Amostras Produzidas com Quitosana no pH de estabilidade da HA.

Amostra	Envelhecimento	Conc. de Quitosana (ppm)
Branco HA Quitosana Pré	Não	0
Branco HA Quitosana Pós	Sim	0
Quitosana HA Pré 1	Não	7,2
Quitosana HA Pós 1	Sim	7,2
Quitosana HA Pré 2	Não	72
Quitosana HA Pós 2	Sim	72

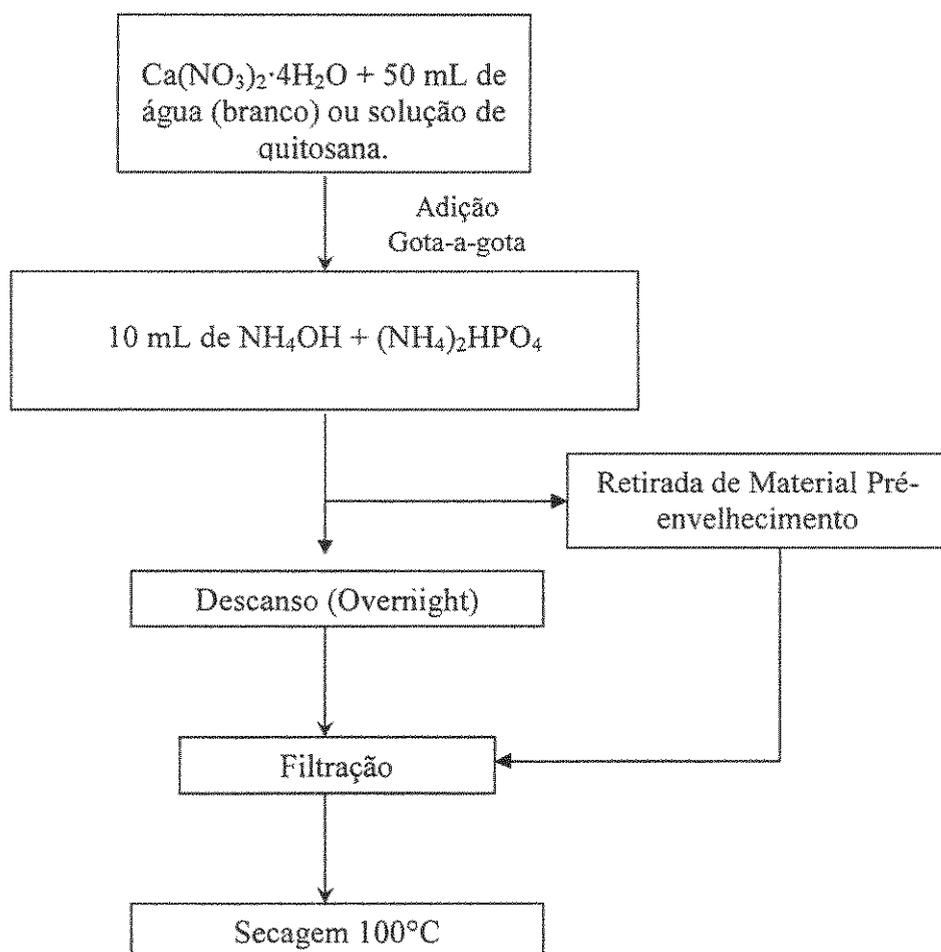


Figura 4.4: Fluxograma do Processo de Produção de Quitosana no pH de estabilidade da HA.

4.3 TRATAMENTO TÉRMICO

A principal aplicação do tratamento térmico em fosfatos de cálcio é na obtenção de novas fases e/ou modificações na microestrutura cristalina do material. Por exemplo, Albuquerque [65] obteve uma cerâmica trifásica (contendo hidroxiapatita e duas fases de fosfato tricálcio, α e β) após tratamento térmico a 1350°C .

Neste trabalho, o objetivo do tratamento térmico foi verificar como a adição de biopolímero influenciou a distribuição final de fases. Esse fator se reveste de maior importância no caso de amostras que contenham HA. As deficiências em cálcio, das

amostras produzidas por esse meio, podem resultar em cerâmicas bifásicas com diferentes razões HA/ β -TCP.

Neste trabalho, dois tipos de tratamentos térmicos foram executados, um a temperatura intermediária e outro a alta temperatura. Inicialmente, os pós foram comprimidos em pastilhas por aplicação de compressão uniaxial através de 20 MPa por 30s. No tratamento em temperatura intermediária, o material foi aquecido a uma taxa de 0,75°C/min, até atingir um platô de 550°C, no qual permaneceu por uma hora. Essa taxa de aquecimento objetivou uma saída lenta dos biopolímeros. No tratamento em alta temperatura, a taxa de aquecimento foi de 10°C/min, até atingir o platô de 1000°C, permanecendo constante por uma hora. Os pós co-precipitados com quitosana foram submetidos só a este último tratamento.

4.4 CARACTERIZAÇÃO

4.4.1 Difração de Raios-X

A difração da luz visível é um fenômeno conhecido, que pode ser facilmente observado, e ocorre quando esta encontra obstáculos cuja distância seja aproximadamente a mesma do seu comprimento de onda λ . Nesse caso, formam-se franjas de interferência, sendo que parte dos feixes difratados se reforça e parte se anula, dando origem a padrões compostos por regiões claras e escuras. Como os raios-X também são ondas eletromagnéticas, só que de energia muito maior, o seu comprimento de onda, inversamente proporcional, é muito pequeno, na verdade da ordem mesma ordem de grandeza que as distâncias interplanares. Assim, feixes de raios-X emitidos sobre cristais estão sujeitos à difração, em ângulos específicos, que dependem da geometria do cristal e do comprimento de onda da radiação incidente, estando os três relacionados pela lei de Bragg.

Dessa forma, o difratograma obtido permite obter informações sobre a estrutura cristalina do material analisado. Os fosfatos de cálcio podem se organizar em uma vasta gama de fases, possuindo cada qual comportamento mecânico, físico-químico e fisiológico diferente. A identificação da composição de fases é obtida primariamente por esse método. Deve-se ressaltar, entretanto, que devido ao fato de haver uma semelhança muito grande

entre os parâmetros de rede das diversas fases, pode-se obter difratogramas onde os máximos se sobreponham. Nesse caso, são necessárias análises mais aprofundadas, como a microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, sendo que a diferenciação é feita através da comparação das intensidades das zonas de Laue alinhadas em relação a determinados planos [34,35].

Nesse trabalho, a análise de fases foi feita através da Difração de Raios-X utilizando radiação $\text{CuK}\alpha_1=0,1542\text{nm.}$, 40kV, 40mA. As varreduras foram feitas em diferentes intervalos 2θ , dependendo da amostra, mas sempre de forma a mostrar o intervalo entre 20 e 50°, onde a maioria dos máximos de difração ocorre nos fosfatos de cálcio. A amostra foi previamente homogeneizada por moagem, no caso dos pós. Algumas pastilhas que sofreram fraturas durante o processo de calcinação/sinterização foram moídas de forma a obter uma amostra homogênea. O difratômetro utilizado foi um Philips® X'Pert X-ray Diffraction System.

4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Quando um feixe de elétrons incide sobre um material ocorrem diversos tipos de interação. São produzidos entre outros Raios-X, elétrons Auger, elétrons retroespalhados e elétrons secundários. Esses dois últimos tipos são freqüentemente utilizados na microscopia eletrônica de varredura.

Nessa técnica, um feixe de elétrons “varre” cada ponto da área da amostra que se deseja observar. Em cada ponto, parte dos elétrons sofre colisões elásticas no interior da amostra, gerando elétrons retroespalhados. Outra parte, através de colisões inelásticas entre os elétrons do feixe e da amostra, gera elétrons secundários. A detecção da resposta de cada ponto permite gerar uma imagem ampliada da amostra, com alta profundidade de foco, o que uma das grandes vantagens desse método [68].

No caso de amostras com baixa condutividade elétrica, é comum que seja feito recobrimento com uma camada de ouro ou carbono, para evitar acúmulo de cargas e distorção da imagem obtida [68]. Nesse trabalho, dois métodos foram utilizados. No primeiro, as amostras foram prensadas e fixadas a uma placa de metal utilizando cola de

prata, recobertas com filme de carbono, e a microscopia foi realizada utilizando um microscópio Philips®, modelo XL-30. No segundo método, as amostras foram coladas sobre fita condutora, na forma de pó, e recoberta com ouro. Todas as imagens foram geradas através de elétrons secundários.

4.4.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia utilizando radiação na faixa do infravermelho tem utilidade especial na identificação química de compostos. Ao absorver radiação na região do infravermelho, há um aumento de amplitude e da velocidade de vibração em torno das ligações covalentes, sendo que essa absorção se dá de forma quantizada. A energia absorvida nos diversos comprimentos de onda pode ser relacionada, então, aos modos de vibração de determinados grupos funcionais, permitindo sua identificação [69].

Neste trabalho, as análises de FTIR foram realizadas em dois modos: por transmitância e por reflexão total atenuada (*ATR, Attenuated Total Reflection*). O primeiro foi utilizado para a análise dos pós, e o segundo na caracterização da quitosana, em intervalos de frequência de 4000-400 e 4000-700 cm^{-1} , respectivamente. Foi utilizado um Espectrofotômetro de IV, modelo Nicolet 800 associado a uma célula MTech PAS

4.4.4 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

As propriedades da quitosana são em grande parte devidas ao seu grau de desacetilação [40,43]. É interessante que, dada essa importância, esse índice seja de determinação tão complexa. Os métodos utilizados incluem espectroscopia no infravermelho, cromatografia gasosa e por permeação em gel, espectroscopia UV, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), dentre outros [55]. Todos apresentam grande discrepância entre si [53,54].

Raymond *et al.* [70] apresentaram um método interessante para determinar o grau de desacetilação, baseando-se em um método de titulação potenciométrica, recomendável quando este for superior a 5%. O método consiste em dissolver a amostra de quitosana em HCl, deixando-a tempo suficiente para que ocorra a protonação dos grupamentos amino. É

feita, a seguir, uma titulação potenciométrica com NaOH. Ocorrem dois pontos de viragem: no primeiro é neutralizado o excesso de ácido e no segundo os grupamentos amino que foram protonados. A diferença entre esses dois é utilizada para determinar o grau de desacetilação.

Detalhadamente, é adicionada uma quantidade conhecida de HCl 0,02M (25 mL), de forma a dissolver uma massa cuidadosamente pesada de quitosana (aproximadamente 0,1g). A mesma fica sob agitação por 24 horas, de forma a completar a dissolução e protonar os grupamentos amino disponíveis. É feita então a titulação potenciométrica utilizando NaOH 0,1 M, até pouco depois do segundo ponto de inflexão. A percentagem de grupamentos amino é calculada pela equação (4.1) [59,70]:

$$\%NH_2 = \frac{M_{NaOH} * (V_2 - V_1) * 161}{m} * 100 \quad (4.1)$$

onde M_{NaOH} é a molaridade do hidróxido de sódio utilizado, V_2 e V_1 são os volumes da segunda e primeira viragem, respectivamente; 161 é a massa da unidade monomérica da quitosana e m é a massa de quitosana analisada. Observe que mesmo que o volume de HCl adicionado não fosse conhecido poder-se-ia proceder a titulação normalmente, visto que a titulação de neutralização do ácido ocorre juntamente com a neutralização dos grupamentos amino. O importante é que esse volume seja suficiente para protonar toda amostra.

4.4.5 Determinação da Presença de Alginato no Sobrenadante

É de grande importância para a compreensão do mecanismo de reação determinar se o alginato é totalmente incorporado ao precipitado ou se parte dele permanece em solução. Para que isso fosse realizado, escolheu-se uma condição em que as análises de FTIR sugeriam (ver Capítulo 5) que havia pouco alginato incorporado ao precipitado.

Assim, realizou-se a precipitação como descrito em 4.2.1.1, com 70 ppm de alginato e sem ajuste de pH. Após esse processo a amostra não foi filtrada, mas submetida a uma secagem com temperaturas variando entre 50 e 70°C. Assim, as espécies presentes no sobrenadante são incorporadas ao precipitado, que foi posteriormente caracterizado por FTIR.

4.4.6 Determinação de birrefringência das amostras precipitadas com quitosana

Os biopolímeros utilizados na coprecipitação dos fosfatos podem causar a orientação não-aleatória dos cristais. Uma forma de se verificar se há orientação é a passagem de luz polarizada pelos cristais. Regiões que apresentem espalhamento da luz transmitida diferente do meio como um todo indicam que estas estão orientadas de forma não-aleatória. Este fenômeno é conhecido como birrefringência.

Para verificar esse efeito, as amostras foram dispersas em vaselina, colocadas em uma lâmina e observadas no microscópio óptico, utilizando luz transmitida. Quando a focalização havia sido executada, colocava-se um polarizador entre a fonte de luz e a amostra, sendo que o primeiro era girado, modificando a orientação do plano da luz incidente. Dessa forma, zonas que apresentavam diferente espalhamento de luz tornaram-se visíveis.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOPOLÍMEROS

5.1.1. Alginato

O alginato apresenta grupamentos carboxila nos seus dois monômeros, o ácido D-manurônico e o L-gulurônico. O pKa do primeiro é 3,38 e o do segundo 3,65 [72], o que implica em um ponto isoelétrico de aproximadamente 3,52. À medida que o pH aumenta, também aumenta o grau de dissociação do alginato, como mostrado na Tabela 5.1. Os valores de dissociação foram calculados com a equação de Katchalky [59], assumindo que o alginato seja composto de quantidades equimolares de ácido D-manurônico e L-gulurônico.

Logo, em pH maiores, a carga negativa líquida do biopolímero é maior, facilitando sua interação com íons positivos. Na verdade, em pHs menores do que 3, a dissociação é fortemente reprimida [72].

Tabela 5.1: Dissociação do alginato para diversos valores de pH

pH	α			
	4	6	8	10
D-manurônico	0,8065	0,9976	1	1
L-gulurônico	0,6912	0,9956	1	1

Observe que o maior responsável pelo efeito ionotrópico é o ácido L-gulurônico [22], que se dissocia menos do que o ácido D-manurônico.

5.1.2 Quitosana

A quitosana bruta, ou seja, antes do processo de purificação, consistia de um material amarelado, em forma de flocos. A dissolução completa desse material em ácido

acético 1% tomou um longo tempo, que chegou a ser superior a 24 horas. A solução obtida era muito viscosa, tornando indispensável a filtração sob pressão reduzida. Assim mesmo, o processo ocorreu de forma lenta, sendo que uma inspeção visual do meio de filtração revelou uma quantidade surpreendente de partículas estranhas, sendo que algumas tinham aspecto de madeira.

Nas etapas posteriores da purificação, observou-se uma redução significativa e crescente no tempo de filtração, relacionada a uma aparente redução da viscosidade. Como o processo não altera a estrutura química do material [66], acredita-se que a diminuição do teor de impurezas facilite o escoamento pela diminuição de interações moleculares entre estas e as moléculas de quitosana.

Para monitorar a eficiência da purificação, determinou-se o índice de desacetilação antes e depois desta. As Figuras 5.1 e 5.2 mostram os gráficos de potencial x volume e da derivada do potencial em relação ao volume versus o volume médio para a amostra antes e depois da purificação. Os pontos de inflexão da derivada foram utilizados para calcular o índice de desacetilação, através da equação 4.1. Os valores são mostrados na Tabela 5.2.

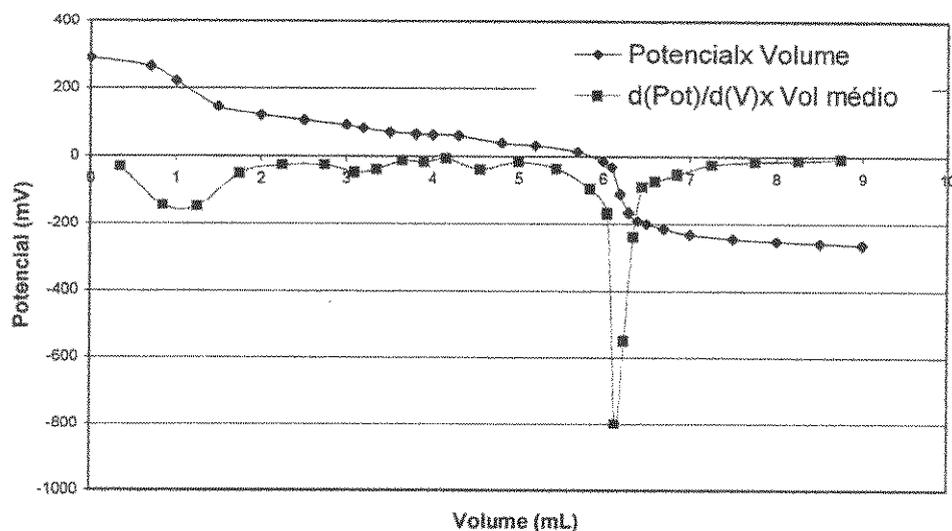


Figura 5.1: Gráfico Potencial x Volume e $d(\text{Pot})/d(V) \times \text{Vol médio}$ para amostra não-purificada de quitosana.

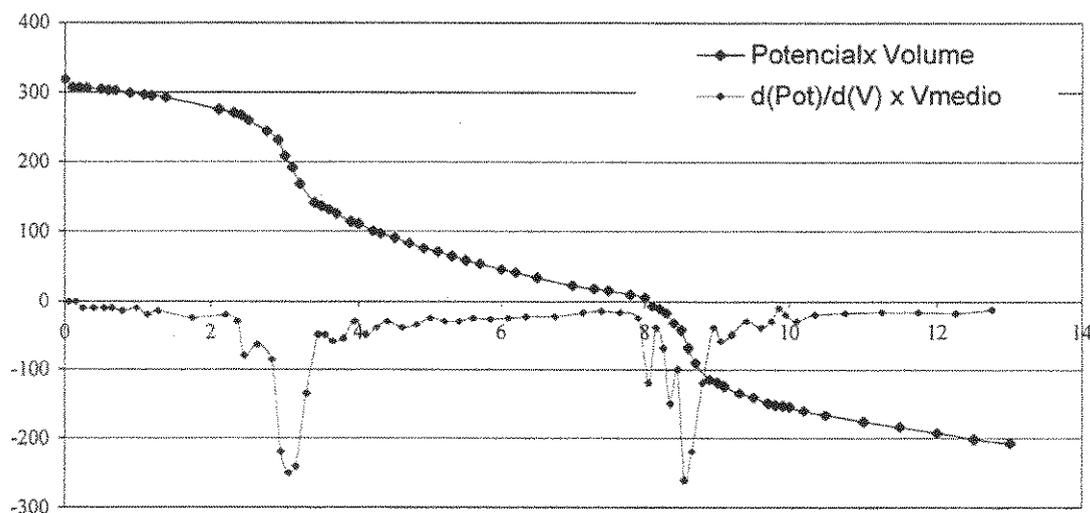


Figura 5.2: Gráfico Potencial x Volume e $d(\text{Pot})/d(V) \times \text{Volume médio}$ para amostra pura de quitosana.

Tabela 5.2: valores médios de índice de desacetilação para as amostras brutas e purificada de quitosana.

Amostra	%NH ₂ (média)
Quitosana Bruta	70.3%
Quitosana Pura	85.55%

Observa-se um claro aumento do índice de desacetilação, provavelmente resultado da retirada das impurezas. Deve-se, entretanto, discutir um outro fator. Antes da purificação, o índice de desacetilação estava bem abaixo do padrão assegurado pelo fabricante do reagente, sendo de cerca de 70%. Entretanto, após a purificação, encaixava-se perfeitamente, sendo pouco superior a 85%. Este fato não deixa de ser curioso, especialmente se for levado em consideração que há uma grande variabilidade entre os índices de desacetilação determinados pelos diversos esquemas de análise. Sabe-se, entretanto, que cada um desses esquemas baseia-se em diferentes interações físico-químicas, algumas sensíveis apenas aos grupamentos NH₂ existentes, como na análise de FTIR, onde a monitoração da intensidade dessas bandas é usada como forma de se determinar este índice.

O que se sugere é que o índice de desacetilação determinado pelo fabricante foi realmente de 85%. Entretanto, seu método de análise não seria sensível à quantidade de

impurezas existente. O método potenciométrico, ao contrário, baseia-se diretamente na massa utilizada para análise, e a presença de impurezas reduz diretamente o valor do índice de desacetilação por reduzir a quantidade de grupos amino primários da quitosana disponível para a reação.

Sugere-se que uma das causas da variabilidade nas determinações do índice de desacetilação da quitosana seja justamente a presença de material estranho nas amostras. A retirada das impurezas poderia reduzir ou minimizar esse efeito.

5.2 INFLUÊNCIA DO ALGINATO NA PRECIPITAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO

A influência do alginato nas fases foi verificada através da análise de difração de raios-X (DRX) dos pós obtidos nas diversas condições. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.3 e 5.4.

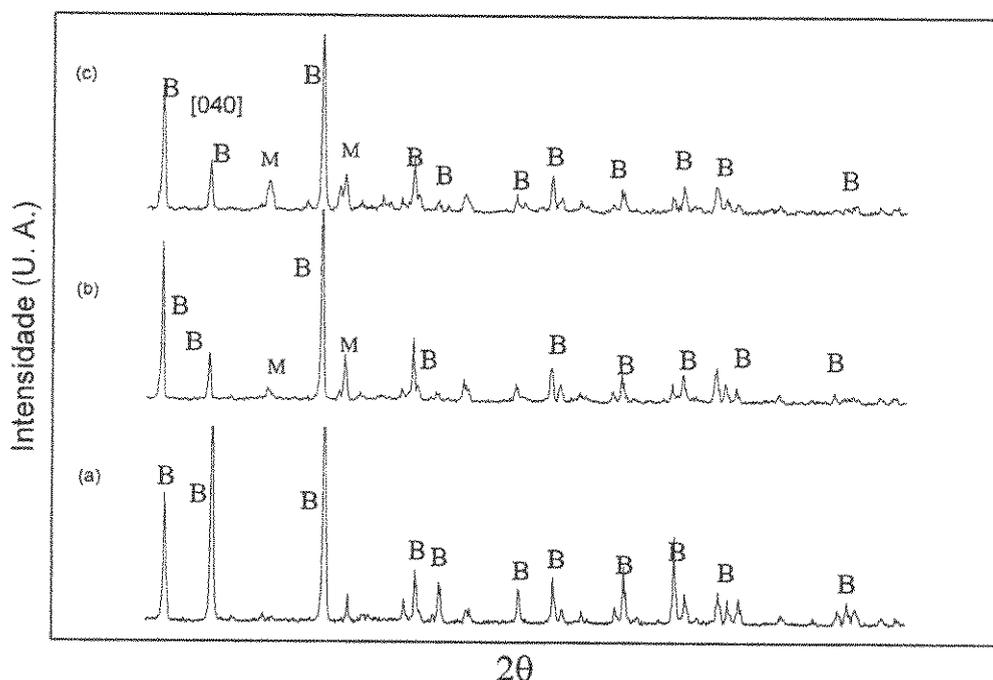


Figura 5.3: Difratograma dos pós obtidos em condição ácida. a) branco ácido, b) alginato ácido 1. c) alginato ácido 2. M indica monetita e B brushita.

O resultado de DRX dos ensaios em branco mostra que ambas as amostras são compostas principalmente por brushita. Isso não é surpreendente, já que é uma fase estável em meios fracamente ácidos, com pH entre 4 e 6 [37]. Além disso, deve-se observar que a mesma é, aparentemente, uma fase intermediária na reação de formação de hidroxiapatita nesse intervalo de pH [40].

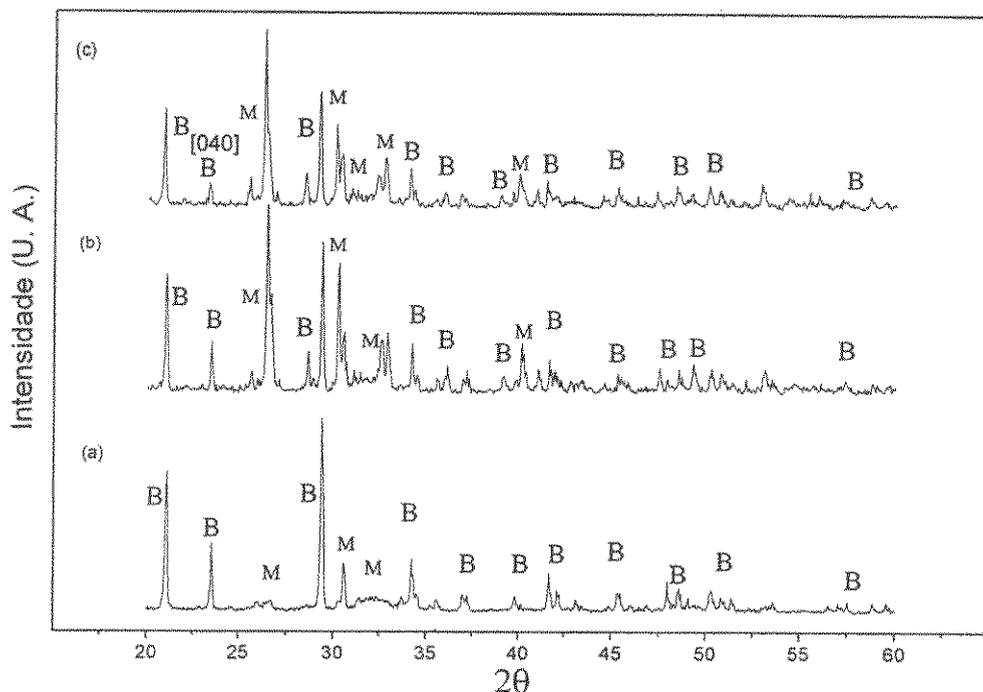


Figura 5.4: Difratoograma dos pós obtidos em condição alcalina. a) branco básico, b) alginato básico 1. c) alginato básico 2. M indica monetita e B, brushita.

O DRX do branco alcalino revelou a presença de picos em $2\theta=26.4$ e 30.4° , característicos da monetita. Sabe-se que, apesar da monetita ser a fase estável, a brushita é a fase metaestável, sendo produzida por ter uma cinética de formação facilitada em relação à primeira [7]. Entretanto, no processo de secagem, parte da brushita produzida no branco pode ser convertida para monetita. Esse processo realmente ocorre para o branco alcalino, provavelmente porque o pH relativamente elevado de precipitação afete a interação entre os íons cálcio e as moléculas de água.

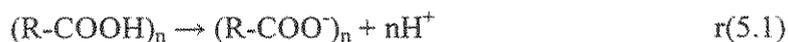
A adição de alginato exerce um forte efeito na composição de fases, e este efeito depende fortemente do pH do meio. Em meio ácido, surgem pequenos picos de monetita, enquanto em meio alcalino esses picos são mais fortes, superando em intensidade os de brushita. Esse fenômeno pode ser compreendido, se relacionado às propriedades deste biopolímero. O alginato é um carboidrato, composto pela associação dos ácidos de L-

Gulurônico e D-Manurônico, conectados entre si através de uma ligação $\beta 1 \rightarrow 4$. A Figura 3.3 mostra sua estrutura:

Além da estrutura da cadeia, é interessante notar a presença dos grupos funcionais hidroxila e, principalmente, carboxila. Este é o principal responsável por grande parte das interações em solução desse composto. De fato, esse grupo funcional é o responsável pela diferente distribuição de fases nas amostras.

Na formação de compostos com água de composição, é comum que esta se ligue diretamente ao metal. Dessa forma, as moléculas de H_2O presentes na brushita estão diretamente ligadas ou são fortemente atraídas pelos íons cálcio, devido à sua natureza de dipolo permanente. Entretanto, a presença de alginato afeta a capacidade de interação desse íon. Sabe-se que o alginato se liga fortemente ao íon cálcio, apresentando atividade antimeralizante [52,53]. Parte desse efeito se deve justamente à presença dos grupamentos carboxila, que é o ponto onde ocorre a ligação com o cálcio. Manoli e Dalas [53] sugerem que essa ligação com o alginato impede o desenvolvimento de certas estruturas por tornar sítios de cristalização na superfície dos cristais inativos. Além disso, sabe-se que a associação cálcio-polieletrólitos em geral é hidrofóbica [27].

O efeito do pH nas fases é explicável levando-se em conta somente o efeito dos radicais. Alginato em solução pode sofrer dissociação, segundo a reação r(5.1):



onde $(R-COOH)$ é uma representação simplificada do alginato não-dissociado. É fácil observar que um aumento no pH do meio desloca o equilíbrio para a direita, resultando em grupamentos carboxila dissociados. Desta forma, o alginato em pHs elevados apresenta uma carga líquida negativa maior em sua superfície, resultando em uma maior eficiência na interação cálcio/alginato, levando a uma diminuição da atividade em solução do primeiro devido a um aumento relativo na deste último. Ou seja, o fato do efeito do alginato na distribuição de fases ser afetado pelo pH do meio, leva a crer que exista uma contribuição fundamental de seu comportamento elétrico em solução.

Esta teoria é confirmada pelos dados de FTIR, mostrados nas Figuras 5.5 e 5.6, que mostram, respectivamente, o resultado dessas análises em meio ácido e básico. A maior

parte dos picos é característica da brushita, como relacionado na Tabela 5.3 [73]. As análises realizadas em material precipitado em meio ácido são muito parecidas, concordando com os difratogramas. Entretanto, nas amostras com alginato em pH alcalino ocorrem algumas mudanças. A primeira delas é relacionada com a mudança na composição de fases. Há uma redução de intensidade do pico largo relacionado à água, ao redor de 3500 cm^{-1} . Esta redução é conseqüência da presença de monetita. Como este é um composto anidro, a quantidade de água de composição na amostra diminui, com a conseqüente redução da intensidade dessa banda.

Mais interessante é a presença de picos na região ao redor de 1400 cm^{-1} . Esses picos são relacionados a ligações dos radicais carboxila [74], sendo indicados nas Figuras 5.5 e 5.6 pelo símbolo ***. Estas ligações aparecem com intensidade muito fraca nas amostras alginato ácido 1 e 2, mas são bem mais intensas nas amostras alginato básico 1 e 2. Isto evidencia que a alteração do pH leva a um aumento da dissociação desses grupamentos, aumentando sua interação com as espécies iônicas em solução.

Outra evidência que o aumento do pH leva a uma melhor associação entre espécies iônicas e alginato é a presença, ainda que fraca, de bandas associadas aos grupamentos metila característicos da estrutura desse sacarídeo [74]. Estas bandas não aparecem nas amostras produzidas em meio ácido e nem nos brancos. Levando-se em conta que o alginato foi adicionado em pequenas quantidades, o aparecimento destas é significativo, e pode-se supor que em pHs elevados, a incorporação de alginato pelo precipitado seja maior.

Tabela 5.3: Números de onda característicos de amostras de brushita/FTIR [73].

Modo Vibracional	Número de Onda (cm^{-1})*
Torção OPO	519,535,583
Estiramento POH	875,2140,2270,2380,2930
Torção POH	785, 1200,1215
Estiramento PO	984,1057,1075,1123,1140
Estiramento ($_2\text{O}$)	1650
H_2O (diversos modos)	3160,3280,3490,3535.

* números em itálico indicam bandas fracas.

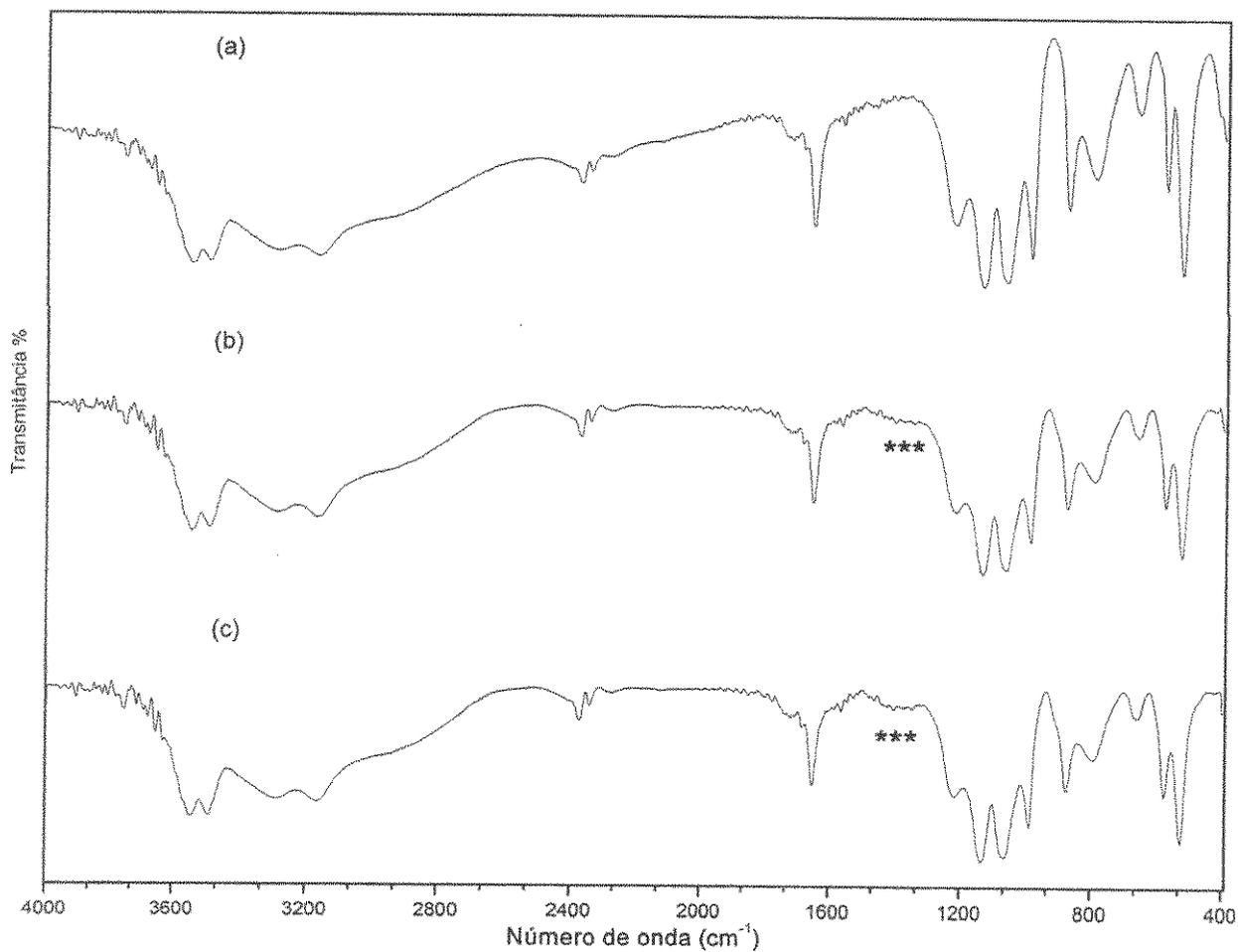


Figura 5.5: FTIR de amostras precipitadas em meio ácido. (a) Branco ácido, (b) alginato ácido 1 e (c) alginato ácido 2.

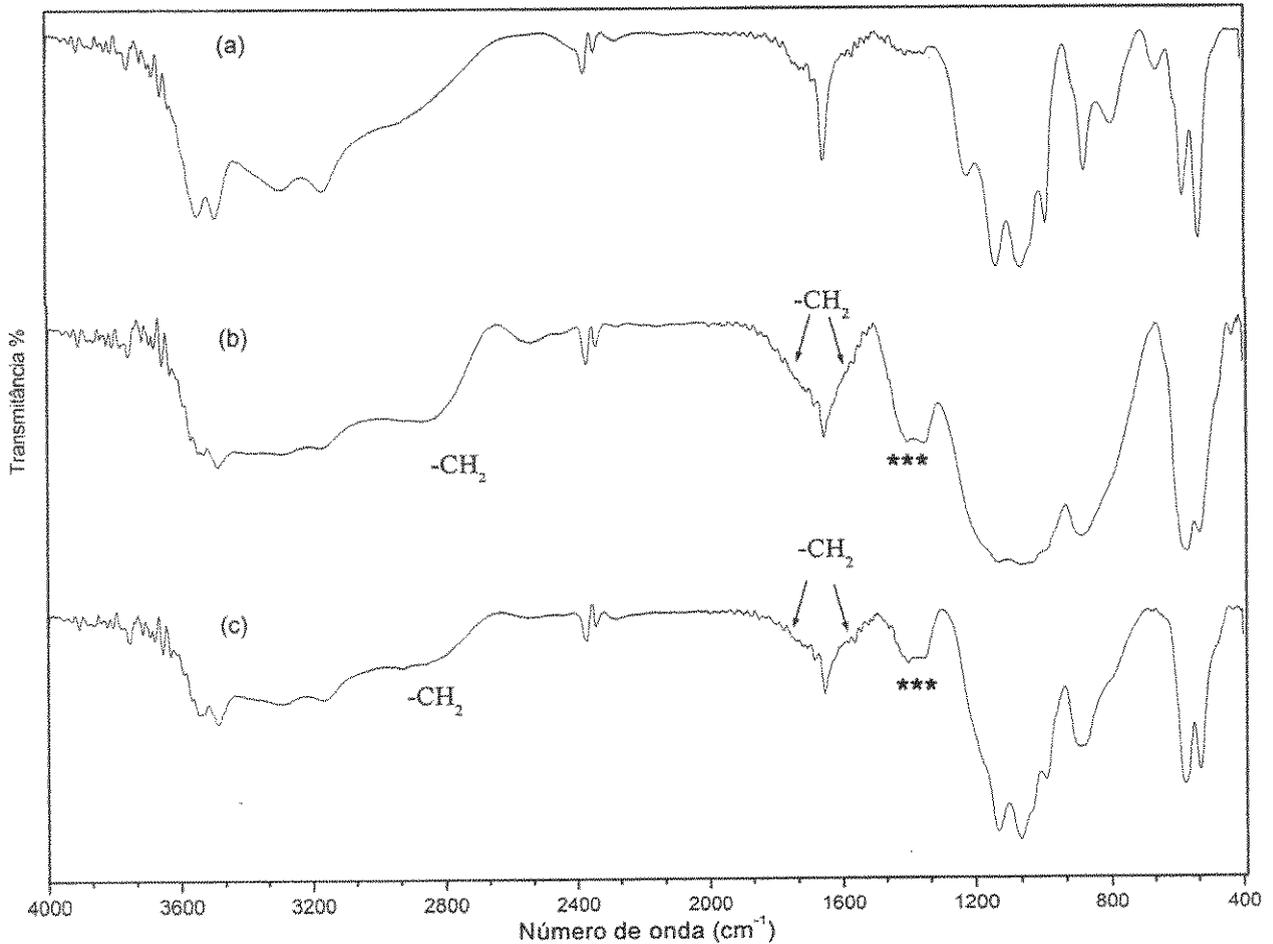


Figura 5.6 Análise de FTIR de (a) Branco básico, (b) alginato básico 1 e (c) alginato básico 2.

Outro fator de importância é que há uma aparente redução da intensidade da banda ao redor de 1400 cm⁻¹ na amostra alginato básico 2, quando comparada com alginato básico 1. Este fator traz mais um aspecto até agora relegado nessa discussão: o efeito ionotrópico.

A presença de íons divalentes em solução de polieletrólitos como o alginato leva a formação de reticulados, ocorrendo a contração das cadeias do alginato. Isto resulta na formação de redes poliméricas bem organizadas, com a presença de capilares e a precipitação de géis [75,76]. Sugere-se que esta associação possa ter dois aspectos que, no

caso, tenderiam a ser opostos: as forças moleculares entre alginato e fosfato de cálcio e a difusão de reagentes, em especial os íons fosfatos, para o interior deste gel capilar.

Quanto ao primeiro, é necessário que se faça, antes, um breve estudo da estrutura cristalina da brushita e da monetita. A diferença básica entre esses dois compostos é a presença de água de composição. Esta água de composição é mantida estável no primeiro composto pela presença de pontes de hidrogênio entre fosfato e moléculas de água. A estrutura da monetita pode ser observada na Figura 5.7 [77]. Os tetraedros representam os grupos fosfato volumosos.

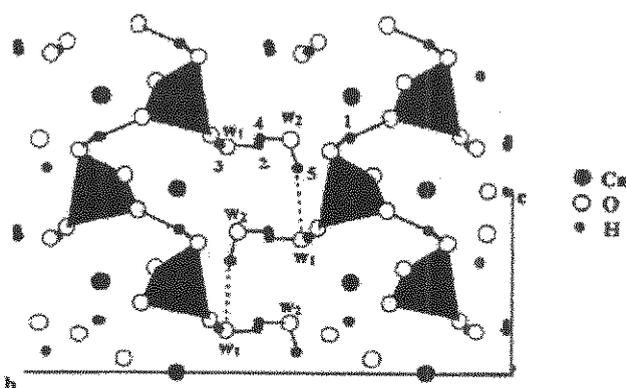


Figura 5.7: Estrutura cristalina da brushita, retirada de [77].

O primeiro aspecto diz respeito justamente às pontes de hidrogênio. Na formação dos fosfatos de cálcio em solução de alginato há, inicialmente, a associação entre alginato e os grupamentos carboxila disponíveis. Esta associação leva à formação de um gel capilar. A partir daí, por razões termodinâmicas (precipitados que ocorrem espontaneamente são geralmente mais estáveis), ocorre a reação com o fosfato e a incorporação da água composicional. A primeira razão para o caráter hidrofóbico que se manifesta já foi discutida: o cálcio já está ligado à matriz polimérica e a carga líquida superficial do sistema dificulta esse tipo de associação. A segunda razão é que o alginato apresenta grupamentos carbonila e carboxila livres, que podem formar pontes de hidrogênio com os fosfatos. Assim, a água, normalmente estabilizada na estrutura cristalina por estas pontes, não encontra forma de se inserir na estrutura cristalina.

A partir de determinada concentração de alginato, entretanto, outro aspecto ganha importância: a redução da difusividade em solução pela formação de géis capilares. Concentrações maiores do biopolímero resultam em vastas redes poliméricas que, na prática, diminuem a difusividade do meio. Isso dificulta a reação entre o cálcio e os volumosos grupamentos fosfatos. Ou seja, apesar da matriz polimérica possuir alta capacidade, esta também possui uma afinidade demasiada com o íon cálcio [24], e este é virtualmente retirado do meio reacional.

Uma confirmação deste efeito é oferecida por um aspecto do DRX: o pico de difração da brushita localizado em $2\theta \approx 23.5^\circ$ apresenta uma intensidade desproporcional, em relação aos padrões JCPDS. Essa assimetria é relacionada a uma orientação preferencial na direção do plano [040], que por sua vez seria provavelmente causada pela diferente taxa de adição das soluções de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Assim, a presença excessiva de cálcio no meio reacional resulta em crescimento diferenciado em uma direção. Esta assimetria, entretanto, é drasticamente reduzida nos ensaios com alginato. Uma comparação semiquantitativa pode ser feita calculando-se a diferença normalizada (em relação ao máximo principal da segunda fase, monetita) entre a intensidade do máximo de difração resultante da orientação preferencial e a esperada para um cristal comum de brushita, e fazendo o gráfico em função da quantidade de alginato presente no meio, como mostrado na Figura 5.8.

Observe que a função orientação (calculada como descrito acima, sem dimensão) diminui de forma praticamente exponencial com o acréscimo de alginato, sendo que em ambos os casos, tende rapidamente para zero. A menor orientação encontrada no branco básico pode ser relacionada à formação de monetita, pois parte do fosfato de cálcio formado estaria contido nessa fase, o que resultaria em uma menor tendência à orientação.

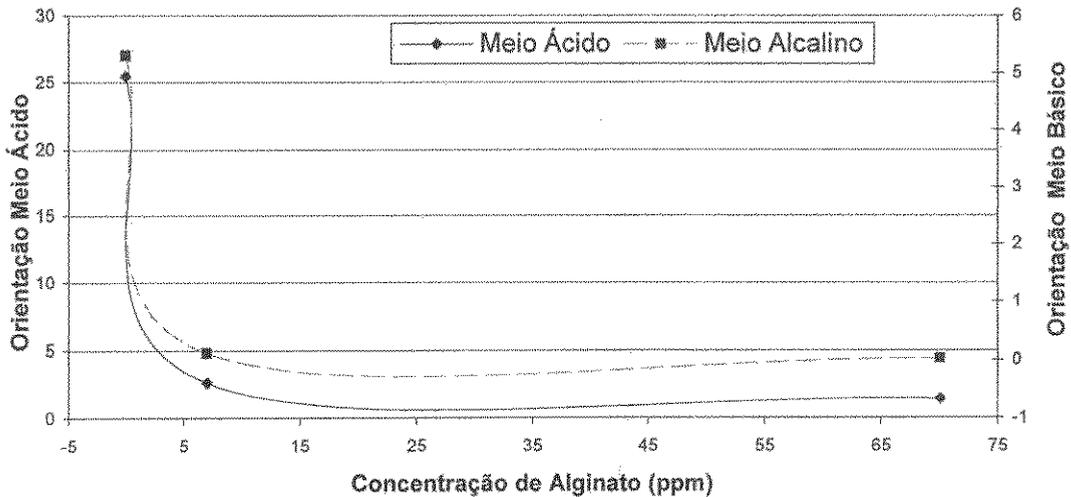


Figura 5.8: Relação entre orientação preferencial, concentração de alginato e pH.

A ação do alginato no sistema é perceptível mesmo quando não há variação na composição de fases. As Figuras 5.9, 5.10 e 5.11 mostram micrografias obtidas por MEV das amostras branco ácido e alginato ácido 1. As amostras foram preparadas a partir da prensagem do pó, como descrito no Capítulo 4. As partículas do primeiro apresentam-se pouco homogêneas, com formas e tamanhos variáveis. Na precipitação com alginato, as partículas apresentam a típica forma de plaquetas [37], apesar de um certo alargamento ser óbvio na altura. Este é atribuído à assimetria do precipitado, como visto anteriormente. Além disso, as partículas são aparentemente maiores que as encontradas na amostra branco.

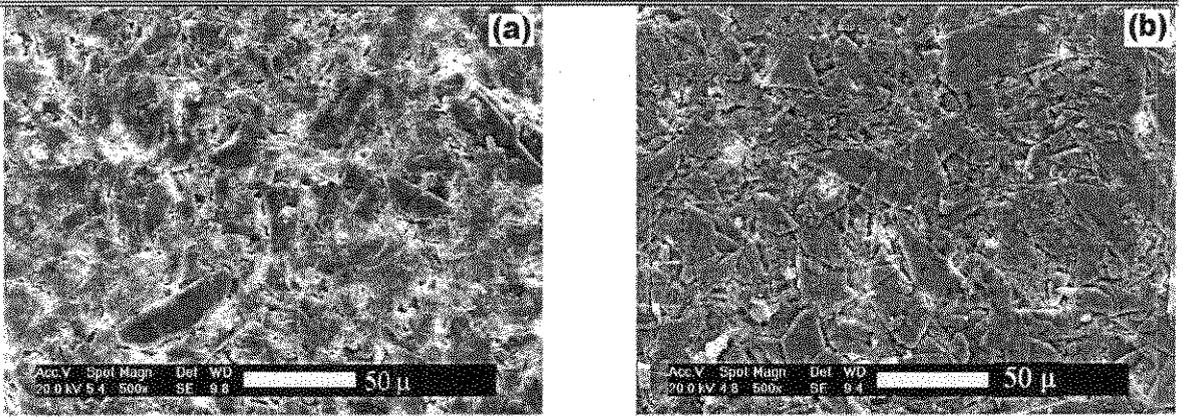


Figura 5.9: MEV das amostras branco ácido (a) e alginato ácido 1(b).

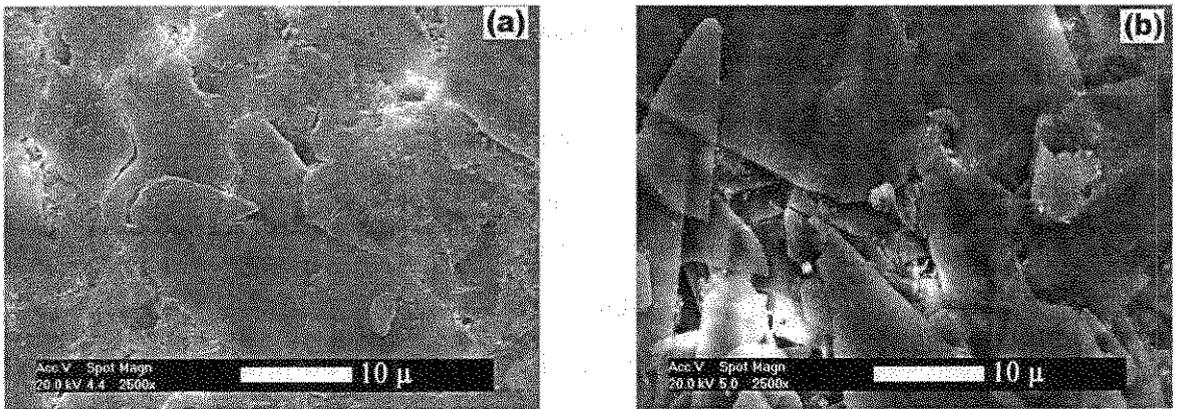


Figura 5.10: MEV das amostras branco ácido (a) e alginato ácido 1(b).

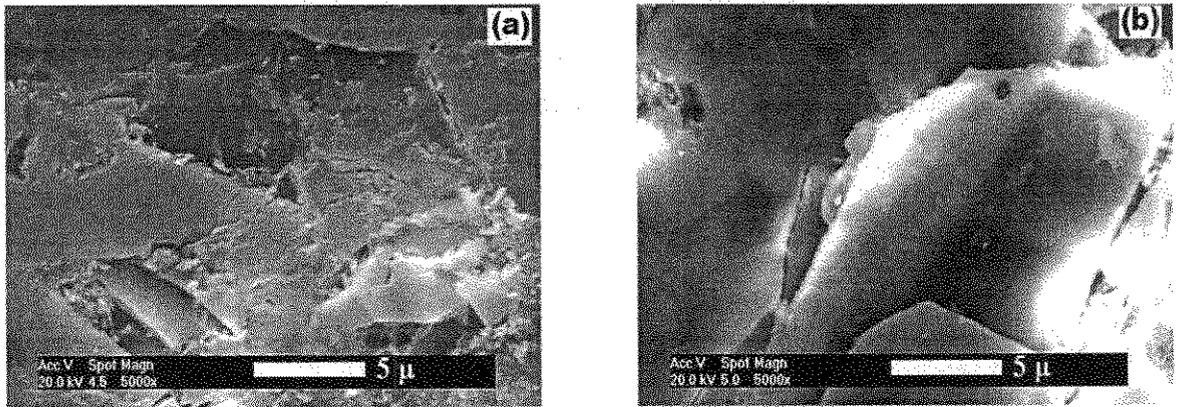


Figura 5.11: MEV das amostras branco ácido (a) e alginato ácido 1(b).

Sabe-se que a precipitação e correspondente formação da estrutura cristalina ocorre em duas etapas: nucleação e crescimento. O ponto inicial é a formação do núcleo, que deve atingir um tamanho crítico para que ocorra a fase de crescimento. A energia livre de nucleação é dada pela diferença entre a necessária para formação da área superficial da nova fase e a obtida com sua formação a partir de uma solução supersaturada [11], como mostrado na equação (5.1):

$$\Delta G = -nkT \ln(S) + \sigma A \quad (5.1)$$

onde S é o teor de supersaturação do meio, σ é energia livre interfacial da nucleação (IFEN, *interfacial free energy for nucleation*) e A é a área da nova fase. Para nucleação homogênea IFEN é igual a tensão superficial entre as fases.

Entretanto, quando ocorre nucleação heterogênea há a presença de um substrato que fornece uma superfície sobre a qual ocorre a formação do núcleo e o crescimento do cristal. Há, necessariamente, um ângulo formado entre substrato e precipitado devido a tensão superficial entre as duas fases. A partir de argumentos geométricos e algumas simplificações (como IFEN independente do tamanho da partícula), pode-se provar que a energia livre de nucleação crítica heterogênea está relacionada à homogênea por [11,25]:

$$\Delta G_{het}^* = \Delta G_{hom}^* \Gamma(\theta) \quad (5.2)$$

$$\Gamma(\theta) = (1 - \cos \theta)^2 \frac{(2 + \cos \theta)}{4} \quad (5.3)$$

onde θ é o ângulo entre as superfícies. O fator $\Gamma(\theta)$ representa uma redução na energia livre necessária para formar um núcleo de tamanho crítico, pela simples presença dessa superfície no meio onde ocorre a nucleação. A presença de cargas pode afetar esse processo de forma ainda mais extensa.

Na precipitação, sem a presença de aditivos, a formação do núcleo é uma etapa decisiva: se ela domina, menores partículas são obtidas. Esse é justamente o caso das amostras em branco, que passariam por um processo de precipitação homogênea. Entretanto, a presença do biopolímero oferece grupamentos carboxila que funcionam como uma miríade de sítios, resultando em um processo de nucleação heterogênea e uma

conseqüente redução do fator $\Gamma(\theta)$. Dessa forma, ocorre a predominância da fase de crescimento, permitindo um maior tamanho de partículas.

Observe que o efeito do alginato não se deve meramente à incorporação do biopolímero ao precipitado. Ele parece exercer, antes de tudo, uma ação dinâmica, agindo como agente nucleador e não sendo necessariamente coprecipitado. Na verdade, parece haver um equilíbrio entre o alginato em solução e o precipitado, visto que boa parte deste se mantém em solução. Este fato é comprovado através do ensaio descrito no item 4.4.5, no qual: uma reação de precipitação é conduzida com 70 ppm de alginato, pH do meio= 4,8, sem correção posterior. Essa condição, como foi demonstrado nos experimentos descrito nesse mesmo item, é tal que não haveria incorporação de alginato ao precipitado. Esta condição é comprovada na Figura 5.5, (c). Entretanto, ao invés de filtrado e seco, o precipitado é simplesmente seco, a uma temperatura de aproximadamente 50°C e analisado por FTIR. O resultado, mostrado na Figura 5.12, mostra um extenso pico a 1400 cm^{-1} , comprovando que houve larga incorporação de alginato. Ou seja, a maior parte do biopolímero continua em solução, capaz de, quiçá, continuar a atuar como agente nucleador.

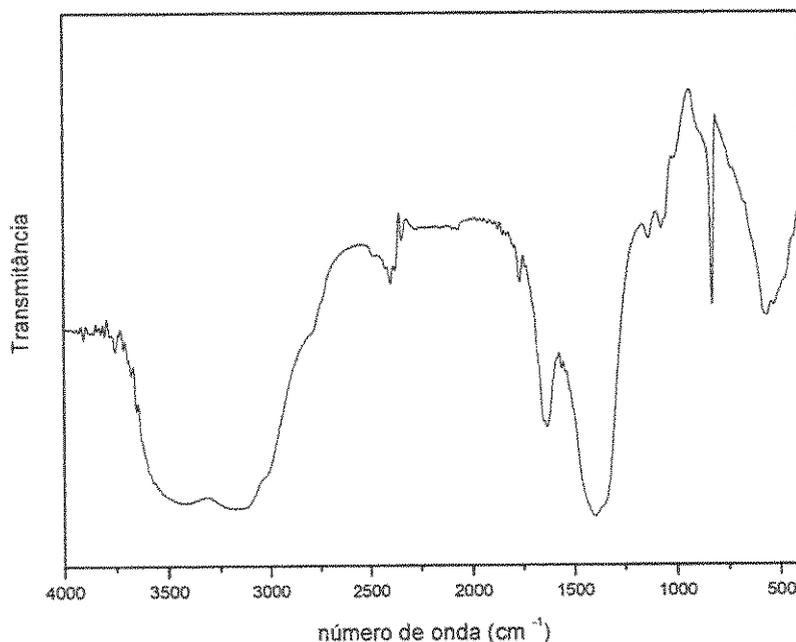


Figura 5.12: FTIR de amostra produzida em pH=4,8, com 70 ppm de alginato e seca sem filtração prévia.

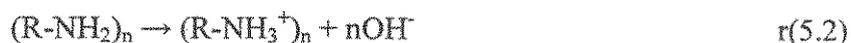
5.3 INFLUÊNCIA DA QUITOSANA NA PRECIPITAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO

A adição de quitosana apresenta também um efeito considerável na formação de fases, como mostrado nas Figuras 5.13 e 5.14. Este efeito, entretanto, apresenta diversas diferenças em relação ao do encontrado nas precipitações com alginato.

Inicialmente, as amostras em branco apresentam uma intensidade bem maior nos máximos relacionados a monetita, em especial a amostra obtida em meio alcalino. Isto é efeito direto da presença da solução de ácido acético. Em meio ácido, apenas uma parte desse ácido fraco se dissocia, liberando íons carboxila no meio. Entretanto, em meio básico, ocorre uma dissociação total, e a disponibilidade desses íons aumenta enormemente. Como explicado anteriormente, o íon carboxila forma ligações hidrofóbicas com o cálcio, por inibir ligações entre o íon cálcio e as demais espécies ativas no meio e exercer impedimento estérico em determinados sítios de crescimento [53]. Aqui, este efeito aparece isolado do efeito ionotrópico, tornando clara a importância das cargas em solução no processo de precipitação dos fosfatos de cálcio.

A presença de quitosana exerce um papel oposto ao do alginato: há maior quantidade de monetita em meio ácido. Essa propriedade é também relacionada à presença das cargas superficiais neste biopolímero.

A quitosana é mantida em solução pela protonação dos seus grupos amina, como visto na reação r(5.2):



onde R representa as glicoses que formam a cadeia deste polissacarídeo. Logo, o próprio processo de dissolução atribui, a este biopolímero, carga superficial positiva. Apesar disso, sabe-se que a quitosana é um eficiente agente quelante, através do par de elétrons não-ligantes do nitrogênio [59,71]. Assim, um mecanismo semelhante ao do encontrado no alginato ocorre: a combinação de interação entre elétrons não-ligantes e íons cálcio e efeito ionotrópico exerce forte ação antimineralizante, impedindo as moléculas de água de se ligarem ao fosfato de cálcio formado, resultando na forma anidra, a monetita.

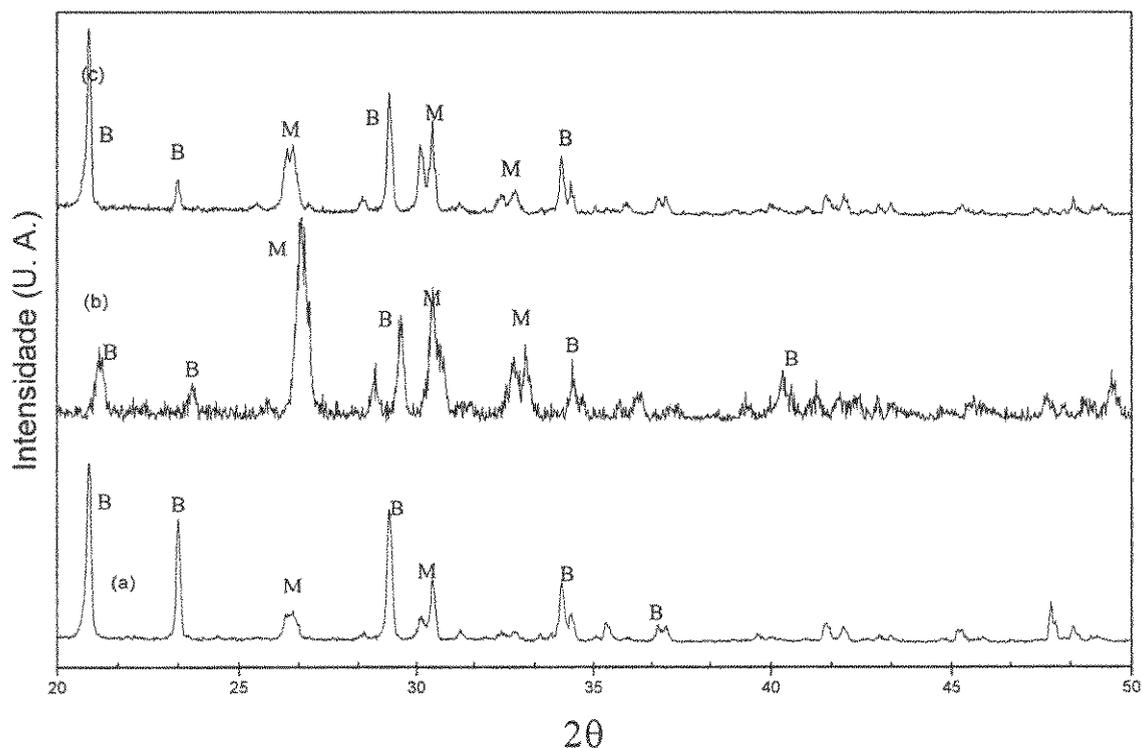


Figura 5.13: Difratoograma das amostras obtidas com quitosana em meio ácido. a) Branco quitosana ácido, (b) quitosana ácida 1 e (c) quitosana ácida 2. Picos principais de monetita marcados por M.

Deve ser observado, contudo, que o efeito do pH é bem menor nesse caso. Há uma redução na quantidade de monetita, que poderia ser relacionada a uma diminuição da sua interação com o cálcio, mas o que ocorre é provavelmente o oposto. Para que ocorra a calcificação é necessário que haja uma boa interação entre cálcio e substrato e que esse íon esteja disponível para reagir com as espécies presentes no meio. Um substrato com alta capacidade e com alta compatibilidade retiraria os íons cálcio eficientemente da solução [59,71], impedindo a reação.

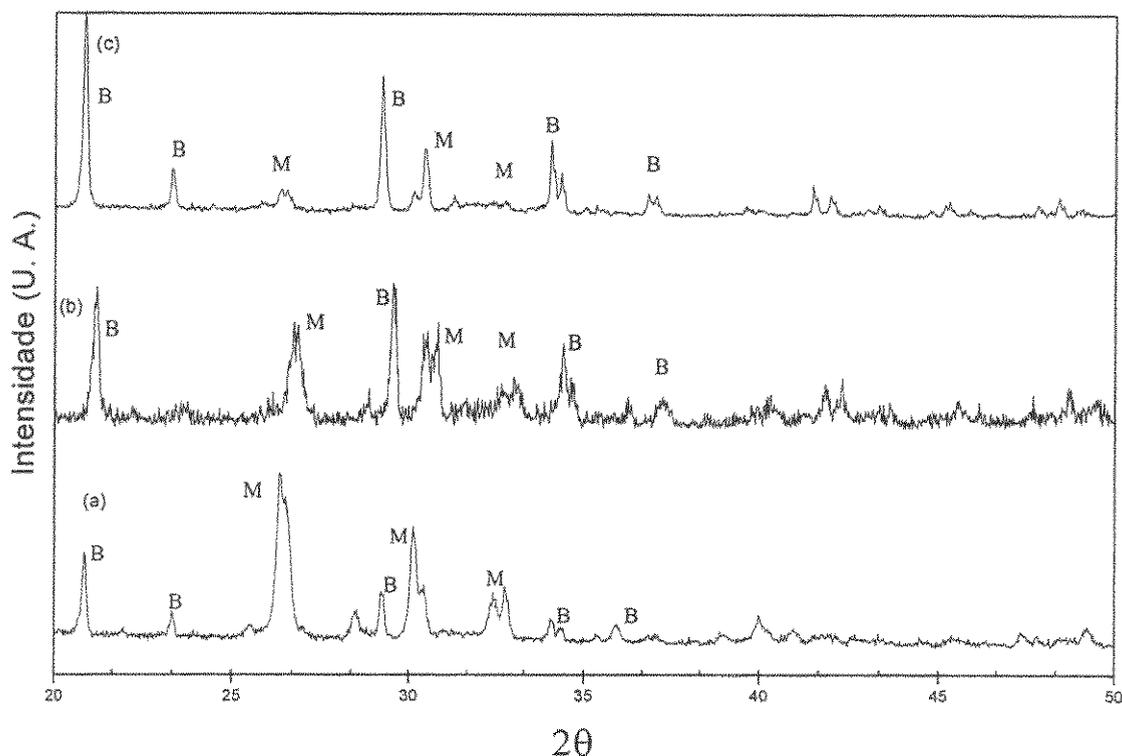


Figura 5.14: Difratoograma das amostras obtidas na presença de quitosana em meio básico. (a) Branco quitosana básico, (b) quitosana básica 1 e (c) quitosana básica 2. M indica os principais picos de monetita.

Com o aumento do pH ocorre a dissociação da quitosana, liberando prótons para o meio e adquirindo uma carga superficial líquida mais negativa, ou seja, com uma maior afinidade pelos íons cálcio. Esse aumento de afinidade impede a interação com o fosfato e a formação de qualquer precipitado. Esta tese encontra apoio na literatura. Beppu [24,59] observou um aumento na compatibilidade entre cálcio e quitosana em maiores pHs. Vieira [71] observou uma diminuição na adsorção de Hg^{2+} - um íon divalente como o cálcio - e atribuiu o fato a um aumento na solubilização do complexo quitosana - metal nessa faixa de pH.

Quando a concentração de quitosana aumenta em 10 vezes há um efeito curioso: a quantidade de monetita no meio diminui. Como foi explicado antes em relação ao alginato, esse fator não é consequência de uma diminuição na interação da quitosana. Ao contrário, o

que ocorre é que um gel capilar tão denso é formado que os íons cálcio são retirados do meio reacional, impedindo a precipitação pela reação com os fosfatos, já que estes não conseguem difundir para o interior da rede. A monetita é formada provavelmente apenas na parte exterior do gel.

Os dados obtidos por FTIR, mostrados na Figura 5.15 e 5.16, confirmam os resultados dos difratogramas. As amostras obtidas com 70 ppm de quitosana mostram espectros semelhantes às amostras de controle do alginato. O que chama a atenção nos outros espectros são as bandas localizadas aproximadamente em 1400 cm^{-1} , que são típicas da interação com carboxilatos. Nas amostras de controle a intensidade é, de certa forma, proporcional ao efeito na composição de fases, uma vez que quanto maior a quantidade de monetita presente no pó, segundo os difratogramas, maior a intensidade dessa banda. Isso confirma o efeito do balanço de cargas através da interação carboxilato-cálcio, e demonstra a interação basicamente eletrostática dessa interação.

A análise dos resultados para as amostras produzidas com 7 ppm de quitosana mostra picos em 1400 cm^{-1} com intensidade semelhante. Como esse efeito não é observado nas amostras de controle, e a influência da quitosana na dissociação dos carboxilatos nessa concentração é desprezível, sugere-se que há um efeito sinérgico entre as duas espécies, ácido acético e quitosana. Obviamente, essa sugestão não pode ser confirmada sem a utilização de análises avançadas que permitam obter detalhes sobre a natureza da ligação dos biopolímeros *in situ*. Entretanto, essa teoria parece concordar com os dados experimentais, inclusive explicando porque a quitosana tem um efeito menor sobre a composição de fases em concentrações maiores, mesmo com a presença de carboxilas dissociadas. Como o efeito é sinérgico, a retirada de um dos elementos do mecanismo (diminuição da interação íons-quitosana) conseqüentemente levaria a falhas no processo como um todo.

As amostras produzidas com quitosana não apresentam grandes diferenças morfológicas em relação à morfologia típica de amostras de brushita/monetita. Algumas micrografias em MEV podem ser vistas nas Figuras 5.17, 5.18 e 5.19. O que chama a atenção é que as amostras produzidas com quitosana apresentam certa orientação de partículas em uma mesma direção. Aparentemente, esta é a mesma direção na qual se

organiza a rede biopolimérica. Casos semelhantes podem ser encontrados na literatura [78] e na morfologia de hidroxiapatita produzida com quitosana, neste mesmo trabalho.

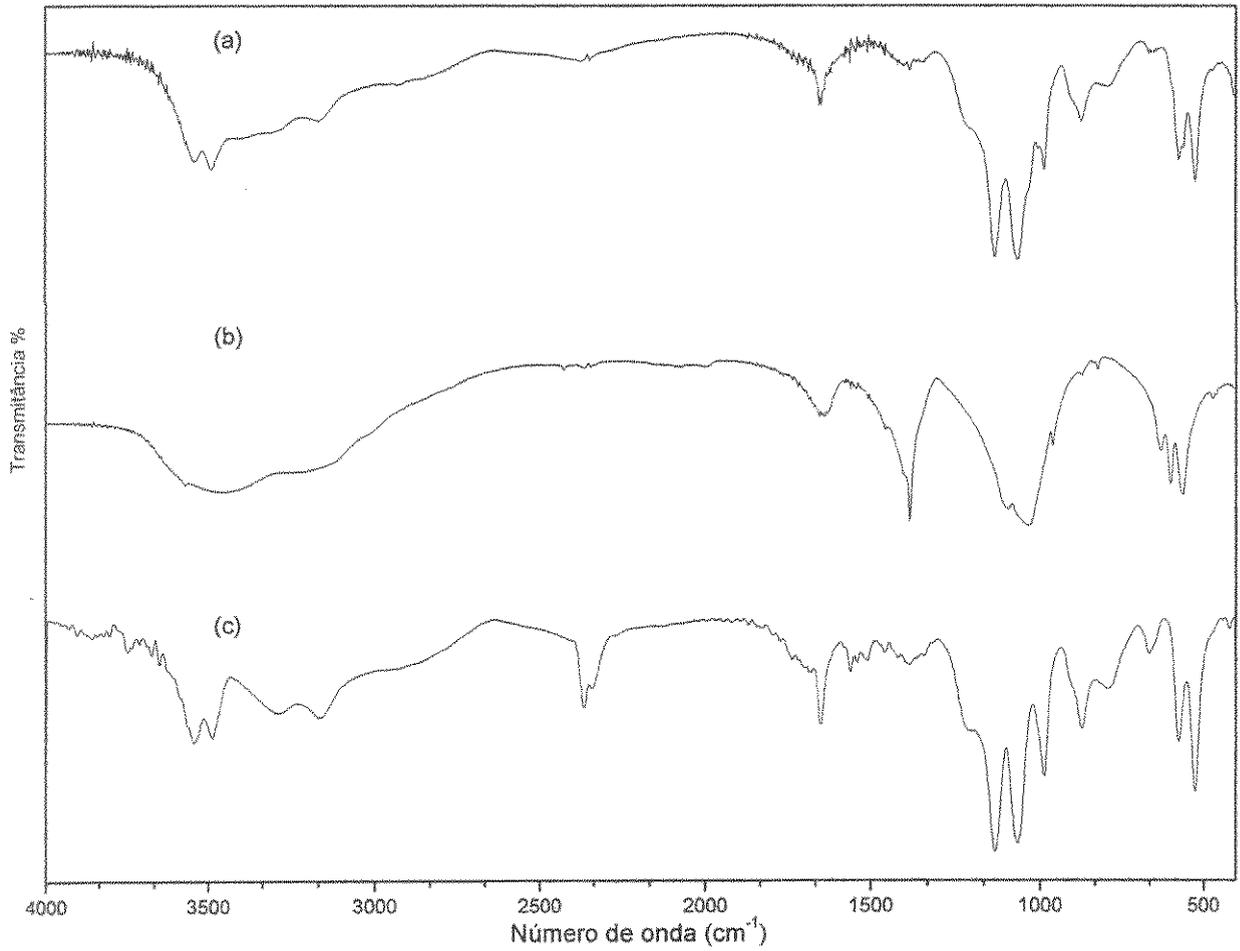


Figura 5.15 Análise de FTIR de (a) Branco Quitosana ácido, (b) Quitosana ácida 1 e (c) Quitosana ácida 2.

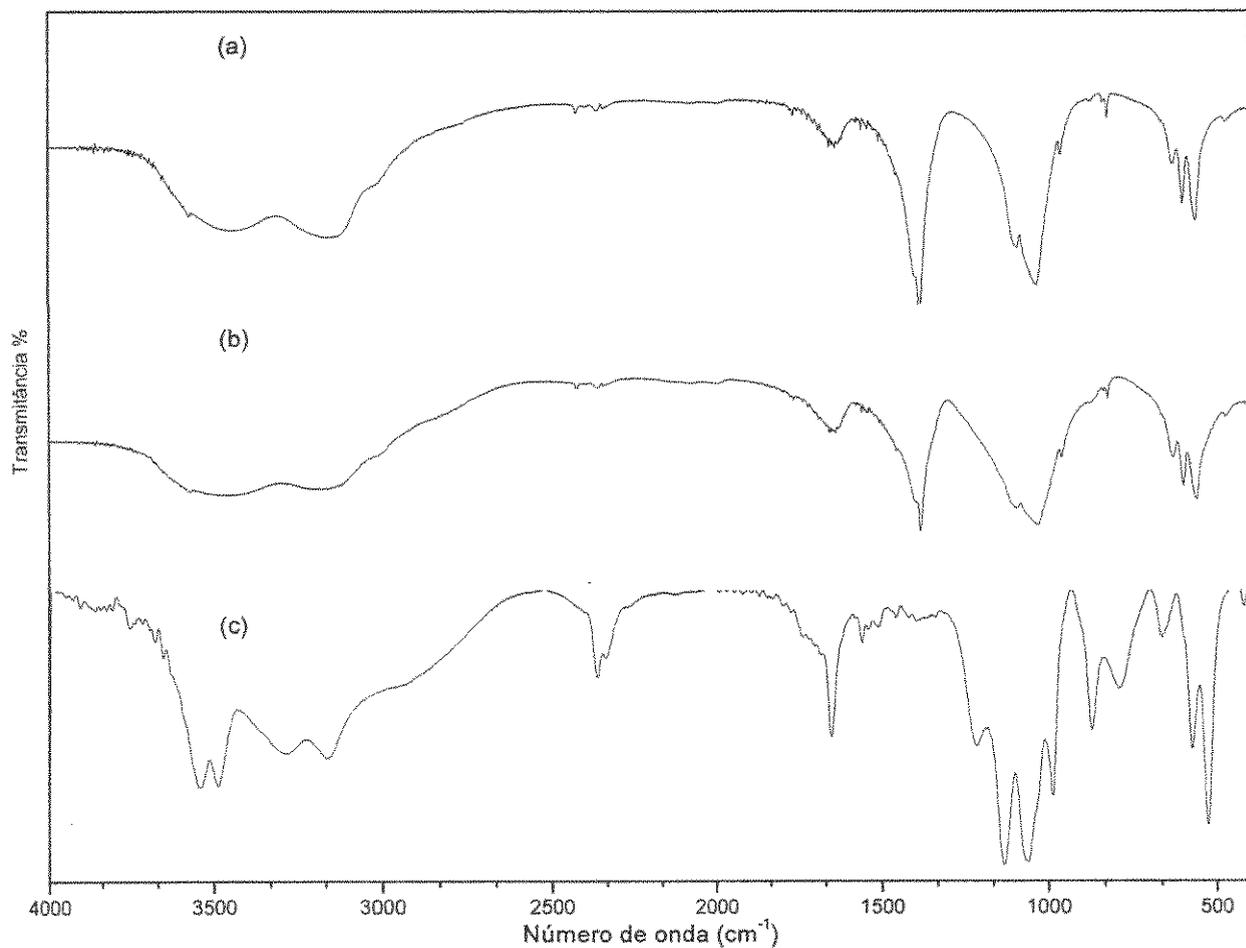


Figura 5.16: Análise de FTIR de (a) Branco Quitosana básico, (b) Quitosana básica 1 e (c) Quitosana básica 2

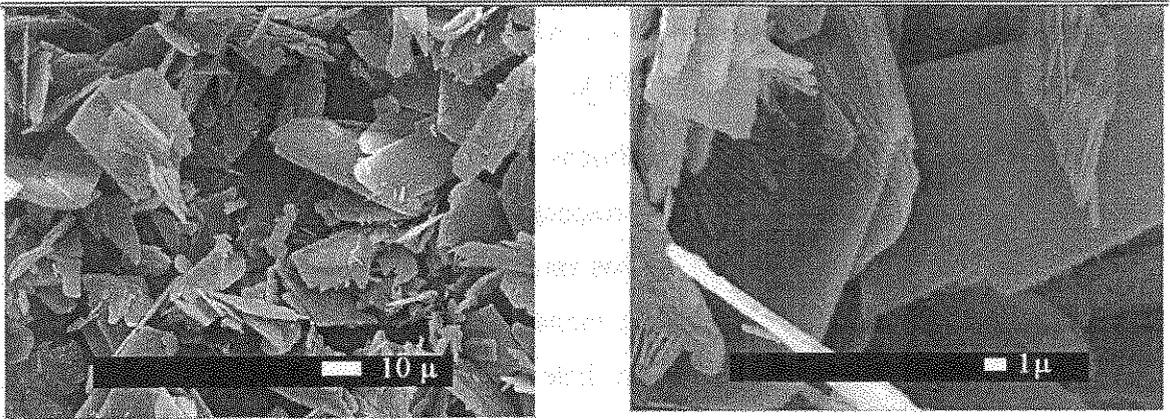


Figura 5.17: MEV da amostra branco quitosana ácido.

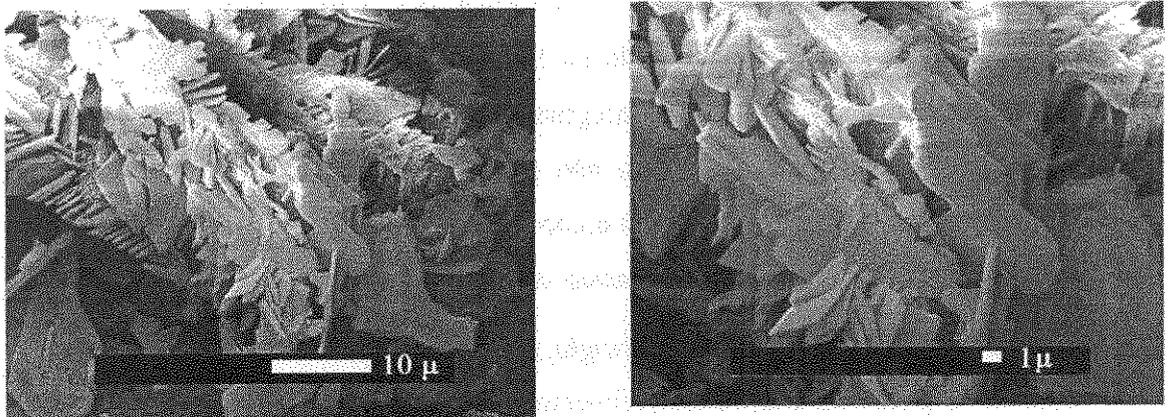


Figura 5.18: MEV da amostra quitosana ácida 1

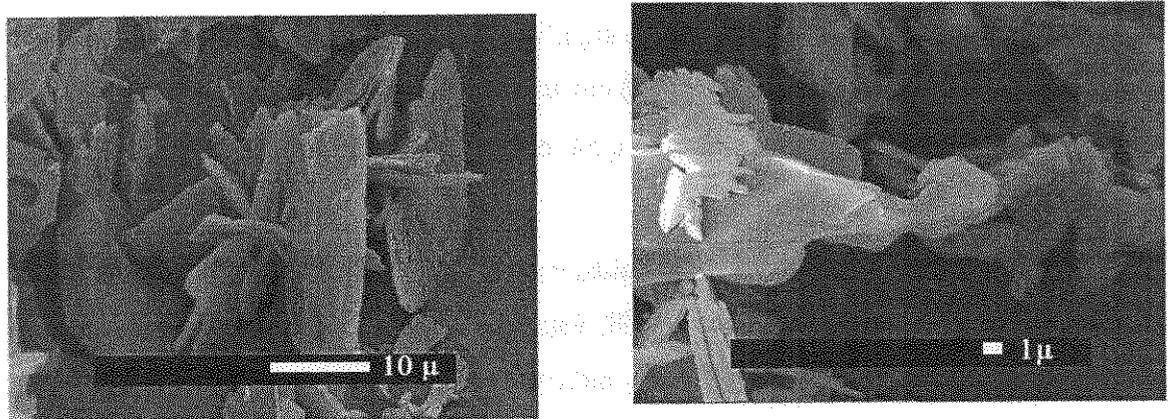


Figura 5.19: MEV da amostra quitosana ácida 2

5.4 PRECIPITAÇÃO NA PRESENÇA DE ALGINATO E QUITOSANA NO PH DE ESTABILIDADE DA HIDROXIAPATITA.

Os difratogramas das amostras obtidas com alginato, pré e pós-envelhecimento podem ser vistos nas Figuras 5.20 e 5.21, respectivamente. Existe grande semelhança entre as amostras antes do envelhecimento, ambas apresentando os mesmos picos principais. Há duas fases identificáveis, hidroxiapatita e monetita (indicado nos difratogramas por M), sendo que a maioria pertence à primeira. Este fato, aliado à ausência da monetita nos difratogramas obtidos com as amostras pós-envelhecimento sugere que esta é uma fase intermediária, posteriormente hidrolisada para formar HA, termodinamicamente estável neste pH. Este fato já havia sido sugerido na literatura [6]. Outro fator interessante é a semelhança entre os picos dos dois difratogramas. Isso sugere que a cristalinidade das amostras é semelhante, e que o alginato não tem efeito na composição de fases para pequenos tempos de reação. Esse efeito na composição de fases é esperado, tendo em vista que a hidroxiapatita é a única fase estável nessa temperatura e pH.

Entretanto, após o descanso *overnight*, há efeitos facilmente identificáveis nos difratogramas. O primeiro, é o desaparecimento dos picos de monetita, indicando que a reação é completada durante este período, tanto na amostra branco quanto nas que contêm alginato. O segundo, é uma redução significativa na cristalinidade, indicada pelo acoplamento dos picos entre 31-34 ° (2θ) em um só. Deve-se observar que esse efeito é oposto ao observado normalmente, no qual ocorre um aumento da cristalinidade do precipitado [67].

A alteração do alginato na cristalinidade do material pode ser estimada a partir das equações apresentadas por Landi *et al.* [79]. Esta se baseia na separação entre as reflexões originadas nos planos [300] e [112] da hidroxiapatita que, em difração efetuada com radiação do tipo $\text{CuK}\alpha_1$, estariam aproximadamente em $2\theta = 32,2$ e $32,9^\circ$, respectivamente. A relação está explicitada na equação (5.1), onde $V_{112/300}$ é a intensidade do intervalo (V do inglês *void*) entre esses dois picos, X_c é a cristalinidade(fracional) da amostra e I_{300} é a intensidade deste pico.

$$X_c = 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \quad (5.1)$$

Observe que essa equação tem um forte caráter semi-empírico, e que a estimativa de cristalinidade deve ser utilizada apenas para hidroxiapatita, não sendo um parâmetro comparável com outros compostos e com os obtidos por tratamentos matemáticos mais complexos, como o refinamento de Rietveld. É importante citar que, por exemplo, em uma cristalinidade calcula como zero por essa equação, o difratograma ainda apresenta diversos picos de difração, mostrando que amostra possui certa organização de rede cristalina e conseqüentemente, uma cristalinidade maior que zero. Assim, para se obter um parâmetro de comparação entre as amostras obtidas, esta equação foi utilizada junto com os difratogramas para calcular os valores de cristalinidade para as diversas amostras. Os resultados estão dispostos na Tabela 5.4.

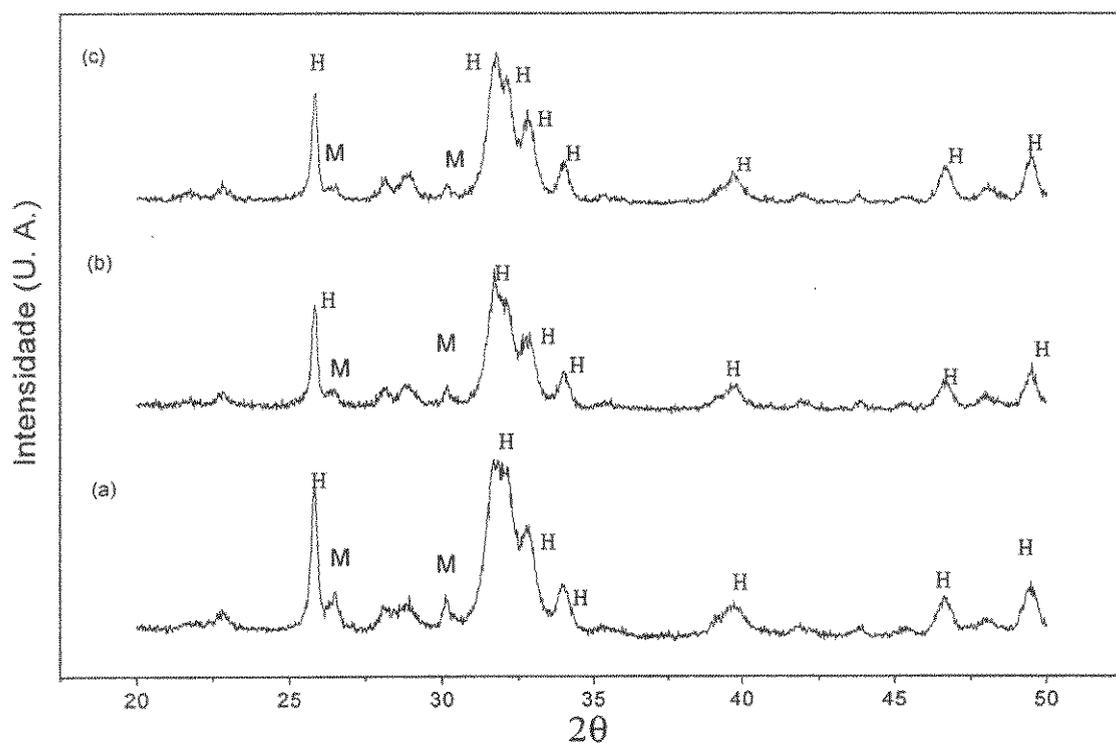


Figura 5.20: Difratogramas de precipitado obtidos na presença de alginato, pré- envelhecimento. (a) Branco HA alginato pré, (b) HA alginato pré 1, (c) HA alginato pré 2.

Antes do envelhecimento os precipitados apresentam cristalinidades muito semelhantes. Tendo em mente que a equação (5.1) é apenas uma estimativa da

crystalinidade, com erros que podem chegar a 10%, pode-se dizer que os valores obtidos são iguais. Após o envelhecimento há um pequeno aumento da cristalinidade da amostra em branco. Não se pode afirmar se esse efeito é significativo, pois o pequeno aumento está dentro da faixa de erro da equação, mas provavelmente isso realmente ocorre, pois a literatura cita um aumento de cristalinidade proporcional ao tempo de digestão [67].

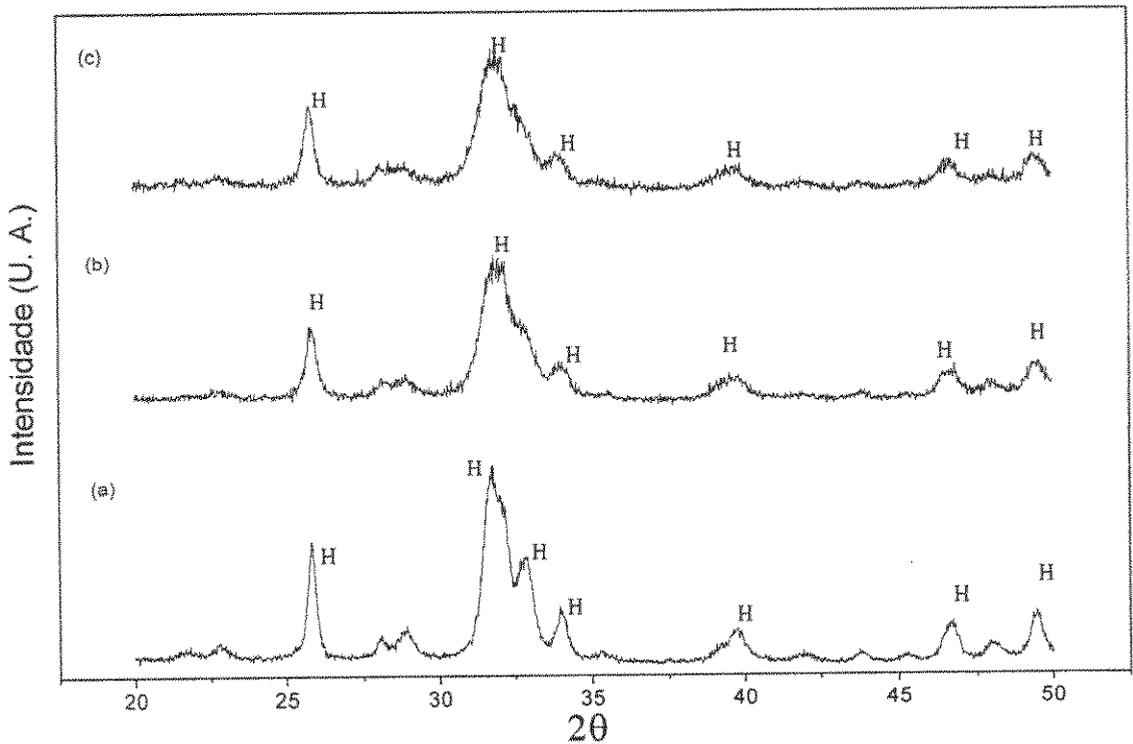


Figura 5.21: Difractogramas de precipitados obtidos na presença de alginato, pós - envelhecimento. (a) Branco HA alginato pós, (b) HA alginato pós 1, (c) HA alginato pós 2.

Tabela 5.4: Cristalinidade das amostras produzidas com alginato / pH de estabilidade da HA.

X _c (fracional)			
[Alginato] (ppm)	0	7	70
Pré-envelhecimento	0,17	0,23	0,20
Pós-envelhecimento	0,26	0,02	0

As amostras produzidas com alginato, após o envelhecimento, apresentam grande redução da cristalinidade, chegando a valores próximos de zero. Este efeito está relacionado diretamente à presença de alginato. Inicialmente, não haveria a formação de ligações efetivas entre cálcio e alginato, provavelmente porque a formação de HA é cineticamente favorável. Além disso, o íon cálcio é protegido no cristal, pela presença dos volumosos grupamentos fosfato (ver Figura 3.1). Entretanto, com o passar do tempo, o alginato tende a alterar a estrutura, possivelmente sequestrando os íons cálcio e retendo-os em um gel, resultando em uma estrutura com deficiência de cálcio. Como a reação ocorre durante o amadurecimento, sugere-se que o alginato tenha sido gradativamente incorporado ao precipitado.

Os resultados de FTIR, mostrados nas Figuras 5.22e 5.23, para os pós obtidos com dopagem com alginato trazem diversas informações novas. Na amostra de controle aparece, antes do envelhecimento, uma banda intensa 1400 cm^{-1} , que se atribui a incorporação de CO_2 durante a precipitação. Esta banda some após o envelhecimento. Esta incorporação, apesar de intensa, é instável devido a própria estrutura cristalina da hidroxiapatita, que admite uma substituição máxima de cerca de 22%. Durante o processo de amadurecimento ocorre uma reorganização da estrutura cristalina, com a dissolução de cristais (especialmente àqueles menores ou com energia livre de Gibbs maior) e reprecipitação sobre outros. Já que o meio não é saturado com CO_2 é natural que durante esse processo os cristais instáveis se dissolvam e reprecitem em uma forma quase livre de carbonato.

Já as amostras produzidas com alginato apresentam um aumento contínuo da banda em 1400 cm^{-1} . Esse aumento é devido à própria incorporação contínua do biopolímero no precipitado. Observe que, ao contrário da brushita, a interação alginato-HA é certamente acompanhada de uma incorporação definitiva do biopolímero. A causa seria a estrutura cristalina da hidroxiapatita, na qual alguns fosfatos são substituídos por carboxilatos. É de se esperar que a reprecipitação ocorra de forma a minimizar a energia livre do processo. Em um processo de nucleação heterogênea com biopolímero, esse papel é exercido pelo alginato. Assim, à medida que ocorre a dissolução dos cristais, estes tendem a reprecipitar sobre a matriz polimérica onde, devido aos aspectos cristalinos já citados, ficariam permanentemente retidos.

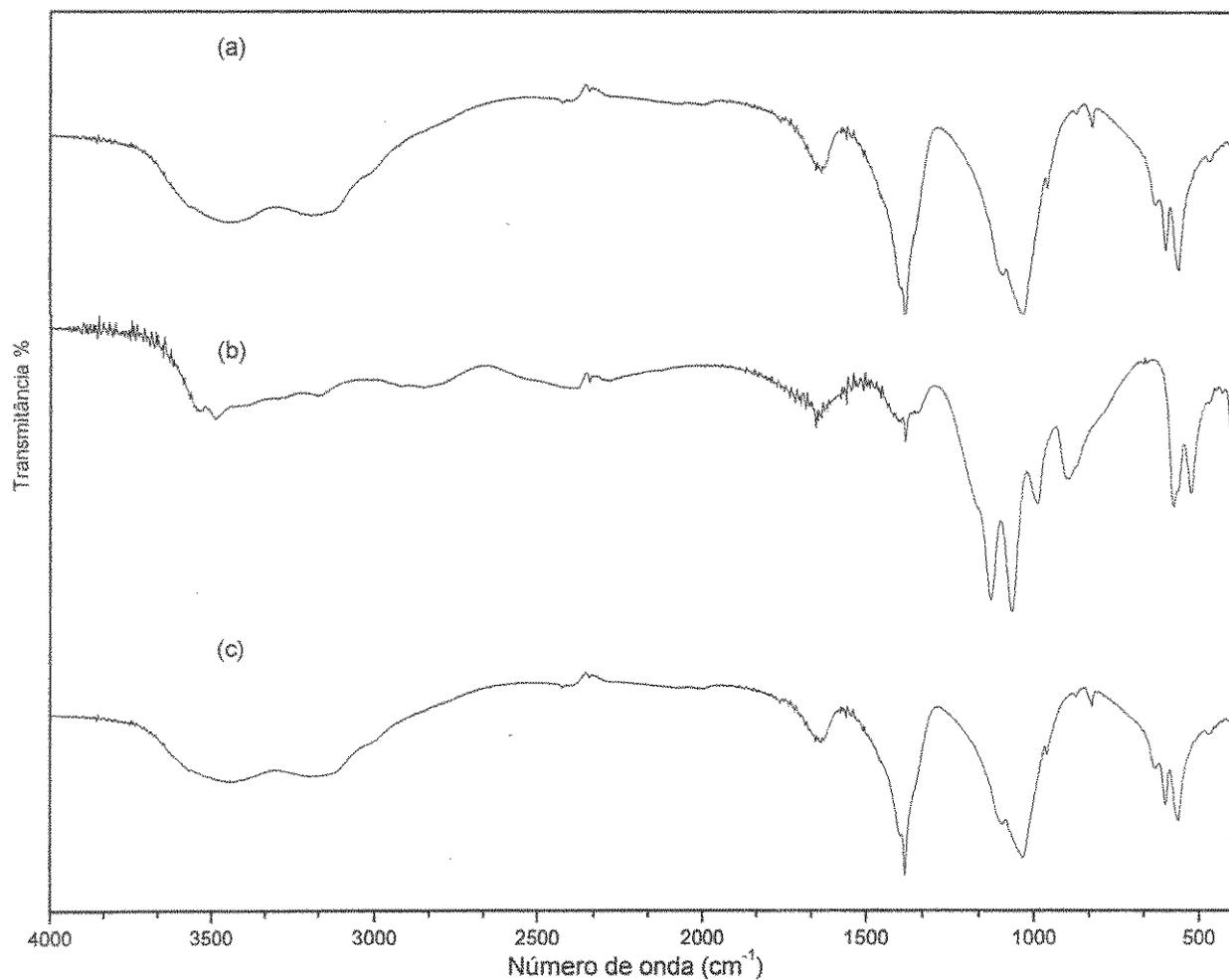


Figura 5.22: FTIR de precipitados obtidos na presença de alginato, pré- envelhecimento. (a) Branco HA alginato pré, (b) HA alginato pré 1, (c) HA alginato pré 2.

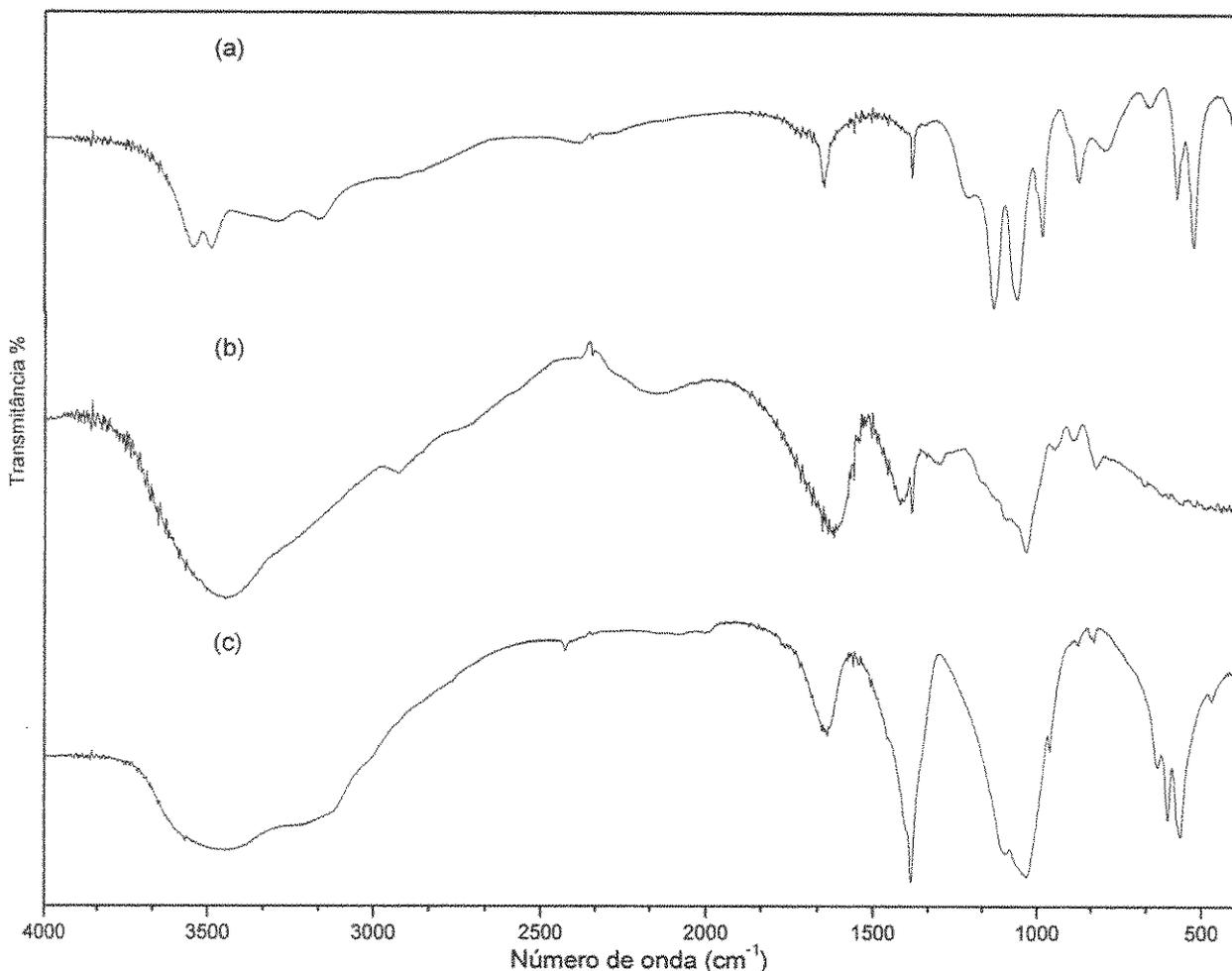


Figura 5.23: FTIR de precipitados obtidos na presença de alginato, pós - envelhecimento. (a) Branco HA alginato pós, (b) HA alginato pós 1, (c) HA alginato pós 2.

O efeito da adição de quitosana nesse mesmo pH tem um efeito bem diverso do alginato. A diferença é óbvia pela própria aparência da amostra. Enquanto as amostras em branco apresentam-se como típicos fosfatos de cálcio, ou seja, como pós de coloração branca, as amostras produzidas com quitosana têm um aspecto vítreo, ou seja apresentam heterogeneidades com uma aparência translúcida. Os difratogramas pré e pós amadurecimento podem ser vistos nas Figuras 5.24 e 5.25. A partir desses também foi calculada a cristalinidade da amostras, ainda utilizando-se a equação 5.1. Os resultados são mostrados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Cristalinidade das amostras produzidas com Quitosana / pH de estabilidade da HA.

X_c (fracional)			
[Quitosana] (ppm)	0	7	70
Pré-envelhecimento	0,22	0,30	0,55
Pós-envelhecimento	0	0,48	0,53

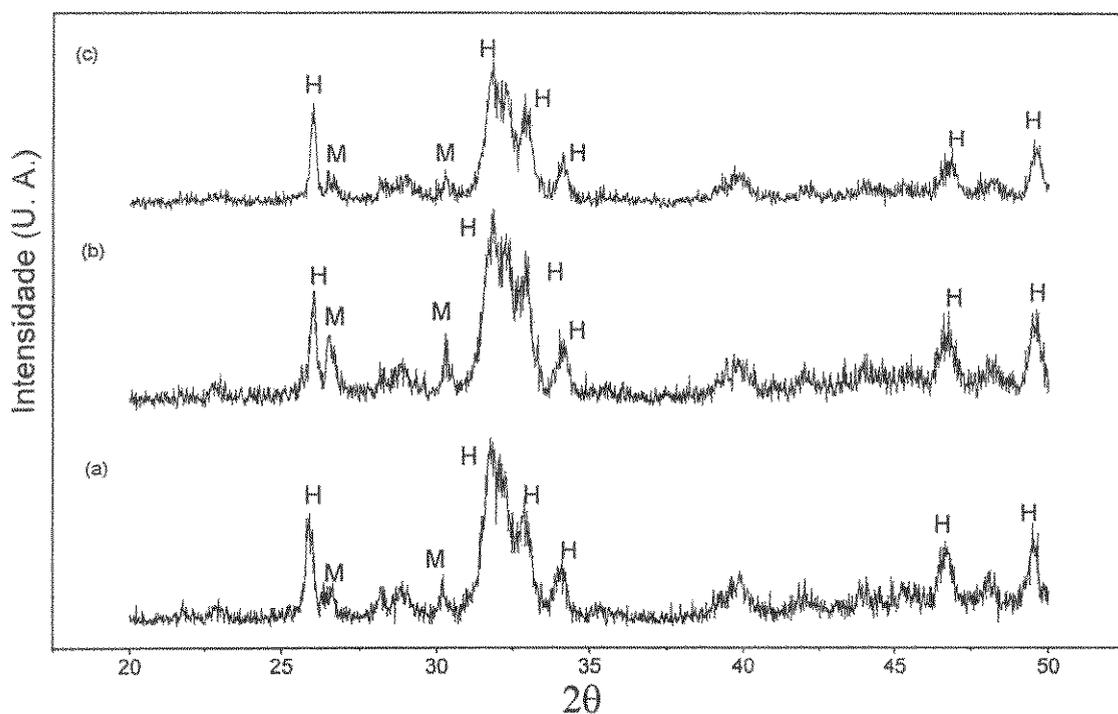


Figura 5.24: Difratogramas de precipitado obtidos na presença de quitosana, pré- envelhecimento. (a) Branco HA quitosana pré, (b) HA quitosana pré 1, (c) HA quitosana pré 2.

Nota-se que a cristalinidade do branco com quitosana é muito semelhante ao do branco do alginato. Entretanto, o amadurecimento produz uma redução na cristalinidade da

amostra. Isso provavelmente se deve ao ácido acético adicionado, que por conter radicais carboxila exerce um efeito semelhante ao alginato.

O efeito da quitosana é perceptível antes do amadurecimento. Apesar de para a amostra produzida com 7 ppm este efeito ser discreto, podendo ser atribuído ao erro inerente à estimativa, a amostra com 70 ppm também apresenta maior cristalinidade, além do limite do erro, sugerindo que essa alteração é realmente provocada pelo biopolímero. Após o envelhecimento, há um aumento da cristalinidade da primeira amostra, enquanto a outra permanece em um nível constante.

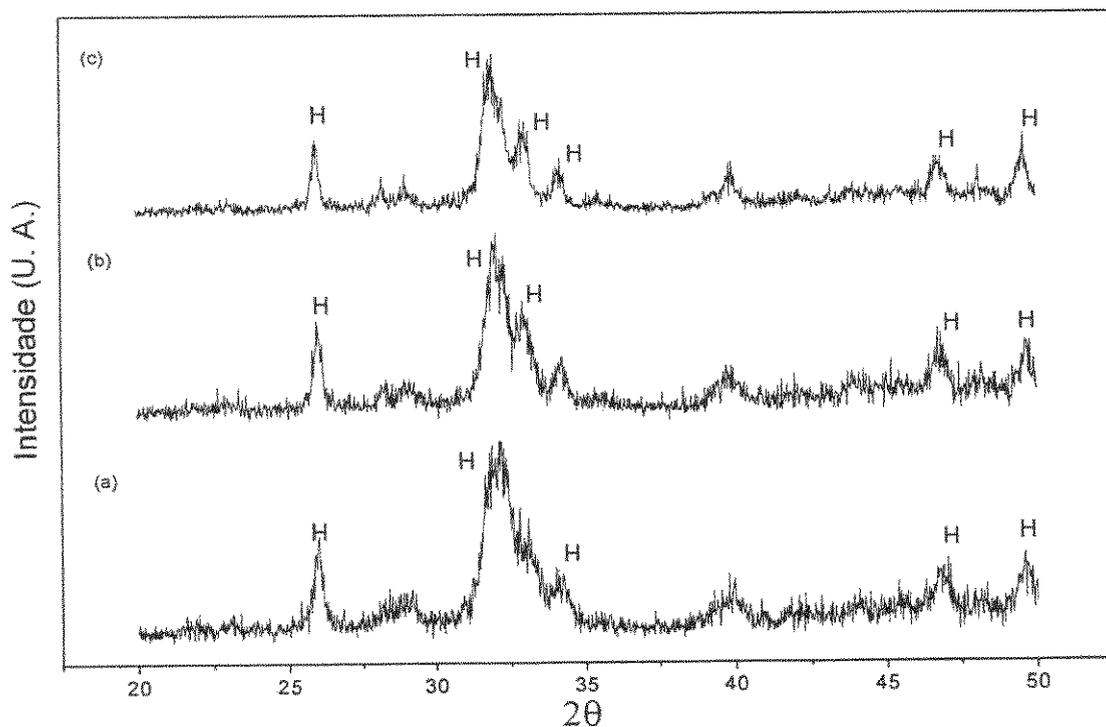


Figura 5.25: Difratogramas de precipitado obtidos na presença de quitosana, pós- envelhecimento. (a) Branco HA quitosana pós, (b) HA quitosana pós 1, (c) HA quitosana pós 2.

A provável causa desse fenômeno é que a hidroxiapatita é formada dentro da estrutura da quitosana. Assim, quando a precipitação ocorresse a 7 ppm haveria uma menor disponibilidade de "sítios de ancoragem" por volume para o cálcio, a partir do qual se

iniciaria o processo de nucleação e crescimento. Assim, haveria um lapso de tempo até que o processo se completasse, durante o qual ocorreria a difusão do cálcio por toda a rede polimérica. Um mecanismo semelhante foi sugerido por Rusu *et al.* [78]: a quitosana formaria uma matriz e, no seu interior, haveria a precipitação dos fosfatos de cálcio, formando uma rede organizada e sujeita a orientação cristalográfica.

Este mecanismo é confirmado, em parte pelos dados de FTIR, mostrados nas Figuras 5.26 e 5.27. Todos os espectros apresentam bandas fortes em 1400 cm^{-1} , que é, como citado anteriormente, característica do grupamento carboxila. Entretanto, nas amostras dopadas com quitosana acontece uma transformação importante antes e depois do envelhecimento: esses picos tornam-se mais estreitos, característicos de amostras com maior cristalinidade. O que se sugere é que o mecanismo de ação sinérgica envolvendo os grupos amina da quitosana, os grupos carboxila do ácido acético e os íons cálcio ocorram durante o processo de reprecipitação. Assim, o estreitamento dessas bandas é devido à formação de nanopartículas nos sítios de ancoragem, orientadas em determinadas direções. Observe que esta teoria está de acordo com os dados de cristalinidade obtidos para precipitados com quitosana, mostrados na Tabela 5.5. Antes do envelhecimento, a amostra contendo 70 ppm de quitosana já apresentava uma banda estreita, bem definida. De fato, a variação de cristalinidade antes e depois do envelhecimento não foi significativa.

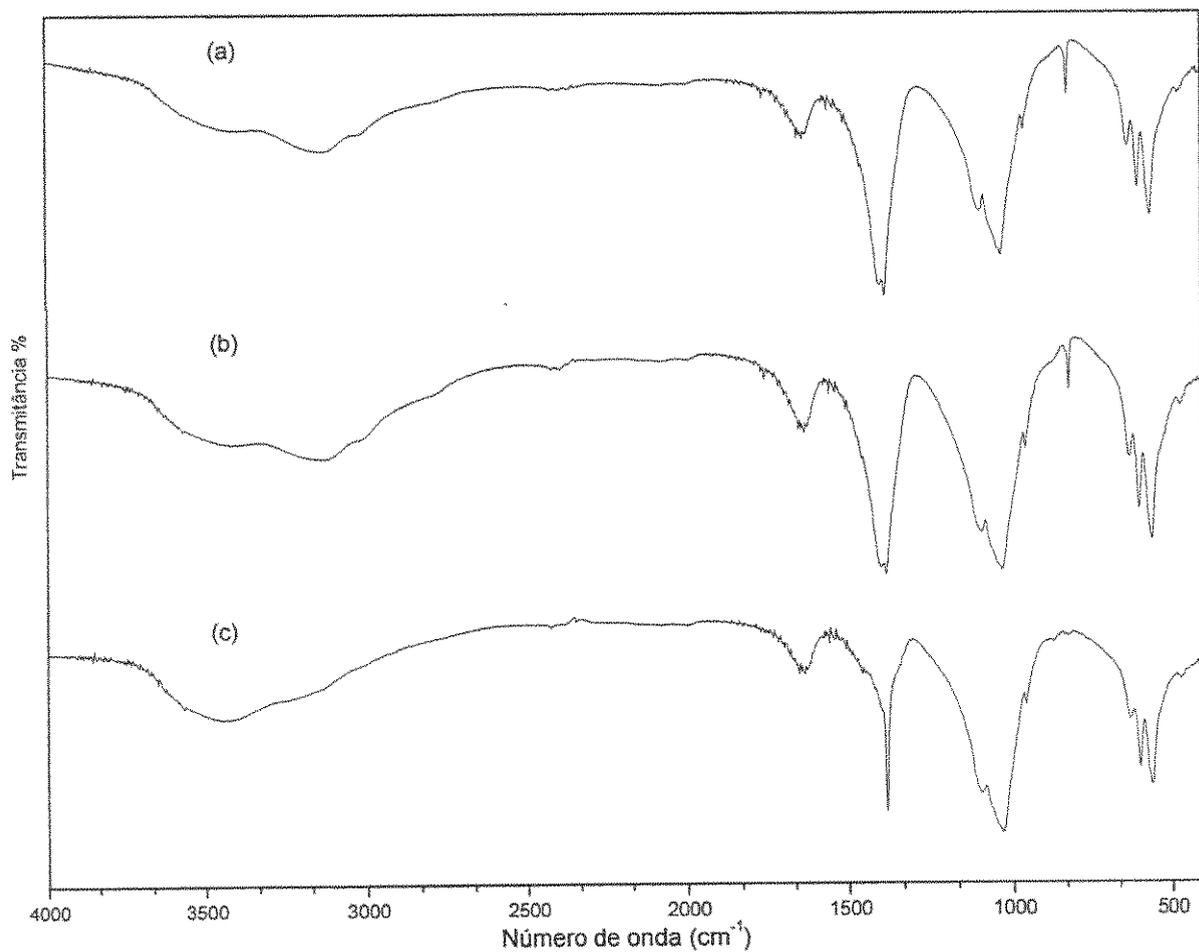


Figura 5.26: FTIR de precipitado obtidos na presença de quitosana, pré- envelhecimento. (a) Branco HA quitosana pré, (b) HA quitosana pré 1, (c) HA quitosana pré 2.

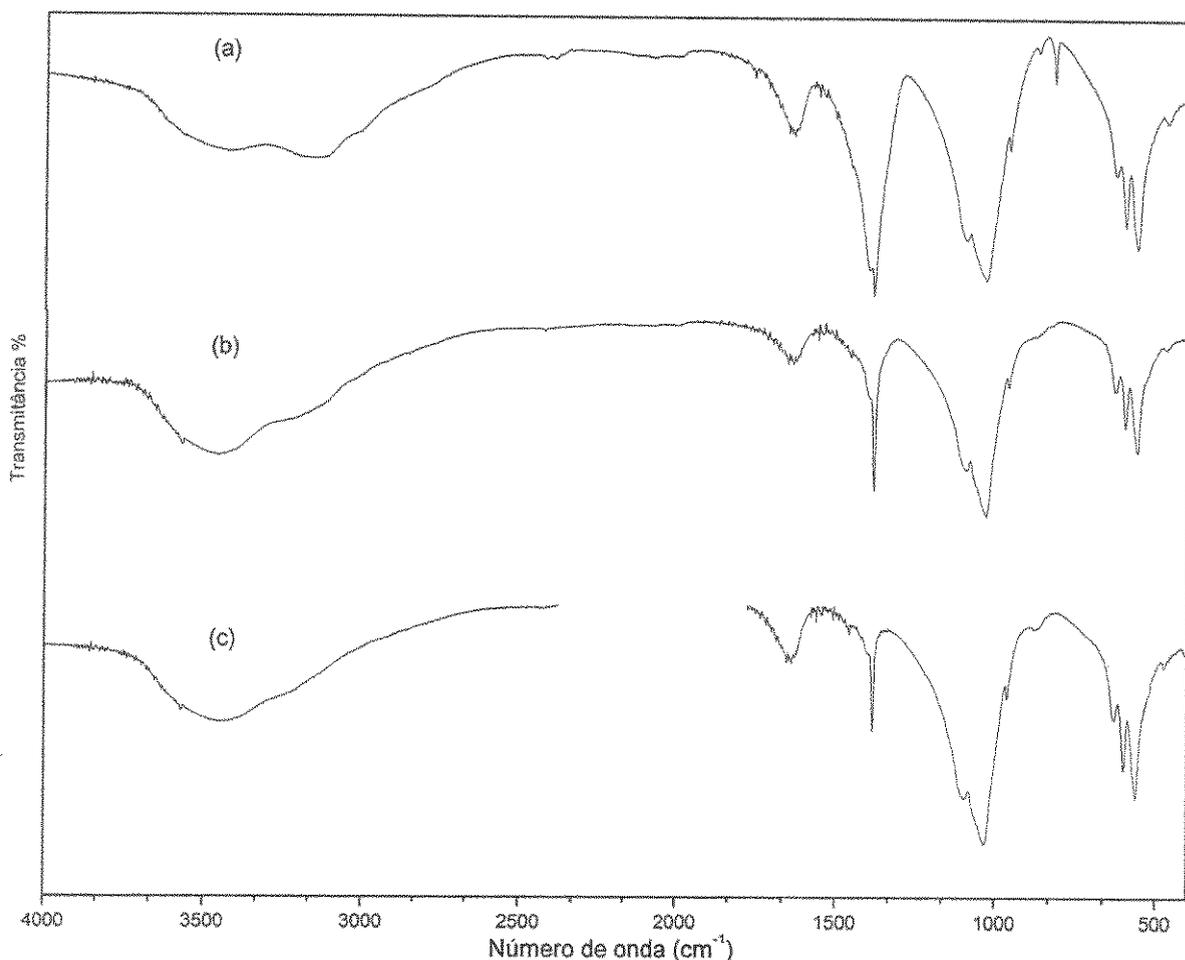


Figura 5.27: FTIR de precipitado obtidos na presença de quitosana, pós- envelhecimento. (a) Branco HA quitosana pós, (b) HA quitosana pós 1, (c) HA quitosana pós 2.

Algumas micrografias obtidas em MEV das amostras em branco e precipitadas na presença de alginato são mostradas nas Figuras 5.28, 5.29 e 5.30. O branco pós-envelhecimento apresenta uma morfologia semelhante à morfologia de agulha da hidroxiapatita, apesar de um pouco arredondadas, sugerindo baixa cristalinidade e substituição por carbonatos. Quando o alginato participa da precipitação, entretanto, aparecem algumas diferenças. Antes do envelhecimento estão presentes partículas de alginato de uma forma tipicamente elíptica. O envelhecimento, entretanto, resulta em

partículas que se apresentam ainda mais semelhantes a apatitas carbonatadas, pouco cristalinas. Essa aparência se deve, provavelmente, a descalcificação promovida pelo alginato.

Alguns aspectos do difratograma podem ser utilizados para a melhor compreensão do processo de precipitação. Scherrer, citado em [80], relacionou o alargamento dos picos ao tamanho dos planos perpendiculares àquela direção cristalográfica, através da seguinte equação:

$$X_s = \frac{0,9\lambda}{FWHM \times \cos(\theta)} \quad (5.2)$$

onde X_s é o tamanho do cristal [nm], λ é o comprimento de onda da radiação incidente [nm], $FWHM$ [rad] é o tamanho do alargamento do pico em uma altura correspondente a metade da intensidade total (do inglês *full width at half maximum*) e θ [°] é o ângulo no qual o pico aparece.

Aplicando a equação (5.2) nos difratogramas, uma estimativa do tamanho das partículas pode ser obtido, como mostrado na Tabela 5.6. Foi utilizado nos cálculos, o pico que aparece aproximadamente em $2\theta=26^\circ$, e que corresponde ao plano [002] da hidroxiapatita e ao crescimento na direção do eixo-c. A principal vantagem é que, além desse pico ser isolado e permitir uma melhor estimativa do alargamento, a literatura associa a presença de monossacarídeos a uma orientação em relação a esse eixo [81].

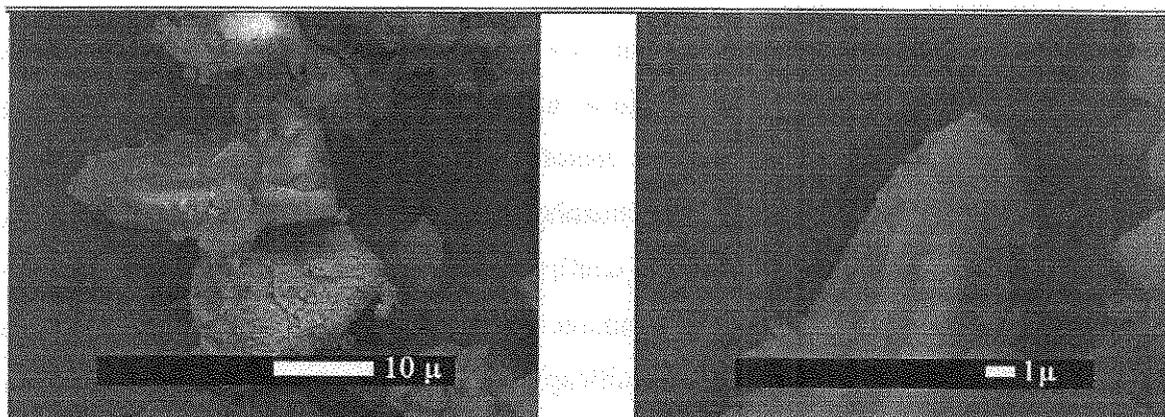


Figura 5.28: MEV da amostra branco HA alginato pós.

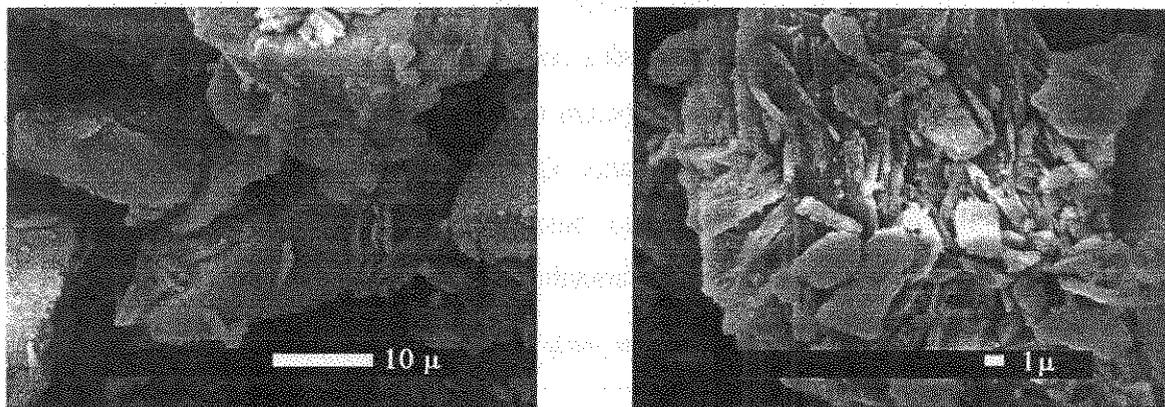


Figura 5.29: MEV da amostra Alginato HA Pré 2.

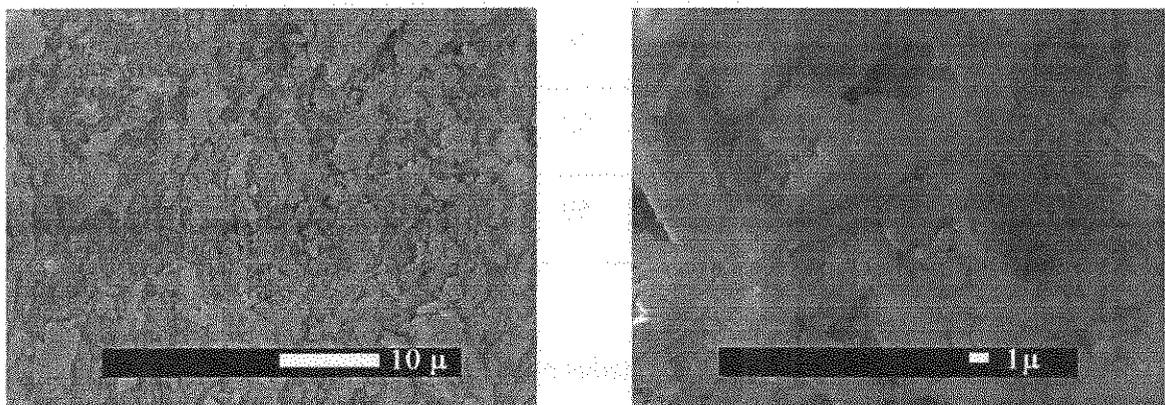


Figura 5.30: MEV da amostra Alginato HA Pós 2

O crescimento dos cristais que ocorre na amostra em branco está de acordo com os dados da literatura [67]. Os íons cálcio e fosfato precipitam sobre as partículas de hidroxiapatita, resultando em cristalitos maiores e com maior cristalinidade. Deve-se chamar a atenção para a diminuição de tamanho que ocorre durante o envelhecimento da amostra produzida com 7 ppm. Este dado confirma a teoria apresentada anteriormente, que envolve a ação do alginato durante o amadurecimento. Sugere-se que o alginato promova um processo dinâmico de descalcificação/dissolução/reprecipitação durante o envelhecimento. Parte dos íons cálcio retidos na rede seriam a base para a reprecipitação da HA, enquanto outra parte ficaria retida, incapacitada de reagir, no gel biopolimérico. Teng *et al.* [72] analisaram precipitados formados com alginato por microscopia eletrônica de transmissão e relataram que estes se associam na forma de fibras, sendo sua morfologia afetada pela quantidade de alginato presente. Quanto maior a quantidade de alginato no meio, maior a rede e o entrelaçamento dessa estrutura, facilitando a formação de precipitados interligados e aumentando o tamanho dos cristalitos.

Tabela 5.6: Tamanho dos cristalitos das amostras precipitadas com alginato / pH de estabilidade da HA.

	X_s (nm)		
[Alginato] (ppm)	0	7	70
Pré-envelhecimento	52	52	41
Pós-envelhecimento	59	30	83

A morfologia das amostras precipitadas na presença de quitosana também apresenta algumas diferenças significativas. A amostra em branco, Figura 5.31, após o envelhecimento apresenta um aspecto esférico, semelhante às precipitadas com alginato. Sua aparência é semelhante à da amostra obtida com 70 ppm de quitosana antes do envelhecimento, Figura 5.32. Entretanto, após esse intervalo, surgem grandes diferenças morfológicas, como pode ser visto na Figura 5.33. Ao invés de aglomerados de conformação esférica, observam-se partículas com formato característico de agulha, típicos

da hidroxiapatita. Merece atenção o fato de que essas partículas aparentam formar aglomerados orientados. Rusu *et al.* [78] sugeriram que a formação do compósito quitosana – hidroxiapatita ocorre dentro do gel polimérico, acompanhando a direção das cadeias. Dessa forma, a quitosana produziria agrupamentos de micropartículas orientadas.

Mais dados a respeito da morfologia podem ser obtidos utilizando a equação (5.2). Os resultados estão dispostos na Tabela 5.7. A redução de tamanho da amostra em branco é atribuída a presença de ácido acético, pois a carboxila inibe o crescimento da partícula por bloquear sítios ativos. Assim, durante a reprecipitação, ocorre uma redução do tamanho do cristalito pela inibição desses sítios.

Observe que a presença de quitosana leva à formação de pequenas partículas cristalinas. A partir das informações apresentadas, pode-se sugerir um mecanismo: a presença da quitosana provê radicais que agem como sítios para a formação da hidroxiapatita. A conformação característica do gel biopolimérico resulta em regiões isoladas, onde se formam nanopartículas de cristalinidade elevada e orientadas epitaxialmente às cadeias da quitosana. O último fato já foi confirmado anteriormente [60], com uma orientação em relação ao eixo *c*. A presença dessa orientação e dos nanocristais seriam os responsáveis pelo aspecto vítreo da amostra. Essa orientação pode ser visualizada por birrefringência, como mostrado nas Figuras 5.33, 5.34 e 5.35.

Observe que a amostra controle mostra alguma birrefringência. Esse fato é esperado, visto que o material é um cristal e, portanto, é orientado em determinadas direções. Entretanto, é observado apenas nas partículas que estão orientadas de forma a ter seus planos cristalinos corretamente orientados em relação ao feixe de luz polarizada. Nas amostras produzidas com quitosana, mostradas nas Figuras 5.34 e 5.35 praticamente todas as partículas exibem este fenômeno, o que sugere uma orientação não-aleatória do material.

Tabela 5.7: Tamanho dos cristalitos das amostras precipitadas com quitosana / pH de estabilidade da HA.

X_s (nm)			
[Quitosana] (ppm)	0	7	70
Pré-envelhecimento	69	83	69
Pós-envelhecimento	41	26	35

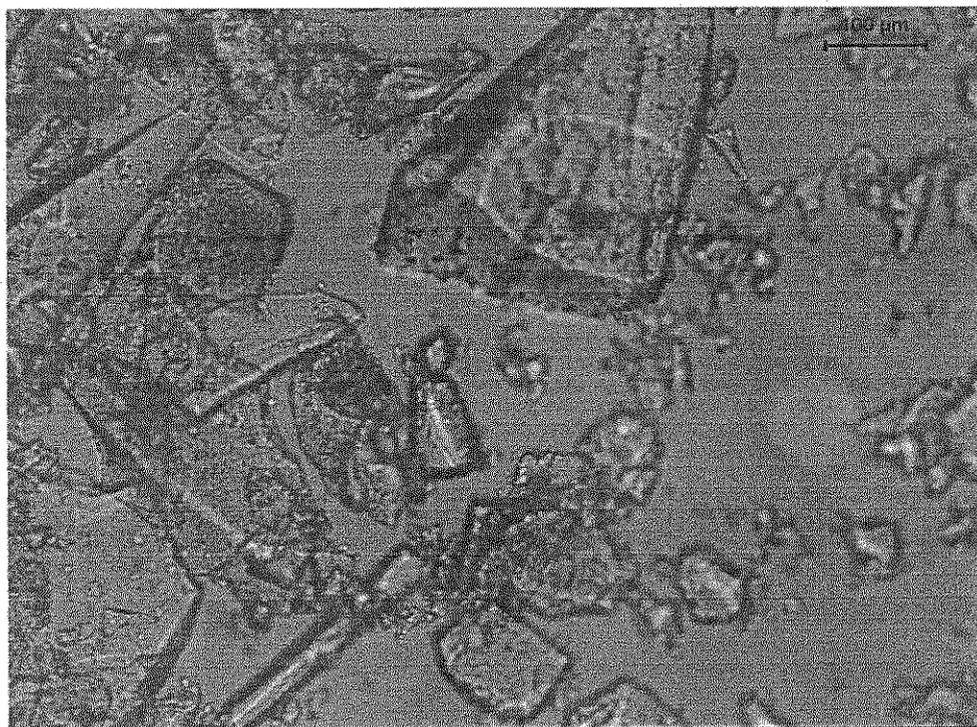


Figura 5.34: Micrografia obtida através da passagem de luz polarizada através da amostra branco HA quitosana pós.

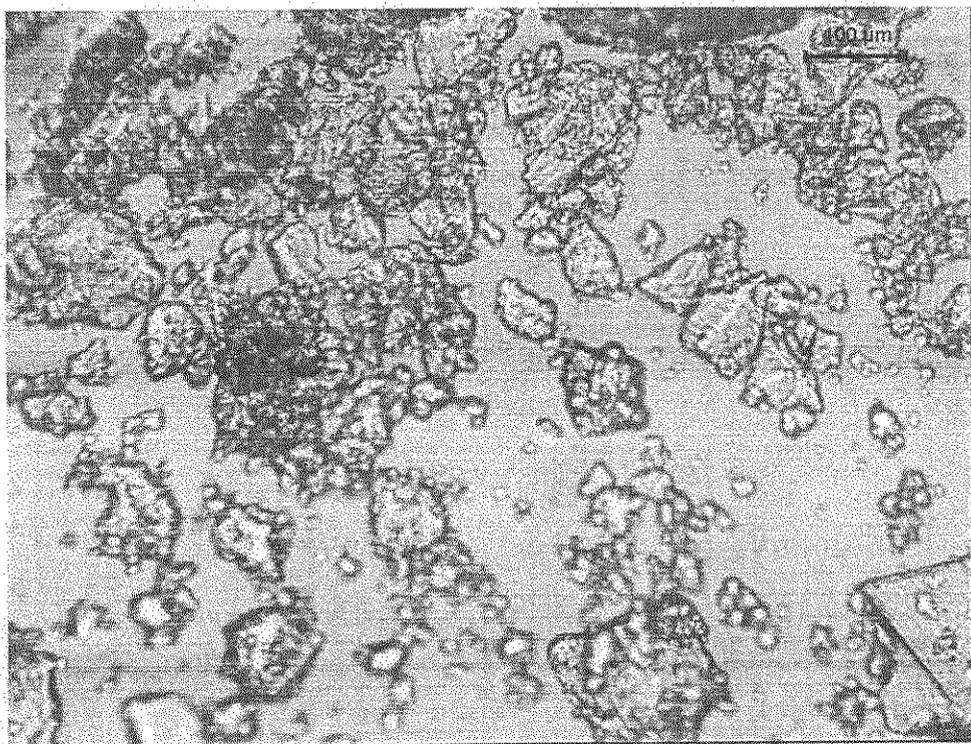


Figura 5.35: Micrografia obtida através da passagem de luz polarizada através da amostra quitosana HA pós1.

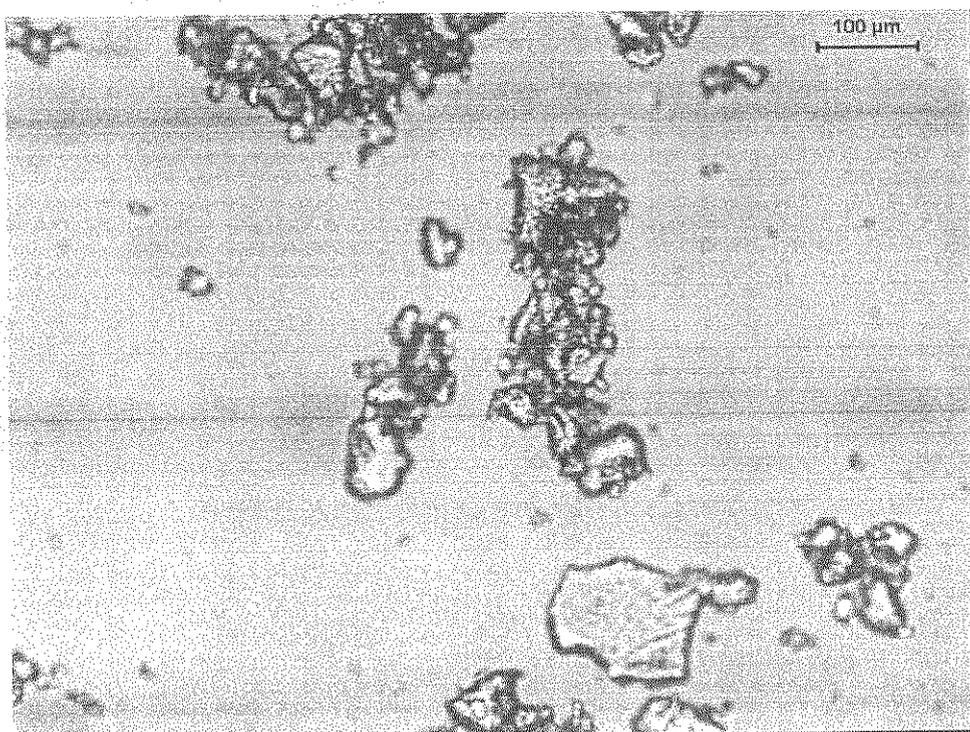


Figura 5.36: Micrografia obtida através da passagem de luz polarizada através da amostra quitosana HA pós2.

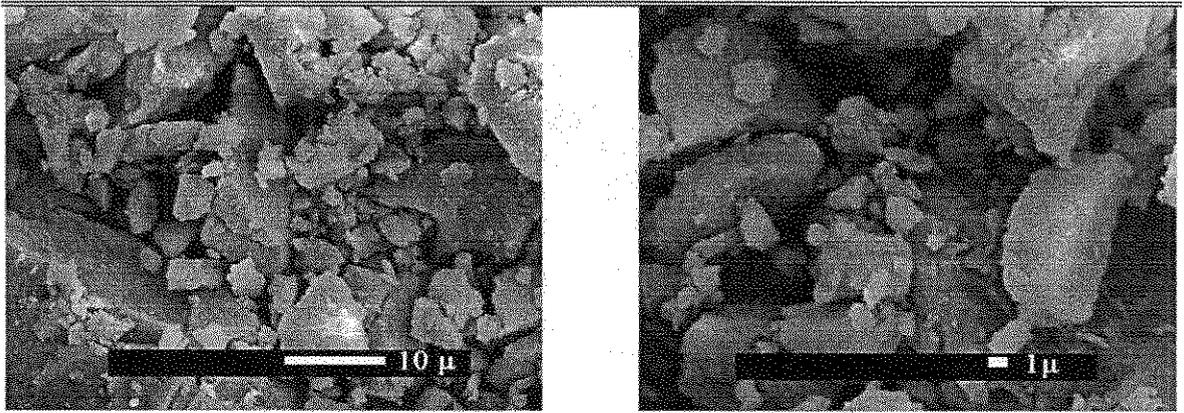


Figura 5.30: MEV da amostra branco HA quitosana pós.

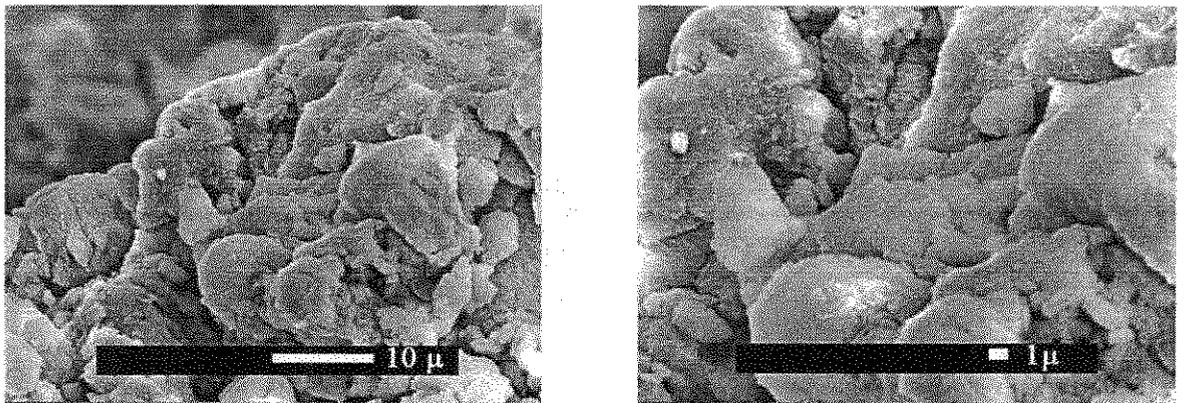


Figura 5.31: MEV da amostra Quitosana HA Pré 2.

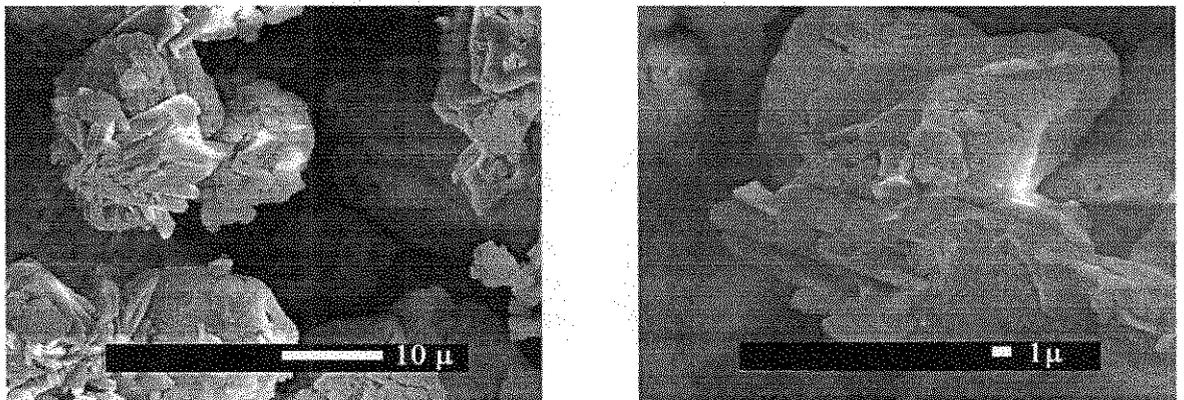


Figura 5.32: MEV da amostra Quitosana HA Pós 2.

5.5 ESTUDO DAS FASES APÓS TRATAMENTO TÉRMICO

Os difratogramas obtidos para as amostras precipitadas com alginato após tratamento a 550°C e 1000°C podem ser vistos nas Figuras 5.36 e 5.37. Todas as amostras apresentam picos que são identificados como pirofosfato de cálcio (CPP, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Entretanto, uma série de fatores nos difratogramas está relacionada as fases presentes inicialmente na amostra utilizada.

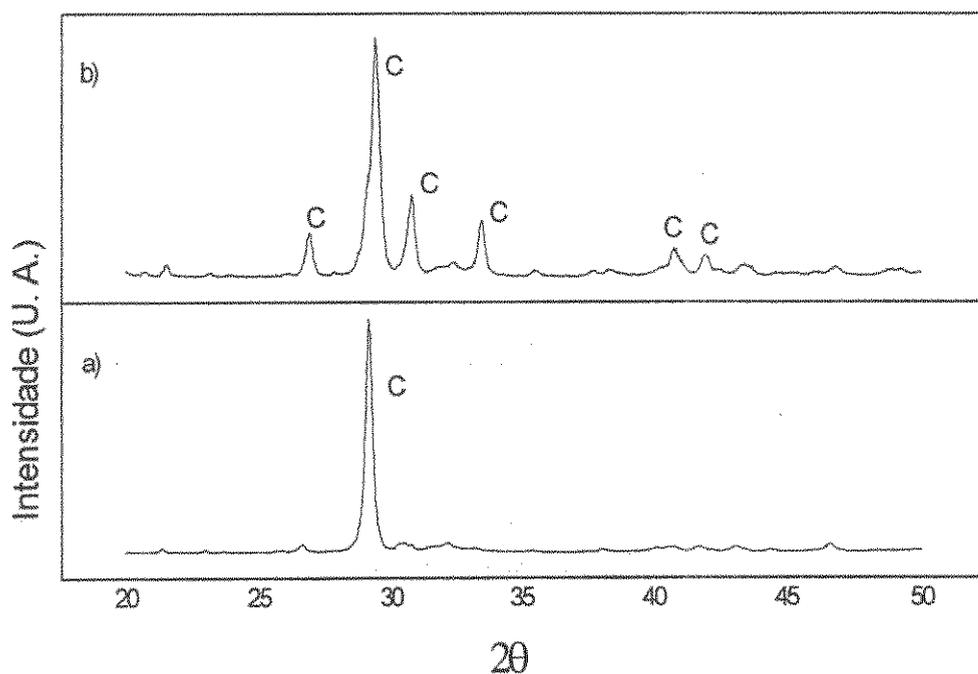


Figura 5.36: Difratograma das pastilhas após tratamento térmico a 550 °C. (a) Branco alginato básico. (b) Alginato básico 2.

Os difratogramas das pastilhas a 550 °C mostram apenas picos de pirofosfato. Entretanto, enquanto a amostra em branco apresenta apenas um pico principal e resquícios de outros, a amostra alginato básico 2 apresenta um difratograma bem mais definido, sugerindo uma maior conversão. Este fenômeno se repete nas amostras sinterizadas a

1000°C. Na amostra alginato ácido 1 há um difratograma intermediário entre o obtido a partir do branco básico e de alginato básico 2.

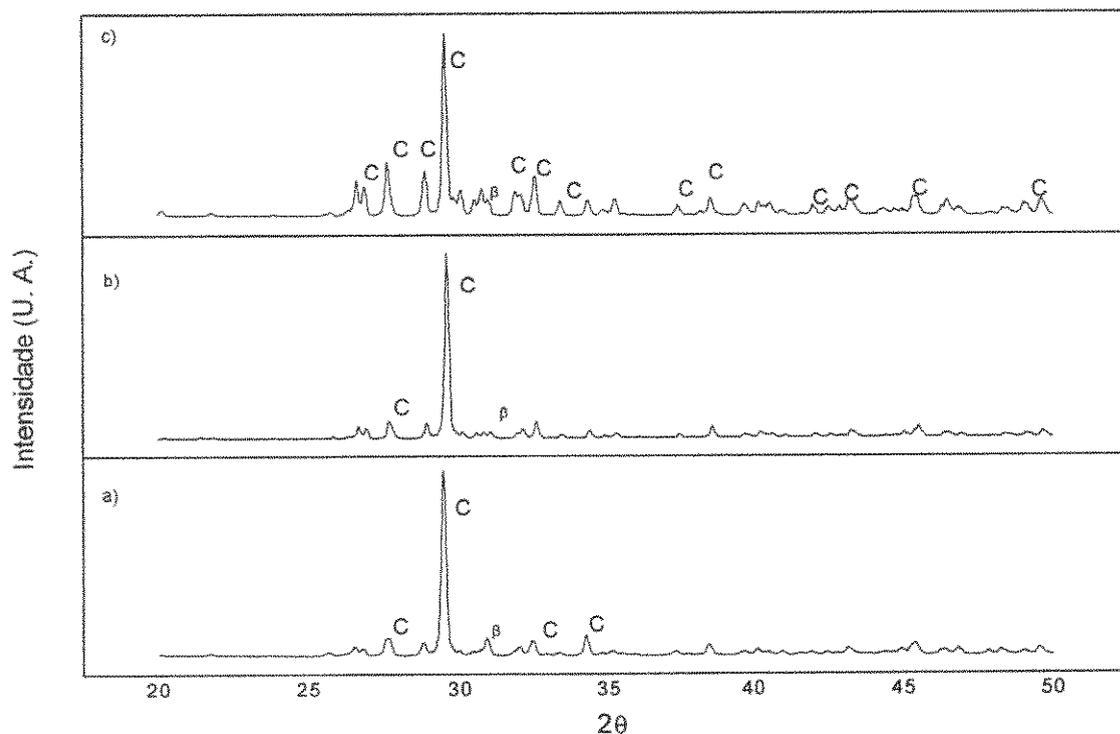


Figura 5.37 Difratograma das pastilhas após sinterização a 1000 ° C. (a) Alginato branco básico. b) alginato ácido 1 c) alginato básico 2.

Também é interessante observar-se a presença de picos de β -TCP nas amostras sinterizadas em 1000 °C. Esse pico é ausente na amostra obtida em meio ácido, mas está presente naquelas obtidas em meio alcalino, sendo de intensidade praticamente idêntica. A explicação para isso é que, quando da etapa de ajuste de pH, ocorre uma formação de apatita cálcio-deficiente, que, pela própria sobreposição comum nos difratogramas de fosfatos de cálcio, não foi detectada na análise das amostras não-sinterizadas. Entretanto, quando aquecidas acima de 700 °C esta apatita se transforma em β -TCP.

A presença de uma maior cristalinidade nas amostras obtidas em meio básico com alginato está aparentemente relacionada à presença de monetita. O mecanismo seria iniciado com a conversão de brushita para monetita através da perda da água composicional e uma mudança da sua organização cristalina. A monetita, por sua vez, passa por um processo mais profundo de reorganização de sua estrutura cristalina que tem início com a junção de dois cristais e a perda de uma molécula de água para formação do CPP. As reações são:



A fase cristalina resultante é tetragonal. Observe que não há modificação da razão Ca/P, mas há uma modificação profunda de sua estrutura cristalina. Enquanto os grupamentos ortofosfato da monetita/brushita apresentam os átomos de fósforo cercados por quatro átomos de oxigênio, o grupamento pirofosfato apresenta um átomo de oxigênio ligado a dois de fósforo, cada um dos quais cercado por mais três de oxigênio. O pirofosfato é, então, resultante da associação de dois grupamentos ortofosfato e da perda de uma molécula de água. Essa modificação torna a reação extremamente lenta, e a mesma é provavelmente intermediada por uma fase amorfa. A presença de brushita certamente torna o processo cineticamente ainda mais desfavorável, pois há necessidade de energia extra para a perda da água composicional e outra mudança na estrutura cristalina (observe que, como todo o processo de organização possui entropia negativa, é inevitável que haja aporte de energia).

Um mecanismo semelhante também foi sugerido no trabalho de Catherine e Skinner [82] e Tanaka *et al.* [83]. A cinética lenta do último passo foi atribuída a grande mudança estrutural dos ânions [82]. Tanaka *et al.* [83], por sua vez, sintetizaram brushita por um método sol-gel e obtiveram uma cristalinidade ainda menor, com a presença de picos apenas em $2\theta < 20^\circ$. A sugestão do mecanismo por parte desses últimos baseou-se largamente em estudos por análise termogravimétrica diferencial e FTIR. Até 350°C haveria a transformação de brushita em monetita e a partir daí ocorreria a reação r(5.4).

Assim, se há maior presença de monetita na amostra não-sinterizada, a formação de pirofosfato torna-se cineticamente facilitada em relação à de amostras que contenham apenas brushita. Isso permite a obtenção de um produto final mais cristalino.

As amostras sinterizadas na presença de quitosana apresetam resultados curiosos, como mostrado nas Figuras 5.38 e 5.39. Mesmo as amostras que apresentam pouca monetita, como a quitosana ácida 2, apresentam picos mais definidos do que as obtidas com alginato. O mecanismo não está bem claro, porém acredita-se que o ácido acético afete a cristalografia das amostras antes da sinterização, influenciando na cristalografia final.

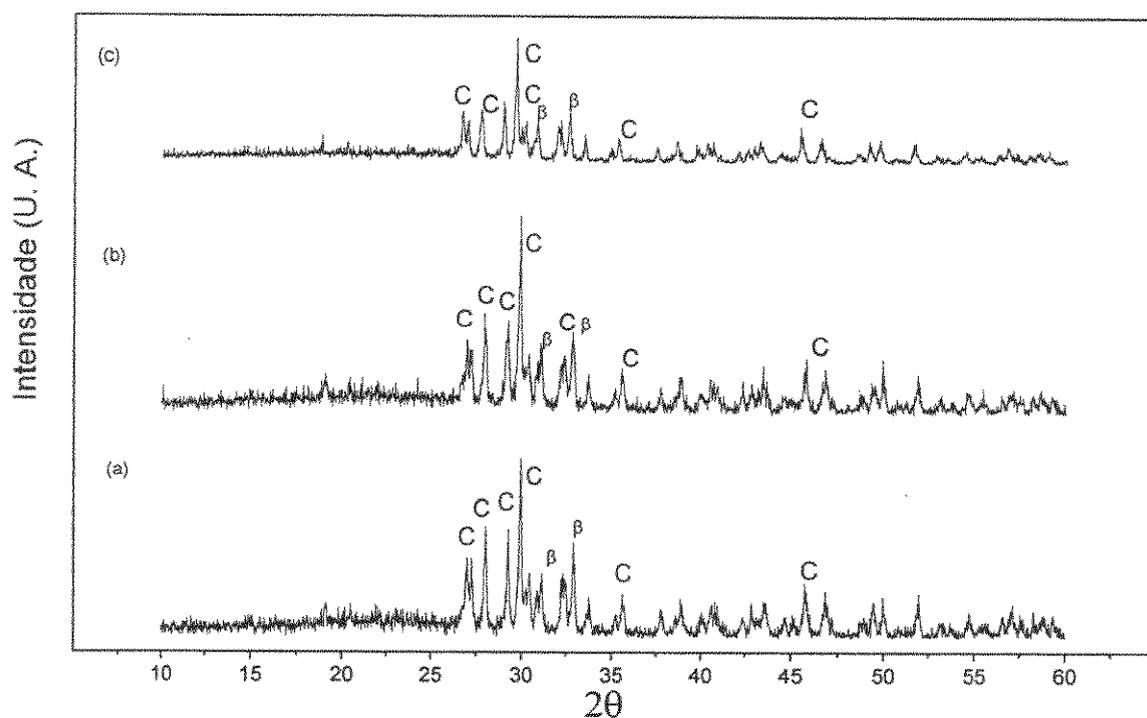


Figura 5.38: Difratoograma das pastilhas após sinterização a 1000 ° C. (a) Quitosana Branco ácido. b) Quitosana ácida 1 c) Quitosana ácida 2.

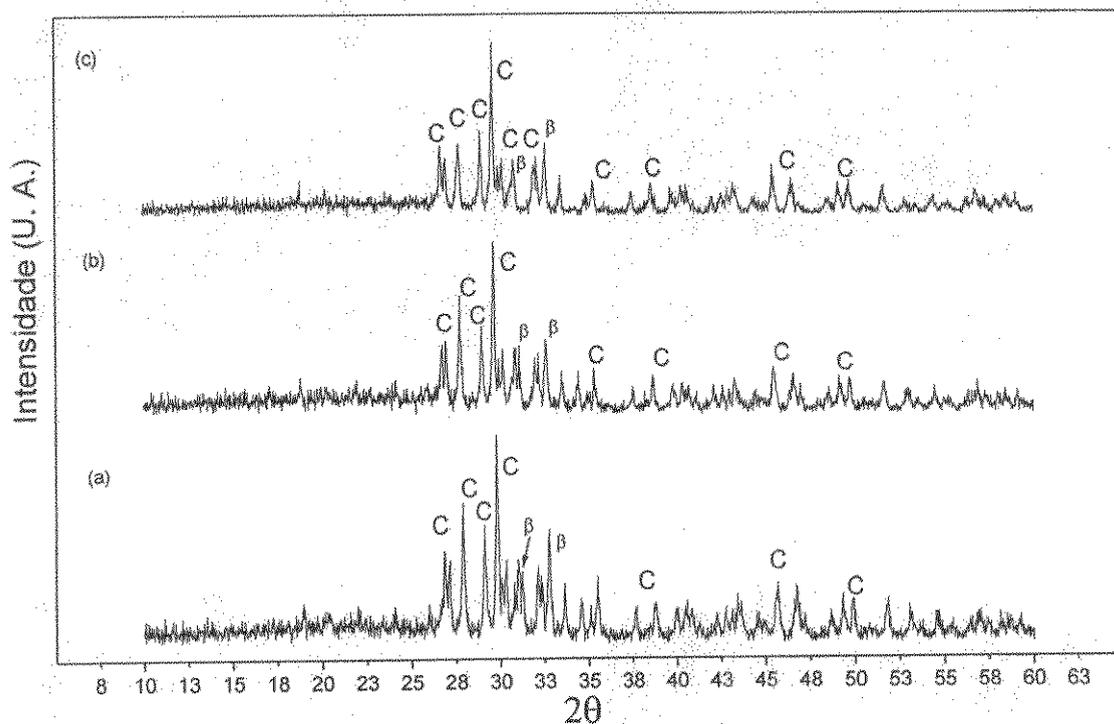


Figura 5.39: Difratoograma das pastilhas após sinterização a 1000 ° C. (a) Quitosana Branco básico. b) Quitosana básica 1 c) Quitosana básica 2.

As micrografias obtidas por MEV das amostras com alginato (Figuras 5.40 e 5.41) mostram poucas diferenças morfológicas, confirmando que as alterações nas amostras sem tratamento térmico se devem apenas a adição dos biopolímeros. Assim, confirma-se também que o fator principal nas diferenças nos difratogramas é a composição de fases da amostra.

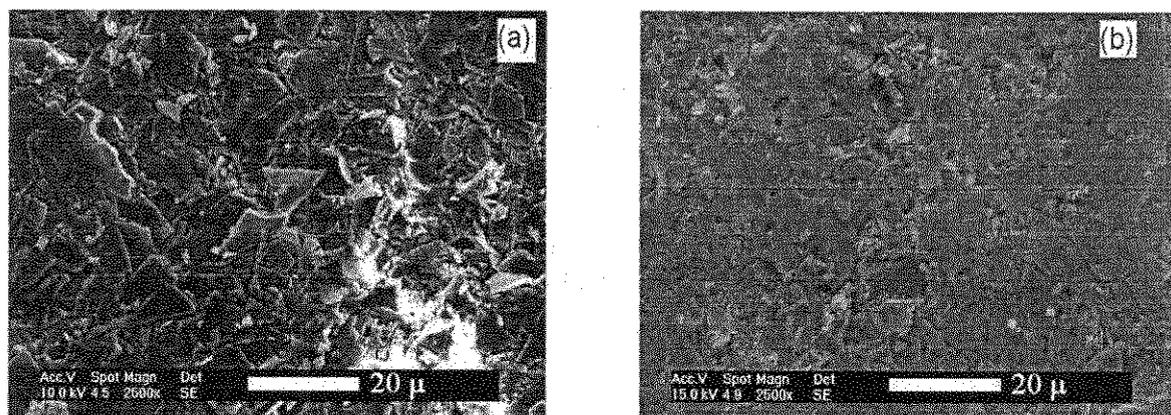


Figura 5.40: MEV das amostras branco básico e alginato básico 2 após tratamento térmico a 550°C.

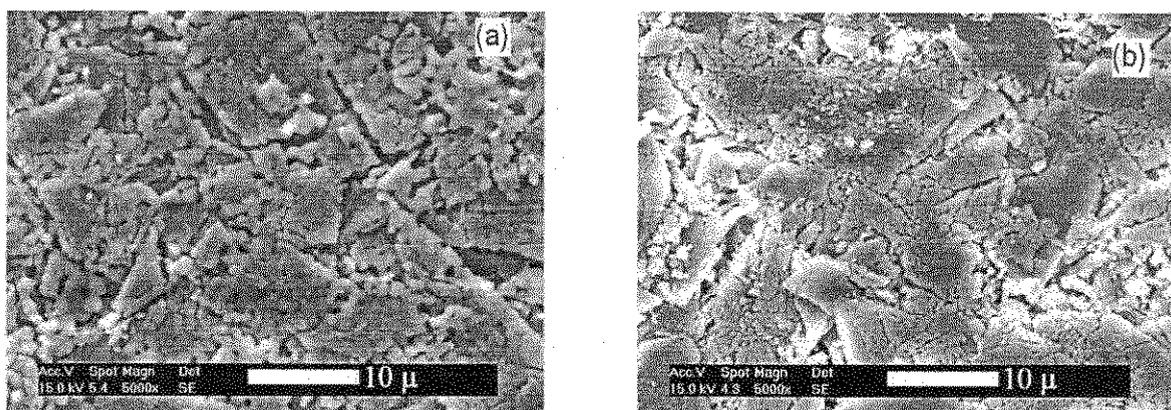


Figura 5.41: MEV das amostras branco básico e alginato básico 2 após tratamento térmico a 1000°C.

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO FINAL

6.1. MECANISMO DE AÇÃO DO ALGINATO

A compreensão do mecanismo de interação alginato/fosfatos de cálcio deve, necessariamente, levar em conta o comportamento de ambas as espécies em solução. O cálcio é um íon de pequeno raio iônico, que em solução aquosa se complexa formando o hidrato $\text{Ca}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$ [84]. Este fato resulta em duas conseqüências de interesse direto para este trabalho. O primeiro deles é que, dado o seu pequeno raio iônico, a interação entre biopolímeros ocorre, no início, preferencialmente com esses íons. Apesar de ser difícil comprovar este fato diretamente, a literatura sugere através de dados cristalográficos que este realmente ocorre [84]. A partir daí, ocorreria a reação de formação dos fosfatos, com a ligação desses e de outras espécies pertinentes ao núcleo, como a hidroxila, ao complexo cálcio / biopolímero [84]. Outra conseqüência é na formação de fases. Apesar da monetita ser a fase termodinamicamente estável no pH entre 4-6, a presença de água de composição torna a formação de brushita cineticamente favorável. Além disso, há uma estabilização extra dessas moléculas pela formação de pontes de hidrogênio com os fosfatos. Observe que mesmo que o mecanismo pode não ocorrer dessa forma que foi sugerida, com as reações sucedendo-se em uma série bem organizada. Entretanto, mesmo que ocorra a formação dos fosfatos de forma concomitante com a ação do alginato, o efeito final do mecanismo seria o mesmo.

Compreendido este primeiro aspecto, cabe analisar uma propriedade importante dos alginatos. A literatura indica que a ligação cálcio/alginato se dá principalmente por um mecanismo de quelação através da ação dos grupos carboxilato, especialmente os presentes no ácido L-gulurônico, devido a efeitos estéricos [85]. A formação desses quelatos ocorre de duas formas distintas, conhecidas como *inner-sphere* e *outer-sphere complex* (uma tradução aproximada seria esfera de complexação interna e externa) [85]. A diferença entre um e outro se deve principalmente à intensidade das forças de interações entre metal e

ligante. Complexos do tipo *inner-sphere* têm maior proximidade entre as espécies, e a água de composição é geralmente excluída do complexo final.

Assim, na interação entre alginato e cálcio em pHs ácidos, o balanço de cargas levaria a formação de um complexo do tipo *outer-sphere*. Assim, a interação das duas espécies não levaria a uma modificação significativa da composição de fases. Seriam detectadas apenas mudanças da morfologia, como pode ser visto neste trabalho. Terminada a reação, o fosfato de cálcio precipitaria, deixando o alginato em solução. Assim, pequenas quantidades de alginato podem afetar a morfologia de grandes volumes de precipitado. Aliás, uma elevação excessiva na concentração de biopolímero poderia acarretar até uma redução nesse efeito, pois, como discutido no capítulo 5, levaria a diminuição da interação de espécies pelo efeito ionotrópico.

Com o aumento do pH, o balanço de cargas é afetado, e a interação passa a ser do tipo *inner-sphere*, com a conseqüente exclusão da água de composição e a formação de monetita. Inclusive, como a interação é mais forte, uma parte do alginato é arrastada da solução junto com o precipitado. Essa teoria encontra indícios no resultado de FTIR do ensaio de precipitação sem filtração, mostrado na figura 5.12, que mostra que boa parte do alginato se encontra no sobrenadante.

Na precipitação com hidroxiapatita, a situação é levemente diferente. A conformação cristalina dessa fase força o alginato a ser diretamente incorporado à sua estrutura. Assim, inicialmente há precipitação sem incorporação apreciável do alginato. Entretanto, à medida que ocorre a dissolução e reprecipitação, fenômeno que ocorre para diminuir a energia livre dos cristais, ocorre nucleação heterogênea no biopolímero, dada a vantagem termodinâmica desse passo. Uma análise da cristalografia da HA [84] sugere que o biopolímero é efetivamente incorporado.

6.2. MECANISMO DE AÇÃO DA QUITOSANA E COMPARAÇÃO COM AÇÃO DO ALGINATO.

O mecanismo de ação da quitosana também depende fortemente de seu comportamento em solução. Como citado anteriormente, seus grupamentos amina interagem através dos elétrons não-ligados do nitrogênio. Ou seja, o tipo de interação é fundamentalmente diferente da encontrada no alginato. Além disso, sabe-se que é um material sujeito ao efeito ionotrópico, sendo que a formação do gel pode dificultar seriamente o processo difusivo [63].

Os resultados de DRX para as amostras contendo principalmente brushita e monetita sugerem que o mecanismo de complexação dos íons cálcio é do tipo *inner-sphere*, independente do pH do meio. Esse fato isolado poderia ser atribuído a um menor impedimento estérico dos grupamentos amina, menos volumosos do que os grupamentos carboxila do alginato. Entretanto, este mecanismo aparentemente é muito simplificado para descrever o fenômeno.

Os diferentes efeitos do alginato e da quitosana sobre os precipitados estão diretamente relacionados aos grupos funcionais dos dois biopolímeros, que por sua vez afetam seu comportamento eletrostático e suas propriedades coligativas em solução. A primeira evidência a esse respeito vem da comparação de suas estruturas, mostrada na figura 1.2. A cadeia principal de ambos é formada pelo mesmo tipo de monômero, que estão ligados da mesma forma, variando apenas os grupos funcionais ligados a essa cadeia. A quitosana apresenta grupamentos amina e o alginato, grupamentos carboxila.

Essa diferença seria a razão pela qual a quitosana não tem sua ação muito afetada pelo pH do meio. Os grupamentos tanto desta quanto do alginato apresentam elétrons não-ligantes, sendo que no caso da quitosana estes estão associados ao nitrogênio e na carboxila aos átomos de oxigênio. Sabe-se que a eletronegatividade do oxigênio é bem maior que a do nitrogênio. Assim, quando os grupamentos carboxila não se encontram dissociados, a ação desses pares não-ligantes é minimizada pela própria eletronegatividade do oxigênio. No caso dos grupamentos amino, este efeito é diferente: sua baixa eletronegatividade permite que esse átomo aja como um eficiente doador de elétrons. Assim, mesmo em meio ácido, quando o grupamento amina se encontra com uma carga positiva líquida (como pode

ser visto na reação $r(2)$), este pode se associar aos íons cálcio, havendo apenas uma pequena redução da sua afinidade aparente.

Entretanto, a quitosana apresenta um efeito bem menor sobre a composição de fases e concentrações maiores, enquanto esse quase não é discernível nos ensaios com alginato. Este fenômeno parece estar relacionado à mobilidade que os biopolímeros têm em solução, que permitiria um melhor contato entre grupamentos dos biopolímeros e íons. Por exemplo, moléculas como os biopolímeros utilizados neste estudo estão sujeitas ao chamado movimento browniano, devido a flutuações instantâneas de densidade das moléculas do solvente, resultando em um gradiente de pressão sobre sua superfície, que provoca a difusão mesmo quando não há gradiente de concentração no meio [86,87]. Esse processo de autodifusão certamente aumentaria a probabilidade de contato entre os radicais do biopolímeros que ainda não houvessem participado do processo de nucleação. Sabe-se que, quanto maior a probabilidade de contato, maior a taxa de nucleação [90]. Assim, uma queda no valor da autodifusão teria como consequência imediata uma menor ação do biopolímero sobre o precipitado. Esse efeito não deve ser desprezado ao considerarmos os mecanismos de precipitação em concentrações maiores de biopolímero, pois a partir de determinada concentração crítica ocorre o entrelaçamento de cadeias, diminuindo a taxa de autodifusão no meio [87]. Esse fator somado ao efeito ionotrópico explica a redução do efeito dos biopolímeros em concentrações maiores, e porque a quitosana sofre uma redução mais brusca. Ou seja, a interação cálcio/quitosana produz um gel que por sua própria natureza sofre uma limitação difusiva que reduz a probabilidade de nucleação. O que se sugere é que o efeito ionotrópico seja mais pronunciado na quitosana, resultando em um gel capilar com um menor coeficiente de difusividade efetiva. Assim, um aumento da concentração de quitosana teria um efeito muito mais significativo na remoção do cálcio do meio que no alginato.

Uma indicação de que esta teoria sobre os efeitos difusivos está correta são estudos anteriores de calcificação sobre membranas de quitosana [59]. Este processo é fortemente inibido em pHs menores. Membranas estão impedidas de se difundir pelo meio, e a probabilidade de contato entre íons e grupamentos está diretamente relacionada à carga líquida da superfície. Pelo conceito de dupla camada [84], quanto maior a carga positiva da

superfície, menor a probabilidade que uma carga de mesmo sinal seja encontrada junto a essa superfície, o que reduziria praticamente a zero a possibilidade de nucleação na superfície em determinados valores de pH, como realmente ocorre [59].

Os efeitos (e a diferença entre estes) da ação dos dois biopolímeros sobre a hidroxiapatita também podem ser compreendidos levando-se em conta as conformações de suas cadeias. Durante a precipitação há formação de hidroxiapatita provavelmente tanto no biopolímero quanto na solução, e ambos precipitam juntos. Durante o processo de envelhecimento ocorre o chamado amadurecimento de Ostwald, no qual as pequenas partículas se dissolvem levando ao surgimento de maiores [89], de forma a reduzir a energia livre do sistema. Ora as partículas formadas nos substratos têm menor energia livre, e existe uma tendência termodinâmica que o crescimento ocorra sobre elas. Entretanto, esse processo é afetado cineticamente pela conformação das cadeias.

Assim, a reprecipitação que ocorre sobre as partículas formadas no alginato tem um menor impedimento estérico, permitindo o crescimento de partículas e até a suposta incorporação de carbonatos. As apatitas cálcio-deficientes formadas têm origem provável nos íons cálcio que são retidos no alginato devido a sua alta compatibilidade com o mesmo. No caso da quitosana, a formação de uma cadeia contraída apresenta um alto impedimento estérico, e os cristais crescem nos intervalos dessa estrutura [78]. Não há difusividade suficiente para permitir que aja a carbonatação, e as partículas crescem organizadamente, ou seja, com cristalinidade elevada, e se orientam em relação ao eixo do biopolímero.

Tendo em vista a discussão acima, é conveniente perguntar como, exatamente, se dá a interação entre quitosana e íons cálcio. Rusu *et al.* [78] sugeriram que ocorre nucleação e crescimento em sítios específicos no interior do biopolímero. Esse fato é corroborado por seus resultados e também nesse trabalho, através de observações por MEV, que mostram várias partículas agrupadas em *clusters*, aparentando um crescimento preferencial em direções definidas. As figuras 5.34, 5.35 e 5.36. A orientação maciça vista nas amostras com quitosana reforça a sugestão anterior.

Outro fato curioso que merece ser abordado é relacionado aos resultados de FTIR. Estes apresentam poucos picos característicos da quitosana e muitos picos característicos de carboxila. Ainda assim, há fortes indícios do papel da quitosana no processo. O que se

sugere que a ação dos grupamentos amina não ocorra necessariamente de forma isolada, mas que antes, há um complexo balanço de cargas envolvendo estes, os grupamentos carboxila e os íons cálcio. Uma sugestão, não corroborada diretamente por fatos experimentais, é que se forme um complexo carboxila-cálcio que é, por sua vez, complexado pela quitosana.

Um resumo dos efeitos do alginato e da quitosana na precipitação da quitosana, em conjunto com suas prováveis causas, é listado na tabela 6.1.

Tabela 6.1: Resumo dos efeitos dos biopolímeros na precipitação dos fosfatos de cálcio

	Efeitos		Causas
	Alginato	Quitosana	
pH	Alto	Baixo	Eletronegatividade do grupamento
Concentração	Baixo	Alto	Auto-difusão Efeito Ionotrópico
Morfologia (HA)	Normal	Vítrea	Interação precipitado / cadeia do biopolímero
Cristalinidade (HA)	Diminuição	Aumento	

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.

7.1 CONCLUSÕES

Os biopolímeros têm uma forte ação sobre a precipitação dos fosfatos de cálcio. O alginato aparenta exercer um efeito basicamente eletrostático, com forte influência do pH e aparente mudança do tipo de coordenação. A quitosana tem um efeito que depende dos elétrons livres do nitrogênio e, portanto, não é tão dependente do pH. O efeito de ambos os biopolímeros na composição de fases tende a diminuir com o aumento da concentração, sugerindo que a formação de um gel ionotrópico pode diminuir o efeito do biopolímero através de uma redução na difusividade efetiva. O efeito nos precipitados obtidos no pH de estabilidade da hidroxiapatita depende da etapa de amadurecimento, sugerindo um equilíbrio entre os biopolímeros em solução e os contidos no precipitados. Foi observada birrefringência nos precipitados obtidos na presença de quitosana, sugerindo uma orientação não-aleatória dos cristais.

✓ A purificação da quitosana resulta em um aumento do índice de desacetilação medido por titulação potenciométrica. Esse resultado está ligado à retirada de impurezas co-precipitadas com o reagente e que interferem nesse índice por adicionar substâncias não-protonáveis nas mesmas condições (como a celulose) e, portanto, não sujeitas à titulação potenciométrica.

✓ A adição de alginato afeta a composição de fases de fosfatos de cálcio através de um efeito conjunto de cargas e a provável formação de gel ionotrópico. O primeiro, devido às carboxilas, é responsável pela formação de uma ligação hidrofóbica com o íon cálcio. Essa hidrofobicidade é consequência do impedimento estérico dos grupamentos, bloqueando sítios de crescimento, e da alteração da carga elétrica líquida do complexo, tornando-a menos positiva e

conseqüentemente menos atrativa para as moléculas de água. O efeito dos grupamentos carboxila depende fortemente do seu grau de dissociação, sendo por isso maior em pHs alcalinos.

✓ O efeito ionotrópico contribui para a ação antimineralizante do alginato de uma forma que apresenta efeitos contrapostos na composição de fases. Ao mesmo tempo em que o gel formado impede que as moléculas de água sejam estabilizadas no interior da estrutura por pontes de hidrogênio com os grupamentos fosfato, visto que estes já estão ligados à matriz polimérica, a difusividade também diminui, o que pode vir a retirar o íon cálcio totalmente do meio reacional. Assim, em altas concentrações de alginato há a diminuição do efeito na composição de fases pelo impedimento dos íons cálcio retidos no gel em reagir com os grupamentos fosfato.

✓ A adição de alginato afeta morfologicamente as partículas obtidas, que se tornam maiores, sugerindo que a etapa de crescimento é a dominante. Isso seria conseqüência da redução da energia livre crítica de nucleação provocada pela presença do substrato.

✓ O efeito das cargas dissociadas de uma matriz polimérica é apreciável nas amostras em branco dos ensaios com quitosana. O efeito do ácido acético, e portanto, dos grupamentos carboxila, é fortemente hidrofóbico e dependente do pH, confirmando o mecanismo apresentado anteriormente.

✓ A ação da quitosana é apenas fracamente dependente do pH. Este efeito é atribuído a menor eletronegatividade do nitrogênio, o que facilita seu papel como doador de elétrons, além da maior facilidade de contato entre cálcio, fósforo e biopolímero no meio reacional, devido aos processos difusivos e de movimento browniano inerente ao comportamento dessas soluções.

✓ Entretanto, os efeitos difusivos podem ser prejudicados pela própria associação entre o biopolímero e o cálcio, que formam o gel ionotrópico. Assim, em concentrações maiores, o efeito na composição de fases diminui significativamente, sugerindo uma retirada massiva de íons cálcio do meio reacional.

- ✓ As micrografias das amostras produzidas com quitosana deixam claro uma certa orientação dos cristais formados no sentido do que se acredita ser as cadeias de quitosana. Esse fenômeno também ocorre com as amostras produzidas com quitosana no pH de estabilidade da hidroxiapatita.
- ✓ A ação do alginato na precipitação de hidroxiapatita é fortemente dependente do tempo. Isso ocorre porque a formação de HA é cineticamente favorecida ante a interação cálcio-alginato. Assim, amostras que não são submetidas ao amadurecimento *overnight* apresentam apenas pequenas variações na cristalinidade. Ao contrário, precipitados submetidos a essa etapa apresentam alargamento sobreposição de reflexões nos seus difratogramas, sugerindo que uma apatita deficiente em cálcio foi obtida. Essa teoria é reforçada pelas micrografias, que mostram partículas aproximadamente esféricas, semelhante às apatitas obtidas por precipitação sobre substrato bioativos imersos em fluido corpóreo simulado [83].
- ✓ Antes do amadurecimento, o efeito da quitosana na composição de fases parece semelhante ao do alginato. Entretanto, depois desse período a amostra apresenta um aumento da cristalinidade, que, associado a orientação dos cristais formados, confere um aspecto vítreo ao matéria.
- ✓ O tratamento térmico dos pós obtidos na presença de alginato resulta em pirofosfato de cálcio (CPP). A cristalinidade deste, entretanto, depende das fases presentes na amostra inicial. Um maior conteúdo de monetita resulta em um material mais cristalino, provavelmente devido a um favorecimento cinético na conversão, já que não há necessidade de perder água de composição e é necessária uma menor alteração da sua estrutura cristalina.
- ✓ Por sua vez, os pós precipitados com quitosana apresentam difratogramas bem definidos e semelhantes, independente da sua composição inicial. Acredita-se que a estrutura cristalina inicial seja afetada pela adição de ácido acético de tal forma que a reação seja cineticamente facilitada.

7.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudo da calcificação sobre membranas de quitosana e alginato através de um método dinâmico. Basicamente, o equipamento consistiria de uma bomba, com diferencial de pressão semelhante ao débito cardíaco de uma pessoa normal, e tubulações feitas de um polímero inerte. No ponto de estudo estaria uma membrana manufaturada com o biopolímero escolhido. Pelo sistema fluiria líquido corpóreo simulado (SBF), que poderia, após passar por todo o sistema , ter sua concentração ajustada em um tanque separado, através até mesmo de técnicas como osmose reversa. Assim, simula-se um sistema circulatório, em que a bomba é o coração e os rins são o sistema de ajuste da concentração de SBF. Este método, apesar de complexo, permitiria uma avaliação do comportamento dessas membranas quando em aplicações cardiovasculares.
- ✓ Estudo de técnicas de purificação de quitosana e sua correlação com diferentes tipos de análise para determinação do índice de desacetilação. Entre as técnicas de purificação sugere-se acoplar a clássica filtração a métodos como extração por solvente e eletroforese.
- ✓ Estudo da precipitação *in-vitro* de fosfatos de cálcio usando diferentes biopolímeros e derivados de alginato e quitosana.
- ✓ Utilização de alginato e quitosana para realizar substituição controlada do cálcio por outros íons (como Ferro e Magnésio) em apatitas.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1].L.L. HENCH, E. C. ETHRIDGE *In Biomaterial: An interfacial approach*. Nova York, Academic Press, 1982.
- [2]. B.D. RATNER, A.S.HOFFMAN,F.J.SCHOEN, J.E.LEMONS. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego, Academic Press, 1996.
- [3] A.C. GUYTON, J. E. HALL, *Tratado de Fisiologia Médica*, Guanabara-Koogan, 10^o edição, Rio de Janeiro, 2002.
- [4].R.Z. LEGEROS. *Calcium phosphates in oral biology and medicine*. Karger, Basel (Suíça), 1991.
- [5]. E. Y. KAWACHI. *Síntese de nanopartículas de fosfatos de cálcio em ambientes confinados no sistema Renex-100 / ciclohexano / "brine"*. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, Brasil, 2002.
- [6]. M.H. PRADO DA SILVA. *Recobrimento de titânio com hidroxiapatita: desenvolvimento do processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica in vitro*. Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.
- [7]. R Z. LEGEROS, J. P. LEGEROS *In: An Introduction to Bioceramics*. L.L HENCH, J. WILSON (Eds). World Scientific, Singapura, 1993.
- [8]. H.P. RANG, M.M. DALE, J.M. RITTER. *Farmacologia*. Guanabara- Koogan, 4^a edição, Rio de Janeiro, 2001.
- [9]. R Z. LEGEROS, S.LIN, R.ROHANIZADEH,D.J.MIJARES, J. P. LEGEROS. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*14 (2003) 201-209.
- [10]. S. MANN. *Nature* 365 (1993) 499-505
- [11]. P.CALVERT, P.RIEKE. *Chemistry of Materials* 8 (1996) 1715-1727

- [12]. B. R. CONSTANTZ. *Palios* 1 (1986) 152
- [13]. C. E. BOWEN, H. TANG, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 115A (1996) 269-275
- [14]. D. GREEN, D. WALSH, S. MANN, R.O.C. OREFFO. *Bone* 30 (2002) 810-815.
- [15]. S.A. DAVIS, E. DUJARDIN, S. MANN. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7 (2003) 273-281.
- [16]. D. WALSH, B. LEBEAU, S. MANN. *Advanced Materials* 11 (1999)
- [17]. K. YOO, C. GIBBONS, Q. T. SU, R. N. MILES, N. C. TIEN. *Sensors and Actuators A: Physical* 97-98 (2002) 448-456.
- [18]. G.B. KHOMUTOV, E.S. SOLDATOV, S.P. GUBIN, S.A. YAKOVENKO, A.S. TRIFONOV, A.YU. OBYDENOV, V.V. KHANIN. *Thin Solid Films* 327-329 (1998) 550-553.
- [19]. M.E. BYRNE, D.B. HENTHORN, Y. HUANG, N. PEPPAS *IN: Biomimetic Materials and Design: Biointerfacial Strategies, Tissue Engineering and Targeted Drug Delivery*. A.K. DILLOW, A.M. LOWMAN (Eds.). Marcel Dekker, Nova York, 2002.
- [20]. N. A. PEPPAS, J.H. WARD. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1587-1597.
- [21]. H.M. KIM. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7 (2003) 288-289.
- [22]. W. R. GOMBOTZ, S. F. WEE *Advanced Drug Delivery Reviews* 31 (1998) 267-285.
- [23]. A. L. LEHNINGER, D.L. NELSON, M.M. COX. *Princípios de Bioquímica*. Sarvier, 2ª edição, São Paulo, 1995.
- [24]. M.M. BEPPU, C.C. SANTANA. *Materials Research*, 5 (2002) 47-50.
- [25]. C.G. AIMOLI, M.A. TORRES, M.M. BEPPU. *Materials Science and Engineering C* 26 (2006) 78 - 86

- [26]. M.M. BEPPU, C.C. SANTANA. *Materials Science and Engineering C* 23 (2003) 651–658
- [27]. A. JADA, A. VERRAES. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 219 (2003) 7 - 15.
- [28]. H. LIN, Y. YEH. *Journal of Biomedical Materials Research B* 71B (2004) 52-65.
- [29]. M. C. CHANG, C. KO, W.H. DOUGLAS. *Biomaterials* 24 (2003) 2853-2862.
- [30]. D.F. WILLIAMS. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press, Liverpool, 1999.
- [31]. A.S. HORNBY *Oxford Advanced Learner's Dictionary of Current English*. Sally Wehmeier, Michael Ashby (eds.). 6ª edição, Oxford University Press, Oxford, 2000.
- [32]. P. DUCHEYNE, Q. QIU. *Biomaterials* 20 (1999); 2287– 2303.
- [33]. M. VALLET-REGÍ, J. M. GONZALES-CALBET *Progress in Solid State Chemistry* 32 2004 1-31.
- [34]. S. NICOLOPOULOS, J.M. GONZALEZ-CALBET, M.P. ALONSO, M.T. GUTIERREZ-RYOS, M.I. DE FRUTOS, M. J VALLET-REGÍ, *Journal of Solid State Chemistry* 116 (1995); 265.
- [35]. S. NICOLOPOULOS, M. J. VALLET-REGÍ, J.M. GONZÁLVES-CALBET. *Solid State Ionics* 175 (1997); 101–103.
- [36]. H. AOKI. *Medical applications of hydroxyapatite*. Ishikayu Euro America Inc., Tóquio, Saint. Louis, 1994.
- [37]. P.N. KUMTA, C. SFEIR, D.LEE, D. OLTON e D. CHOI. *Acta Biomaterialia* 1 (2005) 65-83.
- [38]. E. MAVROPOULOS, A. M. ROSSI, N. C. C. DA ROCHA, G. A. SOARES, J.C. MOREIRA, G.T. MOURE. *Materials Characterization* 50 (2003) 203-207.
- [39]. G. DACULSI, O. LABOUX, O. MALARD e P. WEISS. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14 (2003) 195-200.

- [40]. M. VALLET-REGÍ, M.T. GUTIÉRREZ-RÍOS, M. P. ALONSO, M.I. DE FRUTOS, S. J. NICOLOPOULOS. *Journal of Solid State Chemistry* 112 (1994) 58-64.
- [41]. C. CÂNDIDO DA SILVA. *Estudo das Propriedades Ópticas, Elétricas e Térmicas da Hidroxiapatita obtida por Moagem de Alta Energia, seus Compósitos e Filmes Espessos*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 2003.
- [42]. K.C.B. YEONG; J. WANG; S.C. NG. *Biomaterials* 22 (2001) 2705 – 2712.
- [43]. S. RHEE. *Biomaterials* 23 (2002) 1147-1152.
- [44]. M.P. PECHINI . Patente Americana No. 3330697, 1967.
- [45]. J. PEÑA, M. VALLET-REGÍ. *Journal of the European Ceramic Society* 23 (2003) 1687–1696.
- [46]. P. PARHI, A. RAMANAN, A. R. RAY. *Material Letters* (2004).
- [47]. I.MANJABULA, M. SIVAKUMAR. *Material Chemistry and Physics*. 71 (2001) 272-278.
- [48]. D.A. REES, *Pure and Applied Chemistry* 53 (1981) 1–14.
- [49]. S. COHEN, E. LOBEL, A. TREVGODA, Y. PELED, *Journal of Controlled Release* 44 (1997) 201-208.
- [50]. M. OTTERLEI, K. OSTGAARD, G. SKJAK-BRAEK, O. SMIDSRØD, P. SOON-SHIONG, T. ESPEVIK,. *Journal of Immunotherapy* 10 (1991) 286–291
- [51]. G.W. VANDEBERG, C. DROLET, S. L. SCOTT, J. DE LA NOÛE. *Journal of Controlled Release* 77 (2001) 297-307
- [52].S. BOGGAVARAPU, J. CHANG e P. CALVERT. *Materials Science and Engineering C* 11 (2000) 47-49.
- [53]. F. MANOLI, E. DALAS. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13 (2000). 155-158.
- [54]. O.A.C. MONTEIRO, JR. *Preparação, Modificação Química e Calorimetria do Biopolímero Quitosana*. Tese de Doutorado, UNICAMP, 1999.
- [55]. M.N.V.R. KUMAR. *Reactive and Functional Polymers* 46 (2000) 1-27.

- [56]. C. ROUGET. *Comptes Rendus de Academie des Sciences Series III* 48. (1859), 792–795.
- [57]. V. DODANE e V. D. VILIVALAM. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (1998) 246-253.
- [58]. M. G. PETER.. *Journal of Macromolecular Science A: Pure and Applied Chemistry* 33 (1996),1459-1477.
- [59]. M.M. BEPPU. *Estudo da Calcificação in-vitro de Quitosana*. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, Brasil, 1999.
- [60]. I. YAMAGUCHI, K. TOKUCHI, H. FUKUZAKI, Y. KOYAMA, K. TAKAKUDA, H. MONMA, J. TANAKA *Journal of Biomedical Materials Research* 55 (2001) 20-27.
- [61]. I. YAMAGUCHI,, S. ITOH, M. SUZUKI, A. OSAKA, J. TANAKA. *Biomaterials* 24 (2003) 3285-3292.
- [62]. C. REMUÑÁN-LÓPEZ. *IV: Advances in Chitin Science* (Domard, A., Roberts, G.A.F and Vårum, K.M., eds),. 600–607, Elsevier Applied Science, 1997.
- [63]. A.C.A. WAN, E. KHOR, J.M. WONG, G.W. HASTINGS. *Biomaterials* 17 (1996); 1529–1534.
- [64]. E. KHOR, L. Y. LIM *Biomaterials* 24 (2003) 2339-2349.
- [65]. J.S.V. ALBUQUERQUE. *Produção de cerâmicas bioativas porosas de apatitas nanométricas para aplicações biomédicas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- [66]. R. SIGNINI, S.P. CAMPANA FILHO. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 11 (2001), 58-64.
- [67]. Y. PANG, X. BAO. *Journal of the European Ceramic Society* 23 (2003) 1697–1704.
- [68]. J.I. GOLDSTEIN, D.E. NEWBURY, P. ECHLIN, D.C. JOY, A. D. ROMIG, Jr., C.E. LYMAN, C. FIORI e E. LIFSHIN. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Nova York, Plenum Press, 2ª Edição 1992.

- [69]. T.W. G. SOLOMONS. **Química Orgânica**. V.1, 6ª edição, LTC, Rio de Janeiro, 1996.
- [70]. L. RAYMOND, F.G. MORIN, R.H. MARCHESSAULT. **Carbohydrate Research** 246 (1993) 331-336.
- [71]. R. S. VIEIRA, **Remoção e Recuperação de Íons Hg(II) Utilizando Quitosana Natural e Reticulada**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 2004.
- [72]. S. TENG, J. SHI, B. PENG, L. CHEN. **Composites Science and Technology**. *In press*.
- [73]. A. BERTOLUZZA, G. BOTTURA, P. TADDEI, A. TINTI, M.A. MORELLI. **Journal of Raman Spectroscopy**, 27 (1996), 759-764.
- [74]. B. SMITHA, S. SRIDHAR, A.A. KHAN. **European Polymer Journal**, 41 (2005) 1859-1866.
- [75]. J. THUMBS, H.H. KOHLER. **Chemical Physics** 208 (1996) 9-24.
- [76]. H. TREML, H.H. KOHLER. **Chemical Physics** 252 (2000) 199-208.
- [77]. TORTET, L., GAVARRI, J.R., NIHOUL, G, DIANOUX, A. J. Study of protonic mobility in $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Brushite) and CaHPO_4 (Monetite) by infrared spectroscopy and neutron scattering. *Journal of Solid State Chemistry*, v.132, n. 1, p. 6-16, 1997.
- [78]. V.M. RUSU, C. NG, M. WILKE, B. TIERSCH, P. FRATZL, M.G. PETER. **Biomaterials** 26 (2005) 5414-5426.
- [79]. E. LANDI, A. TAMPIERI, G. CELOTTI, S. SPRIO. **Journal of the European Ceramic Society** 20 (2000) 2377 - 2387.
- [80]. R. JENKINS, R.L. SNYDER, **Introduction to X-ray Powder Diffractometry**. John Wiley & Sons, Nova York, 1996.
- [81]. D. WALSH, J.L. KINGSTON, B.R. HEYWOOD, S. MANN. **Journal of Crystal Growth** 133, (1993) 1-12.
- [82]. H. CATHERINE, W SKINNER. **Materials Research Bulletin** 5 (1970) 437-447

-
- [83]. H. TANAKA, T. WATANABE, M. CHICAZAWA, K. KANDORI, T. ISHIKAWA. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 139 (1998) 341-349.
- [84]. S. SARIG. *Bone* 35 (2004) 108-113.
- [85]. T. A. DAVIS, B. VOLESKY, A. MUCCI. *Water Research* 37 (2003) 4311-4330.
- [86]. P.C. HIEMENZ, R. RAJAGOPALAN. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, 3ª edição ,Nova York., 1997.
- [87]. F. GALEMBECK. *O Estado Coloidal*. Centro de Informática para Ensino de Graduação, UNICAMP, 2004.
- [88]. X. LU, Y. LENG. *Biomaterials* 26 (2005) 1097 – 1108.
- [89]. C. RIBEIRO, E.J.H. LEE, E. LONGO ,E.R. LEITE. *ChemPhysChem* 6 (2005) 690-696.
- [90]. X. LU, Y. LENG. *Biomaterials* 26 (2005) 1097 – 1108.